

INTERFERÊNCIAS ESPECTRAIS E NÃO ESPECTRAIS NA DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS ESSENCIAIS EM AMOSTRAS SINTÉTICAS E REAIS DE SORO SANGÜÍNEO

Lucilena Rebêlo Monteiro e Jorge Eduardo de Souza Sarkis.

*Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN-CNEN/SP
Caixa Postal 11049
05508-900, São Paulo, Brasil*

RESUMO

Os interferentes espectrais e não espectrais tem sido os principais problemas enfrentados pela espectrometria de massa com fonte de plasma indutivo. Este trabalho discute a formação e a correção destes interferentes em amostras reais e sintéticas de soro sangüíneo. Soluções contendo diferentes concentrações de NaCl e carbono (albumina) foram empregadas de modo a simular as concentrações destes componentes no soro sangüíneo. Efeitos significativos causados pela matriz puderam ser observados em meios de concentração igual ou superior a 1g/L de NaCl e 0,63g/L de albumina. Estes resultados foram concordantes com os obtidos empregando-se amostras reais de soro sangüíneo. Uma diluição de 100 vezes sobre a mostra real previne o aparecimento de interferências não espectrais. A avaliação de interferências espectrais foi efetuada através da determinação de Fe, Cu, Cr e Zn, em amostras reais preparadas sob diferentes condições de diluição. O emprego do modo de média resolução ($R=3000$) permitiu a separação dos elementos de interesse dos principais interferentes espectrais.

Palavras-chave: interferentes, efeito matriz, soro sangüíneo, espectrometria de massa, elementos essenciais.

I. INTRODUÇÃO

A espectrometria de massa com fonte de plasma é uma ferramenta analítica bastante poderosa, permitindo a quantificação isotópica, alcançando baixos limites de detecção, de elevada sensibilidade e muito versátil em termos analíticos. Entretanto, esta técnica fica sujeita, como outras, aos problemas decorrentes de interferentes espectrais e não espectrais.

Em geral, as interferências não espectrais são associadas a efeitos físicos impostos pela matriz à solução de medida[1]. Isto causa diferenças significativas nas relações de calibração[2], prejudicando resultados quantitativos. Este efeito entretanto pode ser facilmente identificado, pois quando se compara a curva de calibração (padrões) com uma curva de adição (padrões + amostra) dois comportamentos gerais são esperados: diferenças significativas nas inclinações das retas de calibração e adição, para a qual há efeitos de matriz alterando o resultado da medida, ou a igualdade nas inclinações das retas, para a qual não há efeitos de matriz alterando o resultado da medida. É comum, também, o surgimento de interferentes espectrais[3], causados pela sobreposição de sinal do elemento de interesse com espécies poliatômicas ou com íons com dupla carga.

Na TABELA 1, são listados alguns dos elementos de interesse, em estudos nutricionais, e os interferentes esperados para a matriz sangüínea. A formação destas espécies, somada a incapacidade do analisador de massa de separar íons que apresentem entre si pequenas diferenças de massas, também leva a resultados analíticos não confiáveis. Entretanto, abundância relativa entre os isótopos de um dado elemento, mantém uma proporcionalidade chamada de composição isotópica natural. Excetuando procedimentos específicos para a modificação desta razão, tais como o enriquecimento isotópico, o valor da composição natural se mantém constante. Sendo assim, a composição isotópica natural pode ser empregada como indicador da ocorrência de interferência espectral, e como indicador da precisão da medida. Quando é observado um desvio em relação a razão natural acentuado, esta modificação é atribuída a formação de espécies interferentes, sobre a massa de um dos isótopos avaliados.

Estes dois tipos de interferência, combinados ou não, limitam algumas aplicações, tais como, as análises de frações de sangue sem diluição por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivo [1,3].

Recentemente, [3,4] a comercialização de espectrômetros de massa de alta resolução possibilita a eliminação de interferentes não espectrais e a separação de interferentes espectrais. Este trabalho, portanto, pretendeu uma avaliação das condições em que interferentes espectrais e não espectrais ocorrem, na análise de amostras de sangue total e na fração de soro, e como estes efeitos podem ser eliminados.

II. PARTE EXPERIMENTAL

Instrumental: Todas as medidas foram realizadas empregando-se o espectrômetro de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo (Element, Finningan MAT, Germany). Dois modos de resolução foram empregados: o de baixa resolução ($R=300$), que permitiu a separação de picos com diferenças de massa de 1u.m.a.; e o modo de média resolução ($R=3000$) que permitiu a separação de picos com diferença de massa de 0,1u.m.a.

Preparo das Soluções Simuladas: As amostras reais de soro sanguíneo tem um elevado conteúdo de sais dissolvidos e de proteínas. O cloreto de sódio está presente no soro a uma concentração de 0,9g/L e a quantidade total de albumina é estimada em 63g/L. Desta maneira foram empregadas soluções de NaCl a 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1 e 10g/L e de albumina a 0,0063; 0,063 e 0,63 g/L de modo a simular a concentração daqueles compostos.

Preparo das Amostras: Um “pool” de soro fornecido pelo Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo constituíram as amostras reais empregadas neste estudo. O único tratamento aplicado às amostras foi a diluição com HNO_3 a 1%v/v. Os fatores de diluição estudados foram iguais a 10, 100, 250 e 500.

Curvas de Adição e Calibração: De modo a identificar qual o comportamento do sistema, foram preparadas quatro curvas de adição de padrões de acordo com a TABELA 2. As curvas de calibração foram preparadas de modo similar, sem a adição da amostra.

TABELA 1: Nuclídeos de interesse e interferentes associados a matriz sanguínea.

Nuclídeo	Interferência
^{50}Cr	$^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}, ^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}, ^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{1}\text{H}$
^{53}Cr	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$
^{54}Cr	$^{54}\text{Fe}, ^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}, ^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^{1}\text{H}$
^{56}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}, ^{40}\text{Ca}^{16}\text{O}$
^{57}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^{1}\text{H}$
^{59}Co	$^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^{1}\text{H}, ^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}$
^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na},$
^{64}Zn	$^{32}\text{S}_2, ^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$
^{65}Cu	$^{33}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}$
^{66}Zn	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}_2, ^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$
^{68}Zn	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}_2, ^{34}\text{S}^{16}\text{O}^{18}\text{O}$
^{70}Zn	$^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^{16}\text{O}, \text{Cl}_2$

TABELA 2: Demonstrativo da preparação das curvas de adição

Adição	A_1	A_1+S_1	A_1+S_2	A_1+S_3	A_1+S_4
Amostra(mL)	1	1	1	1	1
Padrão 100ppb(mL)	0	0,2	0,5	1,0	20
HNO_3 1%(mL)	9	8,8	8,5	8	7
Volume Final(mL)	10	10	10	10	10
Concentração final(ug/L)	0	2	5	10	20

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Interferentes não espectrais - Simulação da matriz: Os sinais relativos obtidos para alguns elementos, em meio contendo NaCl e albumina são mostrados nas figuras 1 e 2. É observada uma supressão de sinal significativa a 10g/L de NaCl (28,29%) e a 0,63g/L de albumina(78,16%). Este comportamento é atribuído a efeitos não espectrais, tais como: mudanças nas propriedades físicas da solução[5]. São relatados, em soluções muito concentradas, a diminuição na taxa de aspiração, o aumento da viscosidade, mudanças no tamanho de gota da névoa levada ao plasma e mudança nas condições de ionização[6]. Os problemas causados por estes efeitos tem sido corrigidos e/ou minimizados com o emprego de padrões internos tal como o mostrado nas figuras 3a e 3b[7,8].

A correção com padrão interno permite que o sinal normalizado mostre uma pequena (ou nenhuma) diminuição, quando em meio de NaCl a 10g/L (3,27%) e de albumina a 0,63g/L (7,55%), com exceção feita ao sinal do magnésio. A correção empregando índio como padrão interno permite a concordância entre o sinal de diferentes elementos tanto em soluções diluídas quanto em concentradas. A normalização do sinal de magnésio pelo sinal de índio não se mostrou adequada, pela diferença significativa entre o potencial de ionização e de massa entre os dois elementos[9].

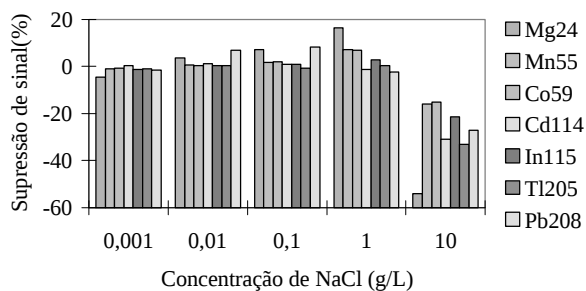


Figura 1: Variação do sinal com o aumento da concentração de NaCl

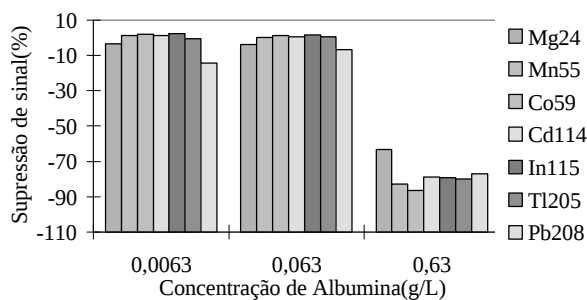


Figura 2: Variação do sinal com o aumento da concentração de albumina.

Amostras Reais: Na figura 4, é possível observar a concentração aparente de zinco obtida para cada faixa de diluição estudada. Mais particularmente, observa-se também, a severa alteração deste valor quando se emprega $F_{\text{diluição}} = 10$. Para $F_{\text{diluição}} = 500$, observou-se um desvio padrão superior às outras diluições. Portanto, o intervalo de diluição adotado foi de 100 até 250 vezes. Os demais elementos estudados (Fe, Cu, Cr, Co, Pb, etc.) apresentaram um comportamento semelhante ao mostrado para o zinco.

Estes fatores de diluição são também concordantes com os obtidos no ensaio com soluções simuladas. O comportamento é semelhante também ao observado por Dams[1], que obteve outros valores para a diluição, por se referir a um instrumento de menor sensibilidade.

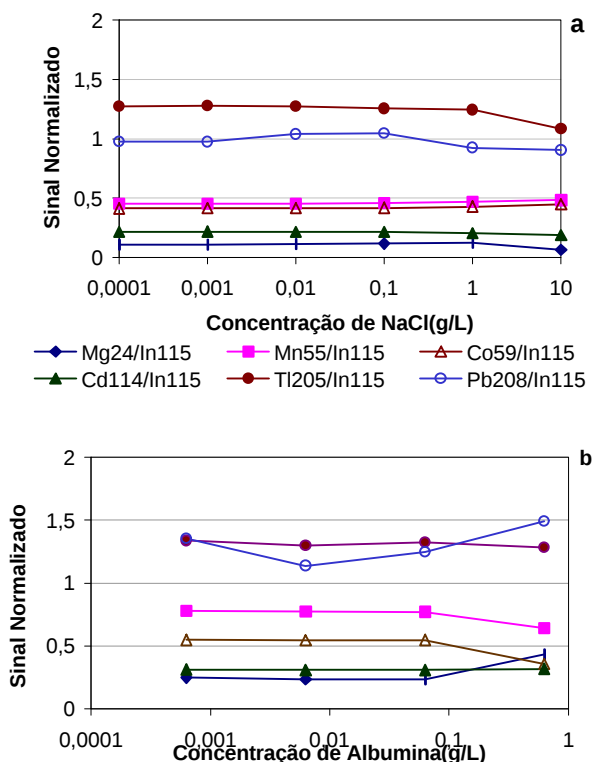


Figura 3: Normalização do sinal de alguns elementos pelo sinal do ^{115}In em presença (a) de NaCl e (b) de albumina.

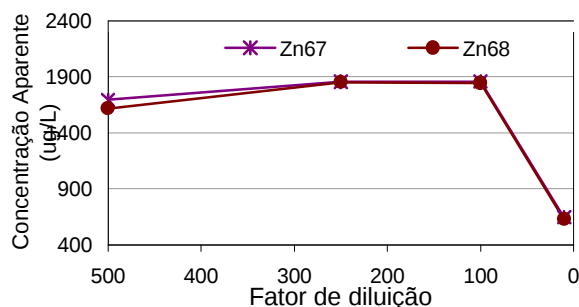


Figura 4: Dependência entre a concentração aparente de zinco observada com a diluição aplicada a amostra real.

Estudo das condições de quantificação: As concentrações das amostras foram calculadas por meio das curvas de calibração e de adição (amostras simuladas e reais), estes resultados foram comparados entre si. Nas adições feitas com amostras reais ($F_{\text{diluição}}=100$) não foram observadas diferenças significativas entre estes valores, conforme o mostrado na figura 5. Na TABELA 3 são listados os coeficientes de correlação obtidos entre os dois tipos de calibração, para alguns elementos. Independentemente do elemento estudado, pode-se, considerar que as curvas de adição e de calibração apresentaram uma correlação linear significativa e do tipo $y=x$, aproximada, onde y é a concentração obtida via curva de adição e x é a concentração obtida por curva de calibração. Portanto o procedimento de que emprega curva de calibração na quantificação da amostra é também adequado, e mais simples, quando as amostras de soro são diluídas de 250 a 100 vezes. Este comportamento já era esperado e se mostrou concordante com os resultados dos experimentos de simulação da matriz, com NaCl e albumina.

TABELA 3: Coeficientes de correlação entre as curvas de calibração externa(x) e as de adição de padrão(y), para alguns núclídeos estudados.

Nuclídeos	Regressão Linear Simples		
	$Y=AX+B$		
	a	b	R^2
^{24}Mg	0,9801	0,7522	0,9641
^{51}V	1	0,2626	0,9998
^{50}Cr	1,2847	0,0992	0,9882
^{52}Cr	1	-0,0002	0,9999
^{53}Cr	1,0011	-0,008	0,9909
^{55}Mn	0,9071	1,2662	0,9796
^{59}Co	0,9997	0,0022	0,9972
^{58}Ni	1	0,0003	0,9988
^{60}Ni	1	0,0001	0,9994
^{63}Cu	0,9994	0,0041	0,9989
^{65}Cu	0,9999	0,0004	0,9986
^{64}Zn	0,9750	0,3800	0,9956
^{66}Zn	0,9925	0,0557	0,9864

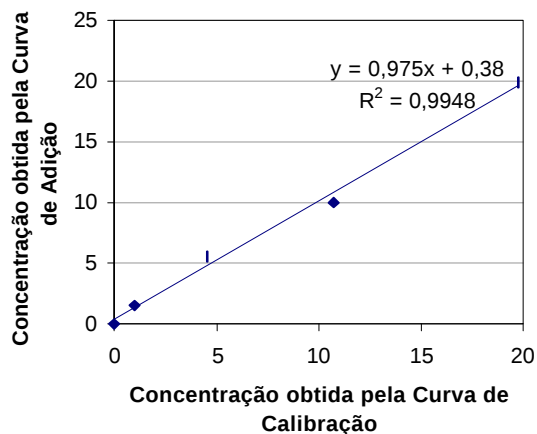


Figura 5: Exemplo de correlação obtida entre os dois modos de calibração para o ^{64}Zn .

Interferentes Espectrais -Modo de média resolução:

Foram obtidos os espectros de massas sujeitos a ocorrência de interferências espectrais na região de 50 a 70u.m.a. O emprego da media resolução, permitiu a separação e identificação dos interferentes. O exemplo mostrado na Figura 6a é referente ao ^{64}Zn e seus interferentes: $^{32}\text{S}_2^+$ $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$. A figura 6b mostra o sinal do ^{52}Cr que sofre uma interferência espectral severa com o $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$. Observa-se que os picos dos elementos medidos ($m/z=63,93$ e $51,93$) aumentam com o aumento da concentração do padrão. Os picos dos interferentes ($m/z= 63,97$ e $51,96$) aumentam com o aumento da concentração da matriz (ver amostra diluída 10X), e que se apresentam ausentes quando o espectro se refere a soluções padrão.

a
b

Figura 6: Espectro de massa em média resolução na região do(a) ^{64}Zn e de seus interferentes: $^{32}\text{S}_2^+$ $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2^+$; e do (b) ^{52}Cr e seu interferente $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$.

Estudo das razões isotópicas: Amostras de soro sanguíneo diluídas 100 vezes foram analisadas de modo a incluir os intervalos de massa dos diversos isótopos de Cr, Ni, Zn e Cd, em baixa e média resolução. Os resultados das medidas de razão isotópica, em baixa e média resolução estão mostrados na TABELA 4. Com base nestes valores, pode-se perceber que medidas realizadas em baixa resolução, ficam sujeitas a interferências espectrais para os elementos de massa atômica intermediária (Cr, Ni, e Zn). Estes interferentes ficam caracterizados pelo desvio (*d*) observado em relação à razão natural. Para estes mesmos elementos, as medidas realizadas em média resolução permitem a separação dos interferentes, e fornecem resultados mais exatos (menores valor para *d*) e precisos (menores valores para *s*) da razão isotópica natural.

Entretanto, para elementos que não estão sujeitos a interferentes isobáricos, há uma menor transmissão dos íons com o aumento da resolução. Este comprometimento faz com que os resultados de razão isotópica, em baixa resolução, sejam mais representativos, tal como o mostrado para a razão $^{111}\text{Cd}/^{114}\text{Cd}$.

* Precisão em 6 determinações, ** Desvio percentual relativo em relação as razões naturais

TABELA 4: Razões isotópicasⁱ obtidas em diferentes modos de resolução, para uma amostra real.

Nuclídeos	R=300			R=3000		
	Razão	s*	d**	Razão	s*	d**
		%	%		%	%
Cr ⁵² /Cr ⁵³	6,13	3,80	30,55	8,42	7,38	4,54
Ni ⁵⁸ /Ni ⁶⁰	5,37	6,17	105,4	2,50	4,07	4,37
Ni ⁵⁸ /Ni ⁶²	28,32	2,76	48,95	19,11	2,17	0,51
Ni ⁶⁰ /Ni ⁶²	5,64	2,53	22,39	7,69	6,12	5,79
Zn ⁶⁴ /Zn ⁶⁶	1,83	4,94	5,09	1,74	6,84	0,00
Zn ⁶⁴ /Zn ⁶⁸	2,55	7,02	1,36	2,50	8,87	3,26
Zn ⁶⁶ /Zn ⁶⁸	1,39	3,43	6,18	1,43	3,28	3,35
Cd ¹¹⁰ /Cd ¹¹¹	0,94	4,41	3,41	0,97	1,77	0,12
Cd ¹¹⁰ /Cd ¹¹⁴	0,42	3,59	3,72	0,43	6,44	0,86
Cd ¹¹¹ /Cd ¹¹⁴	0,44	4,61	0,22	0,44	5,64	0,32

ⁱ A estatística de contagens (n=100) deste experimento permite resultados de razão isotópica aproximados. Experimentos com maior precisão necessitam de um número de aquisições superior (n=2000).

IV. CONCLUSÕES

Os efeitos de supressão de sinal decorrentes da matriz podem ser evitados com o emprego de diluições na faixa de 100 a 250 vezes e/ou com o emprego de padrões internos. Os interferentes espectrais são também minimizados na etapa de diluição.

Quando a diluição não é suficiente para a eliminação de espécies interferentes o emprego da média resolução é necessário. Atendidas estas recomendações a quantificação via curva de calibração é suficiente, dispensando o uso de adição de padrões, que é também adequada, porém mais trabalhosa.

REFERÊNCIAS

- [1] DAMS, R.F.J.; GOOSSENS, J.; MOENS, L. **Spectral and non spectral interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Microchimica Acta*, v.119,p. 277, 1995.
- [2] FUNK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Quality assurance in Analytical Chemistry.** VHC Publishers, p. 40, 1995
- [3] MOENS, L.; VERREPT, P.; DAMS, R.; GREB, U. JUNG, G.; LASER, B. **New high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry technology applied for the determination of V, Fe, Cu, Zn, and Ag in human serum.** *Journal of analytical atomic spectrometry*, v.9, p. 1075, 1994.
- [4] MOENS, L.; VANHAECHE, F.; RIONDATO, J.; DAMS, R. **Some figures of merit of a new double focusing inductively coupled plasma mass spectrometer.** *Journal of analytical atomic spectrometry*, v.10, p. 569, 1995.
- [5] FALK, H.; GEERLING, R.; HATTENDORF, B.; KRENGEL-ROTHENSEE, K.; SCHIMDT, K.P. **Capabilities and limits of inductively coupled plasma mass spectrometry for direct determination of element traces in saline solutions.** *Fresenius journal of analytical chemistry*, v. 359, p. 352, 1997.
- [6] OLESIK, J. W. **Investigating the fate of individual samples droplets in inductively coupled plasmas.** *Applied spectroscopy*, v. 51, No. 5, p. 158A, 1997.

[7] VANDECASTEELE, C.; NAGELS, M.; VANHOE, H.; DAMS, R. **Suppression of analyte signal in inductively coupled plasma/mass spectrometry and the use of an internal standard.** *Analytica Chimica Acta*, v. 221, p. 91, 1988.

[8] VANDECASTEELE, C.; VANHOE, H.; DAMS, R. **Inductively coupled plasma mass spectrometry in biological samples.** *Journal of Analytical atomic spectrometry*, v.8, p.781, 1993.

[9] HARTENSTEIN, S.D.; HASSAN, M.S.; CHRISTIAN, G.D. **Internal standards for simultaneous multielement analysis in inductively coupled plasma mass spectrometry.** *Analyst*, v. 108, p.1323, 1993.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e a FINEP pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho; e a Dra. Célia Colli do departamento de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas por ceder as amostras empregadas neste estudo.

ABSTRACTS

This work discuss the interferent (spectral and non – spectral) formation and correction in serum samples and in synthetic solutions. Solutions containing different NaCl and albumin amounts were employed to simulate the serum matrix. Significant matrix effects could be observed at 1.0g/L of NaCl and 0.63g/L of albumin or more. These results agree with the real samples experiment. The 100-fold diluted real sample avoid non spectral interferences. The spectral interference presence was evaluated through the Fe, Cu, Cr and Zn determination in real samples under several dilutions. The medium resolution mode (R=3000) allows the element separation from the main spectral interferent.

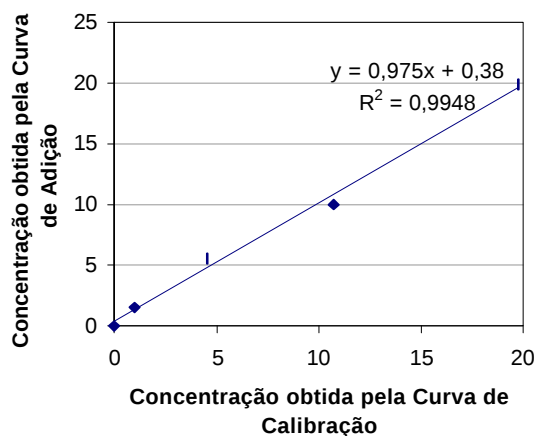
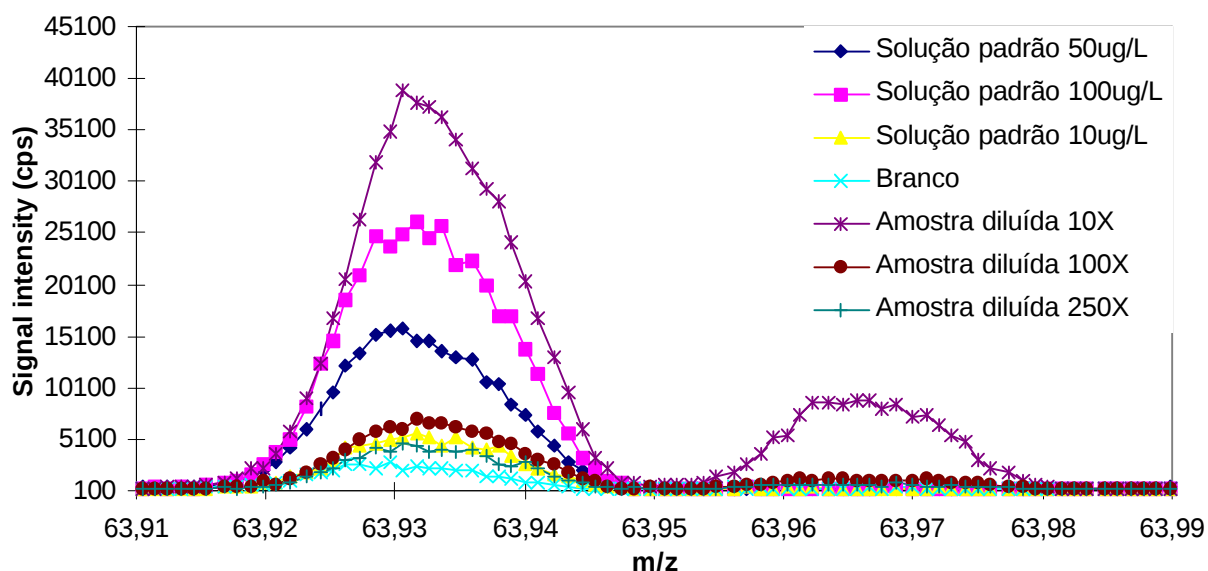


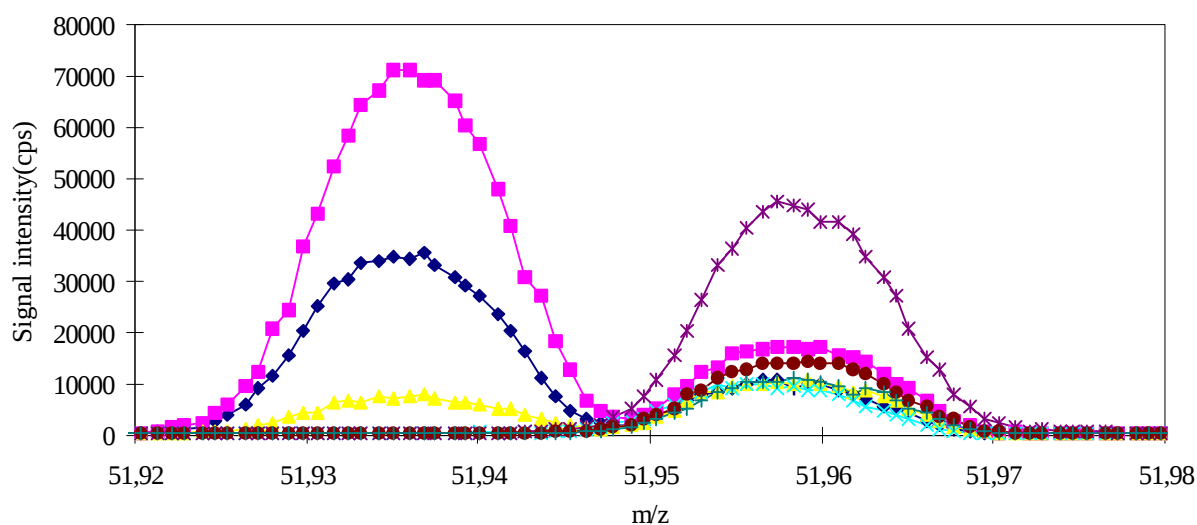
Figura 5: Exemplo de correlação obtida entre os dois modos de calibração para o ^{64}Zn .

Interferentes Espectrais -Modo de média resolução:

Foram obtidos os espectros de massas sujeitos a ocorrência de interferências espectrais na região de 50 a 70u.m.a. O emprego da media resolução, permitiu a separação e identificação dos interferentes. O exemplo mostrado na Figura 6a é referente ao ^{64}Zn e seus interferentes: $^{32}\text{S}_2$ e $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$. A figura 6b mostra o sinal do ^{52}Cr que sofre uma interferência espectral severa com o $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$. Observa-se que os picos dos elementos medidos ($m/z=63,93$ e $51,93$) aumentam com o aumento da concentração do padrão. Os picos dos interferentes ($m/z= 63,97$ e $51,96$) aumentam com o aumento da concentração da matriz (ver amostra diluída 10X), e que se apresentam ausentes quando o espectro se refere a soluções padrão.



a



b

Figura 6: Espectro de massa em média resolução na região do(a) ^{64}Zn e de seus interferentes: $^{32}\text{S}_2$ e $^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$; e do (b) ^{52}Cr e seu interferente $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$.