

**MONITOROVÁNÍ OBSAHU SELENU V LIDSKÉM ORGANISMU METODOU AAS\*****DAGMAR FRIŠOVÁ a JAROSLAV REJNEK***Katedra chemie, Pedagogická fakulta, Univerzita J. E. Purkyně, České mládeže 8, 400 96 Ústí nad Labem  
e-mail: rejnek@pf.ujep.cz*

Došlo dne 15.III.2001

Klíčová slova: selen, vlasy, AAS

**Úvod**

Průmyslově rozvinuté země se stále potýkají s hrozbou kontaminace životního prostředí nejrůznějšími látkami anorganického i organického původu. Výjimkou není ani Česká republika. Pozornost je nutné věnovat hlavně prvkům a látkám pro organismy toxickým. Spolu s těmito toxickými látkami je životní prostředí ovlivňováno řadou dalších látek, jimž je užitečné věnovat pozornost a které jsou v současné době rovněž intenzivně sledovány. Mezi tyto látky patří nepochybně selen, který je celosvětově zkoumán z různých hledisek. Jeho výskyt a funkce v biologických systémech jsou zkoumány již delší dobu a názor na jeho vliv na lidský organismus se měnil a vyvíjel. Do obecného povědomí selen původně vešel jako silně toxický, postupem času se však zjistilo, že má nezastupitelnou roli v lidském těle. Dnes je tedy zařazován jako prvek esenciální. Zajímavou skutečností je relativně úzké rozmezí koncentrací s příznivými a toxickými účinky selenu na lidský organismus. Proto je důležité znát jeho množství v těle. Informace o jeho hladině poskytují tělní tekutiny (krev), tělní tkáň a kožní deriváty (vlasy, nehty). Práce se vzorky vlasů v porovnání s manipulací se vzorky krve nebo tělními tkáněmi je evidentně snazší.

Měření množství selenu v těchto biologických materiálech je možné provést řadou instrumentálních metod. Stanovení selenu metodou atomové absorpční spektrometrie doplněnou o generaci hydridových par je založeno na redukci analytu na hydrid v kapalně fázi, jeho převedení do plynné fáze a následné atomizaci v optické dráze atomového absorpčního spektrometru. Základním rysem této techniky je tedy separace analytu od matrice a jeho vyšší koncentrace v absorpčním prostředí ve srovnání s klasickými metodami AAS. To vede ke zvýšení citlivosti a k výraznému omezení interferencí<sup>1,2</sup>.

Pro redukci analytu na hydrid byly navrženy různé redukční, např. směsi kyseliny chlorovodíkové a jodidu draselného, chlorid cínatý a granule zinku, kovový hořčík, kyselina chlorovodíková a chlorid titanitý<sup>3</sup>. Ke generování hydridů arsenu a selenu se od roku 1973 používá tetrahydridoboritan sodný<sup>4</sup> (NaBH<sub>4</sub>).

Reakci tetrahydridoboritanu sodného v kyselém prostředí popisuje rovnice (A):



Následující rovnice demonstruje vznik hydridu stanovaného analytu:



Optimální uvolňování hydridů závisí především na formě analytu a kyselosti roztoku. Pouze čtyřvalný selen (IV) je schopen tvořit hydridy<sup>6</sup>, a může být tedy stanovován touto technikou, zatímco selen dvojjvalný (II) a šestivvalný (VI) hydridy netvoří, a musí se převádět na selen čtyřvalný (IV). K této přeměně se používá kyselina chlorovodíková<sup>6-8</sup> o koncentraci 5–7 mol.dm<sup>-3</sup>.

Cílem této práce bylo stanovení koncentrace selenu ve vlasech lidské populace okresu Ústí nad Labem a vzájemné porovnání hodnot mezi jednotlivými skupinami probandů.

**Experimentální část**

Vlasy potřebné pro analýzu (asi 1,5 g) byly získány od osob žijících v Ústí n. L. a okolí a byly odebírány v souladu s obecnými zásadami odběru vzorků<sup>9-11</sup>. To znamená, že byly odstřiženy vlasy o délce maximálně 1 cm z několika míst hlavy za použití kvalitních nůžek z nerezového materiálu.

Nejprve bylo nutné zbavit vzorky vlasů povrchové kontaminace. Vlasy byly promývány roztokem detergentu v redestilované vodě, poté proplachovány redestilovanou vodou, acetone a nakonec opět redestilovanou vodou za stálého míchání po dobu asi 10 minut. Následně byly vzorky sušeny při teplotě 100 °C.

Po dokonalém očištění a usušení byly vzorky navázeny a mineralizovány. Pro analýzu jednoho vzorku bylo navážováno 0,4 až 1,5 g vlasů. Navážka byla v křemenném kelímku překryta hexahydrátem dusičnanu hořečnatého.

Pro mineralizaci navážených vzorků vlasů byla použita (na základě řady srovnávacích experimentů<sup>12</sup>) metoda na suché cestě. Křemenné kelímky s experimentálním materiálem byly umístěny do pícky mineralizátoru Progmin s předvoleným programem a spalovány v teplotním režimu, který sestával z těchto kroků: pozvolného vzestupu na teplotu 300 °C po dobu sedmi hodin, tříhodinové prodlevy na této teplotě, dalšího postupného ohřevu na teplotu 550 °C po dobu sedmi hodin a posléze sedmihodinového udržování na této teplotě.

Dalším krokem byla digesce získaného popela v kyselině chlorovodíkové. K popelu bylo přidáno 8 cm<sup>3</sup> koncentrované kyseliny chlorovodíkové a roztok byl po dobu pěti hodin zahříván při teplotě 70 °C. Poté byl roztok doplněn 10 cm<sup>3</sup> deionizované vody, zfiltrován do odměrné baňky a doplněn deionizovanou vodou do požadovaného objemu. Tento roztok byl přelit do polyethylenové nádoby a uchováván v chladničce.

Pro měření selenu ve vlasech lidské populace bylo použito atomové absorpční spektrometrie doplněné o hydridovou techniku. Analyt byl z mineralizátu převeden na hydrid a poté následně vypuzen inertním plynem (dusíkem) do křemenné trubice umístěné v plameni spektrometru Varian SpectrAA

\* Tato práce získala zvláštní ocenění v soutěži o cenu firmy Merck za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytická chemie 2.2.2001 v Olomouci.

20+ se systémem VGA 76. Pro převedení analytu na hydrid bylo použito tetrahydridoboritanu sodného o hmotnostní koncentraci 0,6 % (stabilizovaného přídavkem 0,5 % roztoku hydroxidu sodného) v přítomnosti kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 6 mol.dm<sup>-3</sup>. Podmínky měření a nastavení parametrů přístroje jsou uvedeny v tabulce I.

Nejprve byla nutná adjustace čerpadla tak, aby stoupačí rychlost roztoku tetrahydridoboritanu sodného a kyseliny chlorovodíkové byla 1 cm<sup>3</sup> za minutu a stoupačí rychlost vzorku 6,5 cm<sup>3</sup> za minutu. Protože se tetrahydridoboritan sodný snadno rozkládá, bylo jednorázově připraveno maximálně 500 cm<sup>3</sup> roztoku, jehož životnost byla prodloužena jeho uskladněním v chladničce.

Tabulka I

Parametry atomového absorpčního spektrometru Varian SpectraAA 20+ pro měření obsahu selenu v biologickém materiálu

Parametr	Hodnota
Plamen	acetylen-vzduch
Vstupní tlak acetylenu [MPa]	0,17
Vstupní tlak vzduchu [MPa]	0,50
Rychlost proudění acetylenu [dm <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> ]	1,70
Rychlost proudění vzduchu [dm <sup>3</sup> .min <sup>-1</sup> ]	12,0
Vlnová délka záření [nm]	196,0
Šířka štěrby [nm]	0,5
Žhavicí proud katody [mA]	10
Korekce pozadí	ano
Doba prodlevy [s]	45
Počet opakování měření	3x
Metoda vyhodnocování měření	integrační
Doba měření [s]	3

Tabulka III

Sumarizace statistických údajů měření obsahu selenu ve vlasech některých skupin lidské populace okresu Ústí n. L.

Soubory <sup>a</sup>	Četnost souboru	Medián [ng.g <sup>-1</sup> ]	F <sub>D</sub> <sup>b</sup> [ng.g <sup>-1</sup> ]	F <sub>H</sub> <sup>c</sup> [ng.g <sup>-1</sup> ]	R <sup>d</sup> [ng.g <sup>-1</sup> ]	L <sub>1</sub> <sup>e</sup> [ng.g <sup>-1</sup> ]	L <sub>2</sub> <sup>f</sup> [ng.g <sup>-1</sup> ]	V <sup>g</sup>
M	150	190,37	158,55	239,02	80,47	207,01	173,73	0
Ž	312	121,31	79,47	174,14	94,67	131,19	111,44	6H
M-A	33	194,42	145,71	251,86	106,15	217,70	171,14	0
M-B	42	228,70	186,92	239,13	52,21	240,67	210,92	0
M-C	21	161,93	83,59	177,60	94,01	209,63	114,25	0
M-D	18	249,09	241,92	263,13	21,21	257,83	235,11	0
M-E	36	159,31	100,92	191,15	90,23	180,39	138,22	0
Ž-A	66	179,53	140,08	217,42	77,34	199,97	153,84	6H
Ž-B	90	132,59	95,08	165,93	70,85	148,42	116,44	0
Ž-C	54	125,45	77,49	160,38	82,89	149,85	95,36	0
Ž-D	48	109,00	64,47	121,98	57,51	125,73	92,26	3H
Ž-E	54	49,07	31,22	90,00	58,78	60,51	27,46	6H

<sup>a</sup> M – sjednocení všech výsledků souborů mužů, Ž – sjednocení všech výsledků souborů žen, M-A – muži, věk do 20 let, M-B – muži, věk 21 až 30 let, M-C – muži, věk 31 až 40 let, M-D – muži, věk 41 až 50 let, M-E – muži, věk nad 50 let, Ž-A – ženy, věk do 20 let, Ž-B – ženy, věk 21 až 30 let, Ž-C – ženy, věk 31 až 40 let, Ž-D – ženy, věk 41 až 50 let, Ž-E – ženy, věk nad 50 let, <sup>b</sup> F<sub>D</sub> – dolní kvartil, <sup>c</sup> F<sub>H</sub> – horní kvartil, <sup>d</sup> R – interkvartilové rozpětí, <sup>e</sup> L<sub>1</sub> – dolní hranice intervalu spolehlivosti, <sup>f</sup> L<sub>2</sub> – horní hranice intervalu spolehlivosti, <sup>g</sup> V – vychýlené hodnoty, H – horní hodnoty souboru

Pro kalibraci bylo připraveno pět standardních kalibračních roztoků ze zásobního roztoku selenu hmotnostní koncentrace 1 mg.cm<sup>-3</sup>. U těchto roztoků byla změřena absorbance a sestrojena kalibrační závislost

$$A = f(c) \quad (1)$$

kde A je absorbance roztoku a c je koncentrace kovu v něm. Při použití této metody je nutné dodržet základní podmínku měření, linearitu závislosti absorbance na koncentraci kovu. Koncentrace selenu v kalibračních roztocích byla volena s ohledem na předpokládaný obsah kovu v mineralizátu tak, aby spl-

Tabulka II

Výsledky měření kalibrační závislosti pro stanovení selenu

Roztok	c [ng.cm <sup>-3</sup> ]	A <sup>b</sup>	RSD <sup>c</sup> [%]
K1 <sup>a</sup>	0	0,001	0,1
K2	2	0,040	0,4
K3	4	0,082	1,5
K4	6	0,112	0,3
K5	8	0,159	0,3
K6	10	0,198	1,9
y <sub>c</sub> <sup>d</sup>	0,012	w <sub>c</sub> <sup>e</sup>	0,63
y <sub>d</sub> <sup>f</sup>	0,024	w <sub>d</sub> <sup>g</sup>	1,26
y <sub>s</sub> <sup>h</sup>	0,045	w <sub>s</sub> <sup>i</sup>	2,29

<sup>a</sup> K1 – slepý roztok, <sup>b</sup> A – absorbance roztoku, <sup>c</sup> RSD – relativní směrodatná odchylka, <sup>d</sup> y<sub>c</sub> – kritická úroveň absorbance, <sup>e</sup> w<sub>c</sub> – kritická úroveň koncentrace [ng.cm<sup>-3</sup>], <sup>f</sup> y<sub>d</sub> – limita detekce absorbance, <sup>g</sup> w<sub>d</sub> – limita detekce koncentrace [ng.cm<sup>-3</sup>], <sup>h</sup> y<sub>s</sub> – mez stanovitelnosti absorbance, <sup>i</sup> w<sub>s</sub> – mez stanovitelnosti koncentrace [ng.cm<sup>-3</sup>]

ňovala uvedenou podmínku. Vhodný rozsah a linearitu kalibrace poskytly standardní roztoky o hmotnostních koncentracích 2, 4, 6, 8 a 10 ng selenu v 1 cm<sup>3</sup> roztoku. Pro nastavení analytické nuly přístroje bylo použito slepého roztoku. Za podmínek uvedených v tabulce I byly proměřeny absorbance slepého roztoku a kalibračních roztoků a sestrojena kalibrační závislost. Výsledky kalibračních měření byly zpracovány lineární regresí, byla určena kritická úroveň, limita detekce a mez stanovitelnosti. Hodnoty absorbance kalibračních roztoků a charakteristiky kalibrační závislosti jsou uvedeny v tabulce II. Všechny vzorky byly proměřeny třikrát. Kontrola správné laboratorní praxe byla prováděna vřazováním vzorků certifikovaného referenčního materiálu lidských vlasů GBW 07601.

## Výsledky a jejich zpracování

Z výsledků měření byl počítán aritmetický průměr, směrodatná odchylka a interval spolehlivosti (na hladině významnosti  $\alpha = 0,05$ ). Informace obsažené v těchto datech však mají jen malou vypovídací hodnotu. Proto byly výsledky sjednoceny a uspořádány podle pohlaví probandů a podle věku. Takto vytvořené soubory dat byly zpracovány za použití statistického aparátu<sup>13,14</sup>. Jednotlivé kroky byly voleny tak, aby umožnily odhalit zákonitosti a statistické odlišnosti, které jsou v těchto datech obsaženy. Soubory dat byly podrobeny testování – průzkumové analýze, analýze rozdělení dat, byly provedeny odhady momentových charakteristik a tvarových charakteristik.

Protože u některých souborů dat byly nalezeny vybočující hodnoty a nebyl potvrzen předpoklad normality, byly momentové charakteristiky vyjádřeny mediánem, horním a dolním kvantilem, interkvartilovým rozpětím a intervalem spolehlivosti. Každý soubor je navíc charakterizován uvedením počtu odlehlých hodnot.

Sumární statistické údaje jsou vyjádřeny v tabulce III. Pro porovnání těchto souborů dat bylo použito metody testování statistických hypotéz neparametrickými testy.

## Závěry

Srovnávací analýza souborů dat umožnila rozhodnout o rozdílech v obsahu selenu u jednotlivých skupin sledovaných osob okresu Ústí nad Labem. Můžeme konstatovat, že:

- Ženy, které byly v této práci sledovány, mají (s výjimkou věkové kategorie do 20 let) obecně nižší obsah selenu než stejná věková kategorie mužů.
- V souboru dat žen mají nejnižší koncentraci selenu ve vlasech ženy věkové kategorie nad padesát let, nejvyšší potom ženy do dvaceti let.
- V souborech dat mužů byl zjištěn nejvyšší obsah selenu ve vlasech u věkové skupiny 41 až 50 let, nejnižší naopak u věkové skupiny 31 až 40 a nad 50 let.
- Za kritickou hodnotu koncentrace selenu ve vlasech je považována hodnota 0,1 mg.g<sup>-1</sup> a nižší<sup>15</sup>. Porovnáme-li s tímto výsledky námi získané, je zřejmé, že příjem selenu ve sledované skupině žen nad 50 let je nedostatečný. Skupina žen 41 až 50 let se k této kritické hodnotě přibližuje.

Jestliže soubory dat vytvoříme pouze rozlišením pohlaví probandů a využijeme-li dříve získaných výsledků<sup>16</sup> z okresů Chomutov a Česká Lípa a s těmito výběrovými soubory dat provedeme srovnávací analýzu, zjistíme, že námi získané výsledky skupiny žen se shodují s hodnotami selenu ve vlasech žen z obou oblastí (Chomutov a Česká Lípa) a mužů z oblasti Česká Lípa. Sledovaná skupina mužů z okresu Ústí nad Labem má vyšší obsah selenu ve vlasech než skupina mužů z oblasti Chomutov<sup>16</sup>.

*Autoři děkují magistrátu města Ústí nad Labem za finanční podporu.*

## LITERATURA

- Száková J., Mader P.: Chem. Listy 88, 164 (1994).
- Dědina J., Fara M., Kolihová D., Korečková J., Musil J., Sychra V., Plško E.: *Vybrané metody analytické atomové spektrometrie*. ČSS, Praha 1987.
- Schmidt F. J., Royer J. L.: Anal. Lett. 6, 17 (1973).
- Blazheva T., Delijska A., Russeva E., Havezov I.: Comm. Chem. (Sofia) 22, 2 (1989).
- Thompson K. C., Thomerson D. R.: Analyst (London) 99, 595 (1974).
- Welz B., Melcher M.: Anal. Chem. 57, 427 (1985).
- Gelman A. L.: Varian AA Instruments at Work. Firemní materiál AA-44, 1985.
- Xi C., Huimin J., Guoan H.: Varian Instruments at Work. Firemní materiál AA-82, 1988.
- Erlick K. A., Horowitz A. J.: Varian AA Instruments at Work. Firemní materiál AA-56, 1986.
- Guo T., Erler W., Schulze H.: Atom. Spectrosc. 11, 24 (1990).
- Barlow P. J., Sidani S. A., Lyons M.: Sci. Total Environ. 42, 121 (1985).
- Šulženková J.: *Diplomová práce*. Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem 1997.
- Cihlár J., Pelikán Š.: *Statistika*. Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem 1987.
- Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus, Praha 1994.
- Magos L., Berg G. G.: *Biological Monitoring of Toxic Metals*. Plenum Press, New York 1988.
- Nastoupilová J.: *Diplomová práce*. Univerzita J. E. Purkyně, Ústí nad Labem 1999.

**D. Frišová and J. Rejnek** (Department of Chemistry, Pedagogical Faculty, J. E. Purkyně University, Ústí nad Labem): **Monitoring of Selenium Content in Human Organism by Atomic Absorption Spectrometry**

Although selenium ranks among essential elements, but the range between concentrations with favourable and toxic effects on the human organism is relatively narrow. Determination of selenium in human hair was performed by AAS and supplemented by the hydride technique. By analysis of the obtained data it was found that the selenium content in female hair is generally lower than that in males of the same age category. The highest content was found in males under 50, the lowest in females over 50.