



# LUND UNIVERSITY

## Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material

Pallon, Jan; Pakarinen, Pirjo; Malmqvist, Klas; Hong-Kou, Li; Carlsson, Lars-Eric; Johansson, Gerd; Akselsson, Roland

1984

[Link to publication](#)

### *Citation for published version (APA):*

Pallon, J., Pakarinen, P., Malmqvist, K., Hong-Kou, L., Carlsson, L.-E., Johansson, G., & Akselsson, R. (1984). *Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material*. (Slutrapport för projektet ASF Dnr: 80/19, 81-0150, april 1984; Vol. LUTFD2/(TFKF-3033)/1-33/(1984)). Avdelningen för Kärnfysik, Lunds Tekniska Högskola, Lunds universitet.

*Total number of authors:*

7

### **General rights**

Unless other specific re-use rights are stated the following general rights apply:

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Read more about Creative commons licenses: <https://creativecommons.org/licenses/>

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

LUND UNIVERSITY

PO Box 117  
221 00 Lund  
+46 46-222 00 00

LUTFD2/(TFKF-3033)/1-33/(1984)

**SLUTRAPPORT FÖR PROJEKTET:**

**Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material.  
ASF Dnr.: 80/19, 81-0150, april 1984.**

**Jan Pallon, Pirjo Pakarinen, Klas Malmqvist, Li Hong-Kou,  
Lars-Eric Carlsson, Gerd Johansson och Roland Akselsson**

**Avdelningen för Kärnfysik, Lunds Tekniska Högskola,  
Sölvegatan 14, 223 62 LUND**

## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|   | Sid |
|---|-----|
| Sammanfattning  | 1   |
| 1. Inledning  | 5   |
| 2. PIXE-metoden för analys av biologiskt material               | 6   |
| 3. Anförskaffade och utvecklade resurser                        | 8   |
| 3.1. Teknisk utrustning   | 8   |
| 3.2. Utvecklade datorprogram                                    | 9   |
| 4. Standardmetodik för preparation av biologiskt material       | 10  |
| 4.1. Principer  | 10  |
| 4.2. Detaljerad beskrivning av preparationsmetoder              | 12  |
| 4.3. Tester och resultat  | 17  |
| 5. Analyserade provtyper  | 19  |
| 5.1. Blod   | 19  |
| 5.2. Lever och njure  | 20  |
| 5.3. Faeces   | 20  |
| 5.4. Urin   | 21  |
| 5.5. Analys av urin efter selektiv koncentreringsmed Chelex-100 | 21  |
| 5.6. Hår  | 22  |
| 5.7. Naglar   | 23  |
| 5.8. Mikrostråleanalys av dermatologiskt material               | 24  |
| 6. Proteinfraktionering   | 25  |
| 6.1. Allmänt  | 25  |
| 6.2. Isoelektrisk fokusering                                    | 25  |
| 6.3. Gelfiltrering  | 26  |
| Referensgrupp   | 30  |
| Referenser  | 31  |

SAMMANFATTNING AV SLUTRAPPORT FÖR PROJEKTET: Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material, ASF Dnr.: 80/19, 81-0150, april 1984.

Jan Pallon, Pirjo Pakarinen, Klas Malmqvist, Li Hong-Kou, Lars-Eric Carlsson, Gerd Johansson och Roland Akselsson.

Inledning.

Avsikten med detta projekt har varit att utveckla väl fungerande rutiner för PIXE-analys av biologiska prov med anknytning till exponering i arbetsmiljösituationer. Kravet på metoderna är att de tillvaratar PIXE-metodens fördelar (multielementanalys, små prov, snabb analys, låga detektionsgränser) och samtidigt förändrar eller förstör så lite som möjligt av den information som finns i de ursprungliga biologiska proven under de behandlingssteg som är nödvändiga före analysen.

Ett antal standardrutiner har utvecklats med vilka man kan hantera prov som blod, lever, njure och liknande.

Direkt analys av enskilda hårstrån och nagelprov kan göras utan förbehandling. Avsikten är att dessa vävnader till viss del skall tjäna som personliga monitorer för exponering. För detta ändamål, liksom för studier av elementprofiler i hud har även protonmikrostråleteknik utnyttjats.

Försök med selektiv koncentrerings av vissa ämnen i urin liksom separation av serumproteiner har gjorts. Avsikten med det sistnämnda är att finna om metallbindande protein kan användas som exponeringsindikator.

I det följande redogörs kortfattat för principerna, de olika prepareringsmetoderna och vilka provtyper de tillämpats på. De hänvisningar till figurer som görs syftar till figurer i slutet av rapporten.

PIXE och dess tillämpning på biologiska material.

PIXE (Particle Induced X-ray Emission) är en i Lund utvecklad spårelementanalysmetod av multielementkaraktär. Principen är att joner med en energi av 1 - 5 MeV får träffa ett prov varvid karaktäristisk röntgenstrålning utsänds. Kvantitativ analys är möjlig för element tyngre än aluminium. Detektionsgränserna i absoluta mått ligger i intervallet 0.1 - 10 ng medan koncentrationsdetektionsgränserna är av storleksordningen 0.5 ppm som bäst. Dessa värden uppnås vid rutinanalyser på 5 till 10 minuter.

Normalt sker analysen i vakuum men kan även ske i speciella kammare där protonstrålen via ett plastfönster extraheras in i en atmosfär av t ex He.

Proven som analyseras måste vara torra och tåla vakuum. De bör vidare vara antingen tunna ( $< 1 \text{ mg/cm}^2$ ) eller tjocka ( $> 10 \text{ mg/cm}^2$ ). Det sistnämnda kravet är för att underlätta kvantifieringen. Om tjocka prov analyseras kan man med en

kompletterande metod (Particle Induced Gamma-ray Emission, PIGE) även bestämma halter av B, F, Na, Mg, och Al.

Spårämnen i biologiskt material förekommer ofta i så låga halter att förkoncentrering är nödvändig. Olika metoder för detta har studerats och stor vikt lagts vid att undersöka metodernas koncentrationsförmåga, deras benägenhet att orsaka kontamination eller förluster hos provet. Dessa tester har gjorts dels på standardprover med känt elementinnehåll, dels på "realistiska prov" med anknytning till arbetsmiljö eller medicin. Vidare har ett antal metoder för provpreparering testats och utvecklats, liksom datorprogram för snabb utvärdering av erhållna resultat.

#### Metoder för provberedning.

Framställning av target sker på två sätt;

a) pipettering av 20  $\mu$ l vätskeformiga prov direkt på tunna (2  $\mu$ m, 200  $\mu$ g/cm<sup>2</sup>) folier följt av indunstning i rumstemperatur.

b) pressning av pellets med 5 mm diameter utgående från homogeniserat, malt material. Proven är i allmänhet först frystorkade, ibland även inaskade.

Metod a) är enkel och snabb men ger ej optimala detektionsgränser. Metod b) kräver mer material (> 300 mg). Proven blir då tjocka och simultant med PIXE kan även PIGE-analys göras för bestämning av B, F, Na, Mg och Al.

#### Koncentreringsmetoder.

Standardmetoden för koncentrering av biologiskt material är frystorkning vilken avlägsnar vattnet ur provet och därmed koncentrerar detta, hur mycket beroende på vatteninnehållet. Resterna kan sedan antingen koncentreras ytterligare med någon annan metod eller tjäna som utgångsmaterial för provberedning. (Fig 3.1)

En ytterligare koncentrering kan erhållas med lågtemperatur-inaskning (LTA), där genom mikrovågor exciterad syrgas bildar atomärt syre vilket får reagera med de organiska komponenterna i provet. Inaskning sker vid en temperatur av storleksordningen 100 grader. Koncentreringsfaktorn kan variera mellan 2 och 200 gånger beroende på andelen organisk substans. Förluster av vissa ämnen kan förekomma, bl a S, Cl, Br, Hg och Se. (Fig 3.3)

Ett annat viktigt steg som hör samman med koncentrering men ej bidrar till denna är homogenisering/malning. För att inaskning ska vara effektiv krävs bl a att provet har stor yta och/eller består av små komponenter. Inför pelletpressning krävs att provet är finfördelat och homogeniserat.

Detta kan åstadkommas i en sk "percussion ball homogenizer". Provet placeras i en teflonbehållare tillsammans med en kula och skakas maskinellt så att malning/finfördelning sker. I många fall krävs att provet först kylts ned i flytande kväve för att bli sprött. (Fig 3.2)

### Speciella metoder.

En metod för selektiv koncentrerings av vissa ämnen är jonbyteskromatografi med Chelex-100 i ammoniumform. Vätskor med höga salthalter kan med fördel avsaltas/koncentreras med denna teknik. Provet får passera en kolonn med jonbytaren varvid framför allt metaller bindes till denna. Genom ett speciellt elueringsförfarande kan sedan metallerna samlas upp i en liten fraktion (stor koncentrationsfaktor). Ämnen som hittills kunnat koncentreras är Mn, Ni, Cu, Zn, Co, Mo, Cd och Pb.

Flera metoder för proteinseparation har undersökts och den lämpligaste befunnits vara gelfiltrering med Sephadex G-200 och en tris-acetatbuffert. Vid separationen transporteras provet av ett buffertflöde genom en pelare packad med gelmaterial. Under denna transport sker en uppdelning av proteiner så att de största kommer igenom snabbast medan fria joner och molekyler kommer sist. Metoden är skonsam, dvs det är liten risk att löst bundna metaller ska lossna från proteinen. Genom en noggrann tvättprocedur kan separationen också göras tillräckligt kontaminationsfri. Proteinuppdelningen är relativt grov men kan kompletteras med en efterföljande mer högupplösande separationsteknik.

### Detektionsgränser

Detektionsgränserna för tjocka frystorkade prov kan illustreras av fig 5.1.1, där gränserna går ned till  $< 1$  ppm i provet. För inaskade prov ligger i allmänhet detektionsgränserna i provet något högre beroende på en elementmässigt tyngre matris. Höga halter av bl a Na i provet ger upphov till en störande bakgrund vilken försämrar känsligheten. Hur låga detektionsgränserna blir i det enskilda fallet bestäms av provets vattenhalt, mängden nedbrytbart material liksom förekomsten av störande ämnen. (Fig 5.1.2) Användandet av inaskning förbättrar oftast detektionsgränserna avsevärt, men introducerar också ett ökat osäkerhetsmoment i kvantifieringen och ställer högre krav på noggrannhet vid preparering. I många fall är frystorkning en tillräcklig koncentreringsmetod.

### Resultat och exempel på analyserade provtyper.

Med standardmetoden har pellets tillverkats och analyserats av blod (hel, serum, plasma). P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb och Sr detekteras nästan alltid, medan Se uppträder i vissa prov. Däremot detekteras ej Cr, Ni eller Co. (Fig 5.1.1 och 4.3.1)

Vid proteinseparation med gelfiltrering av blodserum har reproducerbara fördelningar av P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn och Br med molekylstorlek uppmätts. Fe, Cu och Zn har maxima på de ställen där metallbindande protein som transferrin, ceruloplasmin och albumin uppträder, S (och delvis P) följer proteinmängden ganska väl. Ämnen som K, Ca och Br uppträder som fria joner eller små molekyler.

Med standardmetoden frystorkning, homogenisering och pellet-

pressning har bl a lever, njure faeces analyserats. (Fig 5.2.1, 5.2.2, 5.4)

Analys av pipetterat eller pelleterat prov av urin ger mager information (fig 5.3). Avsaltning/koncentrering med Chelex-100 sänker detektionsgränserna kraftigt och bl a har Ni, Cu, Zn, Mo (och Pb) mätts i urin från icke-exponerade personer. (Fig 5.5.1, 5.5.2)

Hår analyseras direkt i en speciell kammare där hårstrået flyttas i längdsriktningen så att en elementfördelning längs med provet erhålls. Huruvida sådana fördelningar kan användas som personlig exponeringsmonitor är inte helt utrett, yttre kontaminering, biologiska processer i håret liksom urlakning av element vid tvätt försvårar tolkningen av resultaten. En enkel metod att skilja på ytfördelningar och volymsfördelningar i håret har utvecklats och kan vara till hjälp vid tolkningen av resultaten. (Fig 5.6, 5.8.1)

Naglar kan liksom hår analyseras direkt, men även här föreligger problem med ytkontaminering, vilken dock med en lämplig provtagningsteknik bör kunna reduceras.

Hudsnitt har studerats med protonmikrostråle, detektionsgränserna är 10 - 100 ggr lägre än vid analys med elektronmikroprob, men den spatiala upplösningen är inte lika god, (5 - 10  $\mu\text{m}$  hos protonmikrostråle). Variation av K, Ca liksom av vissa metaller i ett djupsnitt av hud har undersökts och funnits överensstämma väl med motsvarande elektronmikroprob-analyser. (Fig 5.8.3)

SLUTRAPPORT FÖR PROJEKTET: "Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material", April 1984

Jan Pallon, Pirjo Pakarinen, Klas Malmqvist, Li Hong-Kou, Lars-Eric Carlsson, Gerd Johansson och Roland Akselsson.

1. INLEDNING

Vår arbetsmiljö har gradvis blivit alltmer komplicerad samtidigt som kraven på en god arbetsmiljö växer. Detta medför ett ökat behov av analyser inom de forskningsområden där samband mellan exponering och hälsoeffekter studeras. Det finns en stark önskan och en svag trend till övergång till biologisk provtagning för att få billigare och bättre övervakning av hur den enskilde arbetaren exponeras för kemiska agens i arbetsmiljön. En sådan övergång skapar nya behov av goda analysmetoder för biologiskt material. PIXE-metoden erbjuder unika potentiella möjligheter till multielementanalys av biologiska prov till låga kostnader.

Många arbetsmiljöer är idag sådana att man utan forskning och/eller analyser kan säga att det är nödvändigt att satsa på eliminationsteknik. Men det är inte alltid klart hur denna skall se ut eftersom man vid eliminationsåtgärder måste iakttaga försiktighet så att inte andra, kanske större risker införes. För att kunna göra riktiga bedömningar och prioriteringar av vilka problem som ska angripas och hur detta ska ske krävs kunskaper om samband mellan dos och effekt samt mellan dos och respons. Sådana kunskaper nås genom epidemiologiska studier och genom studier av toxiska agens öde i organismen. I det senare fallet försöker man ofta konstruera goda kinetiska modeller där substansers absorption, transport, metabolism, fördelning, verkningsmekanismer och elimination beskrivs. Sådana modeller är också grundläggande för biologisk provtagning.

Vår övergripande målsättning är att skapa väl fungerande analysrutiner för biologiska prov som optimalt utnyttjar PIXE-metodens egenskaper att snabbt bestämma många element i små prov till låg kostnad. Rutinerna ska ha en inriktning mot analys av biologiskt material insamlat i relevanta arbetsmiljösituationer. Detta projekt är ett första steg mot denna målsättning.



## 2. PIXE-METODEN FÖR ANALYS AV BIOLOGISKT MATERIAL

Particle Induced X-ray Emission (PIXE) är en spårelementanalysmetod som utvecklades vid vår institution omkring 1970, ref. (1). Metoden utnyttjar laddade partiklar för att producera karakteristisk röntgenstrålning, som ger besked om vilka grundämnen som förekommer i ett prov. Metoden är kvantitativ för element tyngre än fosfor, med detektionsgränser i intervallet 0.1 - 10 nanogram. (1 ng=0.000 000 001 g). Med mikrostråleteknik kan mängder ner mot  $10^{-16}$  g bestämmas i prov av en kvadratmikrometers storlek.

En speciell bestrålningskammare för biologiska prov finns utvecklad vid institutionen (ref. (2)). Normalt bestrålas proven i vakuum vilket ibland kan medföra nackdelar, varför i stället partikelstrålen i denna kammare extraheras genom ett tunt folium ut i t.ex. helium vid atmosfärstryck. De relativt värmekänsliga biologiska proven kan härvid kylas med en gasström riktad mot bestrålningsstället.

Det fordras vidareutveckling av metoden innan optimal analys av biologiskt material kan utföras. Den relativt stora mängd material (organisk matris) som ofta finns i obehandlade biologiska prov ger upphov till ökad icke-informativ bakgrundsstrålning. Detta medför i sin tur försämrade detektionsgränser för ett flertal element. Medan de absoluta detektionsgränserna för PIXE-metoden är mycket låga (ng), är således detektionsgränserna uttryckta i koncentration inte lika goda ( $\lesssim$  ppm).

Ett sätt att förbättra detektionsgränserna uttryckta i koncentration av ursprungsmaterialet är att avlägsna en större del av det material som ger upphov till den höjda bakgrundsstrålningen. Eftersom ett biologiskt prov till mycket stor del består av vatten och organiskt material är det naturligt att på något sätt försöka avlägsna denna del av provet och p.s.s. åstadkomma en förkoncentrering av de olika elementen i provet. Det finns olika metoder för att koncentrera, var och en med för- och nackdelar. De grundläggande kraven på en sådan metod är: a) inga förluster av intressanta element, b) god koncentrationsfaktor och c) liten risk för kontaminering med de element som skall mätas.

Ett annat sätt är att med separations/anrikningsteknik isolera sådana komponenter av provet i vilka spårämnen kan förväntas föreligga i högre halter, och sedan analysera dessa. Förutom en ökad känslighet tillför en sådan

teknik även information om provets biologiska/kemiska egenskaper, vilket kan vara mycket värdefullt.

En stor del av arbetet inom projektet går ut på att utveckla metodik väl lämpad att rutinnässigt användas för provpreparering av biologiskt material inför PIXE-analys.

### 3. ANFÖRSKAFVADE OCH UTVECKLADE RESURSER

#### 3.1. Teknisk utrustning

För att avlägsna vattnet ur vävnadsprov eller kroppsvätskor färdigställdes i samband med projektets start en frystork. Principen framgår av fig 3.1 och medger torkning av ett stort antal prov samtidigt med möjlighet att arbeta vid låg temperatur under torkningsprocessen genom extern kylning t.ex. med flytande kväve.

Före och efter torkningsproceduren kan det vara fördelaktigt eller rentav nödvändigt att finfördela och blanda (homogenisera) materialet dels för att underlätta det efterföljande behandlingssteget, dels för att förbättra representativiteten i analysen. För att denna tillblandning inte skall kontaminera provet har en speciell homogenisator inköpts (Braun Mikrodismembrator II) och principen framgår av fig 3.2. I en behållare, t.ex. av teflon, placeras materialet tillsammans med en kula av teflon eller av något tyngre material, varefter behållaren skakas med 50 Hz och variabel amplitud så att malning och blandning sker. Om mjuka eller vätskerika material behandlas kan nerkyllning ske i flytande kväve för att skapa en hårdare och sprödare struktur inför malningen.

Ett ytterligare behandlingssteg innefattar avlägsnandet av den organiska delen av provet. Förbränning i ugn vid ett antal hundra graders temperatur och tillsats av starka syror är exempel på sådana processer. En teknik med flera fördelar är emellertid lågtemperaturföraskning. Från Upsala Elektronik har en anläggning inköpts (se fig 3.3) som kan förbränna den organiska delen vid en temperatur under 100 grader C. Kapaciteten är c:a 20 till 60 prov per dygn beroende på provtyp.

Vid arbete med vätskeformiga material tillsättes normalt en inre standard för att kontrollera ev. förluster av material under preparationsarbetet. Om man arbetar med fasta prov är denna tillsats svår att utföra varför det är nödvändigt med precisionsvägningar. En elektronisk mikrogramsvåg, vilken underlättar vägningsarbetet betydligt, har anförskaffats för medel utanför detta projekt .

För att bringa det slutligen erhållna materialet på en form lämplig för analys pressas ibland det frystorkade eller inaskade materialet till en pellet. För sådan pressning finns dels några mindre manuella pressar, dels har nyligen en

hydraulisk press färdigställda, med vilken reproducerbar pressning kan ske. Som pressytor används höglanspolerad hårdmetall som förväntas ge försunbara kontaminationsbidrag till provets yta.

För kemiskt arbete finns sedan tidigare resurser i form av kemilaboratorium och utrustning för arbete med spårelement i ren miljö. Bland annat finns en renluftsbänk med sterilt luftflöde att användas vid mindre arbetsmoment, för större och mer krävande arbeten i fråga om renhet finns ett så kallat renluftsrum där all lufttillförsel sker genom filter, varvid en mycket god, dammfri miljö erhålls. Vidare finns en anläggning för framställning av extremt rent vatten, så kallat Milli Q (Millipore) vatten (i fortsättningen förkortat MQ vatten), vilken med en serie av kolonner jonbyter och renar inkommande destillerat vatten till vatten av mycket hög teknisk kvalitet.

### 3.2. Utvecklade datorprogram

För rationell PIXE-analys är det nödvändigt att ha tillgång till ett väl fungerande automatisk datautvärderingsprogram. Ett bra sådant, HEX, finns sedan länge på institutionen och används för att utvärdera analyser av de hittills förhärskande tunna proven. Arbete har därför utförts för att koppla ihop detta stora program med ett annat datorprogram, TJOCKT, som sköter beräkningar av koncentrationer för tjocka prov. Samtidigt med PIXE-analysen registreras den gammastrålning som bildas p.g.a. kärnreaktioner i provet (så kallat PIXE, ref. (3)). Denna strålning kan användas för att bestämma de lätta element, t.ex. Na, som förekommer i höga halter i inskade prov. Kännedom om halterna av de lättare ämnena förbättrar dessutom möjligheterna att programmet TJOCKT skall fungera bra. En utveckling av datorprogrammet har gjorts så att mängderna av de lätta elementen registreras automatiskt samtidigt som HEX användes för utvärdering av PIXE-resultat.

För att kunna lagra och hantera de stora datamängder som genereras vid PIXE-analysen har ett speciellt programpaket, HEKS-UT byggts upp. Det tillåter snabb framtagning från massminne av ett godtyckligt provs resultat att användas för utskrift på terminal eller skrivare. För att snabbt och enkelt kunna göra jämförelser mellan olika prov representerande olika provbehandlingsmetoder, olika prov i en mätserie etc, har programpaketet byggts ut med funktioner som skalning, numerering, division med annat provs resultat, subtraktion av blankspektrum osv. Resultaten kan åskådliggöras såväl i grafisk form med radskrivarplottar, som i tabellform. Programmet styrs genom användandet av enkla kommandon. Programpaketet har blivit till god hjälp vid utvärderingen av de olika provprepareringarnas egenskaper.

#### 4. STANDARDMETODIK FÖR PREPARATION AV BIOLOGISKT MATERIAL

##### 4.1. Principer

###### 4.1.1. Allmänt

För att ett prov skall vara lämpligt för PIXE-analys i vakuum ställs följande krav: provet skall vara torrt, det ska tåla vakuum, det ska antingen vara så tunt (mindre än  $1-2 \text{ mg/cm}^2$ ) att protonstrålens energi endast ändras försumbart vid passage genom provet, eller så tjockt att strålen helt stoppas (mer än  $10 \text{ mg/cm}^2$ ). Analyseras ett tjockt prov måste detta vara homogent, så att den bestrålade delen ( $\text{ca } 0.5 \text{ cm}^2 * 10 \text{ mg/cm}^2$ ) är representativ för hela provet. När det gäller prepareringsmetoder kan man skilja mellan koncentrationsförfarande och provframställningsmetod. De kan inte kombineras fritt utan är avhängiga av varandra, provmaterialets egenskaper och mängd. Använda koncentrationsmetoder är indunstning på folie, frystorkning, lågtemperaturinaskning och jonbyteskromatografi. Provframställning sker på två sätt, genom pipettering på folie (tunna prov) eller pressning av pellets (tjocka prov).

###### 4.1.2. Val av metod, jämförelse av prestanda

En schematisk uppställning av preparationsmetoder för vätskeformiga prov (typ plasma, saliv, urin, proteinfractioner) finns i tabell 4.1.1, för fasta prov (typ lever, njure, faeces) i tabell 4.1.2.

Följande kan sägas om de olika metoderna:

###### Pipettering

- (+) pipettering är lätt, snabbt och kontaminationsfritt
- (-) pipettering är ibland svårt, salter i kroppsvätskor ger vid indunstning kristallstrukturer, i vilka man får okontrollerad röntgenabsorption vid analys, och därmed en underskattning av elementhalterna
- (-) vissa vätskor, tex proteinlösningar, buffertlösningar avdunstar endast långsamt och ger amorfa bildningar.
- (-) detektionsgränserna är måttliga pga den begränsade mängden material

###### Frystorkning

- (+) fungerar bra, kräver ringa övervakning
- (-) tar tid

### Lågtemperaturfaskning

- (+) förbränning av organiskt material ger en viktreducering (2-20) ggr och en anrikning av spårämnen
- (+) askan är oftast lätt att pressa till pellets
- (-) tar lång tid, mer än 8 timmar och en begränsad mängd material
- (-) förluster av Cl, S, Br, Hg, Se
- (-) en del material kan bränna fast i glasskeppet
- (-) kvantifieringen osäkrare

### Homogenisering

- (+) fungerar bra, ger snabbt (1-5 minuter) och kontaminationsfritt ett finfördelat homogent pulver.

### Pelletpressning

- (+) ger ett tjockt prov vilket medför goda detektionsgränser
- (+) tjockt prov tillåter samtidig bestämning av F, B, Na, Li, Mg och Al med PIGE
- (-) tar längre tid
- (-) fordrar mer provmaterial
- (-) materialet måste först malas/homogeniseras
- (-) fler arbetsmoment ger större kontaminationsrisk
- (-) proteinerika material tenderar att kleta fast vid pressning

Utgående från provtyp väljer man alltså preparationsmetod med faktorerna ovan i minne.

## 4.2. Detaljerad beskrivning av preparationsmetoder

### 4.2.1. Pipettering och foliemontering

#### Allmänt

Den enklaste formen av provframställning för vätskeformiga prov utgörs av direkt pipettering på ett tunt folie. Pipettering är snabb, kan göras relativt noggrant och reproducerbart (pipettens kvalitet är avgörande) och även kontaminationsfritt om välutvecklade tvättrutiner används och dammfria torkningsutrymmen finns.

För PIXE-analysen fordras av ett pipetterat prov att det är relativt homogent och begränsat till en yta av mindre än  $0.5 \text{ cm}^2$ . Vidare bör foliet vara så tunt och rent som möjligt för att hålla bakgrunds-nivån låg. Foliets mekaniska egenskaper skall vara sådana att det tål både kemiska angrepp (svagare eller utspädda syror) och bestrålning i vakuum vid själva analysen.

Ett folie som väl uppfyller kraven är Kimfol, ett  $1.5 \mu\text{m}$  tjockt plastfolie. Det är mycket rent, ger relativt lite bakgrundsstrålning och tål lång bestrålning (oftast bättre än själva provet). Man kan pipettera 7 M salpetersyra utan att foliet störs. En nackdel är att filmen är hydrofob, vilket gör att många lösningar som droppats på foliet drar ihop sig i små klumpar istället för att torka till ett väl utbredd prov. För att motverka detta kan filmen göras hydrofil, se nedan.

#### Montering och tvättning

Ett omedelbart praktiskt problem vid användandet av Kimfol är hanterandet av den  $1.5 \mu\text{m}$  tunna filmen, eftersom elektrostatiska krafter vid första bästa tillfälle skrynklar ihop filmen och gör den omöjlig att använda. Filmen finns i rullform och skall monteras över glaslösa diaramar i formatet  $18 \times 24 \text{ mm}^2$ . En väl fungerande teknik för detta, samt för tvättning av filmen före pipettering har utvecklats:

En längd om c:a 20 cm av foliet dras ut och placeras ovanpå ett vanligt pappersark och ännu ett ark läggs ovanpå detta. Pga den elektrostatiska vidhäftningen ligger nu foliet plant och stilla mellan de två arken. Folielängden klipps av, och pappersarken med mellanliggande folie klipps nu lätt i c:a  $2.5 \times 3 \text{ cm}$  stora bitar. En bägare med ungefär 7 cm bredd fylls med avjonat vatten. Man tar en foliesandwich med pincett, avlägsnar det ena av de två pappersarken och håller resten omedelbart ovanför vattenytan med foliet närmast. Genom elektrostatisk attraktion mellan foliet och i vattnet uppkomma

spegelladdningar hoppar foliet över och lägger sig plant på vattenytan. Eventuella veck kan lätt rätas ut. Man för ned den ena av diaramshalvorna i vattnet med pincett, fångar upp foliet så att det fäster vid ramen och täcker över hålet. Ett plant folie erhålls. För att fixera detta vid diaramen används värmesvetsning; först fästes foliet i de fyra hörnen, därpå kan efterjustering av foliespänningen ske med små kompletterande svetsningar på den folietäckta delen av ramen. Med denna metod erhålls mycket väl spända folier.

För att avlägsna eventuella smutspartiklar sköljs såväl de monterade folierna som motsvarande diaramar, först med MQ-vatten och sedan med spektrografiskt ren sprit och får torka i renrum. Den sammanlagda tiden för montering och tvättning blir, om man gör större satser, ett par minuter per prov. Med tanke på den goda mekaniska uppspänningen och möjligheten att tvätta folierna efter montering, är denna metod att föredra framför montering genom limning, där man ej lika lätt kan efterjustera foliespänningen eller tvätta folierna efter montering utan att riskera att folierna lossnar alternativt förorenas av limmet.

#### Hydrofilbehandling

På foliet droppas 50 µl 25% NaOH, och sugs bort efter 7 minuter. Foliet sköljs noggrant med MQ-vatten, man pipetterar på 50 µl 0.02% polyvinylpyrrolidon (PVP), väntar 2 minuter, suger bort vätskan och sköljer igen med MQ-vatten. Mängden vätska har valts så att den hydrofila ytan begränsas till ett område mindre än den strålyta som används vid PIXE-analysen. Efter torkning är foliet klart att användas. Tekniken ovan har utvecklats inom projektet efter en metod beskriven i ref. (4), och anpassats så att den uppfyller våra behov.

Vid pipetteringen används pipetter med fast volym och engångspetsar, vilka tidigare har syradiskats. En vanlig pipetteringsvolym är 20 µl. För att ej kontaminera proven under och efter pipettering sker både arbetet och lufttorkningen i renluftsrum.

#### 4.2.2. Frystorkning

##### Allmänt

Frystorkning innebär att ett prov innehållande vätska torkas genom att provet i fryst tillstånd får befina sig i ett utrymme med så lågt tryck att den frusna vätskan direkt övergår i gasfas utan att passera vätskefasen (sublimering). Det frystorkade provet har en lätt, ofta lucker konsistens, vilket är en bra utgångspunkt för vidare bearbetning. Ju snabbare infrysningen av provet kan ske, desto mindre iskristaller bildas och desto mer bevaras den



biologiska och fysiska strukturen. För våra ändamål är inte utseendet av den biologiska strukturen av samma intresse som vid tex elektronmikroskopering, men en kommande utveckling med utnyttjande av s k protonmikrostråle ger möjlighet till ytstrukturanalys.

Förluster av spårämnen bundna till flyktiga molekyLföreningar kan ske under frystorkningen, men är små jämfört med förluster vid torkning i värmeugn. Material kan dock ibland försvinna genom att små mikroexplosioner sker i provet under frystorkningen då inestängda gaser plötsligt ger sig iväg. En teknik att minska sådana förluster har provats i ett fall, se nedan.

#### Tillvägagångssätt

Proven fryses i frysskåp vid -32 grader C, antingen i s k Petriaskar eller i lutande provrör (för snabb torkning bör proven ha maximal fri yta). De är övertäckta med plastfilm för att skyddas mot kontaminering. Vid transport från frysskåp till frystork används en termosväska vilken i förväg kylts ned med flytande kväve (LN). Proven riskerar därmed ej att tina under transporten utan kommer att ytterligare kylas ned.

Frystorken evakueras med en oljekapselpump via en kylfälla fylld med LN. Trycket är då ca 0.1 torr. Under torkprocessen stiger först trycket något pga gasavgång från proven beroende på en viss upptining av dessa. Temperaturhöjningen begränsas dock av att proven genom sublimation hela tiden förlorar sina energirikaste vattenmolekyler och därmed kyls av. Den bildade vattenången stöter på sin väg mot pumpen på kylfällan där den adsorberas och bildar ett istäcke. I takt med att proven förlorar vatten sjunker trycket ner mot ca 0.03 torr, vilket också är en indikation på att frystorkningen är klar. Tiden för frystorkning varierar starkt med provtyp, och kan röra sig mellan 3 och 48 timmar.

#### "Sprättning"

Vissa prov visade en tendens att sprätta iväg fragment under torkprocessen. För att minska förlusterna av material härigenom täcktes provbehållarna (glasprovrör) med plastfilm och ett litet hål på 1 mm<sup>2</sup> gjordes i filmen. Detta hade avsedd effekt, inga fragment kunde därefter hittas utanför provbehållarna. En konsekvens av övertäckningen var dock en längre torktid.

#### Ispropp, omkonstruktion.

Den första versionen av frystork visade sig ha otillräcklig is-samlingskapacitet pga en olämplig utformning av kylfällan. Avståndet mellan kylfälla och anslutande rör var för litet med påföljd att isbildning vid torkning av större vätskevolymer helt blockerade pumpvägarna och fick en

kraftig tryckstegring som följd. Konsekvensen var att frystorkningen fick avbrytas med jämna mellanrum och avisas, en procedur på 10-15 minuter.

En omkonstruktion har sedermera skett; dels används två parallella kylfällor på ett sätt så att den ena kan avisas medan den andra arbetar (utan att torkprocessen avbryts), dels har kylfällorna fått en utformning som minskar risken för lokala isproppar.

I framtiden planeras en tillbyggnad så att de plattor på vilka proven står förses med värme- och kylslingor. Därmed kan proven frysas direkt i frystorken, vilket ibland kan vara fördelaktigt, och värme kan i vissa fall behöva tillföras mot slutet av torkningen.

#### 4.2.3. Homogenisering/malning

För vissa typer av prov fordras malning och homogenisering. De placeras i syradiskade teflonbehållare som (efter ev. neddoppning i flytande kväve) fästes i den i avsnitt 3.1 beskrivna homogenisatorn. Efter 1-5 minuters skakning är provet homogent och finfördelat (kornstorlek 3-10 µm).

#### 4.2.4. Lågtemperaturinaskning

##### Princip

För de analyssituationer där en ytterligare förkoncentrering är nödvändig vidtager nästa preparationssteg som består i överföring av materialet till syradiskade glasdegler som införes i den beskrivna lågtemperaturföraskaren och efter 1-8 timmar är proven helt inaskade. På grund av ett mikrovågfält omvandlas syremolekylerna till betydligt mer aggressivt atomärt syre som förmår oxidera de organiska beståndsdelarna i provet redan vid en temperatur under 100 grader C. De bildade gaserna är flyktiga och försvinner. Dessvärre gäller det också andra ämnen i provet, bla Cl, S, Br, Se och Hg vilka, beroende på kemisk form, kan försvinna under askningen i varierande utsträckning. Några typiska exempel på askningens inverkan finns i figur 4.2.1-4 där en jämförelse görs mellan halter i frystorkade och inaskade prov.

##### Homogenisering

Före askning är det lämpligt att mala/homogenisera materialet. Det är viktigt att provet har en så stor yta som möjligt, askningstidens längd beror starkt av förhållandet exponerad provarea till total provvolym. Även efter askning är det väsentligt att materialet först homogeniseras, åtminstone om man avser att pressa pellets. Korn med kärnor av ofullständigt askat material och med en annan elementsammansättning än provet i övrigt kan, om de ej blir homogent

fördelade i provet, ge upphov till icke-representativa resultat.

#### Fukt

Kvoterna mellan halter bestämda med PIXE i prov efter och prov före askning (enbart frystorkade), avviker ibland avsevärt från den relation som erhålls genom vägning av provet före och efter inaskning. Om proven minskar tex 10 ggr i vikt vid inaskningen bör rimligtvis halterna (i koncentration mäkt) av icke-flyktiga element som Fe, Cu, Zn och Rb ha ökat 10 ggr. Att så ej alltid är fallet, viktändringen är ofta större än anrikningsfaktorn, kan misstänkas bero på fukthalten i de icke inaskade proven. Om dessa efter frystorkningen ej förvaras i eckskator kan de absorbera vatten ur luften och få en högre vikt, ledande till en skenbart större inaskningskvot. Detta problem kommer att bli föremål för närmare studier.

#### 4.2.5. Pelletpressning

Frystorkat och homogeniserat material, liksom inaskat sådant, kan med fördel pressas till pellets. Ju mindre kornstorleken i materialet är desto bättre och hållbarare pellets kan tillverkas. För närvarande pressas 5 mm:s pellets med en handmanövrerad hävstångspress, men nyligen har färdigställt en hydraulisk. En fördel med analys av pelletprov är att man med PIXE kan bestämma halterna av bl a F, Na och Mg.

#### 4.2.6. Jonbyteskromatografi med Chelex-100

En teknik för att kunna förbättra detektionsgränserna vid bl a analys av urin har testats. Den utnyttjar en kolonn med jonbytarmaterial av typ Chelex-100 (BIO-RAD), vilken efter tvättning i suprapur 2.5 M salpetersyra överförs i ammoniumform med hjälp av ammoniumhydroxid. Därpå har urin, vilken först mineraliserats genom kokning i syra, fått passera in i kolonnen, och avslutningsvis eluerats med 1 M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , MQ-vatten och 2.5 M  $\text{HNO}_3$ . Beroende på  $\text{NH}_4^-$ -jonens likhet (här) med alkalimetalljoner kan alkalimetaller elueras med ammoniumacetat. En del alkaliska jordartsmetaller kommer också ut med ammoniumacetaten. Övergångsmetaller kommer däremot ut med syran. Hela processen är pH-beroende.

Innan vattenfasen eluerats har Na, K, Rb, Sr och 70% av Ca försvunnit ut ur pelaren. I salpetersyrafasen kommer så Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd och Pb ut i väl avgränsade fraktioner. Se figur 4.2.5., ref. (5) och även punkt 5.5 nedan. Med denna teknik ligger detektionsgränserna för bl a Ni under de naturligt förekommande halterna.

Arbete med undersökning av teknikens tillförlitlighet och beroende av provtill jonbytarvolym för olika grundämnen pågår, liksom tester av reproducerbarhet och recovery. Försök skall göras med både mindre pelare och mindre provvolym, ett mål är att minska provmängden till ca 5 ml.

#### 4.3. Tester och resultat

##### 4.3.1. Detektionsgränser

De uppnådda detektionsgränserna är beroende av graden av koncentration av de intressanta elementen, förekomst av störande signaler från t.ex. folier som proven placeras på, samt förekomst av höga halter av element som natrium vilka ger upphov till en störande bakgrund i PIXE-spektra.

Vätskehalt och andel nedbrytbart organiskt material varierar kraftigt mellan olika typer av biologiskt material (t.ex. helblod och tänder) vilket innebär att detektionsgränserna omräknade till s.k. våtvtkt kommer att variera i ett stort intervall. Totala förkoncentrationen kan vara mellan 2 och 200 ggr. I ref. (6) har vi gjort en studie för att undersöka kombinationen frystorkning+inaskning för analys av blodplasma. Av diagram 4.3.1 framgår att de detektionsgränser som uppnås ligger under de naturliga koncentrationerna av ett flertal intressanta element medan för andra viktiga element (t.ex. Cr och Pb) de uppnådda detektionsgränserna är för höga. Ytterligare utveckling krävs således för att analysera även dessa element. I sammanhanget kan påpekas att plasma är ett svåranalyserat material med mycket låga naturliga halter och relativt blygsam koncentrationsfaktor p.g.a. hög halt av salter och Na som störande bakgrundselement.

##### 4.3.2. Noggrannhet

I ref. (6) studerades metodens noggrannhet genom analys av ett väldokumenterat standardmaterial (NBS Bovine lever). I tabell 4.3.2 visas resultaten uttryckta som bestämd koncentration i procent av certifierade NBS-värden. Resultaten visar på god noggrannhet. En allvarlig källa till fel vid analys av biologiskt material är risken för förlust av lättflyktiga komponenter i samband med inaskningsförfarandet. Den låga temperaturen vid lågtemperaturfrysning bör minimera dessa risker men vissa element som t.ex. brom och selen är kritiska.

#### 4.3.3. Homogenisering

För att visa behovet och effekten av det ovan beskrivna homogeniseringsförfarandet preparerades 10 prov av frystorkad svinlever genom att montera slumpmässigt valda bitar av levern på aluminiumtape. Sedan maldes en stor bit frystorkad lever med homogeniseringsförfarandet och 10 prov gjordes av homogenisatet genom att pressa pellets som monterades på samma sätt som bitarna. Av tabell 4.3.3 framgår skillnaden i spridning i analysresultaten för de två fallen. Medelvärdet av standardavvikelseerna i fall ett är c:a dubbelt så stort som i fall två. I figur 4.3.4 och 4.3.5 jämförs två parallellprov för homogeniserat material. Förutom att en bättre representativitet uppnås vid homogenisering skapar denna dessutom förutsättningar för ett snabbare inaskningsförfande p.g.a. den större angreppsytan för det atomära syret vid ett finfördelat prov.

## 5. ANALYSERADE PROVTYPER

Ett flertal olika provtyper har preparerats och använts under utvecklingen av de ovan beskrivna standardmetoderna för analys av biologiska prov. De har valts på ett sådant sätt att arbetet dels ska vara intressant från arbetsmiljösynpunkt, dels bidra till utveckling av en fungerande preparations- och analysteknik för biologiskt material.

### 5.1. Blod

En sådan provtyp är blod, vilket är intressant ur monitoringsynpunkt och samtidigt en god representant för provtypen kroppsvätska. Blod är ett viktigt biologiskt material som genom sin kontakt med alla kroppens organ återspeglar dess hälsotillstånd. Det är också lätt att ta prov på då proven av sig själva är homogena och representativa. Vissa svårigheter vid analysen kan föreligga då blod innehåller låga till mycket låga halter av många grundämnen, och i likhet med flera av kroppsvätskorna har en störande bakgrundsmatris av salter. När det gäller helblod försämrats analyskänsligheten dessutom av den stora mängden järn närvarande i hemoglobin. Därför, och även av andra skäl är det bättre att analysera blodplasma eller blodserum. Blodplasma har också analyserats, se referens (6). Både plasma och serum kan analyseras direkt utan någon mer omfattande provpreparering än pipettering på tunna folier. Då får man emellertid enbart information om de ämnen som finns i högre halter, (S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, Rb). En ökad känslighet kan nås genom frystorkning följt av pelletpressning, där man kan utnyttja den högre känsligheten för tjocka prov och samtidigt genom gammareaktioner bestämma lättare grundämnen som Na. Exempel på resultat från en helblodsanalys finns i figur 5.1.1. För större undersökningar av innehåll i t ex plasma och serum av ovan nämnda element, utgör PIXE-metoden nu ett attraktivt alternativ i fråga om tillförlitlighet, kapacitet och ekonomi. Ytterligare ökning av känsligheten kan uppnås genom lågtemperaturinnskning, se fig 5.1.2.

I många fall är man intresserad av de ämnen som transporteras bundna till protein i blodet, och man kan då göra en proteinfraktionering. Via kontakter med bl a institutionerna för hygien och för medicinsk kemi har vi fått prov på och analyserat lymfocyter samt alfa, beta och gammaglobulin. Genom kontakter med kliniskt kemiska centrallaboratoriet i Lund och onkologiska kliniken vid Lunds lasarett har vi kunnat utföra elektrofores av blodplasma och isoelektrisk fokusering av bl a blodserum (se nedan).

### 5.2. Lever och njure

En aman provtyp utgörs av lever. Lever representerar dels humant vävnadsmaterial, dels provtypen fasta organiska prov. Under projektets tidigare delar användes leverpreparat i form av ett frystorkat pulver (NBS Bovine Liver SRM 1577, ett biologiskt standardmaterial tillverkat av oxlever) för att utveckla och testa rutiner framför allt inaskning. I och med färdigställandet av frystork och inköp av homogenisator kunde vi själva utveckla en teknik för att kontaminationsfritt överföra ett prov i form av en organdel till ett torrt pulver, lämpligt för antingen vidare inaskning eller direkt pelletering och PIXE-analys. Exempel på halter funna i lever och njure finns i figurena 5.2.1 och 5.2.2.

### 5.3. Faeces

Från Yrkesmedicinska kliniken i Lund (YMK) erhöll vi 5 st faecesprov vilka inlämnats till kliniken för bestämning av blyhalt. Vi avsåg att testa vår behandlingsteknik på dessa prov samt att undersöka vilka ämnen som kunde detekteras. Följande gjordes:

- a) proven som var uppslammade i vatten förtorkades i vattenbad
- b) proven frystorkades
- c) proven frystes i LN och homogeniserades enligt metoden beskriven ovan
- d) pellets pressades

De tjocka proven analyserades med PIXE/PIGE och ett typiskt resultat finns i fig. 5.4.

På YMK bestämmer man bly i faeces genom att först mineralisera provet i svavelsyra, saltsyra och perklorosyra, sedan komplexbinda bly med dithizon, extrahera det med metylisobutylketon och slutligen analysera den organiska fasen med atomabsorption (AAS).

PIXE-värdena stämmer väl överens med de erhållna AAS-värden utom för ett prov, där PIXE gav 10 ppm och AAS ett ca 10 ggr lägre värde. PIXE-analysen visade också att provet innehöll stora mängder Ba, närmare 20 000 ppm, och en viss del Ag, ca 30 ppm. Inga av de andra proven hade något som liknade dessa halter av motsvarande ämnen. Källan till denna stora mängd barium är ej känd. En misstanke är att det rör sig om rester av kontrastmedel intaget i samband med röntgen av mag-tarmkanalen. Enligt tillgängliga uppgifter hade personen ifråga magröntgats ca 2 månader tidigare, vilket är lång tid för att förklara den höga Ba-halten.

Beträffande AAS-metodens lägre blyvärde kan det tänkas bero på att komplexbindaren blockerats av den stora bariummängden, så att bly ej bundits i

normal mängd till denna. Normalt utförs kontroller av analysmetoden genom att göra standardtillsatser av Pb till proven, men det görs inte till varje prov och det hade inte gjorts till detta.

En situation som denna är ett utomordentligt exempel på en av fördelarna med multielementanalys.

Vi kan med PIXE detektera många ämnen i faeces. Ursprunget till en del av dem är att söka i den intagna kosten, medan andra härrör från utsöndringar i magtarmkanalen, tex vet man att en del Cd utsöndras via gallan.

För utvärderandet av vissa sjukdomstillstånd eller yrkesexponeringar kunde mätningar på faeces eller galla vara av intresse.

#### 5.4. Urin

Urin frystorkades och pressades till pellets, vilka analyserades på sedvanligt sätt, se resultat i fig. 5.3. Försök gjordes till ytterligare koncentrerings genom inaskning, men pga salter och organiska beståndsdelar brände materialet fast så hårt i glasskeppet att det inte var meningsfullt att lösa upp resterna och tillverka något prov därav.

De detektionsgränser som uppnås vid frystorkning är inte tillräckligt låga ifall man har för avsikt att mäta ämnen som Cr och Ni i urinen, därtill krävs ytterligare koncentrerings och avlägsnande av matrisämnen som Na, K, och Cl, se vidare nedan.

#### 5.5 Analys av urin efter selektiv koncentrerings med Chelex-100

Med användande av jonbyteskromatografi med Chelex-100 i ammoniumform som jonbytare kan en avsevärd koncentrerings göras för vissa ämnen i urinen, samtidigt som provet avsaltas.

100 ml urin delades i två portioner, varav hälften dopades med 40 µg/l Ni. Den organiska matrisen destruerades genom kokning i salpetersyra och resterna späddes med MQ-vatten till ca 40 ml volym. Tre parallella jonbytesförsök gjordes; urin, urin dopad med Ni och vattenblank i varsin pelare med tvättad Chelex-100. Som pelare användes korta pasteurpipetter med en gelvolym av 1.5 ml.



Fraktioner uppsamlades under hela tiden, och delades in i fyra klasser beroende på elueringsvätska:

- |                                    |                |
|------------------------------------|----------------|
| 1) prov in i pelaren               | fraktion 1 - 6 |
| 2) 1 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ | 7 - 12         |
| 3) MQ-vatten                       | 13 - 15        |
| 4) 2.5 M $\text{HNO}_3$            | 16 - 20        |

De 13 sista fraktionerna var på omkring 1 ml. I de 12 första fraktionerna hamnar majoriteten av Na, K, Ca, Fe, Rb och Sr. I en enda fraktion, nr 17, kommer majoriteten av Ni, Cu och Zn. Se figur 4.2.5 och 5.5.1-2. Om man räknar om detektionsgränserna för dessa ämnen från fraktion 17 till hela mängden ursprunglig urin skulle de bli:

|    | ( $\mu\text{g}/\text{l}$ ) | "normalhalt" (enl Iyengar et al, ref. (7) ) |
|----|----------------------------|---|
| Ni | 0.7                        | 2.3 - (83)                                  |
| Cu | 0.9                        | 17 - 300                                    |
| Zn | 1.0                        | 193 - 2040                                  |

Se även referens (5). De ämnen som kan koncentreras med denna metod enligt våra försök hittills är Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd och Pb. Metoden är ännu bara prövad på urin, men bör kunna användas på andra vätskor med höga salthalter under förutsättning att de kan mineraliseras.

### 5.6. Hår

En tredje provtyp som kan tänkas för monitorering och som indikator på en eventuell metallexponering, är enskilda hårstrån. Ett flertal grundämnen i blodplasma byggs in i och anrikas i olika grad i hårvävnaden under hårstråets tillväxt. Förutsatt att ingen till- eller frånförsel av dessa grundämnen sker i efterhand, t ex genom tvättning, färgning eller deposition av luftföroreningar, avspeglar halterna i hårstrået de koncentrationer som fanns i blodplasma då håret bildades. Hårstråets tillväxthastighet är känd och således kan tidsvariationen av ett flertal element bestämmas med direkt PIXE-analys av ett hårstrå med en tidsupplösning av ca 1 vecka. Således kan förändring i halterna relateras till en eventuell exponering eller ett sjukdomsförlopp vid en viss tidpunkt. Kvantifieringen av koncentrationen i hårstrå från PIXE-analys är ett i litteraturen dokumenterat problem beroende på de olika hårtjocklekar som förekommer (diameter mellan 40 och 120  $\mu\text{m}$ ), och den variation som kan föreligga längs ett enskilt hårstrå. Detta problem har emellertid lösts, se ref (8) och (9). I en för håranalys specialbyggd

kammare har hårstrån analyserats i halumatmosfär med samtidig detektering av röntgenstrålning (PIXE) och registrering av laddade partiklar spridda vid kollisioner med atomkärnor i hårmatrisen. Det sistnämnda används för att beräkna hårtjockleken i varje punkt och ger tillsammans med PIXE-resultaten koncentrationen av detekterade element, ref. (8), (9) och (10). Detektionsgränsen för t ex Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Hg, Pb, As och Se ligger i området 1- 10 ppm. I figur 5.6 visas ett exempel på resultat av en analys längs ett hårstrå från en kvicksilverförgiftad person.

Användningen av hårstrån som "dosimeter" inom t ex arbetsmiljöundersökningar är som antytts ovan inte invändningsfritt. Risk föreligger att det intressanta elementet kan tillföras håret både genom upptag via kroppen (endogent) och genom direkt exponering av håret för t ex damm eller rök (exogent). Genom ett noggrant studium av tidsvariationen längs ett hårstrå kan indikationer på en eventuell exogen komponent erhållas. För att få ytterligare information av betydelse för att kunna avgöra huruvida ett element i hår är endogent eller exogent, kan man studera elementets radiella fördelning i hårstrået med mikrostråle (se avsnitt 5.8 nedan). Sådana undersökningar är dock inte realistiska när det gäller analys av flera element i många hår. Li Hong-Kou och Klas Malmqvist har utarbetat en snabbare teknik för att få information om den radiella fördelningen och jämfört resultat från denna metod med resultat från mikrostrålebestämningar (ref. (11)). Hår som medium för biologisk provtagning i arbetsmiljö kan således sannolikt erbjuda många fördelar.

### 5.7. Naglar

I samarbete med institutionerna för Hygien i Umeå och Medicinsk Fysik vid Karolinska Institutet i Stockholm har studier påbörjats i avsikt att utvärdera huruvida PIXE-metodens speciella egenskaper kan utnyttjas för dermatologiskt material. Hud och naglar från patienter med olika symptom bestrålas på vanligt sätt och resultaten jämförs med normalmaterial.

Av särskilt intresse för arbetsmiljöområdet är ett försök att studera tidsvariationen av As-halten längs naglar. Dessa växer c:a 0.1 mm/dag och det är välkänt att As förekommer i höga halter i naglar. Således bör 3-5 månaders exponering för arsenik kunna följas längs en nagel. Hela naglar låter sig svårligen insamlas för analys varför ett speciellt instrument används för att hyvla av ett "spån" från nagelns ovansida. Detta analyseras sedan med PIXE varvid en tidsupplösning av c:a 10 dagar erhålls med detektionsgränser för As på ca 1 ppm. I figur 5.7 visas ett resultat från en PIXE-analys av ett sådant

spån i vilket bl a Cd detekterats. Vidare arbete med denna insamlings- och analysteknik pågår. Liksom för hår utgör exogen tillförsel ett problem. Huruvida detta problem är hanterbart t ex genom att använda ett djupare lager och tånaglar måste utforskas, bl a med hjälp av mikrostråleanalys av nagelsnitt i avsikt att erhålla djupfördelning.

### 5.8. Mikrostråleanalys av dermatologiskt material

Vid institutionen har utvecklats ett system för protonmikrostråleanalys. PIXE-analys kan därmed utföras med en spatial upplösning av 5 till 10  $\mu\text{m}$ . Vid analys av elementsammansättning som funktion av djupet i hud kan bl a elektroninducerad röntgenanalys (EDX) utnyttjas på tunna snitt av hud i ett elektronmikroskop. Den högre relativa känsligheten (100-1000 ggr) hos protonmikrostrålen har väckt intresset för att utvärdera dess tillämpbarhet inom dermatologisk forskning. Inom ramen för samarbetet med Medicinsk Fysik och Karolinska Institutet har några analyser av tunna snitt (några  $\mu\text{m}$ ) av hud och hårstrån utförts med en upplösning av 4-8  $\mu\text{m}$  (ref. (12) och (13) ).

I figur 5.8.1 visas resultaten från en tvärsnittskaraktärisering av ett hårstrå från en person med misstänkt jämförgiftning. Som framgår av figuren varierar elementförekomsten kraftigt över tvärsnittet.

I figur 5.8.2 visas resultatet från bestämning av djupfördelning av ett antal element i normal hud, särskilt epidermis. I förlängningen av detta arbete på normalmaterial planeras systematiska studier av penetration av yrkesdermatologiskt intressanta element som Cr och Ni.

Metodiken är unik såtillvida att den ger en till två storleksordningar lägre detektionsgränser än vad som kan åstadkommas med EDX analys. Detta framgår bl a av fig 5.8.3, där järn-, zink- och calciumfördelningar i epidermis visas för flera olika hudsnitt. Metoden öppnar därmed nya möjligheter för studier av t ex hudens barriärfunktion vid arbetsmiljöexponering. Detta arbete har redan fått en viss internationell uppmärksamhet genom en inbjudan till oss (Roland Akselsson) att hålla ett längre föredrag vid konferensen Scanning Electron Microscopy 1983, ref. (12).

Eftersom de två metoderna protonmikrostråle och EDX i flera avseende är komplementära pågår f n jämförande studier bl a med avseende på kvantifieringsteknik. Detta sker i samarbete med Medicinsk fysik, Karolinska Institutet och Experimentell Biologi, Wenner-Gren Institutet.

## 6. Proteinfraktionering

### 6.1. Allmänt

Man känner till drygt 200 plasmaproteiner i blod. Dessa kan vara transportprotein, skyddsprotein eller hemostasprotein.

För vissa protein med förmågan att knyta metaller till sig känner man relativt väl till funktionen, t ex binds koppar hårt till ceruloplasmin. Albumin, det kvantitativt mest förekommande proteinet i plasma, är ett allmänt transportprotein som transporterar många metaller till levern eller andra organ, där mer specifika protein syntetiseras och i sin tur binder metallerna till sig. En förhöjd nivå av sådana specifika protein kan förväntas efter en exponering. I en efterföljande separation och PIXE-analys bör dessa förhöjda halter tydligt avspeglas. Tack vare PIXE-metodens multielementkaraktär får man samtidigt information om andra ämnens närvaro, vilket kan vara mycket värdefullt vid studier av synergistiska och antagonistiska effekter.

En mindre studie över lämpliga proteinseparationsmetoder har därför påbörjats. Tankbara metoder är bl a elektrofores, isoelektrisk fokusering (IEF) och gelfiltrering. Med hjälp av elektrofores i agarosgel gjordes ett antal separationer av blodplasma. Dessvärre var resultaten något tvetydiga, dels beroende på förekomst av metallföroreningar i gelmaterialet (detta framställs för kliniska syften och är ej direkt ägnat för spårämnesanalys), dels beroende på att mängden plasma ej kunde vara större än ca 10 µl, vilket gjorde att endast element som Fe, Cu och Zn kunde detekteras. Ett annat viktigt faktum var att separationen skedde vid ett pH av 8.6, vilket avviker från det fysiologiska pH-värdet 7.4, med risk för att proteinen förlorat en del av sitt metallinnehåll då det hela tiden föreligger en pH-beroende jämvikt  $\text{protein} + \text{metall} \leftrightarrow \text{metallprotein}$ .

### 6.2. Isoelektrisk fokusering

En metod som tillåter större mängder protein att separeras är IEF, vilken beroende på val av utrustning, kan var antingen analytisk (god upplösning, små mängder) eller preparativ (sämre upplösning, stora mängder).

Vi har gjort ett antal försök med analytisk separation av blodserum på en gel av polyakrylamid, därefter skurit gelen i bitar, och efter preparering analyserat innehållet. Ett exempel på en sådan analys finns i figur 6.2.1. Metoden med isoelektrisk fokusering är intressant men kan förmodligen ej

direkt utnyttjas för våra syften. Liksom i fallet med elektrofores är IEF utvecklad för separation och analys av protein i klinisk eller forskningskala, men ej för metallanalys på spårämnesnivå. Renheten hos det använda materialet måste undersökas liksom om metallförluster från proteinen vid deras vandring i pH-gradienten kan uppträda. För att undersöka detta måste ett stort antal prov prepareras, analyseras och utvärderas, även med annan teknik.

Med preparativ isoelektrisk fokusering (PIEF) kan större mängder plasmaproteiner separeras, men det sker till priset av en sämre upplösning. I PIEF blandas det prov som ska separeras direkt in i gelen (en sk "granulerad" gel) redan från början, och under fokuseringens gång vandrar de olika proteinen till respektive isoelektriska punkter. Då fokuseringen är klar placeras ett galler genom gelen och stänger inne de bildade fraktionerna. pH-värdena för gelfraktionerna uppmättes och finns i fig 6.2.2. Gelfraktionerna som inestängts mellan gallerväggarna skrapas upp och placeras i speciella siktar där de slämmas upp med 4 ml MQ-vatten. Protein och amfolytvätska kommer då att passera genom siktens botten och kan samlas upp. Totalt erhålls 30 fraktioner.

Ett försök gjordes med blodplasma, och den bildade vätskan behandlades på två sätt; en del pipetterades direkt på Kimfol för analys, en del frystorkades först och koncentratet löstes i en liten mängd vatten och pipetterades. Frystorkning sänkte detektionsgränserna med en faktor 3-4. Åtskilliga ämnen kunde detekteras och hade en fördelning längs med pH-gradienten, figur 6.2.3.1-6. Pga en misstänkt kontamination från de filterpappersremsor som utgör vätskereservoarer för elektrolytlösningarna, vågar vi inte uttala oss om källan till ämnena. Halterna av Mn var tex så höga att de omöjligt kunnat härröra från blodet. Vi arbetar för att finna ett lämpligt ersättningsmaterial för filterpapperet och därmed ha möjlighet att utesluta denna föroreningskälla.

### 6.3. Gelfiltrering

#### 6.3.1. Princip

Gelfiltrering (molekylsiktningkromatografi) är en metod som separerar molekyler efter deras storlek. Gelen framställs genom att en dextranprodukt får ta upp vatten och svälla. Gelnorna är porösa och släpper in lågmolekylära substanser. Större molekyler kan inte fritt passera in i gelkornen och tillräckligt stora stängs helt ute. Om en glaspelare packas med dextrankorn

kan den utnyttjas för molekylseparation. Det material som ska separeras får passera genom pelaren. De största molekylerna, som utestängs från gelkornen, passerar snabbt genom pelaren. Mindre molekyler går däremot in i kornen och får en längre vandringssträcka. Ju mindre molekyler desto längre tid tar det innan de passerat genom pelaren.

Dextrankorn finns i olika täthet vilket tillåter val av separationsegenskaper. För separation av serum-proteiner har Sephadex G-200 använts, vilket tillåter molekyler med molekylvikt upp till 800 000 att tränga in i kornen. Gelfiltreringen utfördes i kylrum på institutionen för medicinsk kemi i Lund.

### 6.3.2. Tvättning

Eftersom försökets syfte var att bestämma element med spårhalter i separerade serumproteiner, inses lätt att alla delar i den ingående separationen måste vara extremt noggrant rengjorda. Det gäller förutom självklara saker som glasrör, behållare för buffertlösning, redskap och glasutensilier använda vid beredningen av buffert, också själva gelmaterialet liksom bufferten själv. Följande procedur användes:

- 1) Glasvaror syradiskades i 1 dygn.
  - 2) Bufferten (Tris-HCl) fick passera en pelare med Chelex-100 i ammoniumform för att rensas från metaller. Därpå späddes den till 0.02 M och pH-justerades till 7.8
  - 3) Sephadexgelen tvättades genom att två pelarvolym 0.01 M  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  fick passera gelen under 15 dygn.  
(Vi använde en färdig pelare, längd 1380 mm, inre diameter 55 mm, volym mellan gelkornen 800 ml, total volym 3200 ml.)
  - 4) Gelen sköljdes och konditionerade därpå med två pelarvolym tvättad Tris-buffert under 13 dygn.
- Därmed ansågs gel, pelare, anslutande plastslangar och buffert som tillräckligt noggrant rengjorda för separationsförsöket.

### 6.3.3. Övrigt

De syradiskade glasrören (120 st) täcktes med parafilm, vägdes och numrerades (för att senare kunna bestämma mängden i varje fraktion). Elueringsbufferten (Tris-HCl) måste före varje påfyllning i pelarreservoiren "luftas", dvs med undertryck och värme befrias från lösta gaser. Dessa hade annars kunnat övergå i gasform inuti pelaren, där bildat luftfickor och avsevärt försämrat pelarens egenskaper.

#### 6.3.4. Utförande

Försöket utfördes i kylrum. Provet, 10 ml blodserum, applicerades på pelaren, buffert påfylldes och anslutning till pelarreservoiren gjordes. Med en peristaltisk pump åstadkoms ett flöde av ca 12 ml/timme. En förfraktion (ej av intresse här) på 525 ml insamlades och slängdes. Provrören placerades i en fraktionssamlare, ca 20 st avtäcktes från parafilm och drygt 20 ml fraktion samlades i vart provrör. Med jämna mellanrum täcktes fyllda provrör med plastfilm, nya avtäcktes och buffert till pelaren påfylldes. Hela separationen tog 9 dygn och resulterade i 106 fraktioner.

#### 6.3.5. Efterarbete

Proven vägdes, 0.5 ml hälldes av för att användas till proteinhaltsbestämning med UV-absorptionsmätning vid 280 nm. Fraktionerna placerades därefter i frysskåp, - 32 grader C.

Proven frystorkades därpå i mellan 36 och 48 timmar, återstoden utgjordes av en vit, porös och fintrådig struktur. Innehållet löstes upp i 500 µl MQ-vatten, varav 20 µl pipetterades på folier för analys. PIXE-analys gjordes på sedvanligt sätt, resultaten beräknades med HEX och sammanställdes med HEKS-UT, se fig. 6.3.1-7. För att förbättra detektionsgränserna behandlades en del prov på försök med två metoder, dialys och ultrafiltrering.

#### 6.3.6. Diskussion

De ämnen vi letar efter förmodas sitta bundna i proteiner och det prov vi pipetterat innehöll både protein och buffert. Den höga Cl-halten i bufferten, vilket är en konsekvens av vårt val av buffert, gör att vid PIXE-analysen dränks en stor del av informationen i bakgrundsstrålning. För att komma tillrätta med detta undersöktes om separering av mindre molekyler än protein (däribland buffertmolekyler) från gelfiltreringsfraktionen skulle kunna ge ett renare spektrum. Bägge metoderna visar att separationen ger en klar förbättring av topp till bakgrundsförhållandet, Cl-halten har också minskat en faktor 100 - 1000. Även andra ämnen har minskat i olika proportioner, vilket ännu gör kvantifiering osäker. Detta kan bero på att en viss nedbrytning av proteiner har ägt rum sedan gelfiltreringen skedde, en del metaller är kanske också så löst bundna till proteinen att dialys/ultrafiltrering kan få dem att lossna.

I en av fraktionerna kunde efter separation se detekteras, vilket inte hade observerats i det ursprungliga provet pga den höga bakgrunden. Uppenbarligen

kan man med separering med dialys/ultrafiltrering erhålla ny intressant information. Ett problem vi upptäckt är den kontaminering av bl a Hg som orsakas av att ultrafiltreringsenheterna är indränkta i en antibakteriell lösning. En metod att tvätta bort Hg och en del andra ämnen pågår.

En enklare väg att sänka detektionsgränserna har visat sig vara att som buffert använda Tris-acetat i stället för Tris-HCl. Därmed elimineras den störande bakgrundsstrålningen från Cl, och man kan få ut betydligt mer information ur spektrat. En annan fördel är att pelarstorleken kunnat minskas så att provmängden kan vara 1 ml serum. Separationstiden har minskat till ca 4 dygn, och av innehållet i de bildade fraktionerna har man efter koncentrerings också kunnat utnyttja 2/5, vilket är en avsevärd förbättring. Se även ref. (14).

De problem med kontaminering som nämns i denna artikel har sedermera kunnat bemästras, bl a genom att en uppställning för gelfiltrering byggts upp i ett kyskåp i institutionens lokaler, dels genom användandet av ett "tvättprogram" för gel och pelare efter var separation. Kontrollen över förhållanden vid separationen är därmed bättre, den ökade tillgängligheten har medfört att fler separationer kunnat utföras. Hittills har mest serum från icke-exponerade personer undersökts, och reproducerbara fördelningar av P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn och Br med molekylvikt erhållits. Metallerna kan knytas till bl a transferrin, ceruloplasmin och albumin. P och S följer proteinnmängden medan K, Ca och Br mest uppträder som fria joner/små molekyler.

Ett fortsatt arbete med en ökning av känsligheten, en eventuell kombinerings metod med en efterföljande högupplösande separationsmetod liksom en säker proteinidentifikation planeras.



REFERENSGRUPP

Den referensgrupp (Prof G. Lindstedt och 1:e yrkeshyg. A. Schütz) som utsetts av ASF för detta projekt sammanträdde för första gången i Lund okt 1980. Därvid visade PIXE-gruppen sina laborativa resurser och sin verksamhet inom arbetsmiljöområdet. Vidare diskuterades uppläggningsen och detaljer av projektet samt formerna för gruppens vidare arbete.

För att underlätta samarbete och koordination med en forskningsgrupp i Göteborg (Doc E.Selin) bestämdes att referensgruppen skulle vara gemensam för båda grupperna och en medicinsk expert knöts till gruppen (Doc P.Nordqvist). Gruppen sammanträdde en andra gång i Göteborg dec 1981 och Göteborgsgruppen fick därvid tillfälle att visa sin verksamhet.

Ett tredje sammanträde har hållits i april 1984 i Lund där de bägge grupperna redogjort för sina forskningsresultat och erfarenheter.

REFERENSER

1. S A E JOHANSSON AND T B JOHANSSON  
ANALYTICAL APPLICATION OF PARTICLE INDUCED X-RAY EMISSION  
NUCLEAR INSTRUMENTS AND METHODS 137 (1976) 473 - 516
  
2. JAN PALLON  
KAMMARE FÖR PIXE-ANALYS AV BIOLOGISKA PROV VID ATMOSFÄRSTRYCK  
TECHNICAL REPORT NO: LUTFD2/(TEKF-5005)/1-44/(1978), DEPT OF  
NUCLEAR PHYSICS, LUND, SWEDEN
  
3. R B BOULTON AND G T EWAN  
ANALYTICAL CHEMISTRY 49 (1977) 1297
  
4. N F MANGELSON, D J EATOUGH, N L EATOUGH, L D HANSEN, M W HILL,  
M L LEE, L R PHILLIPS, M E POST, B E RICHTER AND J F RYDER  
PROTON INDUCED X-RAY EMISSION ANALYSIS - A COMPLEMENT TO ANALYTICAL  
METHODS USED IN ENVIRONMENTAL STUDIES  
IEEE TRANSACTIONS ON NUCLEAR SCIENCE, VOL. NS-28, NO 2, APRIL 1981
  
5. P PAKARINEN, J PALLON AND R AKSELSSON  
ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY AS A SELECTIVE PRECONCENTRATION  
METHOD FOR PIXE-ANALYSIS OF URINE  
TO APPEAR IN  
NUCLEAR INSTRUMENTS AND METHODS IN PHYSICS RESEARCH, VOL 231, APRIL/  
MAY 1984
  
6. J PALLON AND K G MALMQUIST  
EVALUATION OF LOW TEMPERATURE ASHING OF BIOLOGICAL MATERIALS AS A  
PRECONCENTRATION METHOD FOR PIXE ANALYSIS  
NUCLEAR INSTRUMENTS AND METHODS 181(1981)71-75

7. IYENGAR, KOLLMER, BOWEN  
THE ELEMENTAL COMPOSITION OF HUMAN TISSUES AND BODY FLUIDS  
(VERLAG CHEMIE, WEINHEIM, NEW YORK, 1978)
  
8. LI HONG-KOU AND K R AKSELSSON  
A QUANTITATIVE BASIS OF HAIR ANALYSIS USING PIXE  
TECHNICAL REPORT NO: LUTFD2/(TFKF-3036)/(1983), DEPT OF  
NUCLEAR PHYSICS, LUND, SWEDEN
  
9. LI HONG-KOU AND K R AKSELSSON  
PROTON BACK-SCATTERING - A TOOL FOR QUANTIFICATION OF THE  
RESULTS OF PIXE ANALYSIS OF SINGLE HAIRSTRANDS  
LUTFD2/TFKF-3039/(1983), DEPT OF NUCLEAR PHYSICS, LUND, SWEDEN
  
10. LI HONG-KOU, K G MALMQVIST, L-E CARLSSON AND K R AKSELSSON  
A PIXE SYSTEM FOR ROUTINE LONGITUDINAL SCANNING OF SINGLE  
HAIR STRANDS  
TO APPEAR IN  
NUCLEAR INSTRUMENTS AND METHODS IN PHYSICS RESEARCH, VOL 231, APRIL/  
MAY 1984
  
11. LI HONG-KOU AND K G MALMQVIST  
A SIMPLE METHOD FOR DETERMINING OF THE ELEMENTAL DISTRIBUTION  
OVER THE TRANSVERSE CROSS SECTION OF A HAIR  
TECHNICAL REPORT NO: LUTFD2/(TFKF-3037)/(1983), DEPT OF  
NUCLEAR PHYSICS, LUND, SWEDEN
  
12. K G MALMQVIST, L-E CARLSSON, K R AKSELSSON, B FORSLIND.  
PROTON INDUCED X-RAY EMISSION - A NEW TOOL IN QUANTITATIVE  
DERMATOLOGY  
SCANNING ELECTRON MICROSCOPY/1983/ IV, (PP 1815 - 1825)

13. K G MALMQVIST AND L-E CARLSSON  
PROTON AND ELECTRON MICROPROBE ANALYSIS OF HUMAN SKIN  
TO APPEAR IN  
NUCLEAR INSTRUMENTS AND METHODS IN PHYSICS RESEARCH, VOL. 231, APRIL/  
MAY 1984
  
14. J FALLON, P PAKARINEN AND R AKSELSSON  
PIXE-ANALYSIS OF BLOOD SERUM PROTEINS, SEPARATED BY GEL FILTRATION  
TO APPEAR IN  
NUCLEAR INSTRUMENTS AND METHODS IN PHYSICS RESEARCH, VOL. 231, APRIL/  
MAY 1984

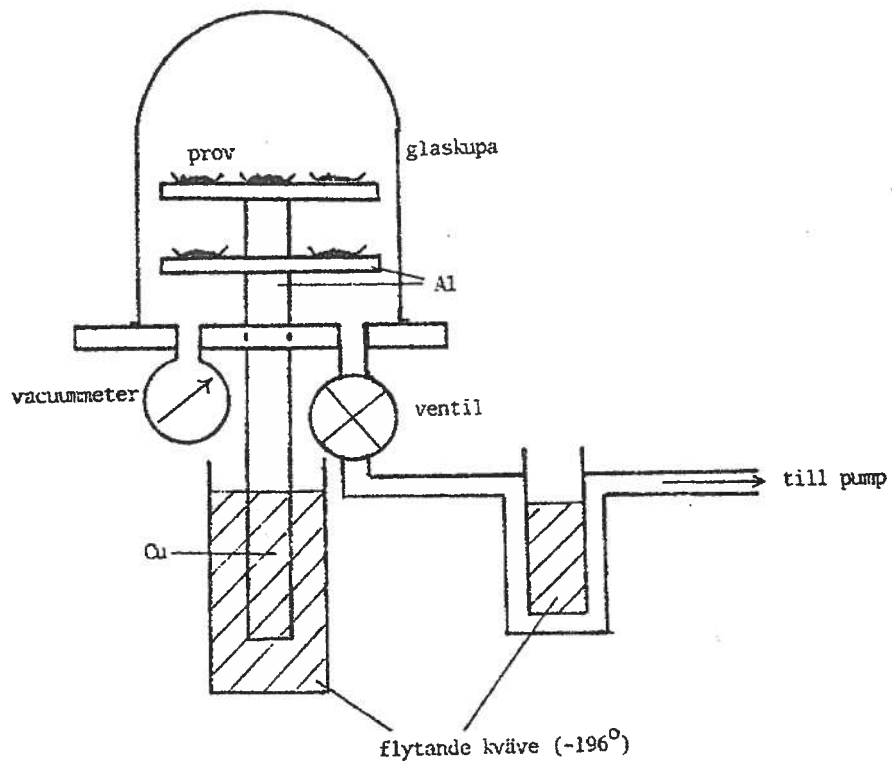


Fig. 3.1 Schematisk bild av frystork.

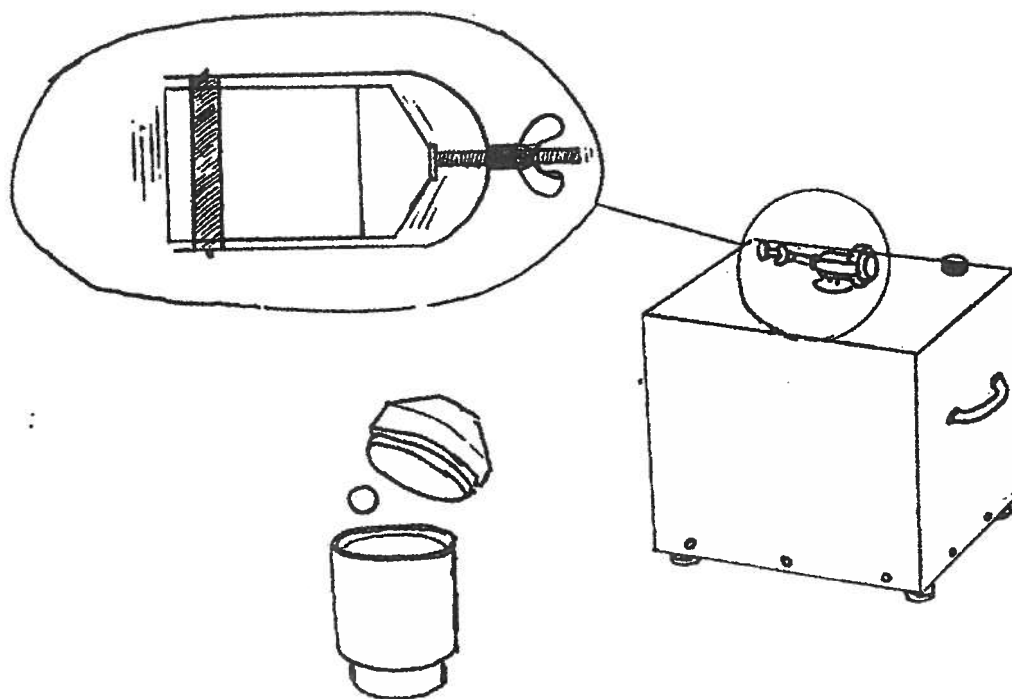


Fig. 3.2 Principskiss av homogenisator/kvarn.

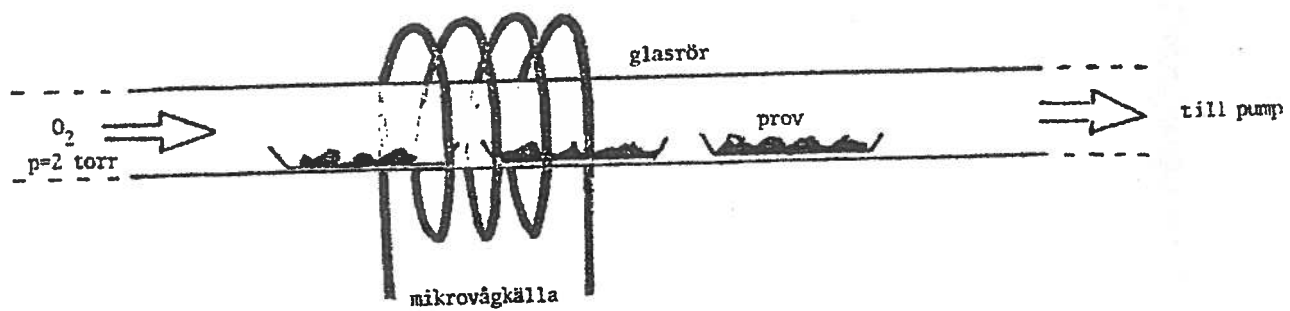


Fig. 3.3 Principen för lågtemperaturföraskning.

| PREPARATIONSMETODER FÖR VÄTSKEFORMIGA PROV<br>(PLASMA, SALIV, URIN, PROTEINLÖSNINGAR) |  |                   |   |
|---|--|-------------------|---|
| KONC. FÖRFARANDE  | PROVFRAMSTÄLLNING  | DETEKTIONSGRÄNSER | KOMMENTARER                             |
| A<br>Indunstning på folie   | Pipettering av t ex 20 ul                                      | Måttliga          | Snabbt, enkelt                          |
| B<br>Frystorkning   | Upplösning i liten mängd vätska + pipettering.                 | Bättre än A       | Möjlighet att bestämma F, B, Na, Li, Mg |
| C<br>Frystorkning<br>lågtemperatur-<br>inaskning                                      | Upplösning i minimal mängd vätska + pipett.<br>Pelletpressning | Goda<br>Bäst      | Möjlighet att bestämma F, B, Na, Li, Mg |

Tabell 4.1.1

| PREPARATIONSMETODER FÖR FASTA PROV I STÖRRE MÄNGDER (100-500 mg)<br>(TYP LÄVER, PÄCES, VEXTDELAR) |  |                    |   |
|---|--|--------------------|---|
| KONC. FÖRFARANDE  | PROVFRAMSTÄLLNING  | DETEKTIONSGRÄNSER  | KOMMENTARER                                 |
| A<br>Frystorkning<br>+ homogenisering   | Pelletpressning  | Goda               | Tjockt provs för- och nackdelar             |
| B<br>Frystorkning<br>+ homogenisering<br>+ lågtemperatur-<br>inaskning                            | Pelletpressning  | Oftast bättre än A | Hög Na-halt kan störa. Förluster uppträder. |
| C<br>HÄR<br>TÄNDER<br>NAGLAR  | Ev. snittning för att nå inre ytor eller göra profil-mätningar | Varierar           | Direkt analys Kan scannas med mikrostråle   |

Tabell 4.1.2



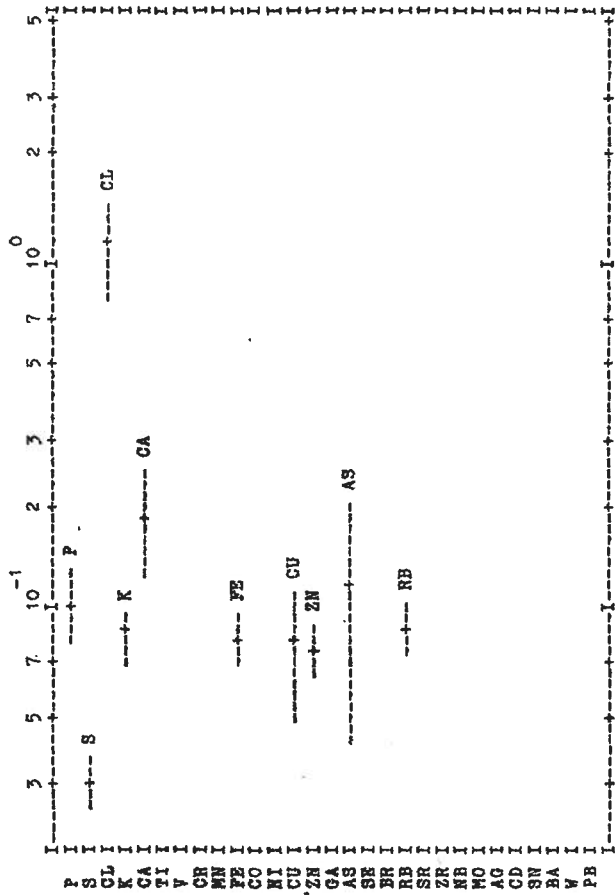


Fig 4.2.1 Förhållande mellan halterna i ett frystorkat och ett lågtemperaturinaskat prov av helblod.

Teckenförklaringar:  
 ---+--- Halt med adderade felgränser  
 Observera logaritmisk skala.

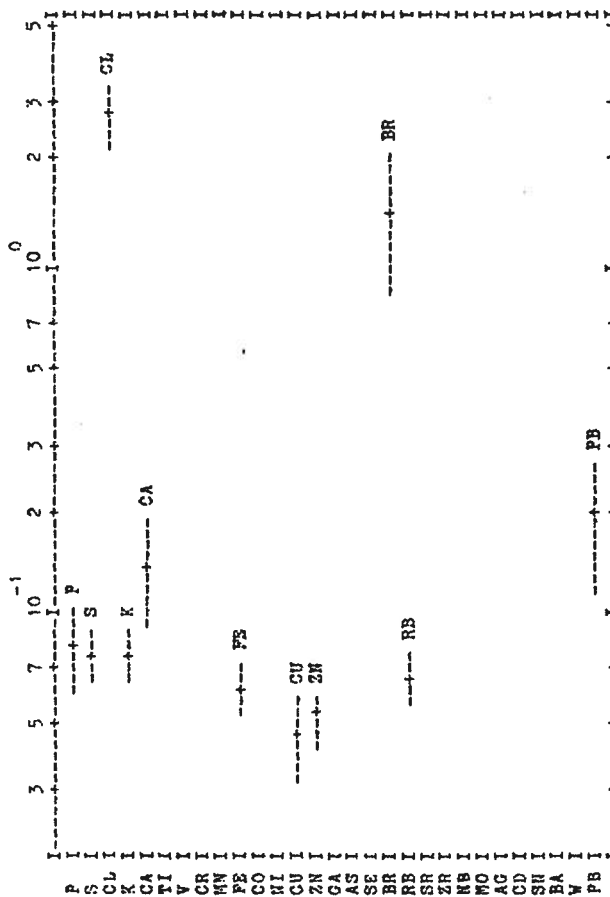


Fig 4.2.2 Förhållande mellan halterna i ett frystorkat och ett lågtemperaturinaskat prov av helblod.

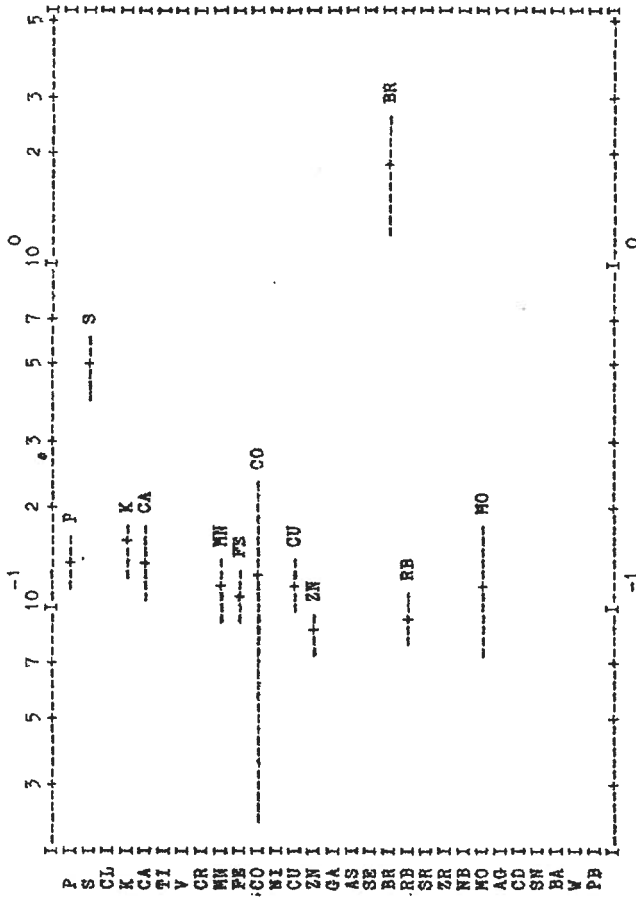


Fig 4.2.3 Förhållande mellan halterna i ett frystorkat och ett lågtemperaturinaskat prov av lever.

Teckenförklaringar:  
 ---+--- Halt med adderade felgränser  
 --- Observera logaritmisk skala.

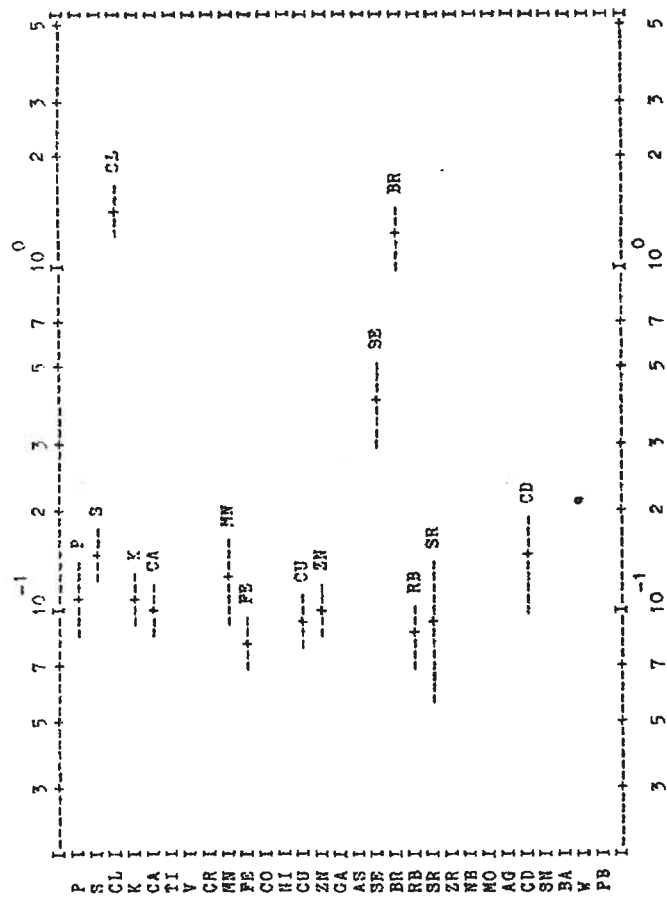


Fig. 4.2.4 Förhållandet mellan halterna i ett frystorkat och ett lågtemperaturinaskat prov av njure.

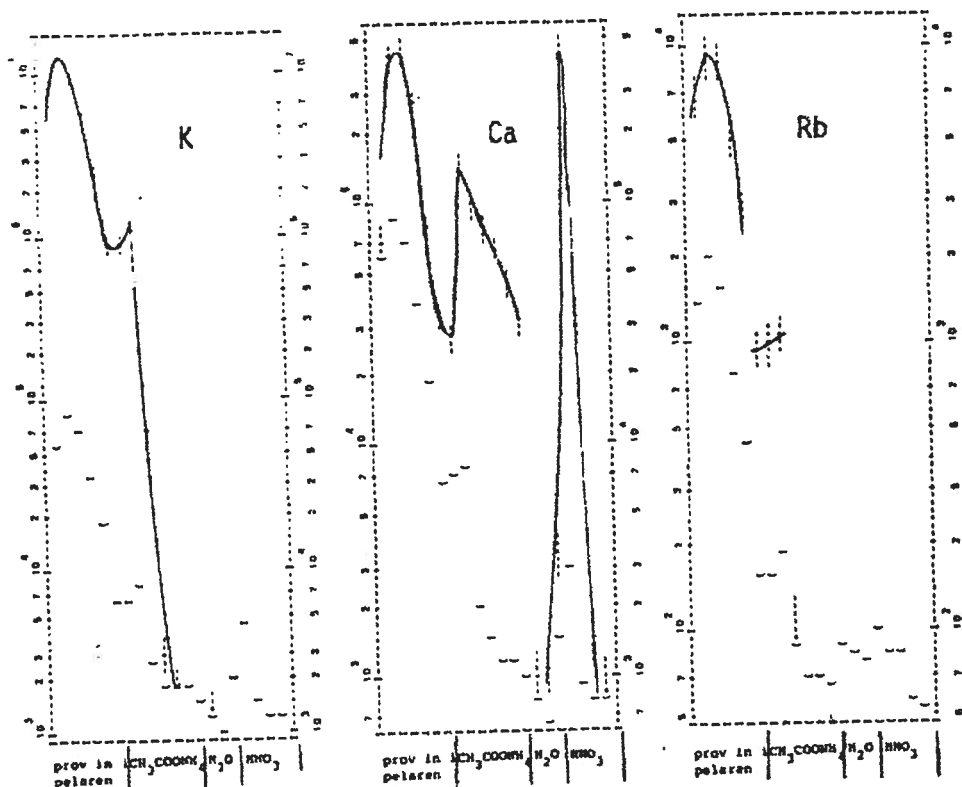


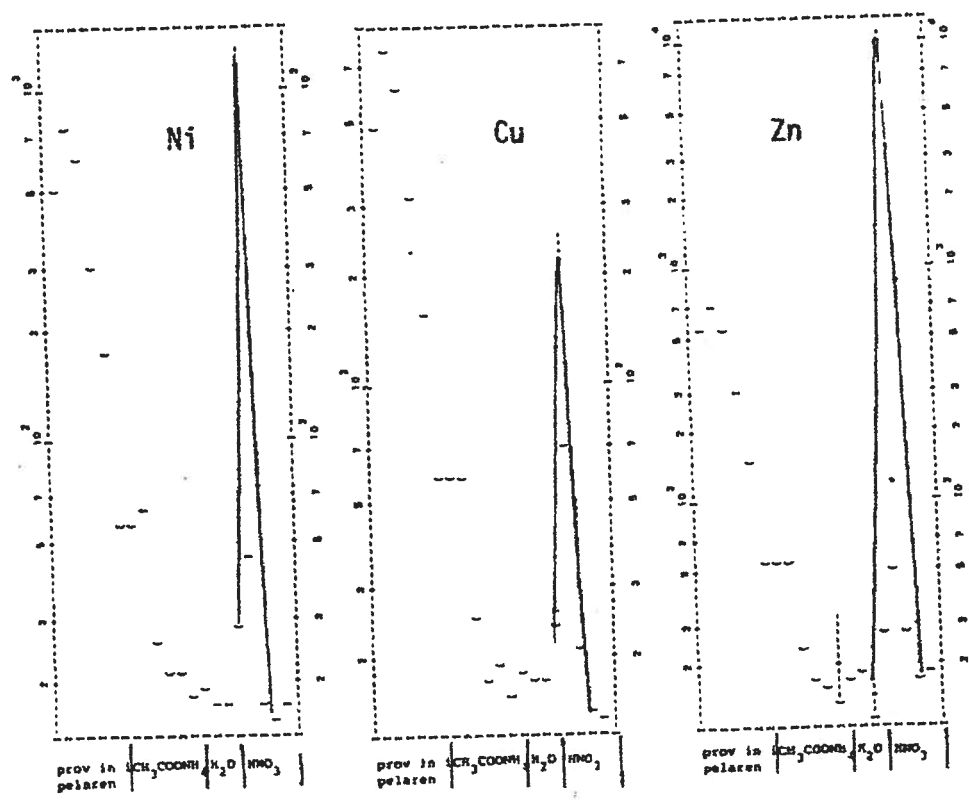
Fig. 4.2.5

Fördelning av K, Ca, Rb, Ni, Cu och Zn på olika elueringsfraktioner vid jonbyteskromatografi med Chelax-100 i ammoniumform.

Under "prov in i pelaren" passerar den mineraliserade urinen in i pelaren, under "CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>" tvättas alkaliometaller ut, "H<sub>2</sub>O" är en sköljfas och "HNO<sub>3</sub>" den fas där metaller elueras.

Alkaliometallerne K och Rb elueras antingen direkt medan provet fylls på pelaren eller under efterföljande fas med ammoniumacetat. En del Ca elueras här och en del tillsammans med syrafasen.

Ni, Cu och Zn elueras med syrafasen i ett mycket snävt intervall, mer än 90% återfinns i en enda 1 ml fraktion (nr 17). Tack vare denna selektion kan alltså metaller som ursprungligen förelåg i en volym av 50 ml anrikas en faktor 20 - 40. Som en konsekvens kan Ni detekteras i halter svarande mot de naturligt förekommande i normalurin.



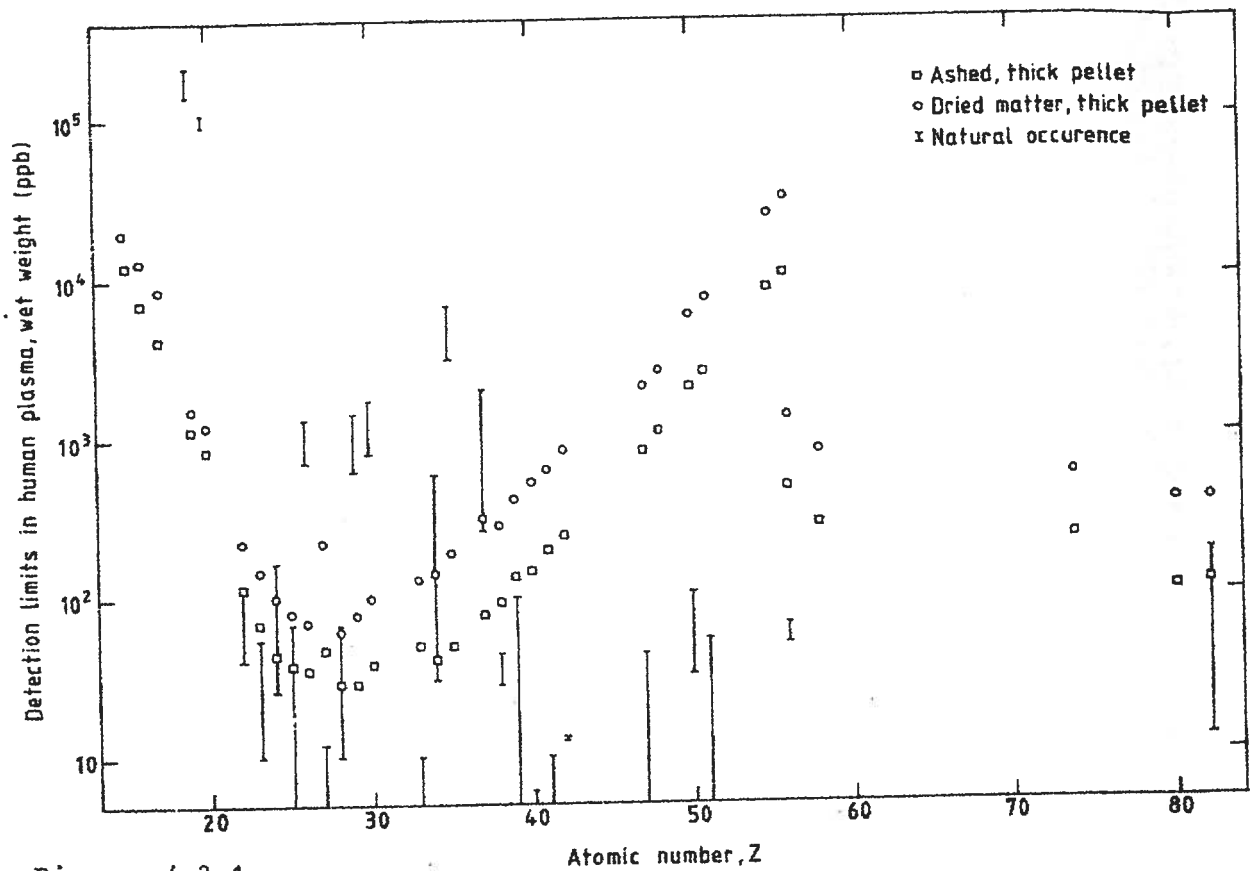


Diagram 4.3.1

Detektionsgränser i blodplasma vid två prepareringsmetoder:

- a) frystorkning
- b) frystorkning och lågtemperaturinaskning

De vertikala linjerna visar rapporterade naturliga nivåer av spårelement i blodplasma.

Tabell 4.3.2

Ratios of measured element abundance in NBS bovine liver (SRM 1577) to the stated value in percent. Mean value  $\pm$  1 standard deviation. The NBS-value in brackets is not certified, but given for information only.

| Element | Dried, thick a) | Ashed, dissolved b) | Ashed, thick c) | NBS           |
|---------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------|
| P       | 92.7 $\pm$ 2.7  | 63.6 $\pm$ 3.6      | 116 $\pm$ 9     | (100)         |
| Cl      | 122 $\pm$ 4     | <0.8                | <0.9            | 100           |
| K       | 105 $\pm$ 6     | 88.7 $\pm$ 4.1      | 127 $\pm$ 9     | 100 $\pm$ 6.2 |
| Ca      | 145 $\pm$ 8     | 145 $\pm$ 12        | 169 $\pm$ 16    | 100           |
| Mn      | 115 $\pm$ 4     | 99.0 $\pm$ 2.9      | 90.3 $\pm$ 7.8  | 100 $\pm$ 9.7 |
| Fe      | 93.3 $\pm$ 5.6  | 89.6 $\pm$ 3.7      | 101 $\pm$ 8     | 100 $\pm$ 7.5 |
| Cu      | 98.4 $\pm$ 5.2  | 88.1 $\pm$ 2.6      | 95.9 $\pm$ 7.8  | 100 $\pm$ 5.2 |
| Zn      | 96.2 $\pm$ 4.6  | 92.3 $\pm$ 7.7      | 100 $\pm$ 8     | 100 $\pm$ 7.7 |
| Se      | 100 $\pm$ 27    | <82                 | <27             | 100 $\pm$ 9.1 |
| Rb      | 98.4 $\pm$ 5.5  | 95.6 $\pm$ 5.5      | <90             | 100 $\pm$ 5.5 |

a) 3 pellets.

b) 4 samples pipetted on Nuclepore filters.

c) 1 pellet, only analytical error stated.

Tabell 4.3.3

Spridningen i resultaten för några grundämnen vid

PIXE-analys av a) 10 homogeniserade prov

b) 8 icke homogeniserade prov

| Ämne | Relativ standardavvikelse (%) |                  |
|------|-------------------------------|------------------|
|      | Homogeniserat                 | Ej homogeniserat |
| Cl   | 13                            | 50               |
| K    | 13                            | 19               |
| Ca   | 11                            | 21               |
| Mn   | 12                            | 12               |
| Fe   | 11                            | 17               |
| Cu   | 13                            | 90               |

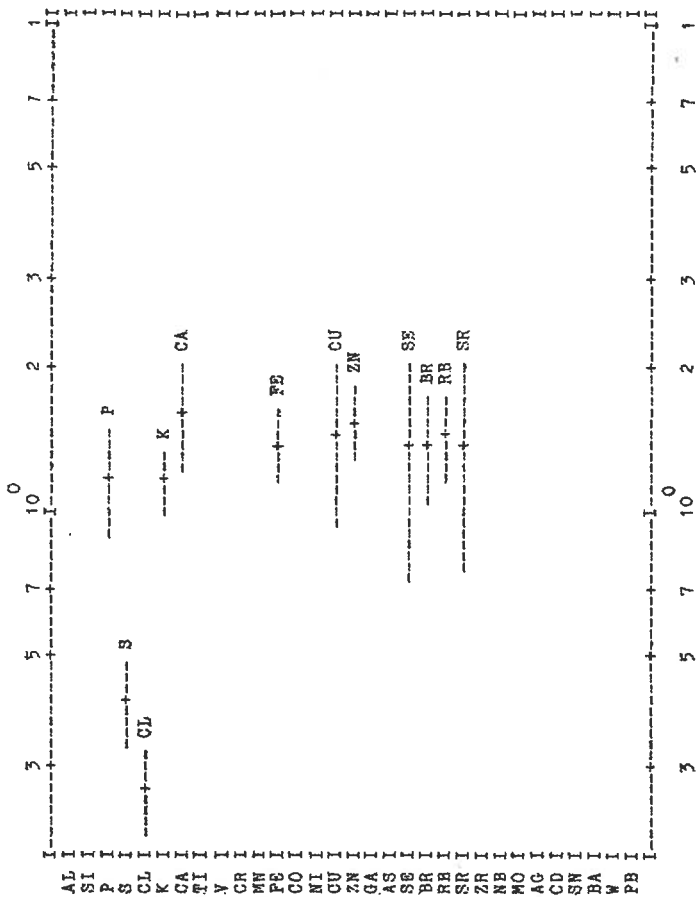


Fig 4.3.4 Parallellprov.  
Förhållande mellan halterna i två pelletprov av samma frystorkade och homogeniserade helblod.

Teckenförklaringar:  
|+|+| Halt med adderade felgränser  
Observera logaritmisk skala.

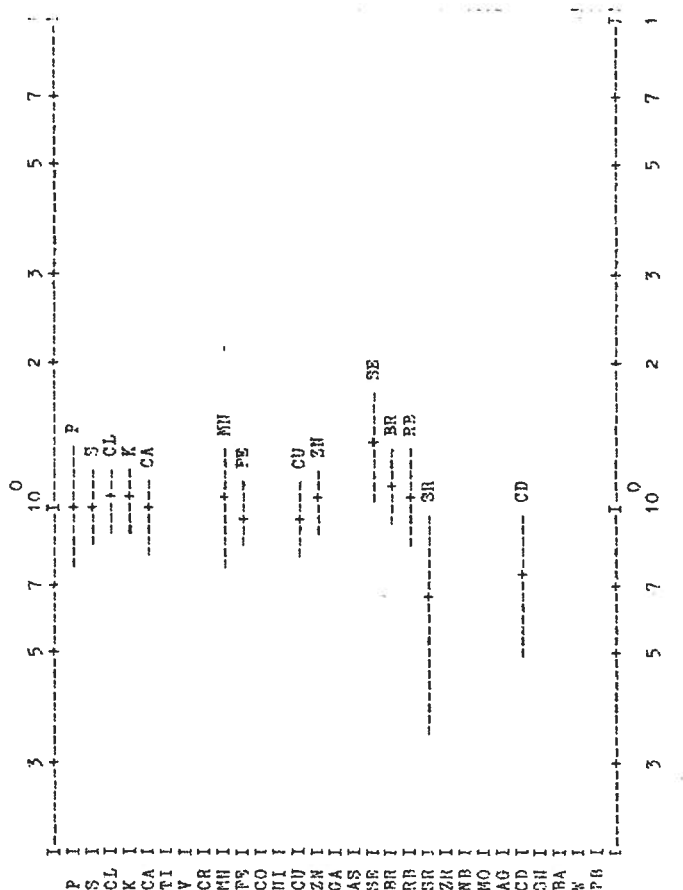


Fig 4.3.5 Parallellprov.  
Förhållande mellan halterna i två pelletprov frystorkat och homogeniserat material från samma njure.

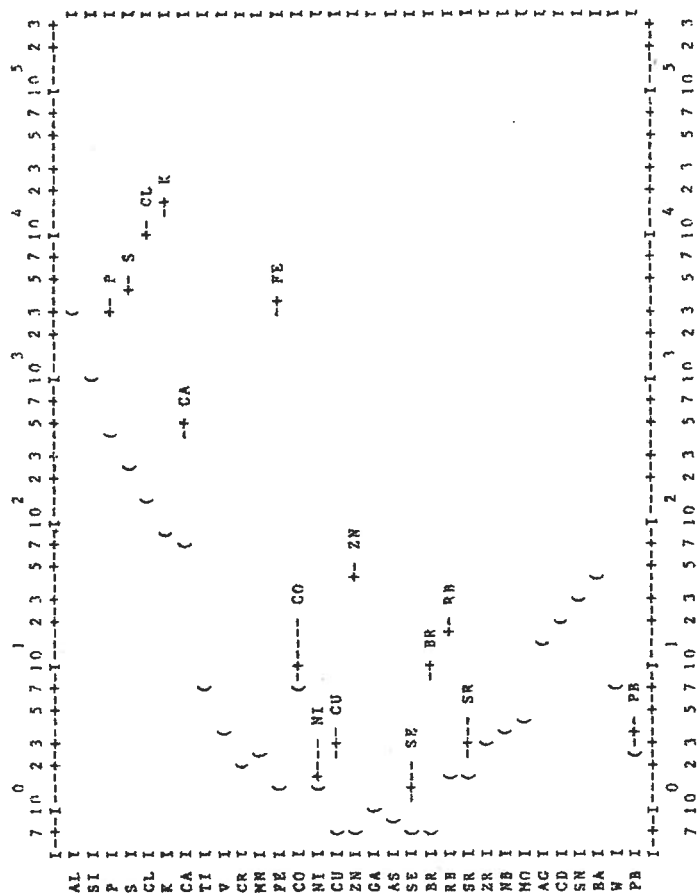


Fig. 5.1.1  
 Resultat från PIXE - analys av en pellet  
 av frystorkat och homogeniserat helblod.  
 Halterna svarar mot ppm i det torra  
 provet.

Teckenförklaringar:  
 --- Halt med felgränser (+/- 1 sigma)  
 ( detektionsgräns  
 Observera logaritmisk skala.

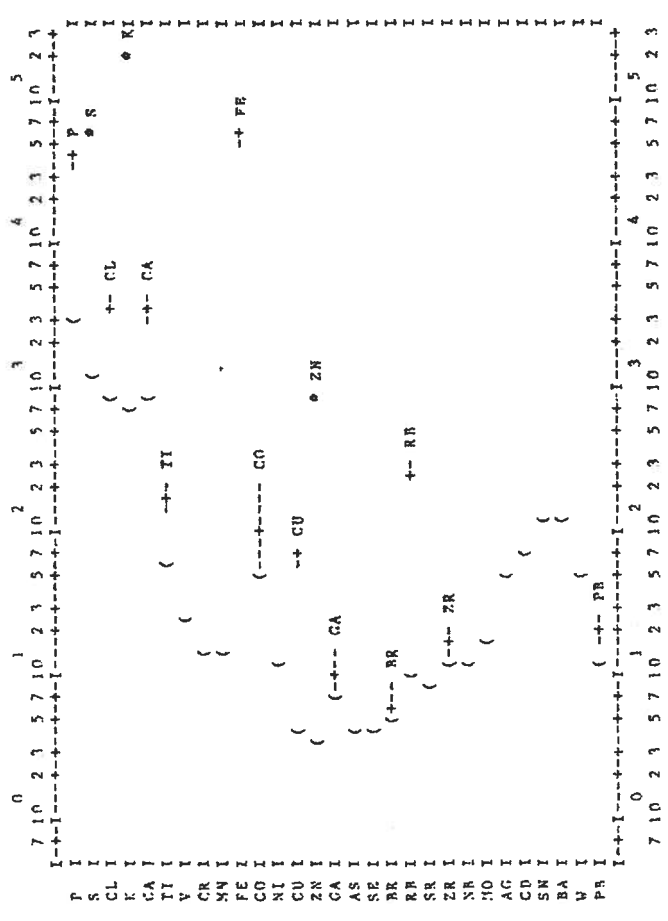
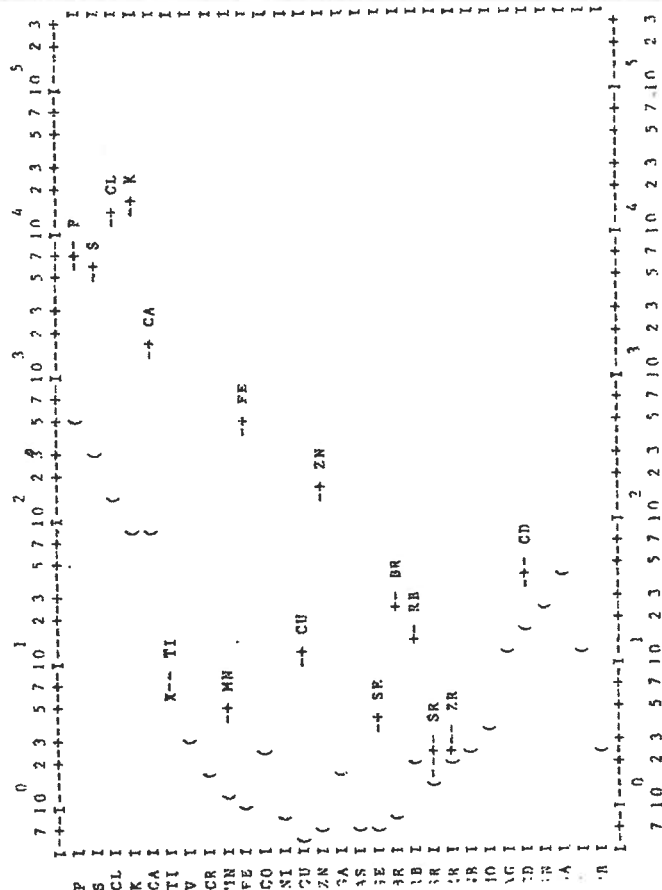


Fig. 5.1.2  
 Halter i samma material efter frystorkning  
 och lågtemperaturinaskning.  
 Att halterna här är högre än i det frystorkade  
 provet beror på att provet efter  
 askning är mer koncentrerat.  
 Halterna svarar mot ppm i det torra  
 provet.

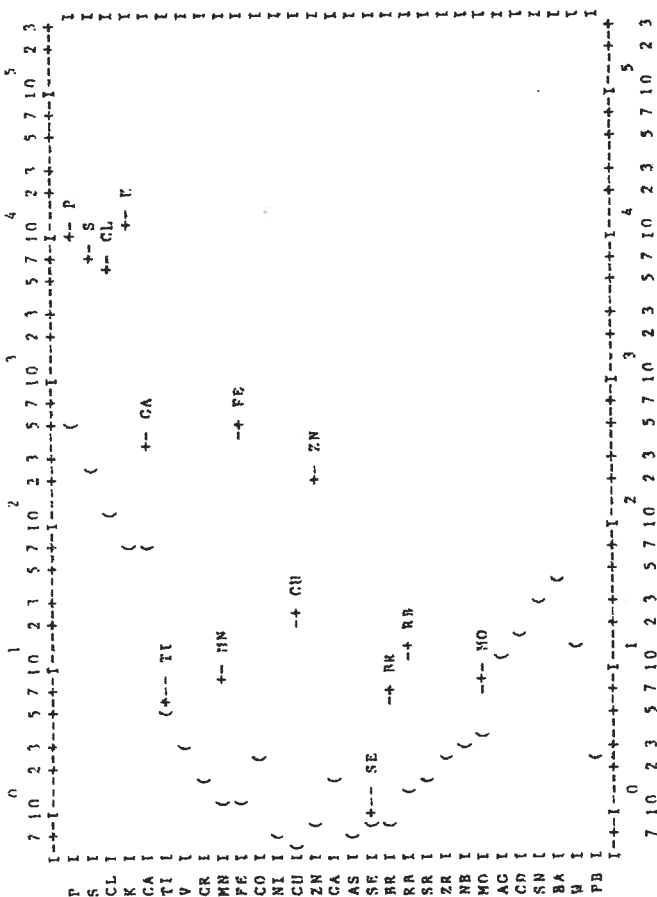


Teckenförklaringar:  
 --- Halt med felgränser (+/- 1 sigma)  
 ( detektionsgräns  
 Observera logaritmisk skala.

Resultat från PIXE - analys av en pellet av frystorkad och homogeniserad njure.

Halterna svarar mot ppm i det torra provet.

Fig 5.2.1

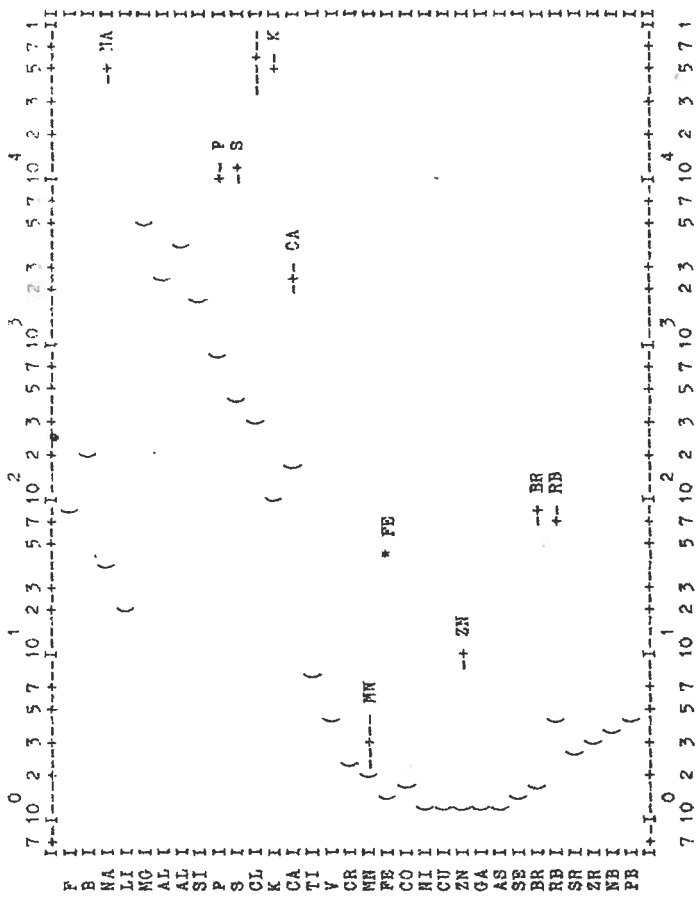


Resultat från PIXE - analys av en pellet av frystorkad och homogeniserad lever.

Halterna svarar mot ppm i det torra provet.

Fig 5.2.2

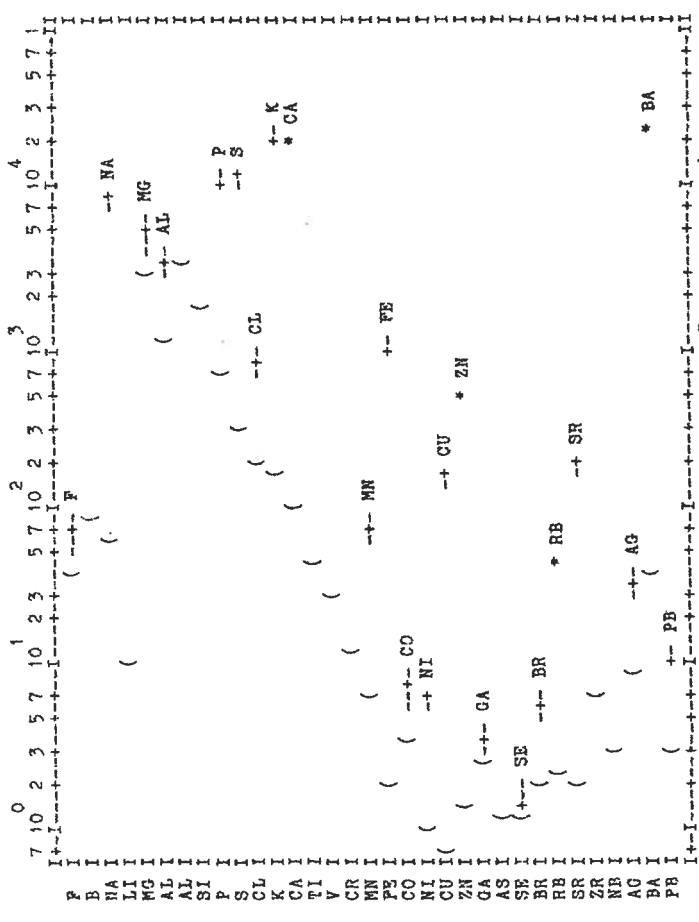




Resultat från PIXE - analys av en pellet av frystorkad och homogeniserad urin.  
 Halterna svarar mot ppm i det torra provet.

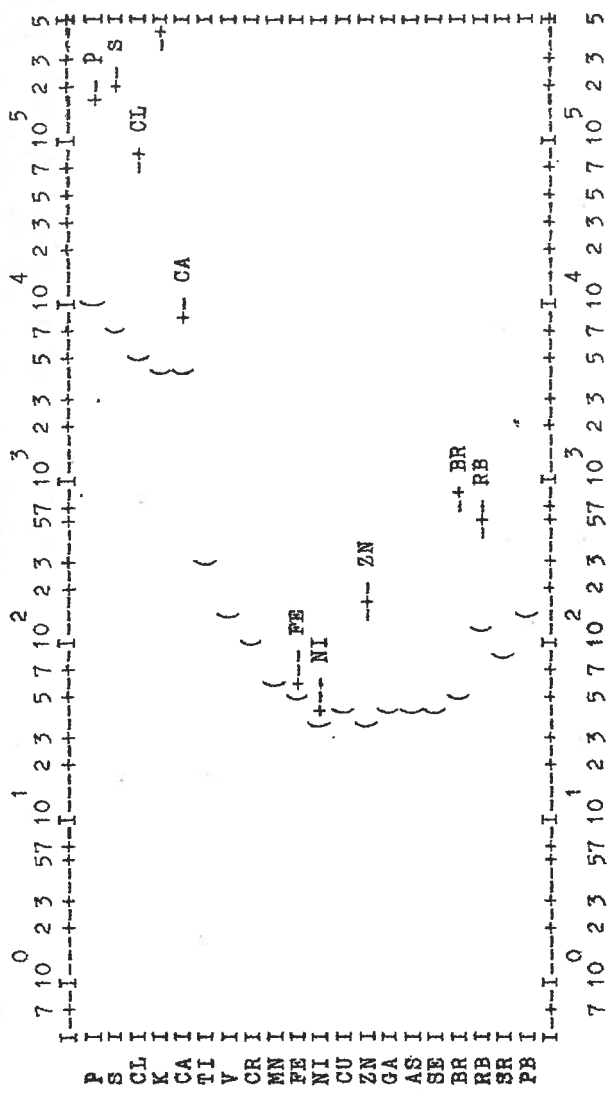
Fig. 5.3

Teckenförklaringar:  
 --- Halt med felgränser (+/- 1 sigma)  
 ( ) detektionsgräns  
 Observera logaritmisk skala.



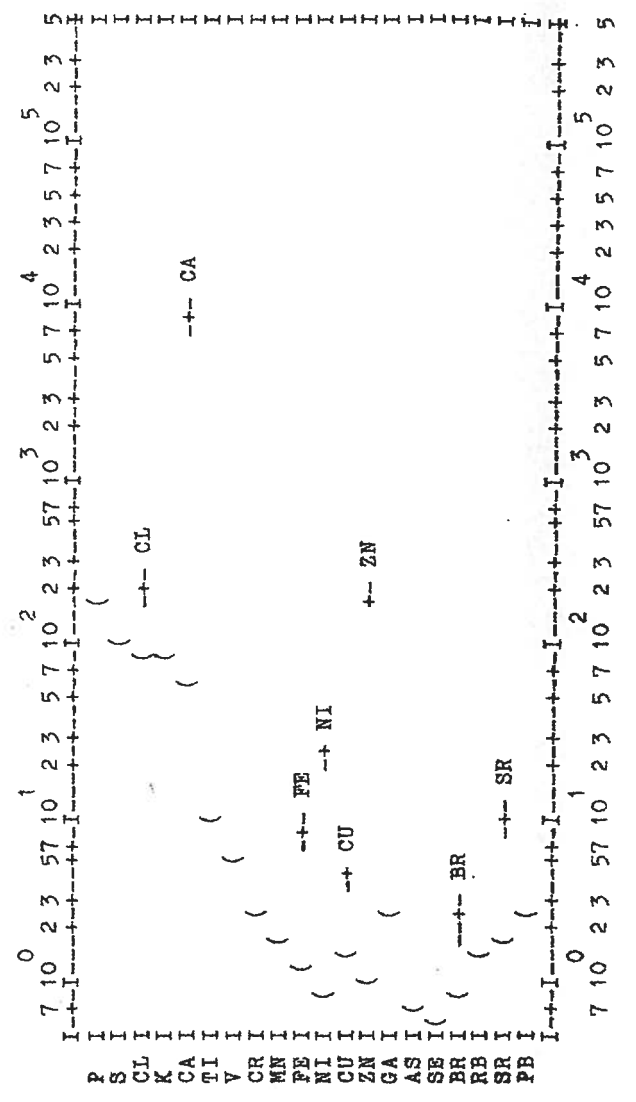
Resultat från PIXE - analys av en pellet av frystorkad och homogeniserad faeces.  
 Halterna svarar mot ppm i det torra provet.  
 Provet antages innehålla röntgenkontrastmedel.

Fig. 5.4



Halter och detektionsgränser i mineraliserad Ni-dopad urin. Mängderna svarar mot ng/ml i ursprunglig urin.

Fig. 5.5.1



Halter och detektionsgränser i den syrafraktion där majoriteten av metallerna hamnar vid jonbyteskromatografi med Chelex-100 i ammoniumform. Mängderna svarar mot ng/ml i ursprunglig urin.

Fig. 5.5.2

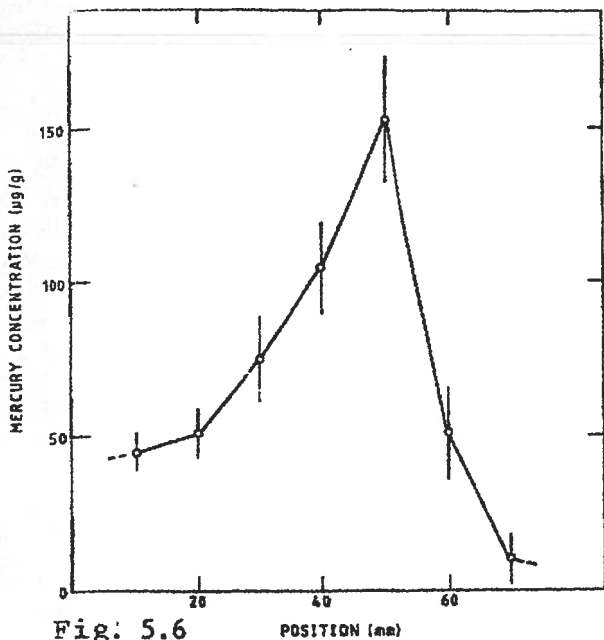


Fig. 5.6

Kviksilverkoncentrationen längs ett hårstrå bestämt med PIXE-analys. Origo motsvarar roten på håret. Håret kommer från en person med kviksilverförgiftning. Bestrålningarna skedde i heliumatmosfär med en 2.5 MeV protonstråle kollimerad till  $2 \times 4 \text{ mm}^2$  och en strömstäthet mindre än  $5 \text{ nA/mm}^2$ . De heldragna linjerna är enbart hjälplinjer för ögat och felgränserna visar den statistiska osäkerheten svarande mot  $\pm 1$  standardavvikelse.

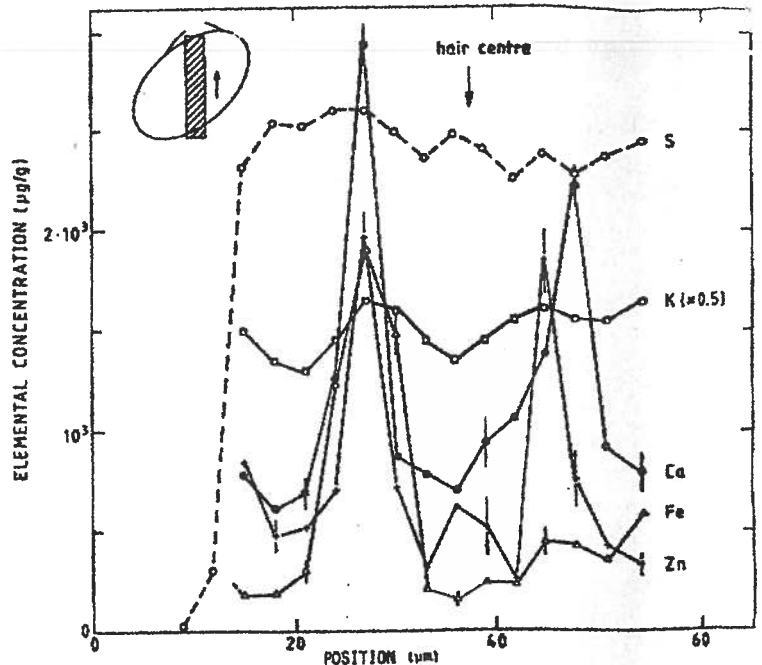


Fig. 5.8.1

Elementfördelningar tvärs över ett tunt snitt av ett mänskligt hårstrå. Bestrålningen skedde enligt skissen i övre vänstra hörnet. Analysen skedde med protonmikrostråle fokuserad till  $4 \times 15 \text{ µm}^2$  och en ström av cirka 200 pA. Den streckade linjen visar svavelfördelningen uttryckt i godtycklig enhet och refererar ej till y-skalan. De heldragna linjerna är enbart hjälplinjer för ögat och felgränserna visar den statistiska osäkerheten svarande mot  $\pm 1$  standardavvikelse.

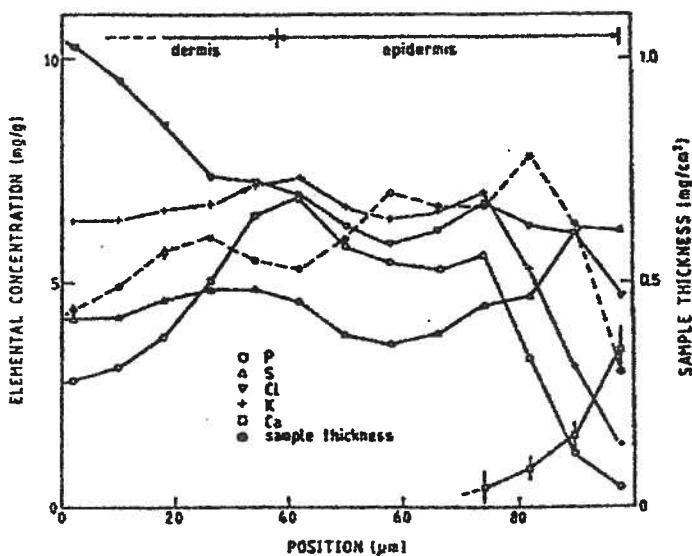


Fig. 5.8.2

Elementfördelningar i normal hud bestämda med protonmikrostråle med en strålyta av  $10 \times 100 \text{ µm}^2$  med den längsta sidan parallell med hudstrukturen. Den streckade linjen visar provtjockleken (högra skalan) bestämt från bakgrunden i PIXE-spektrat. De heldragna linjerna är enbart hjälplinjer för ögat och felgränserna visar den statistiska osäkerheten svarande mot  $\pm 1$  standardavvikelse.

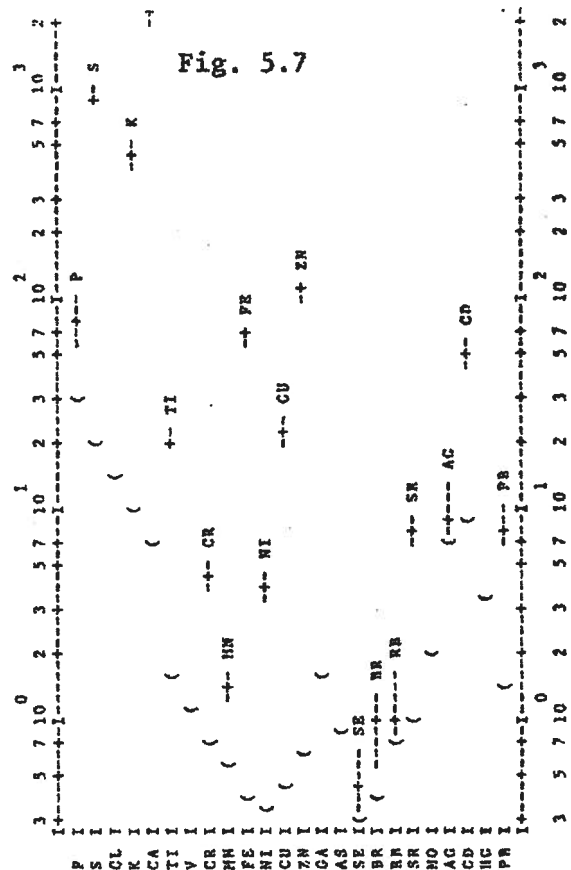


Fig. 5.7

Resultat vid PIXE analys av en punkt på ett nagel-spån. Stråldiametern var 1 mm. Bland de detekterade ämnena finns bl a Cd. De angivna resultaten är uttryckta i ppm.

--- Halt med felgränser ( $\pm 1$  sigma)  
( ) detektionsgräns

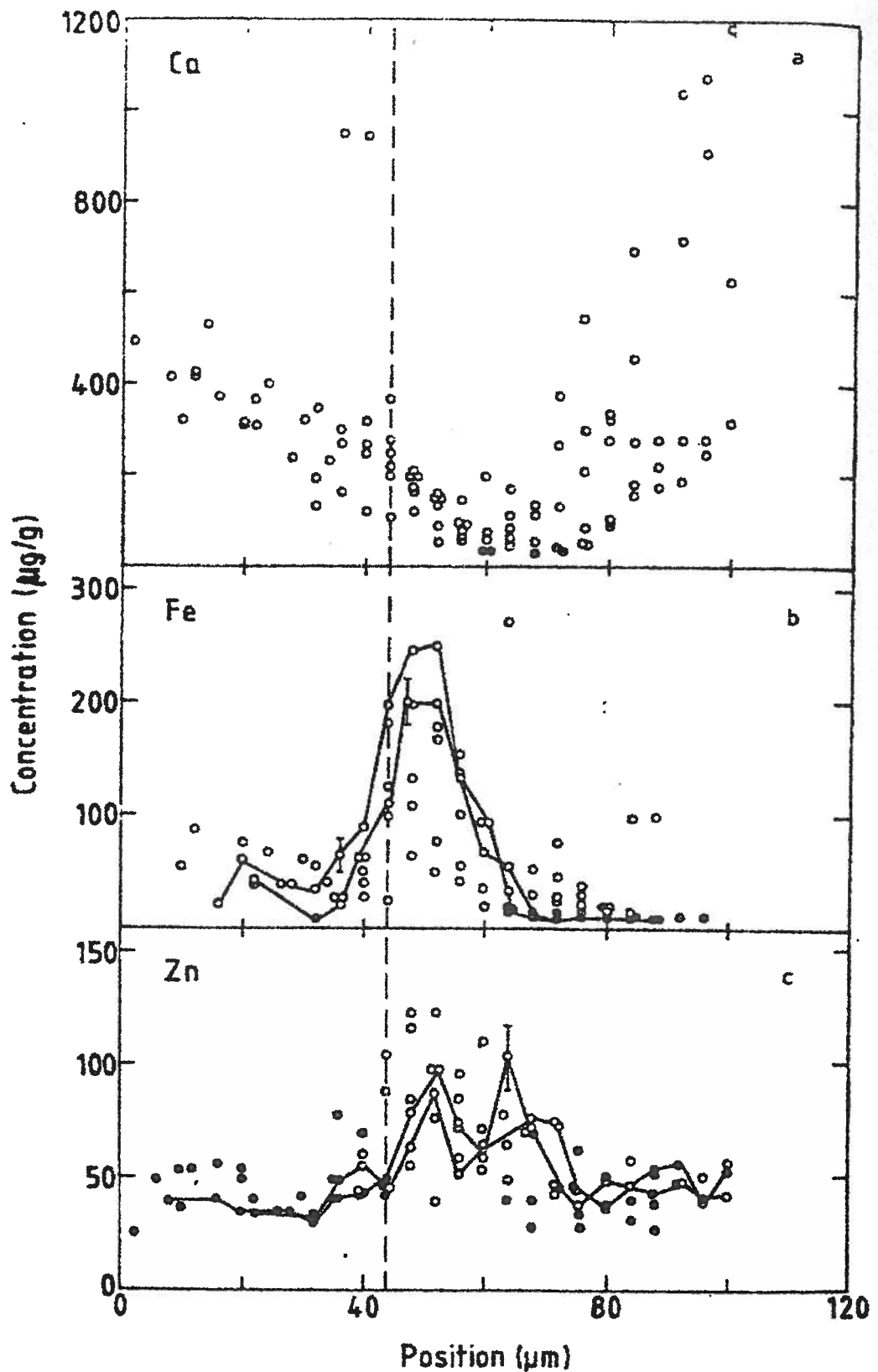


Fig. 5.8.3

Trace elemental distributions plotted for a) calcium, b) iron and c) zinc, versus position for all sections with position related by matching the position of the steep phosphorus increase in each section to the position in one section (indicated by broken line). Values below the detection limits are represented by filled circles at the detection limits. The solid lines in b) and c) connect corresponding values from section a and c of sample 1. The error bars show the statistical uncertainties  $\pm 1$  S.D..

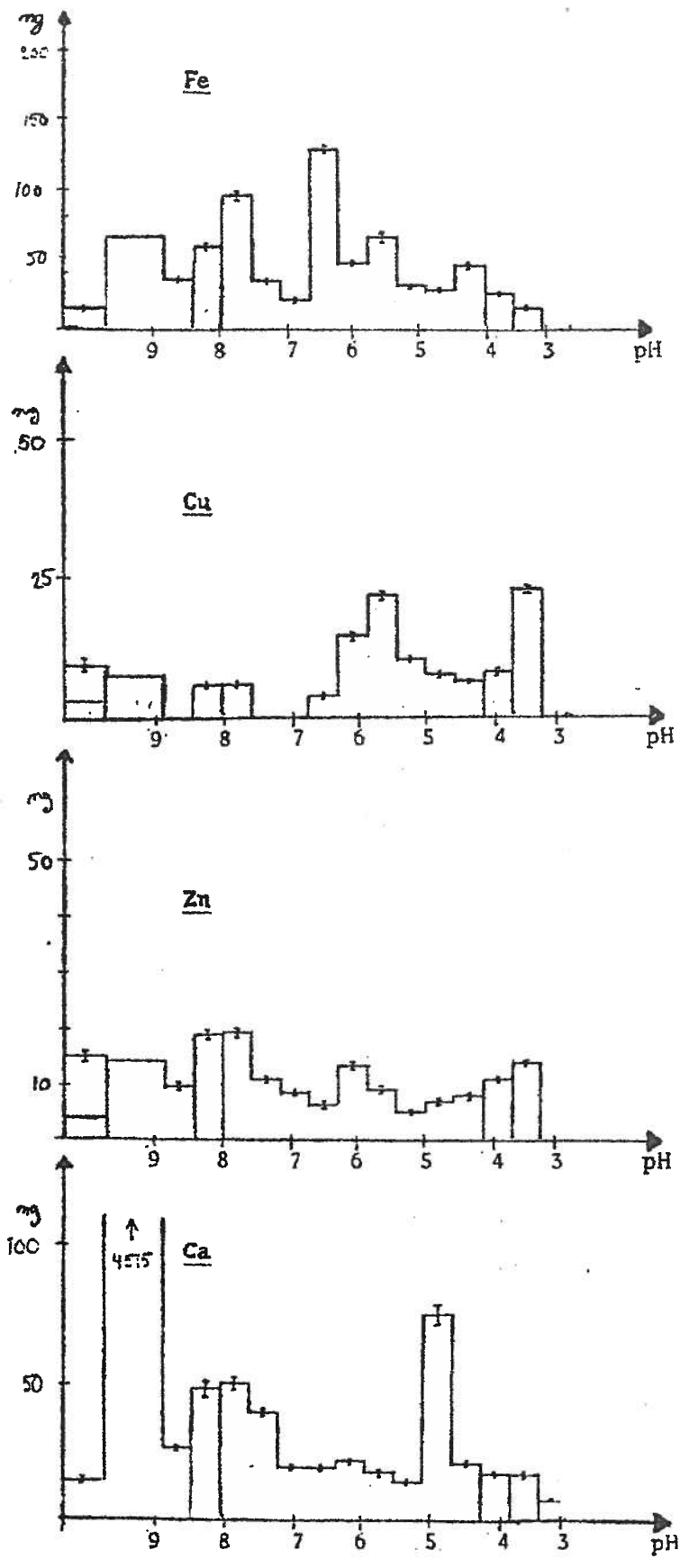
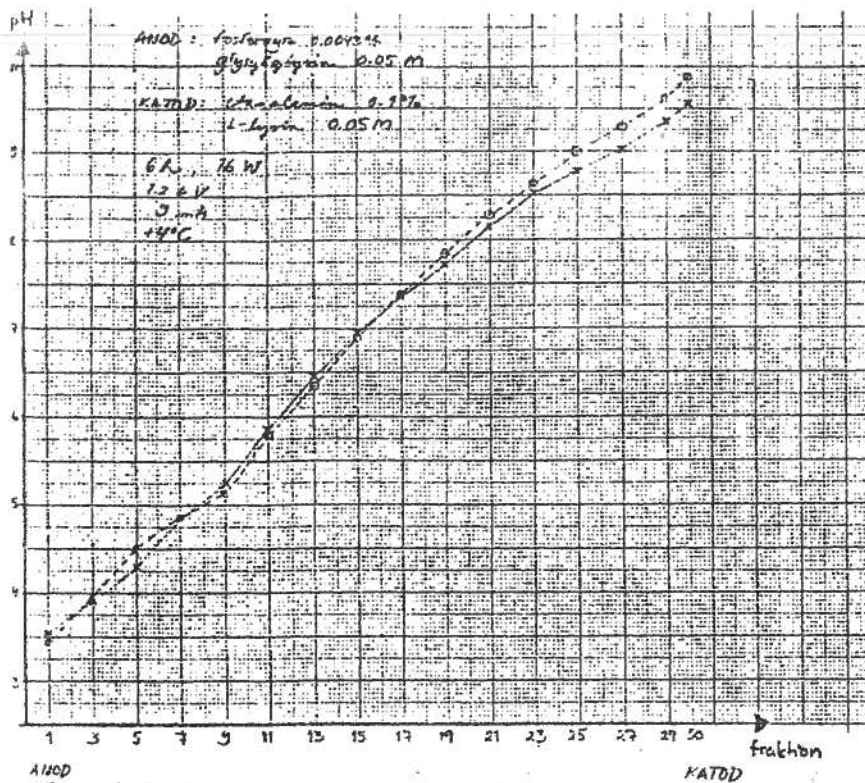


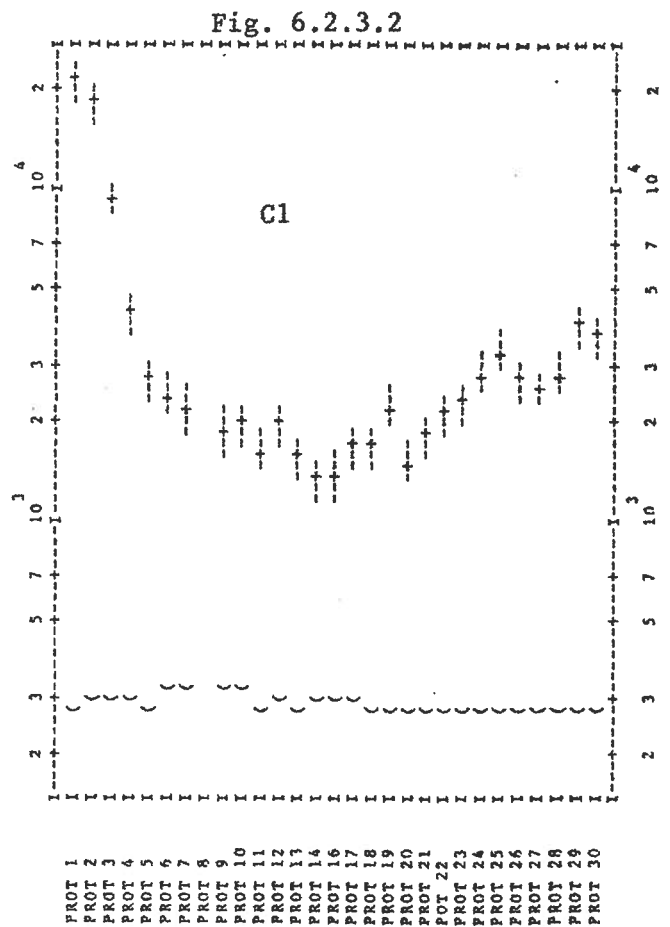
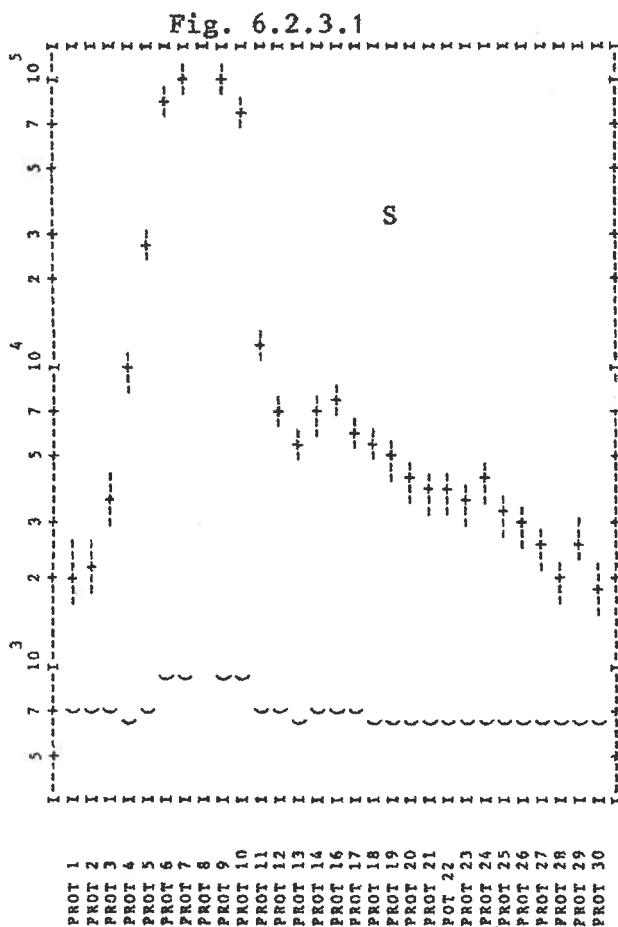
Diagram 6.2.1  
 Nivåer av Fe, Cu, Zn och Ca i en gel efter isoelektrisk fokusering av serum. Olika protein fokuseras till olika pH-intervall.



ANOD

Fig. 6.2.2

pH-gradienten vid preparativ isoelektrisk fokusering på en "granulerad" gel i två olika fall, x blankfokusering o med 5 ml plasma. Mätningarna gjordes efter avslutad fokusering.



Fördelning av några ämnen i olika fraktioner efter preparativ isoelektrisk fokusering. Pga en misstänkt kontaminering från de filterpappersremor som utgör vätskereservoarer för elektrolytlösningarna kan inte källan till ämnena fastläggas.

Fig. 6.2.3.3

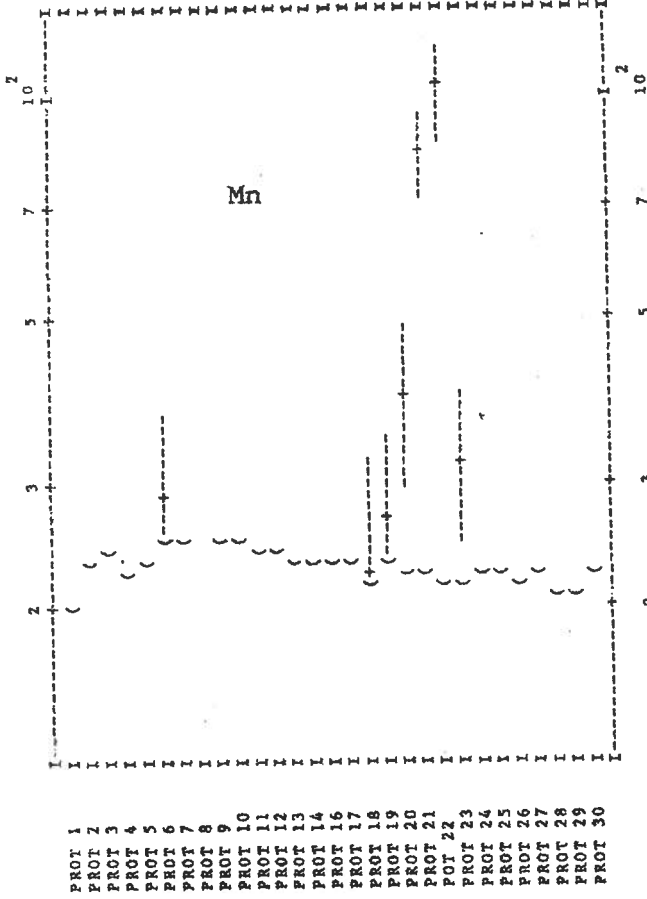
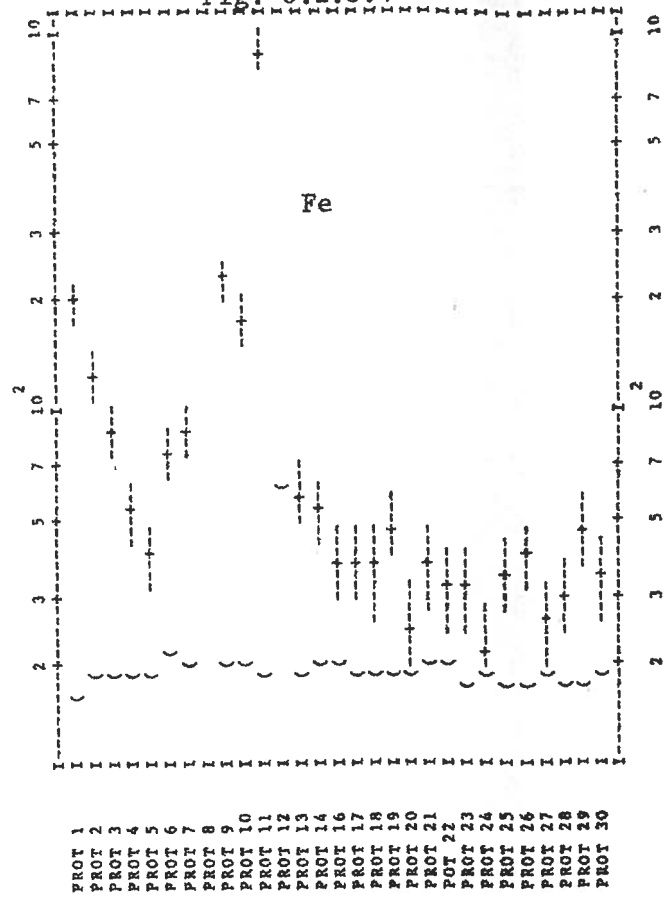


Fig. 6.2.3.4



Fördelning av några ämnen i olika fraktioner efter preparativ isoelektrisk fokusering. Pga en misstänkt kontaminering från de filterpappersremor som utgör vätskereservoarer för elektrolytlösningarna kan inte källan till ämnena fastläggas.

Fig. 6.2.3.5

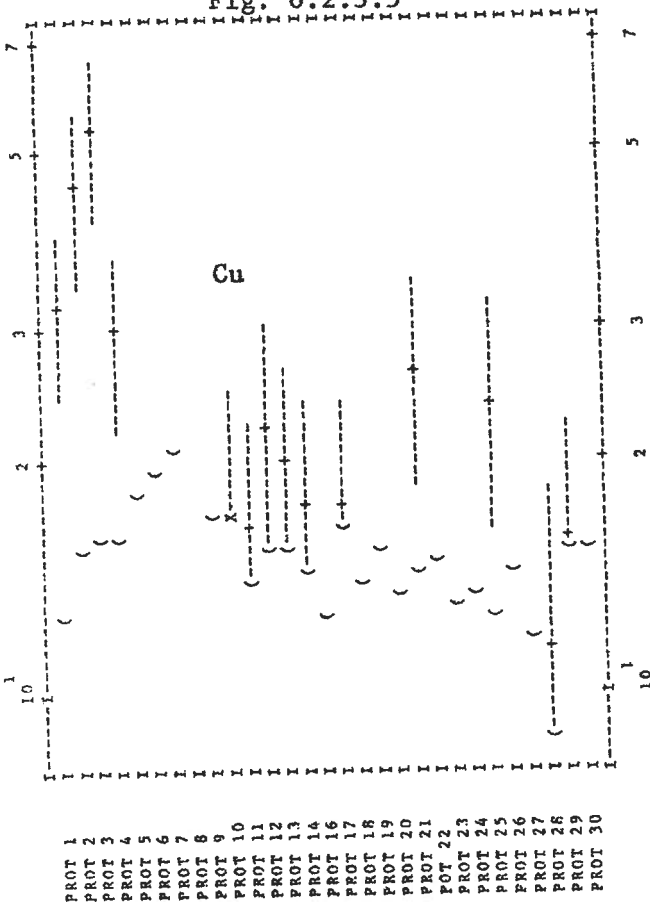
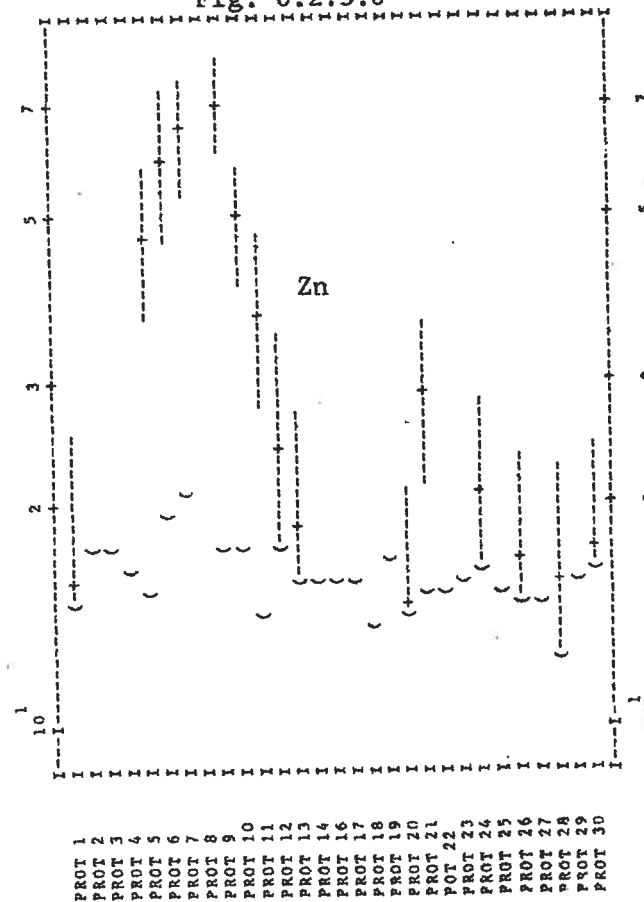
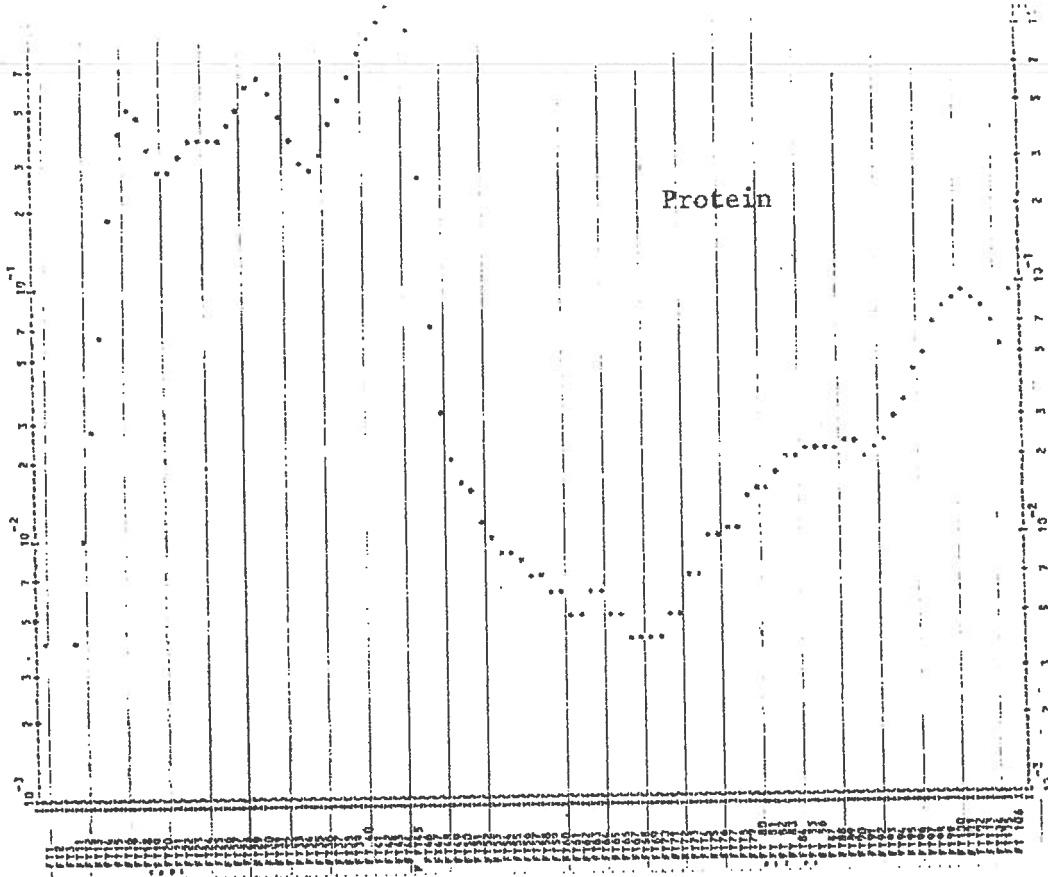


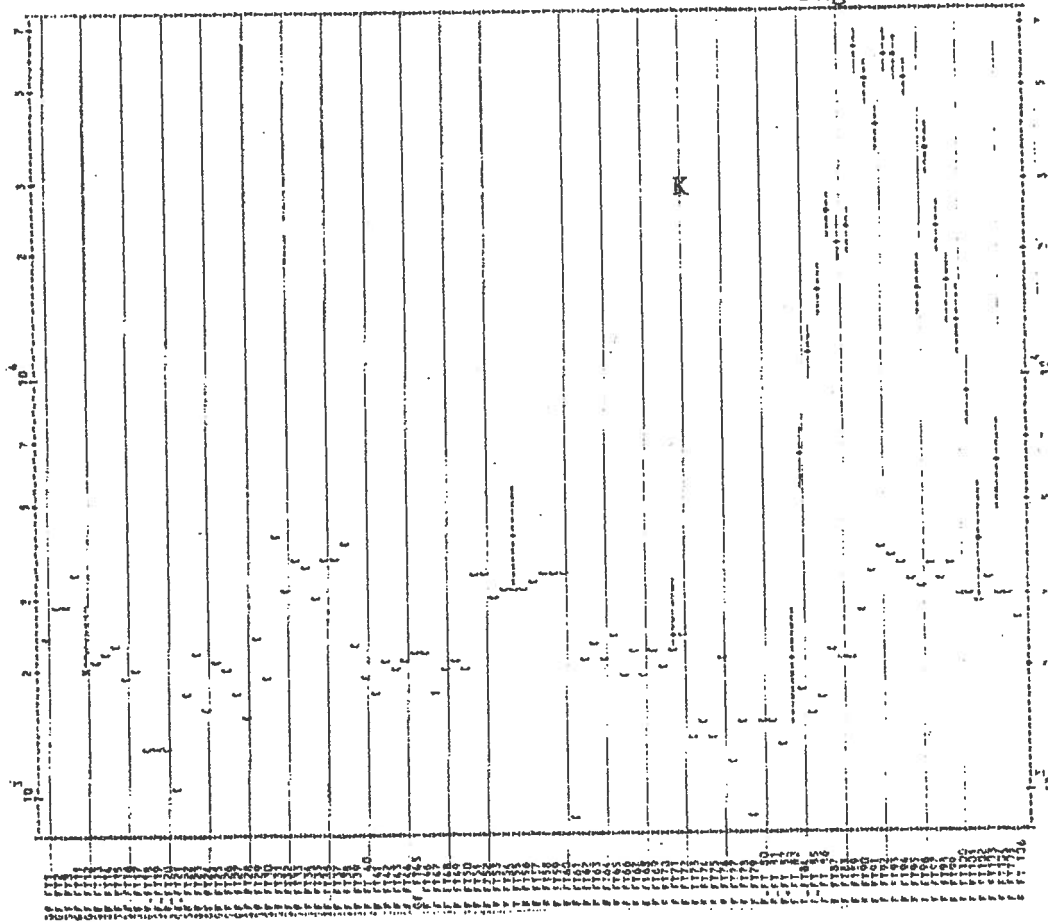
Fig. 6.2.3.6





Proteinhalt bestämd med UV-absorption vid 280 nm.  
 Den första av de tre topparna (=FT 17) innehåller bl a IgM  
 och  $\alpha_2$ -makroglobulin, den andra (=FT 30) innehåller bla  
 IgG och IgA, medan i den tredje bl a finns albumin.  
 I den sista toppen (=FT 101) finns peptider, salter och  
 andra lågmolekylära substanser.

Fig. 6.3.1



K, Ca och en stor del av Br kommer bland de lågmolekylära  
 substanserna, vilket visar att dessa ämnen inte varit  
 bundna till några högmolekylära proteiner.

Fig. 6.3.2



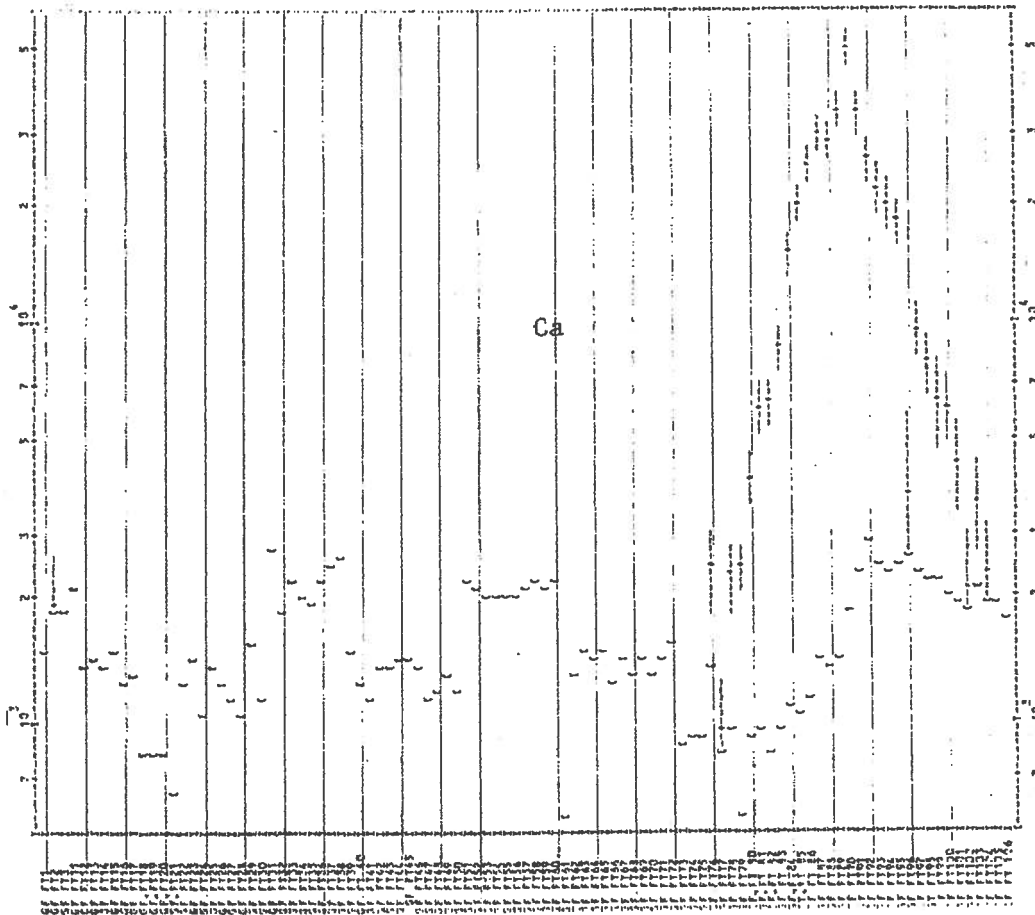
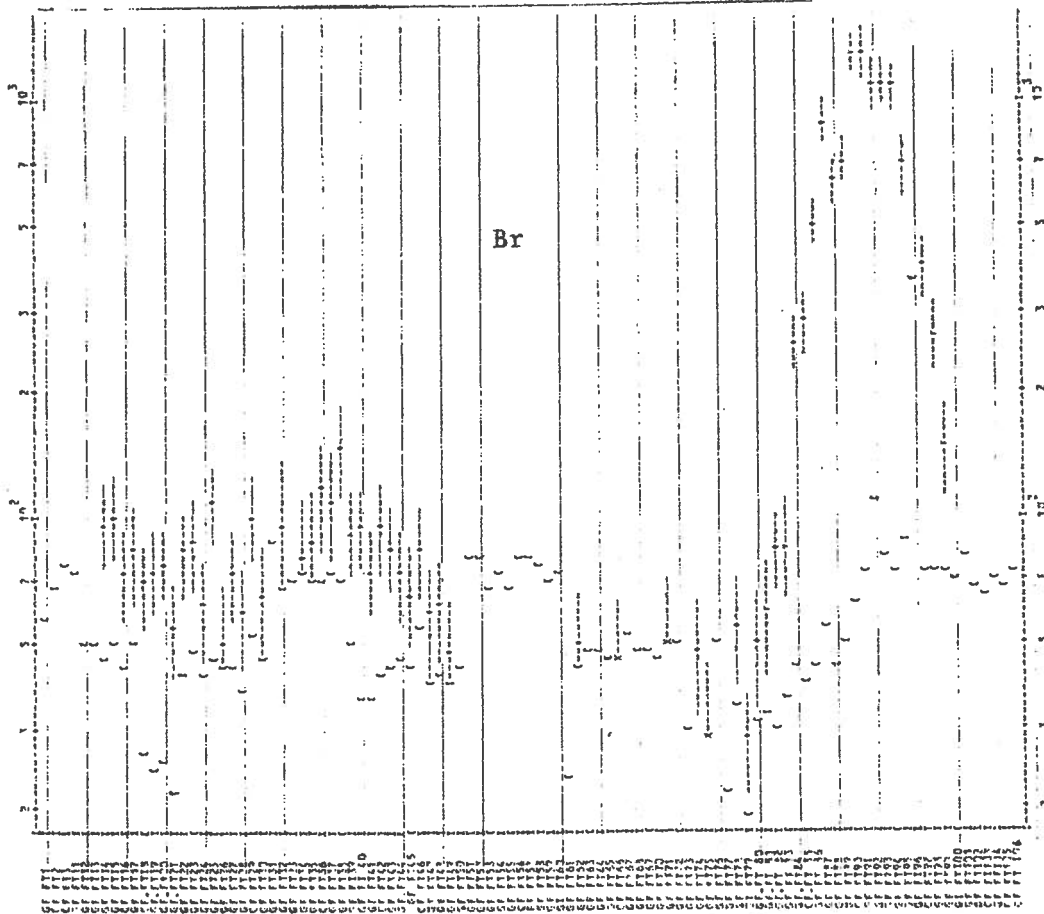


Fig. 6.3.3

K, Ca och en stor del av Br kommer bland de lågmolekylära substanserna, vilket visar att dessa ämnen inte varit bundna till några högmolekylära proteiner. En viss förekomst av Br i samband med proteintopparna kan dock skönjas.

Fig. 6.3.4



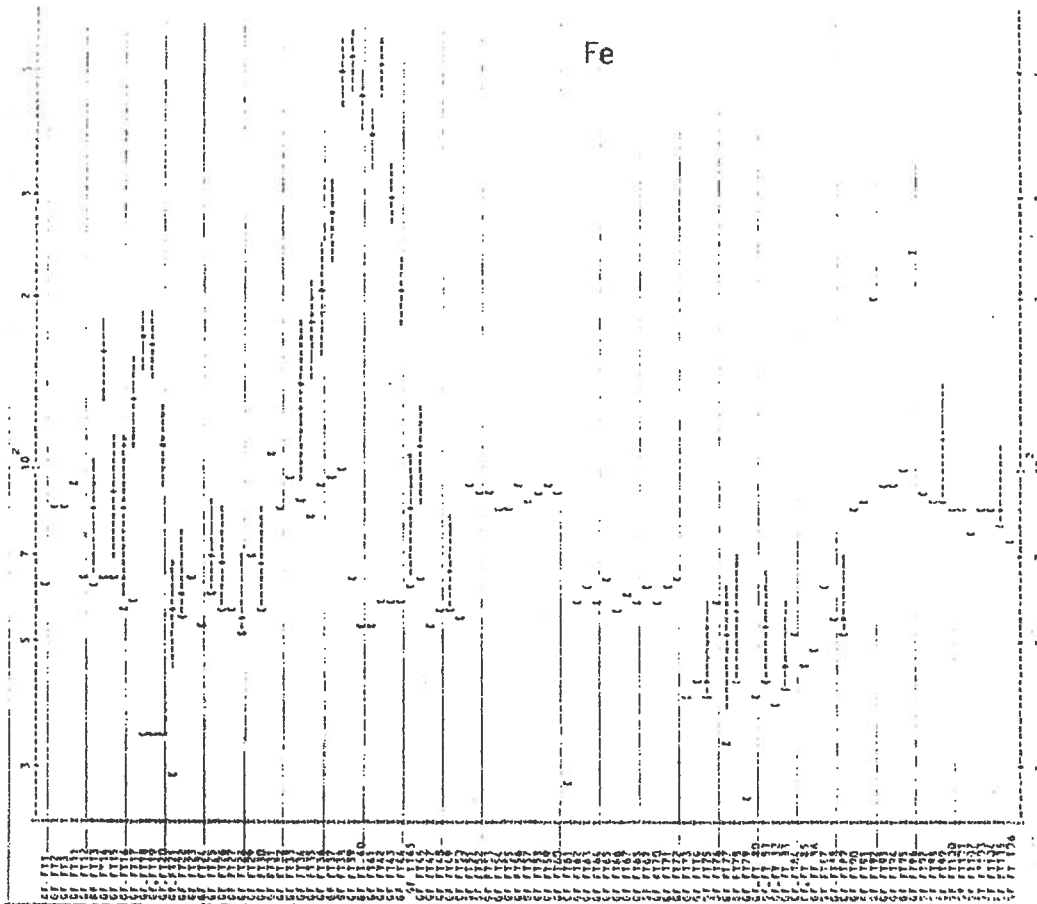
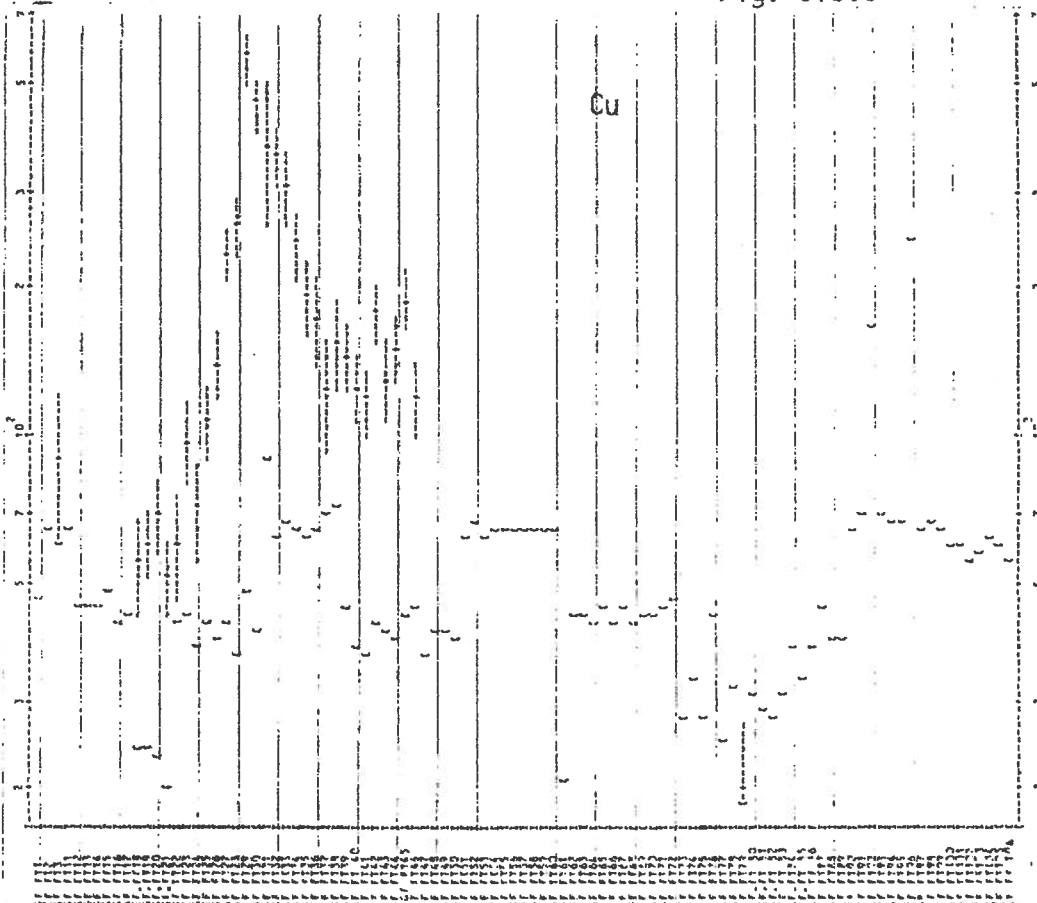
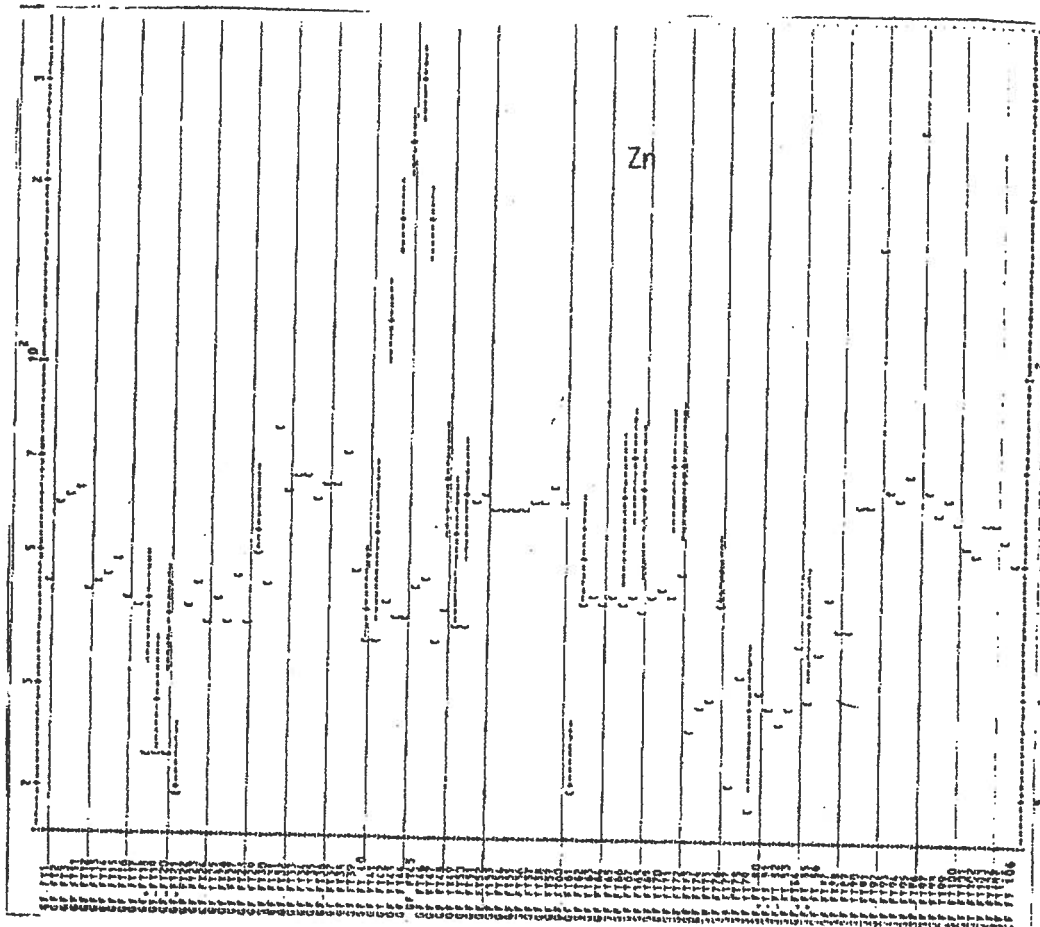


Fig. 6.3.5

Fe binds i serum till största delen till transferrin, Cu till 95 % till ceruloplasmin, medan ca 60 % av Zn binds till albumin.

Fig. 6.3.6





Fe binds i serum till största delen till transferrin, Cu till 95 % till ceruloplasmin, medan ca 60 % av Zn binds till albumin.

Fig. 6.3.7

Dessa proteiners läge överensstämmer med ovanstående metallers fördelningar, men för absolut säker identifiering av metallbindande protein krävs analys med t ex immunokemiska metoder.