

DETERMINAÇÃO DE ELEMENTOS ESSENCIAIS EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

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

Neste trabalho são discutidas as principais figuras de mérito na determinação de metais essenciais empregando a espectrometria de massa de alta resolução com fonte de plasma indutivo. O desempenho desta técnica é comparado com dados disponíveis na literatura para espectrômetros do tipo quadrupolo. O processo de quantificação foi avaliado através do limite de detecção, da estabilidade, e precisão obtidos em dois modos de resolução ($R=300$ e $R=3000$). A linearidade da calibração foi avaliada através da análise de resíduos das retas de regressão linear simples e linear ponderada ($w=1/s$ e $w=1/s(x)$). O padrão de sangue total (IAEA-A13) foi empregado a fim de verificar a exatidão da medida. Os resultados obtidos para Mg, Cu, Zn, Rb e Pb ($R=300$ e $R=3000$) e para o Fe ($R=3000$) concordaram significativamente com os valores recomendados.

Palavras-Chave: sangue total, espectrometria de massa, elementos essenciais, elementos traços.

I. INTRODUÇÃO

O sangue é o principal agente transportador de nutrientes para os tecidos. Esta propriedade o caracteriza como um importante monitor biológico[1] de tal modo que são empregados parâmetros hematológicos como critérios de normalidade e toxicidade[2]. Desta forma, nos últimos anos, tem crescido a necessidade de se avaliar a concentração de diversos metais no sangue e em suas frações[3, 4, 5, 6]. Deste modo as dosagens de elementos presentes no sangue total, no soro ou no plasma servem a investigações que envolvem o diagnóstico de doenças[6,7,8], seu tratamento ou o estudo do metabolismo de uma proteína específica em uma população saudável[5,7,9], e a avaliação de exposições de origem ocupacional. Contudo, estes estudos têm esbarrado no fato de que o sangue é uma matriz bifásica, extremamente complexa, com um elevado conteúdo salino e rica em proteínas, para a qual os elementos de interesse potencial ocorrem em muito baixas concentrações[10]. Estas características causam interferências e impedem a determinação de muitos elementos presentes a níveis de traços e sub-traços. Portanto, diversas técnicas têm sido estudadas no sentido de fornecer resultados cada vez mais sensíveis, precisos e exatos [11,12], na determinação de metais em sangue e suas frações que permitam as diversas aplicações possíveis. Metodologias envolvendo a espectrometria de absorção atômica,

embora amplamente empregadas, permitem determinações a níveis de alguns mg/L.

Entretanto, são várias as interferências de matriz, exigindo correções com modificadores, agentes complexantes ou correções de background e de efeito Zeeman[6,13]. A espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma induzido permite determinações aproximadamente no mesmo nível de concentração, que a espectrometria de absorção atômica, sem requerer correções analíticas. Entretanto também fica sujeita a interferências, requerendo modificadores de matriz e sistemas alternativos de introdução de amostras como a injeção em fluxo[14].

As técnicas de aplicações na área nuclear (análise por ativação de neutrons[15], diluição isotópica[16]) são reconhecidamente as que fornecem os resultados mais precisos, em geral os melhores limites de determinação. Contudo, apresentam um custo elevado e não permitem rapidez na análise.

Este trabalho pretende portanto, desenvolver e empregar uma metodologia de análise por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivo, na determinação de metais traços e subtraços essenciais em amostras de sangue total.

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). O sistema de introdução de amostras constituiu-se de um nebulizador pneumático do tipo Meinhard e de uma câmara de expansão do tipo Scott. 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.

Padrões Certificados- IAEA-A-13: Sete frações de aproximadamente 0,5g do padrão IAEA-A-13 de sangue animal total, foram tomadas e digeridas em 10mL de HNO_3 concentrado, a temperatura ambiente. Após a digestão, procedeu-se uma diluição 1:100 em balão volumétrico. Uma fração foi empregada no ensaio de umidade. Após as medidas, as concentrações foram calculadas em base seca (Umidade=2,23%) e estes resultados foram comparados com os valores certificados disponíveis, para avaliação da precisão e exatidão.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Limite de Detecção: O limite de detecção foi calculado segundo recomendação do Analytical Methods Committee, 1989[17], empregando o critério 3sigma. Os limites de detecção obtidos (exceto os do Pb) foram suficientes para a análise destes elementos em populações genéricas, conforme a TABELA 1. Estes valores foram também compatíveis com aqueles esperados para a técnica.

TABELA 1: Limites de detecção expressos de acordo com a condição de resolução

Isótopo	Limites de detecção; 3s, n=10 ($\mu\text{g/L}$)		Quadrupolo Referência [20]
	R=300	R=3000	
Mg24	0,24	0,71	
Fe54	0,61	-	
Fe56	-	2,5	
Fe57	-	2,3	
Cu63	0,04	0,22	-
Cu 65	0,04	0,26	3
Zn64	0,12	0,53	
Zn66	0,14	0,72	4
Zn67	0,37	2,39	
Zn68	0,12	0,69	
Rb85	0,01	0,07	0,5
Pb206	0,02	-	0,2
Pb207	0,02	-	

Estabilidade da Medida: Esta figura de mérito serve para estimar a flutuação de sinal inerente ao instrumento de medida, em condições constantes. A avaliação da estabilidade foi feita através do acompanhamento do sinal de 38 isótopos, no modo de baixa resolução, a curto (1h) e longo prazo (8hs). No modo de média resolução apenas a estabilidade a curto prazo foi estudada.

Na primeira hora foram feitas aquisições a cada 5 minutos. Nas horas seguintes, os intervalos foram de 15 minutos. Uma solução contendo 38 elementos foi nebulizada continuamente, durante todo o experimento.

No modo de baixa resolução, as flutuações relativas do sinal a curto e longo prazo recomendadas pelo fabricante do instrumento são de 2,5% e 5% respectivamente.

Os valores obtidos foram bastante coerentes com os recomendados, conforme o mostrado na Figuras 1 e 2. Tal como o mostrado nestas Figuras o sinal da maioria dos isótopos estudados ($n>35$) teve uma flutuação menor que 1,5% a curto prazo e menor que 5% a longo prazo.

No modo de média resolução, não se estabelece valor limite para a estabilidade a longo prazo, devido a necessidade de recalibrações de massa mais frequentes.

Ainda para média resolução, a estabilidade a curto prazo apresenta valores mais abrangentes (5 a 10%), pois é dependente da resolução efetiva no momento da medida e da menor transmissão de íons nesta condição. Considerando estes fatores, os valores experimentais observados foram compatíveis com os valores recomendados pelo fabricante.

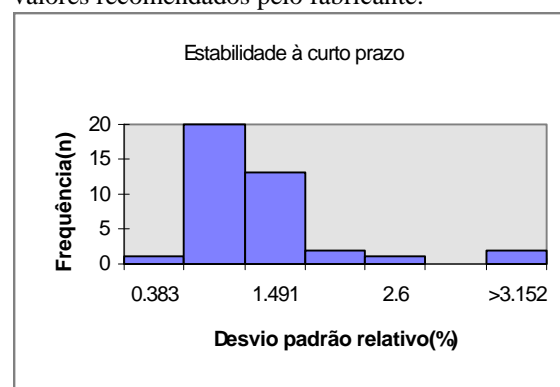


Figura 1: Distribuição de frequência da estabilidade a curto prazo, para 38 elementos estudados.

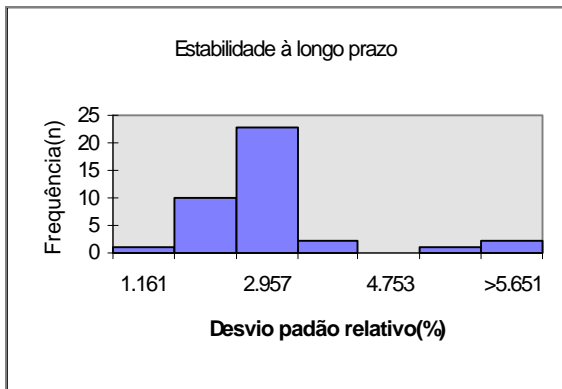


Figura 2: Distribuição de freqüência da estabilidade a longo prazo, para 38 elementos estudados.

A flutuação de sinal convertida para concentração é muito menor do que $1\mu\text{g/L}$, mesmo no caso mais extremo, em todo o tempo considerado do experimento. Observa-se ainda que qualquer tendência atribuída aos resultados pode ser corrigida com procedimentos de recalibração, em intervalos de tempo regulares. Portanto os valores de estabilidade observados são compatíveis com a repetibilidade requerida a procedimentos quantitativos, e com os valores relatados por Feldman[18], para a técnica.

Linearidade: A uma curva de calibração de Zinco ($n=40$) foi aplicada a regressão linear simples. Conforme pode ser observado na figura 3, o desvio padrão da medida aumenta com a concentração da solução. Desta forma os resíduos da regressão linear simples apresentam uma tendência crescente (Figura 4), o que invalida o modelo linear de regressão simples. Foi testada também a regressão linear ponderada, onde dois pesos (w) foram aplicados: $1/s$ e $1/s(x)$, onde s é o desvio padrão observado e $s(x)$ é uma função de regressão (x,s). Na TABELA 2 são mostrados os coeficientes das retas de regressão e seus erros padrão. A regressão ponderada para $w=1/s$ tem seus resíduos mostrados na figura 5.

TABELA 2: Modelos de regressão aplicados para teste de linearidade.

Regressão	\underline{a}	\underline{b}	R
Linear	5847,8	11822,8	0,978
Linear Ponderada $w=1/s$	5858,1	11305,0	0,998
Linear Ponderada $w=1/s(x)$ $s(x)=370x+4159$	5896,45	7515,7	1

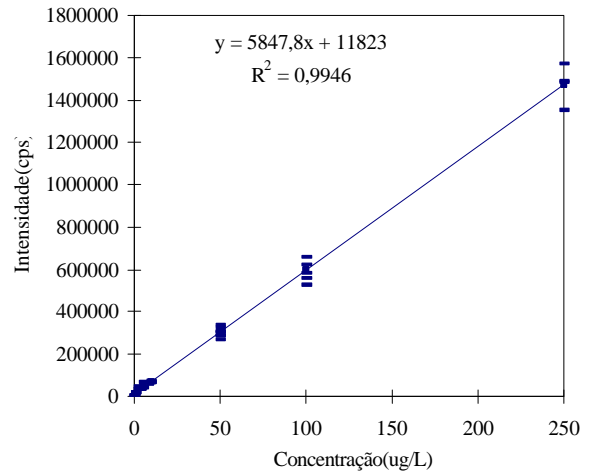


Figura 3: Curva de Calibração do ^{64}Zn ($R=300$)

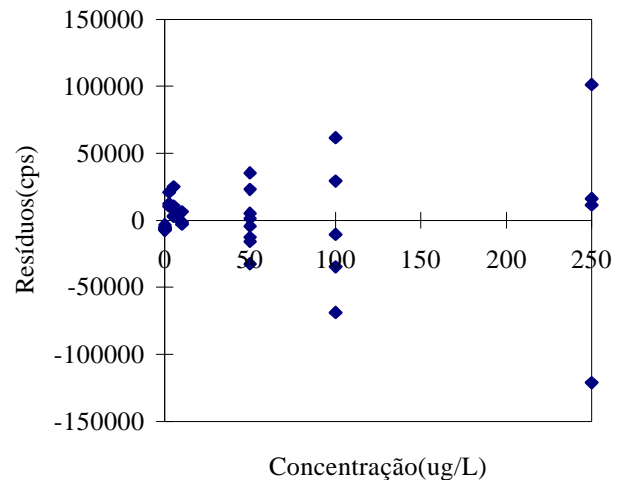


Figura 4: Resíduos da regressão linear aplicada a curva de Calibração do ^{64}Zn ($R=300$)

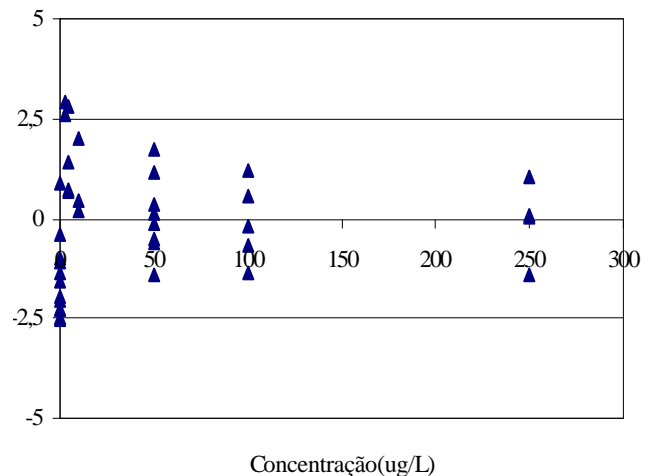


Figura 5:Resíduos da regressão linear

Observa-se que o resíduo da regressão ponderada não apresenta uma tendência evidente, caracterizando este tipo de regressão como a mais adequada. Os dois modelos ponderados permitem uma adequação maior dos pontos observados à reta de regressão.

Exatidão da medida - Padrão IAEA-A-13: Os resultados obtidos para Mg, Cu, Zn, Rb e Pb ($R=300$) e para Mg, Fe, Cu, Zn e Rb ($R=3000$) concordaram com o valor certificado. Uma comparação em termos dos desvios padrão não foi possível pois o padrão certificado apresenta seus valores em uma distribuição não normal (ver TABELA 3). Pode-se observar que algumas das precisões obtidas, expressas em $\mu\text{g/g}$ (TABELA 3), foram pelo menos uma ordem de grandeza menores do que as obtidas por outras técnicas[17]. Estes valores de precisão foram compatíveis com valores esperados pelo teste de estabilidade. Além dos desvios padrão foram calculados os desvios em relação ao valor certificado ($x-\mu$), para os resultados obtidos entre os diferentes isótopos de Zn, nas duas condições de resolução (Figura 6). Observou-se que ambas as condições de resolução apresentaram valores compatíveis com o valor certificado, com precisões similares.

Entretanto, é possível observar, que os desvios em relação ao valor certificado foram maiores para a condição de baixa resolução. Este desvio embora pequeno já era esperado, devido a formação de interferentes discutidos em outro trabalho[19]. Os resultados de Se e Ni não concordaram com os valores certificados (TABELA 4), e nem entre os valores

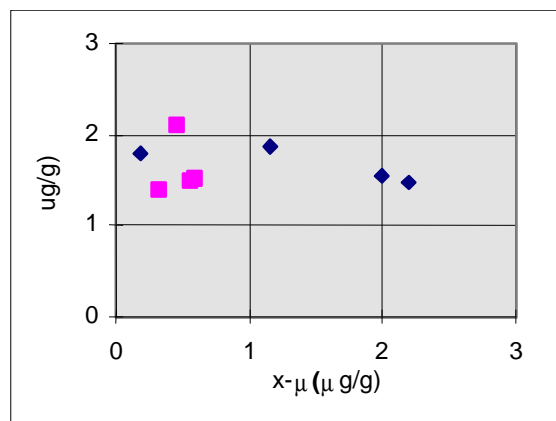


Figura 6: Desvios padrão(s) e desvios em relação ao valor certificado ($x-\mu$) para os isótopos do Zn obtidos em baixa(♦) e média resolução(■).

obtidos para diferentes isótopos (^{60}Ni e ^{62}Ni ; ^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se e ^{82}Se). Embora a concentração de Se ($22,88 \pm 1,84 \mu\text{g/g}$) tenha diferido bastante do valor certificado ($0,24 \mu\text{g/g}$), esta foi compatível com o valor obtido por Barany[20] ($22,9 \pm 6,4 \mu\text{g/g}$). Esta coincidência entre os valores necessita de maiores estudos. De modo, também, similar ao observado por Barany, uma variabilidade grande e não esperada por se tratar de um padrão certificado, foi encontrada para os valores de concentração de Ni. Provavelmente, este efeito foi observado em função da baixa concentração de Ni no instante da medida, pois a concentração no padrão certificado é de $1 \mu\text{g/g}$ ao qual foi aplicado um fator de diluição de 100 vezes.

*As concentrações elementares estão expressas para cada isótopo empregado na medida.

TABELA 3: Valores de concentração obtidos que concordaram significativamente com os valores certificados do padrão IAEA-A-13 (todos os valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$).

Isótopo	Baixa Resolução		Média Resolução		Valor Certificado	Limites
	X*	$\pm s$	X*	$\pm s$		
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Mg24	94,10	3,76	90,81	2,93	99	81-139
Fe54	1028	46	-	-	2400	2200-2500
Fe56	-	-	2481	178		
Fe57	-	-	2184	166		
Cu63	4,36	0,35	3,54	0,52	4.3	3,7-4,8
Cu 65	3,94	0,23	3,62	0,54		
Zn64	15,20	1,47	13,56	1,50	13	12-14
Zn66	14,15	1,86	13,18	1,79		
Zn67	13,32	1,40	13,45	2,11		
Zn68	14,99	1,55	13,59	1,51		
Rb85	2,07	0,23	2,04	0,42	2,3	1,7-3,7
Rb87	1,98	0,14	1,87	0,38		
Pb206	0,22	0,16	-	-	0,18	0,14-0,30
Pb207	0,26	0,19	-	-		

TABELA 4: Valores de concentração obtidos na análise do padrão IAEA-A-13 que não concordaram significativamente com os valores certificados (todos os valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$).

Isótopo	Baixa Resolução		Média Resolução		Valor Certificado	Limites
	X*	$\pm s$	X*	$\pm s$		
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Ni62	1,74	1,05	-	-	1	0,6-1,4
Se77	22,88	1,84	25,68	7,45	0,24	0,15-0,31
Se82			-	-	22,9	14,3-29,5

TABELA 5: Valores de concentração obtidos na análise do padrão IAEA-A-13 para os quais não se dispõe valores certificados (todos os valores estão expressos em $\mu\text{g/g}$).

Isótopo	Baixa Resolução		Média Resolução	
	X*	$\pm s$	X*	$\pm s$
V51	2,23	0,24	-	-
As75	3,02	0,39	3,23	0,79
Sr86	0,24	0,10	0,17	0,06
Sr88	0,23	0,09	0,21	0,03
Ag107	0,06	0,04	0,07	0,03
Ag109	0,06	0,04	0,07	0,05
Tl203	0,007	0,005	0,007	0,006
Tl205	0,007	0,005	0,010	0,007

Para alguns elementos analisados não foram encontrados valores de referência disponíveis, entretanto os resultados das medidas se mostraram reprodutíveis (^{51}V e ^{75}As) e/ou compatíveis com as composições isotópicas naturais esperadas (Sr, Ag e Tl), conforme o mostrado na TABELA 5.

IV. CONCLUSÕES

Os limites de detecção obtidos são compatíveis com os valores esperados da técnica e adequados aos estudos populacionais, para os elementos estudados, com exceção para o Pb.

O sinal apresenta estabilidade adequada a curto e a longo prazo, permitindo análises quantitativas sem que sejam observadas derivações de sinal significativas.

Há uma relação linear, em várias ordens de grandeza entre o sinal e a concentração. Entretanto para efeito de quantificação faz-se necessário o emprego de um modelo de regressão linear ponderado, a fim de evitar os erros decorrentes do modelo de regressão linear simples. Caso se escolha o modelo de regressão simples deve-se escolher faixas de concentração mais estreitas.

A técnica apresenta precisão e exatidão adequadas à análise quantitativa metais (Mg, Fe, Cu, Zn, Rb e Pb) em amostras de sangue total.

REFERÊNCIAS

- [1] BARNES, R. **Inductively coupled plasma mass spectrometry: capabilities and prospects for analysis of biological materials.** ICP information newsletter, v. 23, no1, p.3, 1997.
- [2] LAUWERYS, R. R.; HOET, P. **Industrial Chemical Exposure Guidelines for Biological Monitoring**, 2a ed., Lewis Publisher, CRC, Boca Paton, Florida, p.1-98, 1993
- [3] HARRISON, I.; LITTLEJOHN, D.; FELL, G.S. **Distribution of selenium in human blood plasma and serum.** Analyst., v.121, p.189-194, 1996.
- [4] WRÓBEL, K.; BLANCO GONZALEZ, E.; SANZ-MEDEL, A. **Progress with the speciation of aluminium and silicon in serum of chronic renal patients using atomic spectroscopic techniques.** Journal of analytical atomic spectrometry, v. 9, p.281, 1994.
- [5] LEFLON, P.; PLAQUET, R.; ROSE, F.; HENNON, G.; LEDEME, N. **Rapid determination of lithium in human serum and urine, at physiological concentrations, by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry.** Analytica chimica Acta, v.327, p. 301-306, 1996.
- [6] PATRIARCA, M.; FELL, G.S. **Determination of nickel in serum of haemodialysed patients by means of electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction.** Journal of analytical atomic spectrometry, v.9, p. 457, 1994.
- [7] ALIMONTI, A.; PETRUCCI, F.; FIORAVANTI, S.; LAURENTI, F.; CAROLI, S. **Assessment of the content of selected trace elements in serum of term and pre-term newborns by inductively coupled plasma mass spectrometry.** Analytica chimica Acta, v. 342, p.75-81, 1997.

[8] PEDROSA, L. DE F. C. **Avaliação do estado nutricional relativo ao zinco de crianças com diabetes mellitus insulino dependentes** Tese (doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição experimental, 109p. São Paulo, 1997.

[9] CAMPANELLA, L. CRESCENTINI, G. ACHILLI, M. AVINO, P. CALI, A. GROSSI, R. TOMASSI, F. **Determination of aminoacids and heavy metals in biological fluids and tissues.** ICP Information Newsletter, V.23, No 1, p.23, 1997.

[10] Vandecasteele, C.; Vanhoe, H.; Dams, R. Inductively coupled plasma mass spectrometry of biological samples, Journal of analytical atomic spectrometry, v. 8, p. 781, 1993.

[11] TAYLOR, A.; BRIGGS, R.J. **External quality assesment schemes and improvements in the measurement of trace elements in biological fluids.** Journal of analytical atomic spectrometry, v. 10, p.1033, 1995.

[12] KING, B. **Tracebility of chemical analysis** Analyst, v. 112, p. 197-204, 1997.

[13] LEWIS, S. O'HAVER, T. C. HARNLY, J. H. **Analysis of blood serum for essential metals by simultaneous multielementar atomic spectrometry with flame atomization.** Analytical Chemistry, v. 56, no7, p. 1066-1070, 1996.

[14] LIM, H. B.; HAN, M. S.; LEE, K. J. **Determination of trace elements in human serum by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with flow injection.** Analytica Chimica Acta, v. 320, p. 185-189, 1996.

[15] XILEI, L.; RENTERGHEM, D. VAN; CORNELIS, R.; MEES, L. **Radiochemical neutron activation analysis for thirteen trace metals in human blood serum by using inorganic ion-exchanges.** Analytica Chimica Acta, v. 211, p. 231-245, 1988.

[16] CREWS, H. M.; DUCROS, G.; MELLONS, F. A.; KASTENMAYER, P.; LUTEN, B.; MCGAW, F. A. **Mass spectrometry methods for studing nutrient mineral and trace elements absorption and metabolism in humans using stable isotopes.** Analyst, v. 119, p. 2491-2499, 1994.

[17] ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. **Limit of detection** . Analyst, p.1108-1110, 1989

[18] FELDMAN, I.; TITTES, W.; JAKUBOWSKI, N.; STUEWER, D. **Performance charactersitics of inductively coupled plasma mass spectrometry with high mass resolution.** Journal of analytical atomic spectrometry, v. 9; p. 1007-1011, 1994.

[19] MONTEIRO, L.R.; SARKIS, J. E. S. **Interferências espectrais e não espectrais na determinação de elementos essenciais em amostras sintéticas e reais de soro sanguíneo.** Nesta conferência, 1998.

[20] BARANY, E.; BERGDAHL, I. A.; SCHUTZ, A. SKERFVING, S. OSKARSSON, A. **Inductively coupled plasma mass spectrometry for direct multi-element analysis of diluted human blood and serum.** Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Vol. 12, p.1005-1007, 1997.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES e a FINEP pelo auxílio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho.

ABSTRACTS

In this work, the main figures of merit in the essential metal determination by using high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry are discussed. This technique performance is compared with quadrupole results found in literature. The quantification process was evaluated with detection limit, stability and precision, in two resolution conditions (R=300 and R=3000) . The residual analysis allows the linear and the weighted ($w=1/s$ and $w= 1/s(x)$) regression models. The certified reference material (IAEA-A-13) checks the accuracy. The Mg, Cu, Zn, Rb and Pb (R=300 and R=3000) and the Fe (R=3000) results agree with the certified values.