LUND UNIVERSITY

Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material

Pallon, Jan; Malmqvist, Klas; Akselsson, Roland

1984

Link to publication

Citation for published version (APA):
Pallon, J., Malmqvist, K., & Akselsson, R. (1984). *Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material*. (Arbetsmiljöfondens sammanfattningar; Vol. 778). ASF Arbetsmiljöfonden.

Total number of authors:
3

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

Download date: 17. Dec. 2025

ARBETARSKYDDSFONDENS SAMMANFATTNINGAR

ASFs Pnr 80-0190 Kemiska problemområden, allmänt (10)
Metaller och metallföreningar (18)

Nr 778

Metodik för snabba multielement-analyser av biologiskt material

För innehållet i sammanfattningen svarar Jan Pallon, Klas Malmqvist, Lunds Tekniska Högskola, Avdelningen för Kärnfysik, Sölvegatan 14, 223 62 Lund, tel 046-10 76 31 och Roland Akselsson, Lunds Tekniska Högskola, Avdelningen för Arbetsmiljöteknik, Box 725, 220 07 Lund.

PIXE — Particle Induced X-ray Emission
(partikelinducerad röntgenstrålning)

PIXE är en snabb och känslig analysmetod för bestämning av grundämnen i små prov (typiskt milligram till gram). Metoden kan bestämma alla grundämnen tyngre än aluminium samtidigt. Den minsta mängd som kan bestämmas (detektionsgränsen), ligger i storleksordningen nanogram (tusenmiljondels gram), medan koncentrationer kan mätas ned till ca en miljondel (ppm).

Protoner (eller tyngre joner) accelereras med en accelerator till hög energi (2—3 MeV) och får träffa provet. Därvid utsänds röntgenstrålning vars energi (våglängd, frekvens) är karaktäristisk för det grundämne som sänt ut den. Röntgenstrålningen detekteras med en speciell detektor ((Si)Lidetektor), och de ämnen som utsänt strålningen identifieras och kvantifieras. En rutinanalys tar ca 1—5 min. PIXE är en analysmetod som är analog med XRF, dvs röntgenfluorescens, men där alstras den utsända strålningen genom att röntgenstrålning med högre energi får bombardera provet.

Inledning

PIXE-metoden (se ruta nedan) är en spårelementanalysmetod som utvecklats i Lund med stöd bl a från ASF, STU och NFR. Idag används den i många laboratorier över hela världen. I Lund används metoden rutinmässigt bl a för analys av luftburna partiklar som samlats in på filter i t ex en arbetsmiljö.

PIXE-metoden har unika egenskaper som med stor framgång torde kunna utnyttjas inom många olika områden. För många av specialisterna är PIXE-metodens egenskaper emellertid ej tillräckligt kända för att metodens fördelar ska kunna tas tillvara t ex vid planering av projekt och genom kombination med avancerad separationsteknik.

För att bedöma hälsorisker från luftföroreningar utgör s k biologisk provtagning i många fall ett mycket attraktivt alternativ, eftersom analys efter sådan provtagning kan ge mått som är bättre korrelerade till individernas risk och som är mindre kostsamma än de mått man får genom exponeringsmätningar.

Avsikten med detta projekt har varit att utveckla några rutiner för PIXE-analys av biologiska prov av potentiellt arbetsmiljöintresse. Ett krav på rutinerna har varit att de skulle ta vara på åtminstone någon av PIXE-metodens speciella fördelar — multielementkapacitet, snabbhet och låga detektionsgränser i små prov.

Ett mycket viktigt skäl för projektet har dessutom varit att exemplifiera PIXE-metodens användbarhet såväl vid direkt analys av biologiskt prov som i kombination med någon separationsmetod. Det är vår förhoppning att någon toxikolog, yrkesmedicinare, yrkeshygieniker, osv med specifika frågeställningar ska kunna extrapolera till andra typer av prov och annan förkoncentrations-/separationsmetodik, som tillsammans med PIXE-metoden kan skapa unika möjligheter till forskning och tillämpning.

Preparering av prov för PIXE

För att kunna genomföra PIXE-analys av biologiska prov fordras ofta någon form av förbehandling. Eftersom halterna av de intressanta ämnena är låga eller mycket låga är det mycket viktigt att den preparerings/koncentrationsteknik man använder inte förorenar provet genom att tillföra nya ämnen (metallkärl eller metallverktyg kan t ex inte användas), eller att den orsakar förluster av andra ämnen.

Frystorkning

En teknik där frystorkning ingår som ett viktigt steg har utvecklats, och möjliggör analys av prover som blod, lever, njure och liknande vävnader.

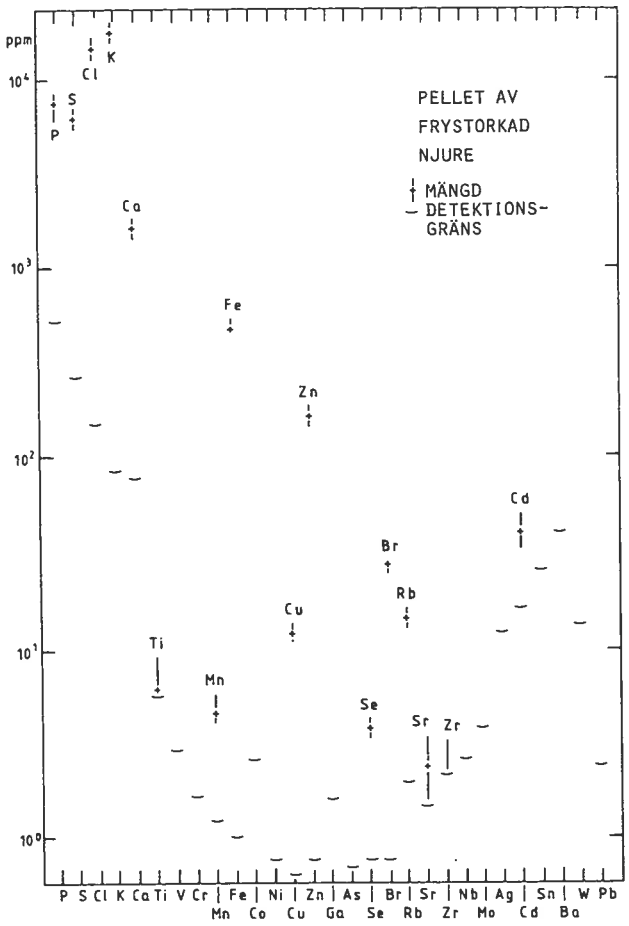
Frystorkningen avlägsnar vattnet ur proven och koncentrerar det därmed till en grad som beror på vatteninnehållet. Efter torkningen kan materialet användas för provberedning eller koncentreras vidare med någon annan metod t ex lågtemperaturinaskning.

Minsta bestämbara koncentration går ned till ca 1 ppm i det behandlade och analyserade provet. Antag att det ursprungliga provet har en torrvikt på 20 % (efter frystorkning väger provet 20 % av sin ursprungliga vikt). Motsvarande detektionsgränser för det "våta" provet blir då 0,20 ppm, vilket är ett typiskt värde för många biologiska material.

Med standardmetoden frystorkning, malning och pelletpressning har prov av blod, lever, njure, avföring och liknande analyserats, se figur 1. I blod detekteras alltid fosfor, svavel, klor, kalium, kalcium, järn, koppar, zink, brom, rubidium och strontium, medan selen återfinns i vissa prov. Grundämnena krom, nickel eller kobolt detekteras normalt ej.

Lågtemperaturinaskning

Lågtemperaturinaskning sker då syrgas efter att ha passerat ett mikrovågsfält, får strömma över provet. Syrgasen består då, förutom av vanliga syremolekyler, också av enskilda syreatomer och joner vilka är starkt reaktiva. Vid kontakt med provet bildas bl a oxider av kol och kväve vilka förs bort i gasform. Inaskning sker redan vid en temperatur av omkring 100 grader. Koncentreringsfaktorn kan variera mellan 2 och 200 gånger beroende på andelen organisk



Figur 1.
Resultat från PIXE-analys av en pellet av frystorkad och homogeniserad njure. Halterna svarar mot ppm i det torra provet.

substans i provet. Förutom de organiska delarna kan även flyktiga ämnen såsom svavel, klor, brom, kvicksilver och selen försvinna i varierande grad, dock i mycket mindre grad än vid högtemperaturinaskning i ugn.

Lågtemperaturinaskning kan alltså användas som ett ytterligare koncentrationssteg om man accepterar förluster av vissa ämnen. Man inför emellertid ytterligare ett moment i hanteringen, vilket ökar risken att det biologiska materialet oavsiktligt förorenas. I många fall är därför enbart frystorkning av provet att föredra.

Jonbyteskromatografi av urin

En metod för selektiv koncentrering (bara vissa ämnen koncentreras) har utnyttjats för att bestämma halter av en del grundämnen i bl a urin. Metoden lämpar sig för avsaltning av vätskor. Provlösningen

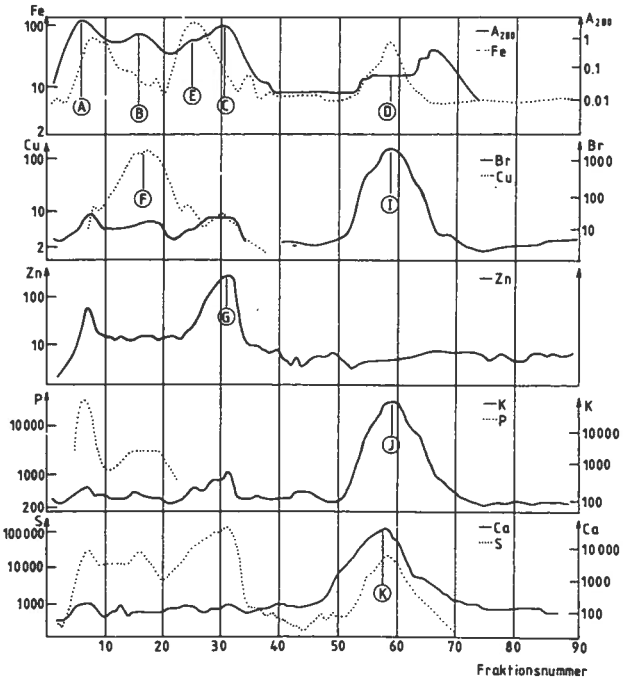
får passera genom en kolonn fylld med en jonbytare (Chelex-100 i ammoniumform). Framförallt binds då metaller till jonbytaren medan andra ämnen försvinner rakt igenom. Genom att skölja ur kolonnen med syra kan man få metallerna att lossna och samlas upp i en liten volym vätska (stor koncentreringsfaktor). Hittills har mangan, nickel, koppar, zink, kobolt, molybden, kadmium och bly kunnat koncentreras med denna metod.

Efter avsaltning/koncentrering med Chelex-100 har i urin från icke-exponerade personer uppmätts bl a nickel, koppar, zink och molybden.

Gelfiltrering för separation av serumproteiner

Man vet att vissa metaller binds till speciella proteiner i t ex blodserum. Olika tekniker för att särskilja dessa har prövats för att undersöka om analys av metallbindande protein kan användas för att visa på graden av exponering.

Med hjälp av s k gelfiltrering (Sephadex G-200, tris-acetatbuffert) har separation av proteiner i blodserum utförts. Vid separationen sorteras proteinerna upp i storleksordning och samlas upp i 80—100 fraktioner. Dessa frystorkas och prov tillverkas. Man finner bl a att järn, koppar och zink förekommer maximalt i de fraktioner där de metallbindande proteinerna transferrin, ceruloplasmin och albumin förekommer. Se figur 2. Svavel är nära kopplat till halten av protein (varierar på likartat sätt). Gelfiltrering är en skonsam men grov separationsmetod och bör kunna kompletteras med en efterföljande mer högupplösande metod.

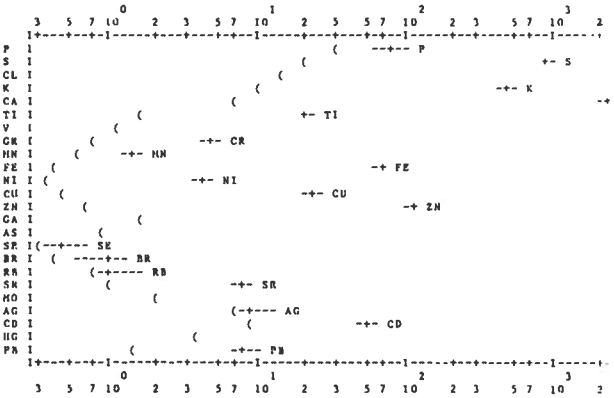


Figur 2.
Fördelningar av ett antal element i blodserum efter proteinseparation genom gelfiltrering. Mängdskalorna är logaritmiska. Den horisontella skalan är ungefär en logaritmisk skala av molekylstorleken. Kurvan A_{280} visar proteinmängden moniterad med UV-absorption vid 280 nm. Toppen vid A innehåller IgM och α_2-makroglobulin, vid B finns IgG och IgA, medan vid C främst finns albumin. I området efter D kommer lågmolekylära substanser ut.

Svavel och fosfor har fördelningar som väl följer proteinhaltskurvan. Järn, koppar och zink har toppar vid E, F och G som sammanfaller med de metallbindande proteinerna transferrin, ceruloplasmin och albumin respektive. Kalium, kalcium och brom kommer ut med lågmolekylära substanser vid I, J och K.

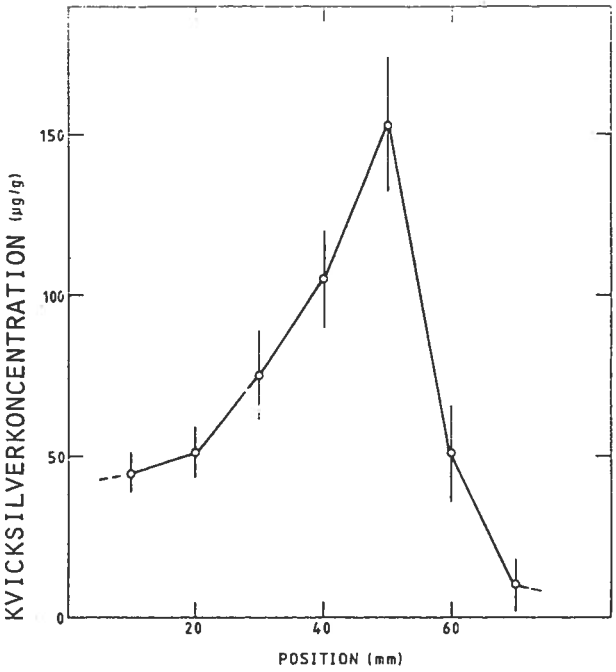
Hår och naglar

Enskilda hårstrån och nagelprov kan analyseras direkt utan någon förbehandling, se figur 3. Genom att göra analysen i provets tillväxtriktning kan man få en uppfattning om tidsförloppet vid inlagringen av de olika ämnena då håret/nageln bildades.



Figur 3.
Resultat vid PIXE-analys av en punkt på ett nagelspån. Stråldiametern var 1 mm. Bland de detekterade ämnena finns bl a bly och kadmium. Resultaten är uttryckta i ppm.

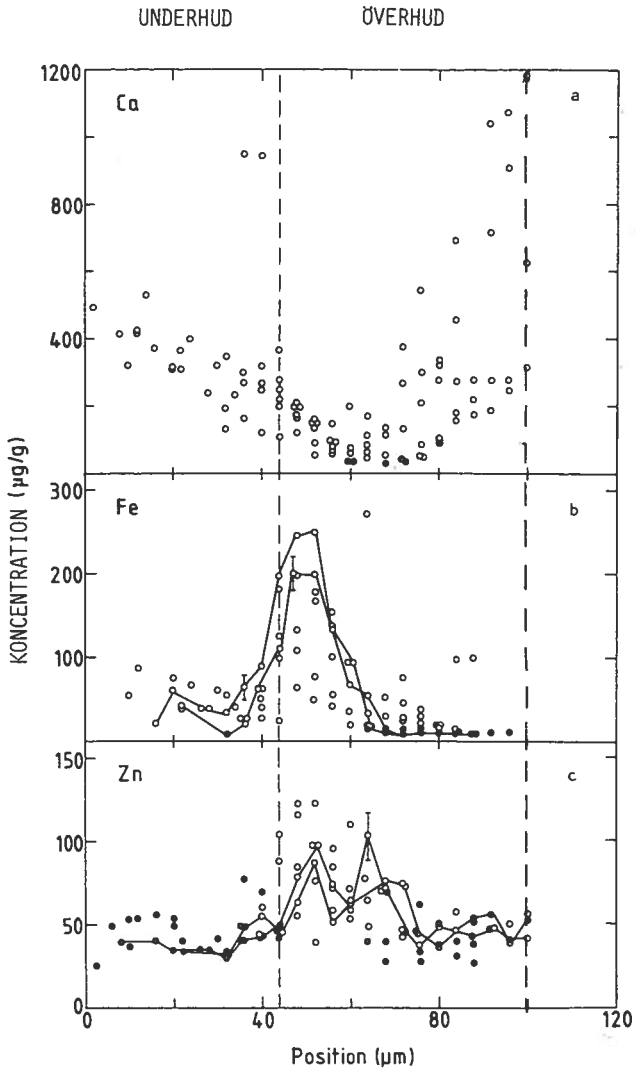
Hår analyseras direkt i en speciell analyskammare där håret kan flyttas i längdriktningen. På så sätt erhålls elementfördelningar längs med håret, se figur 4. En sådan fördelning kan avspegla halter av ämnen i kroppen då håret bildades, men förändringar i hårets elementinnehåll kan också ske genom nedsmutsning, biologiska processer i håret, liksom urlakning vid t ex hårtvätt. En enkel metod har utvecklats för att avgöra om ett ämne huvudsakligen ligger på ytan, finns i centrum eller är jämnt fördelat inuti hårstrået, vilket kan vara till en viss hjälp vid tolkningen av resultaten.



Figur 4.
Kvicksilverkoncentrationen längs ett hårstrå bestämd med PIXE-analys. Origo motsvarar hårroten. Håret kommer från en kvicksilverförgiftad person.

Hud med mikroråle

Vid normal PIXE-analys är den bestrålade arean av storleksordningen mm² till cm², men genom fokusering av protonstrålen till s k mikroråle minskas den analyserade provarean till typiskt 0,01* 0,005 mm². Jämfört med analys med elektronråle i ett elektronmikroskop (elektronmikroprob) är detektionsgränserna för protonmikroråle 10—100 gånger lägre, men elektronmikroproben kan å andra sidan urskilja mindre detaljer. Med protonmikroråle har vi bl a studerat tunna (0,01 mm) snitt av hud. Fördelningar i djupled av kalium, kalcium och vissa metaller har uppmätts och visat sig stämma väl överens med motsvarande analyser med elektromikroprob, se figur 5.



Figur 5.
Mikroråleanalys av ett snitt av hud i djupled. Hudytan finns vid position 100 och gränsen mellan över- och underhud strax ovanför position 40. Figuren visar fördelningarna av kalcium, järn och zink.

Rapporten

Metodik för snabba multielementanalyser av biologiskt material, kan beställas kostnadsfritt från Lunds Tekniska Högskola, Avdelningen för Kärnfysik, telefon 046-10 76 31.

ARBETARSKYDDSFONDEN

Tunnelgatan 31, Box 1122, 111 81 Stockholm
Tel 08/14 32 00.

Liber Tryck Stockholm 1984