

Direktbestimmung von Cu, Fe, Zn, Ca, Mg und Na im Serum mittels ICP-Emissionsspektralanalyse

P. Schramel und B.-J. Klose*

Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Inst. f. Angew. Physik, Physikal.-Techn. Abt., D-8042 Neuherberg

* Kreiskrankenhaus Erding, Frauenklinik, D-8058 Erding

Direct Determination of Cu, Fe, Zn, Ca, Mg, and Na in Serum by Means of ICP-Emission Spectrometry

Summary. The application of ICP-emission spectroscopy for the determination of Cu, Fe, Zn, Ca, Mg and Na in human and animal serum is described. Due to the very high excitation temperature in a plasma the well known chemical interferences in atomic absorption spectroscopy do not appear in this technique. It is possible to carry out very sensitive and very well reproducible measurements on very small amounts of the sample (the total sample consumption for the determination of the above mentioned six elements is less than 1 ml).

Zusammenfassung. Die Anwendung der ICP-Emissionsspektralanalyse für die direkte Bestimmung von Cu, Fe, Zn, Ca, Mg und Na in menschlichem und tierischem Blutserum wird beschrieben. Aufgrund der hohen Anregungstemperatur in einem Plasma treten dabei die von der konventionellen Atomabsorptionsspektroskopie her bekannten chemischen Interferenzen nicht auf, so daß mit geringen Probenmengen (max. 1 ml Serum für den Nachweis dieser 6 Elemente) ein sehr empfindlicher und sehr gut reproduzierbarer Nachweis möglich ist.

Key words: Best. von Kupfer, Eisen, Zink, Calcium, Magnesium, Natrium in Blutserum; Spektrometrie, ICP

Einleitung

Eine schnelle und direkte (d.h. ohne notwendige vorhergehende Aufarbeitung der Probe) Bestimmungsme-

thode für die Untersuchung der essentiellen Spurenelemente Cu, Fe, Zn, Ca und Mg und des wichtigen Elektrolyten Na im menschlichen und tierischen Serum ist heute zur Früherkennung, zur zusätzlichen diagnostischen Absicherung und auch für die Therapie verschiedener Krankheiten von entscheidender Bedeutung. Bisher wurden in der klinischen Chemie, aber auch in der biomedizinischen Forschung für diese Bestimmungen hauptsächlich die seit langem bekannten Verfahren der Flammenphotometrie und der Atomabsorptionsspektroskopie eingesetzt. Beide Verfahren haben den Nachteil eines relativ großen Probenverbrauches (ca. 10 ml Serum für die Bestimmung der o.a. Elemente) und oft auch den der Notwendigkeit einer vorhergehenden Probenaufbereitung, d. h. einer Veraschung. Daneben stellt auch die Eichung der Geräte, zumindest für die Elemente im Spurenbereich wie Cu, Fe und Zn einen erheblichen Zeitaufwand dar.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit das moderne Verfahren der ICP (Inductively Coupled Plasma)-Emissionsspektralanalyse für die Direktbestimmung dieser Elemente im Serum eingesetzt und die Leistungsfähigkeit dafür überprüft.

Methode

Bei der ICP-Emissionsspektralanalyse (ICP-OES) wird das Probenmaterial nach einer geeigneten Zerstäubung, d.h. einer Aerosolbildung (pneumatischer oder Ultraschallzerstäuber) in den heißen Kern eines Plasmas injiziert. Dieses Plasma ist einer chemischen Flamme sehr ähnlich. Es handelt sich um ein in konzentrischen Quarzröhren brennendes, sehr heißes Argonplasma, dem die Energie auf elektrischem Weg von einem Hochfrequenzgenerator über eine Induktionsspule zugeführt wird. Das Probenaerosol passiert dann einen Tunnel, der von einem ringförmigen Plasma hoher Temperatur (ca. 10000 K) umgeben ist. Während

* Korrespondenz-Anschrift

der Verweildauer der Probenpartikel im heißen Plasma werden diese atomisiert und angeregt, so daß sie durch ihre Strahlungsemission quantitativ und qualitativ nachgewiesen werden können.

Die ICP-OES eignet sich daher u.a. besonders gut zur Bestimmung von Spurenelementen in biologischen Materialien. Die hohe Anregungstemperatur der Probe im Plasma von mehr als 8000 K vermeidet dabei auch die von der Atomabsorptionsspektroskopie her hinlänglich bekannten und unerwünschten chemischen Interferenzen. Allerdings sind die Spektren aufgrund der hohen Anregungsenergie sehr linienreich, so daß durch Überlagerung von Linien verschiedener Elemente, trotz der Verwendung hochauflösender Monochromatoren physikalische Interferenzen auftreten können, die aber in den meisten Fällen durch die Verwendung einer anderen Emissionslinie ausgeschaltet werden können. Auf jeden Fall ist aber bei unbekannten Proben bzw. Matrices der störungsfreie Nachweis des gesuchten Elements zu überprüfen, da es andernfalls zu unübersehbaren systematischen Fehlern bei der Bestimmung kommen kann. Ähnlich wie bei der Atomabsorptionsspektroskopie in der Flamme ist auch bei der ICP-OES einer der wichtigsten Faktoren für die Empfindlichkeit und auch für die Reproduzierbarkeit die Aerosolbildung aus der Probelösung oder bei flüssigen Proben aus der Probe selbst. Zwei Verfahren befinden sich dafür z.Z. im Einsatz, nämlich die pneumatische und die Ultraschallzerstäubung [1].

Experimentelles

Die Messungen wurden an einem ICP-Sequenzspektrometer JY 38P der Fa. Instruments S.A. ausgeführt. Das Gerät ist mit einem PDP-11/03-Rechner zur gesamten Prozeßsteuerung und zur Auswertung gekoppelt. Die maximale Hochfrequenzleistung beträgt 1,5 kW. Der Spektrometerteil besteht aus einer Czerny-Turner Anordnung mit 1 m Brennweite, wodurch ein spektrales Auflösungsvermögen von 0,02 nm erreicht wird. Als Zerstäuber wurde ein pneumatischer Zerstäuber vom Typ „Meinhard“ eingesetzt, der aber nicht frei ansaugend betrieben wurde. Das Aufzwingen eines konstanten Flüssigkeitsstroms durch die Capillare des Zerstäubers mittels einer peristaltischen Pumpe [2] bringt dabei zwei entscheidende Vorteile: 1. einen sehr viel geringeren Probenverbrauch gegenüber dem frei ansaugenden Zerstäuber von etwa 0,9 ml gegenüber 2,5–3 ml/min und 2. wird die Dichteabhängigkeit für den Flüssigkeitsstrom durch die Capillare (nach dem Poiseuilleschen Gesetz) praktisch eliminiert, was z.B. in diesem Fall der Direkteinspritzung von Serum einen sehr wichtigen Faktor darstellt. Das Plasma wurde konstant mit 70 % Leistung (etwa 1 kW), 13 l/min Argon und einem Aerosolträgersgasstrom von 0,4 l/min betrieben. Dabei traten für alle untersuchten Elemente optimale Bedingungen auf. Tabelle 1 zeigt die für die Messungen verwendeten Emissionslinien der verschiedenen Elemente und ihre Referenzlinien [3].

Da es sich bei dem verwendeten ICP-Gerät um ein, wie bereits erwähnt, Sequenzspektrometer handelt, werden die jeweiligen Referenzlinien zur Eichung bzw.

Tabelle 1. Zur Messung verwendete Meß- und Referenzwellenlängen [3]

Elemente	λ (Å)	λ Ref (Element)
Cu	3247,54	3092,84 (Al)
Fe	2599,40	2496,78 (B)
Zn	2138,56	2124,12 (Si)
Ca	3933,66	3834,68 (Ar)
Mg	2795,53	2404,88 (Fe)
Na	5889,95	4702,32 (Ar)

Kontrolle des Monochromators und zur Korrektur einer eventuell auftretenden Monochromator-Shift benötigt. Dabei muß die Referenzwellenlänge stets kleiner sein als die Meßwellenlänge. Die genaue Lage der Referenzlinie und ihre Intensität werden dem Rechner vorgegeben, jede Abweichung eines der beiden Parameter wird vor jeder Messung ausgedruckt, so daß dadurch eine ständige Kontrolle des Monochromators und auch der richtigen Plasmaeinstellung gewährleistet ist. Bei konstanten Betriebsbedingungen sind im Verlaufe eines Arbeitstages typische Schwankungen des Monochromators von $\pm 0,1$ Å und ± 10 % der Referenzlinienintensität zu beobachten. Die Schwankungen der Monochromatoreinstellung werden automatisch bei der Messung der Linienintensität berücksichtigt bzw. korrigiert.

Abbildung 1 zeigt das vom Rechner verwendete Auswerteverfahren zur Berechnung der Netto-Peakfläche und die dazu benötigten Parameter.

Die Berechnung der Netto-Peakfläche erfolgt im Rechner mittels folgender Formel:

$$R = \sum_{i=1}^{NMES} I_i - \left(\sum_{i=1}^{NFI} IFI_i + \sum_{i=1}^{NFS} IFS_i \right) \cdot \left(\frac{NMES}{NFI + NFS} \right)$$

Alle Parameter, einschließlich der Integrationszeit/Kanal und der Schrittweite des Monochromators sind frei wählbar und in der jeweiligen Elementtabelle im Rechner gespeichert.

Abbildung 2 zeigt ein typisches Emissionsspektrum, in diesem Fall von Cu (1 ppm), aufgenommen bei $\lambda = 3247,54$ Å mit einer Schrittweite von 0,02 Å und 100 ms Integrationszeit/Kanal.

Das Gerät wurde für die o.a. Elemente geeicht, wobei ein weiterer großer Vorteil dieser Methode im großen Linearitätsbereich der Eichkurven liegt, der sich meist über 4–5 Zehnerpotenzen erstreckt. Für die Eichungen wurden wäßrige bzw. leicht angesäuerte Eichlösungen (ca. 1:100 HNO₃) verwendet. In allen Fällen ergaben sich lineare Eichkurven, die ebenfalls im Rechner abgespeichert werden. Durch Standard-Addition wurde für jedes Element die Gültigkeit dieser Eichkurve für die Messung von Serum überprüft.

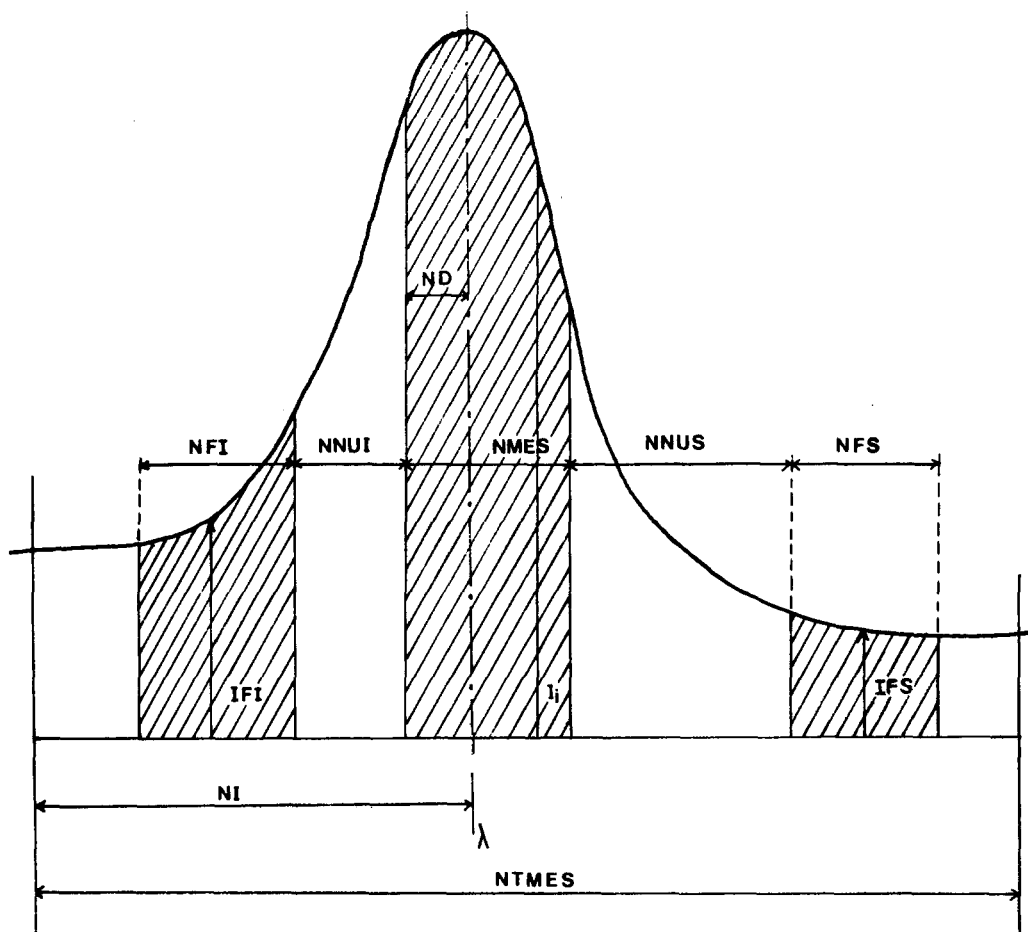


Abb. 1. Parameter zur Berechnung der Nettopeakfläche (jeweils in Monochromator-Schritten)

Dieses Verfahren darf hier zur Kontrolle herangezogen werden, da der jeweilige Untergrund der Linie genau bestimmt und von der Gesamtintensität subtrahiert wird. In allen Fällen ergab sich eine gute Übereinstimmung in der Steigung und in der absoluten Zählrate, so daß die Serumproben direkt mit diesen Eichkurven verglichen werden konnten. Es muß an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, daß dies nur bei Verwendung einer aufgezwungenen Strömung, d.h. eine konstante Probenmenge, durch die Capillare des pneumatischen Zerstäubers erreicht werden kann. Im anderen Fall würde durch den Dichteunterschied zwischen Serum und Wasser eine starke Verfälschung des Meßergebnisses eintreten.

Für die Bestimmung von Cu, Fe und Zn wurde das Serum 1:10 mit bi-dist. H_2O verdünnt. Für die Analyse von Ca, Mg und Na war eine 1:100-Verdünnung ausreichend. Alle 6 Elemente konnten aus insgesamt 1 ml Serum bestimmt werden. Der Zeitaufwand pro Element und Probe beträgt für jeweils 3 Wiederholungen auf jeder Linie (Mittelwert und Standardabweichung werden vom Rechner gebildet) etwa 2 min.

Die Reproduzierbarkeit der Einzelmessungen beträgt 2–4%, wobei aber zu bemerken ist, daß mit einem frei ansaugenden Zerstäuber eine bessere Reproduzierbarkeit (ca. 1%) zu erreichen wäre, da die aufgezwungene kleine Probenmenge von ca. 0,9 ml/min den Zerstäuber in eine leichte Pulsation versetzt, was wiederum die Reproduzierbarkeit etwas verschlechtert, d.h. aber, die Messung mit vorgeschalteter peristaltischer Pumpe wird man nur dann vorziehen, wenn nur kleine Probenmengen für die Analyse zur Verfügung stehen, was aber sicherlich bei der Mehrzahl der bio-medizinischen Fragestellungen der Fall sein wird.

Tabelle 2 zeigt als Anwendungsbeispiel die Ergebnisse von Schweine-Seren-Untersuchungen, wobei auf die bio-medizinische Fragestellung bzw. Aussage nicht eingegangen werden soll.

Die in dieser Tabelle angegebenen Werte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichung aus 30 Tieren dar.

Tabelle 3 schließlich gibt für die untersuchten Elemente die gemessenen Empfindlichkeiten für Serum an. Allerdings wurden diese Werte im Routinebetrieb,

28 JAN 1980 15:00:06

3247.00*	369.
3247.05*	371.
3247.10*	370.
3247.15*	369.
3247.20*	369.
3247.25*	369.
3247.30*	369.
3247.35*	370.
3247.40*	369.
3247.45*	370.
3247.50*	369.
3247.55.*	739.
3247.60....*	1605.
3247.65.....*	2984.
3247.70.....*	4947.
3247.75.....*	6591.
3247.80.....*	8970.
3247.85.....*	10411.
3247.90.....*	13186.
3247.95.....*	17380.
3248.00.....*	22817.
3248.05.....*	25051.
3248.10.....*	25134.
3248.15.....*	25160.
3248.20.....*	21292.
3248.25.....*	16865.
3248.30.....*	11257.
3248.35.....*	7822.
3248.40.....*	5207.
3248.45.....*	3529.
3248.50.....*	2174.
3248.55.....*	1367.
3248.60.*	409.
3248.65*	369.
3248.70*	369.
3248.75*	368.
3248.80*	370.
3248.85*	370.
3248.90*	369.
3248.95*	370.
3249.00*	369.
3249.05*	368.
3249.10*	368.
3249.15*	368.
3249.20*	383.
3249.25*	368.
3249.30*	369.
3249.35*	369.
3249.40*	368.
3249.45*	369.
3249.50*	368.
3249.55*	368.
3249.60*	369.
3249.65*	368.
3249.70*	368.

Abb. 2. Emissionsspektrum von Cu ($\lambda = 3247, 54 \text{ \AA}$). 1 ppmTabelle 2. Konzentrationen der Elemente Cu, Fe, Zn, Ca, Mg, Na in Schweine-Seren in $\mu\text{g/ml}$ (Mittelwert, Standardabweichung, $n = 30$)

Cu	Fe	Zn	Ca	Mg	Na
$2,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,2$	125 ± 20	$18,6 \pm 1,6$	3350 ± 300

d.h. ohne spezielle Optimalisierung des Gerätes für jedes einzelne Element, gemessen. Die Empfindlichkeit ist dabei aus 3 s des Untergrundes an der Meßlinie berechnet. Die letzte Spalte gibt noch die in der Literatur [3] bekannte Empfindlichkeit für die Elemente in wäßrigen Lösungen an.

Diskussion

Die mit diesem modernen Verfahren erreichbaren Empfindlichkeiten für die untersuchten Elemente sind mit denen der Atomabsorptionsspektroskopie ver-

Tabelle 3. Nachweisgrenzen für Cu, Fe, Zn, Ca, Mg, Na im Serum und in wäßriger Lösung

Element	Empfindlichkeit im Serum (ng/ml)	Empfindlichkeit [3] (ng/ml)
Cu	10	5,4
Fe	10	6,2
Zn	5	0,2
Ca	1	0,2
Mg	10	0,15
Na	100	29

gleichbar, in den meisten Fällen besser. In der Reproduzierbarkeit der Messungen ist dabei auf jeden Fall die ICP-OES der AAS (in der Flamme oder flammenlos) deutlich überlegen. Die Richtigkeit der Ergebnisse ist aufgrund der fehlenden chemischen Interferenzen ebenfalls bedeutend höher einzuschätzen als bei der AAS, und bedingt durch die hohe Nachweisempfindlichkeit kann mit kleinsten Mengen der Ausgangs-

substanz gearbeitet werden (in diesem Fall war der maximale Serumbedarf für die Bestimmung der o.a. 6 Elemente nur 1 ml), was bei medizinischen Proben oft von großer Wichtigkeit ist. Bei Verwendung eines Simultanspektrometers, bei dem viele Elemente gleichzeitig bestimmt werden können, kommt dazu noch der geringe Zeitaufwand für eine solche Analyse von nur etwa 3 min. Aufgrund dieser bestechenden Vorteile der ICP-OES und der ständig wachsenden Bedeutung von Spurenelement-Untersuchungen im biomedizinischen Bereich als zusätzliches diagnostisches Hilfsmittel und zur ständigen Therapiekontrolle ist anzunehmen, daß dieses Verfahren neben dem Einsatz in der For-

schung auch in der Routine, z.B. im klinisch-chemischen Labor, eine immer größere Verbreitung und Anwendung finden wird.

Literatur

1. Schramel, P.: Z. Lebensm. Unters. Forsch. **169**, 255 (1979)
2. Schramel, P., Ovcâr-Pavlu, J.: Z. Anal. Chem. **298**, 28 (1979)
3. Winge, R. K., V. S. Peterson, V. A. Fassel: Appl. Spectrosc. **33**, 206 (1979)

Eingegangen am 11. September 1980