

Grafit Tüplü Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrisi ile Kanda Kurşun Tayini

Asuman H. GÜLER*
Recep MÜREVA**
Kemal ÖZKAN***

ÖZET

Çalışmamızda, laboratuvarımızda mevcut Rank Hilger marka H1550 tipi, grafit tüplü Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (AAS) cihazı ile kan kurşunu tayininde en uygun yöntemi saptamayı amaçladık.

Kaynak araştırmalarımız ve deneylerimiz sonucunda, Triton X-100'le hemoliz etme yönteminde deney süresinin kısa, bulaşma tehlikesinin az olduğunu ve tatmin edici sonuçlar alındığını gördük. Sonuçta grafit tüplü AAS ile kan kurşunu tayininde en uygun ve güvenilir yöntemin Triton X-100'le hemoliz etme yöntemi olduğu kanısına vardık.

SUMMARY

Determination of Lead in Blood with Atomic Absorbtion Spectrophotometry Containing Graphite Tube

In our study we aimed to establish the best method, in order to measure lead in blood with the Atomic Absorbtion Spectrophotometry (AAS), named Rank Hilger, H1550 type, present in our laboratory.

In the result of our experiments and investigations, we found out that with the Triton X-100 hemolysing method results were fine, the experiment time was short and there was very little contamination risk. Finally we got the opinion that in measuring blood lead with AAS containing graphite tube the best and believable method was to hemolyse with Triton X-100 method.

* Yrd. Doç. Dr.; Uludağ Üniv. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

** Kimya Mühendisi.; Uludağ Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Merkez Laboratuvarı.

*** Prof. Dr.; Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

Kanda kurşun tayini gerek kurşun konsantrasyonunun düşük olması, gerekse bu analizde "interferans" ın¹ çok önemli bir problem olması yüzünden araştırmacıların ilgisini çekmiş ve bu konuda çok sayıda bilimsel araştırma gerçekleştirilmiştir².

Alevsiz AAS'nin kan kurşunu tayininde hızlı ve güvenilir bir analiz sağlaması dolayısıyla önemli yeri vardır. Karbon çubuk, grafit tüp, grafit fırını terimleri ile adlandırılan alevsiz atomik absorpsiyon teknikleri, geleneksel alevli atomik absorpsiyon tekniklerinden en az 100 defa daha duyarlıdır^{3,4}.

Grafit tüplü AAS ile kan kurşunu tayininde direkt metodun "precision" problemi⁵, ekstraksiyon metodlarının bulaşma tehlikesi⁶, "digestion" metodunun⁷ hızlı analiz sağlamaması nedenlerinden dolayı biz, Triton X-100 ile hemoliz etme yöntemini^{8,9} kullandık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Grafit tüplü AAS'de kan kurşunu tayininde Triton X-100'le hemoliz etme yöntemi çeşitli kaynak araştırmalarımız sonucu tercih edilerek, kullanıldı. Bu yöntemde kullanılan başlıca ayıraç ve araçlar şunlardı:

Triton X-100 (% 5'lik): Hazırlanırken özellikle mezür kullanıldı, çünkü deterjan özelliği olan bu madde pipetin iç yüzeyine bulaşarak, pipeti tıkiyordu.

Kurşun nitrat standart çözeltisi (4,83 mmol/l): 1 mg/ml'de kurşun içeren "BDH Chemical Ltd." tarafından atomik absorpsiyon spektroskopisi için özel hazırlanmış, 14036 nolu çözelti kullanıldı.

Kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$) Merck firmasının (Fed Almanya) 7397 nolu ürünü; % 99 saflıkta olan bu madde BDH'ın yukarda sözedilen sertifikalı standart çözeltisi ile karşılaştırma yapabilmek için kullanıldı.

Temizlik işlerinde kullanılan nitrik asit Merck firmasına (Fed. Almanya) aitti ve kurşun içeriği % 0.0005 gr. dı. Analizlerde ise kurşun içeriği % 0.000005 gr olan BDH firmasına ait nitrik asit kullanıldı.

Antikoagulan olarak kullanılan disodyum EDTA maksimum % 0.001 gr Pb içeriyordu.

AAS'miz, Rank Hilger (Westwood Margate, Kent. CT 9 4 JL) marka idi. Cihazımızda "single beam" optik sistemi mevcuttu. Kurşun için "hollow cathode lamb", "back ground" düzeltimi için de hidrojen lambası kullanıldı^{10,11}.

İçinde yaklaşık 1 mg EDTA bulunan, 5 ml'lik polipropilen tüplere 2 şer ml venöz kan konarak numuneler hazırlandı. Sonra 200 ml antikoagulanlı kan % 5 lik Triton X-100 ile 2 kez seyreltildi.

Cihaz parametrelerinde meydana gelebilecek değişiklikler yüzünden standart kalibrasyon eğrisi günlük olarak hazırlandı. Çalışma standartları da aynen kan gibi 2 kez seyreltildi.

Ayarlar kullanım kılavuzuna göre tamamlanıp, cihaz çalışmaya hazır hale geldikten sonra, hazırlanan standart numunelerden 3 ml otomatik pipetle (Gilson marka) grafit fırına verilerek ölçüm işlemine başlandı. Her numune 3 kez çalışılarak ortalama değer alındı. Standart eğrinin 1 mg/ml ye kadar doğrusallığı sınıandı.

Yaklaşık her 10-12 numune verilışinden sonra grafit fırını, devamlı argon gazı gönderilerek ve yüksek sıcaklık (2500°C) uygulanarak temizlendi. Böylece birikim etkisi "memory effect" önlenmiş oldu.

BULGULAR

Grafit tüpü AAS'de kan kurşunu tayin yöntemimizin güvenilirliğini göstermek amacıyla yaptığımız, çalışmamıza ait bazı kalite kontrol sonuçları şöyle özetlenebilir:

Aynı numune 3 defa çalışıp ortalama değer alındığında;

n = 10 için x = 0.247 mg/L,	SD = 0.044,	CV = % 17.7
n = 20 için x = 0.196 mg/L,	SD = 0.040,	CV = % 20.4
n = 36 için x = 0.206 mg/L,	SD = 0.051,	CV = % 24.7
n = 50 için x = 0.196 mg/L,	SD = 0.038,	CV = % 19.3

olarak bulundu.

"Recovery" çalışmamızda elde ettiğimiz değerler ise Tablo: I'de gösterilmiştir.

Tablo: I
Grafit Tüplü AAS'de 100 Mg/L lik Kurşun Standardı Kullanılarak
Saptanan % "Recovery" Değerleri

Eklene Kurşun (mg/L)	Kurşun Seviyesi (mg/L)	% "Recovery"
—	0.46	—
0.2	0.59	89
0.4	0.93	108
0.6	1.10	103

TARTIŞMA

Grafit tüplü AAS ile kurşun analizi yaparken atomik sinyaller çok hızlı geçmekte, ayrıca hidrojen lambası da kullanılmıyorsa, "non-atomik" absorbands, atomik absorbandsın yanında ikinci bir pik oluşturarak, absorbands göstergesinde okuma yapılmasını hemen hemen imkansız kılmaktadır⁸. Bu nedenlerden dolayı AAS cihazına bir "pen recorder" bağlanması gerekliliği doğmuş ve birçok araştırmada da bu nedenle kullanılmıştır^{12,13-16}. Ama "integrate" modunda çalışırken "pen recorder" a gerek kalmaz. Bizim çalışmamızda uyguladığımız gibi "integrate" kolaylığı bazı AAS cihazlarında mevcut ve bazı çalışmalarda kullanılmıştır^{17,18}.

Kan kurşunu tayininde interferans çok önemli bir sorundur. Numuneler atomize edildiklerinde gaz moleküler parçacıklar, toz partikülleri, duman ve diğen etmenlerin bulunması yüzünden katot lambasından gelen ışığı absorblayabilir veya dağıtabilir. Bu "background" absorbsiyondur. Eğer herhangi bir düzeltme yapılmazsa, numune absorbandsı daha büyük ve sonuç da yanlış olarak yüksek çıkacaktır. Bu sorun ya ilgilenilen elementi içermeyen bir çözelti, ya da döteryum "background" düzelticisi kullanılarak çözümlenebilir. Ayrıca nitrik asit ve hidrojen peroksit gibi oksitleyici elemanların "background" interferansını azalttığı da belirtilmiştir¹⁹.

Biyolojik materyallerde eser element tayini yapılırken, numune hazırlama işlemlerinin az olması, hızlı bir analiz sağlanması ve asıl önemlisi bulaşma tehlikesini azaltması istenen bir durumdur. Bunları sağlamaya yönelik çeşitli yöntemler geli-

tirilmiştir. Biz, direk metodu zayıf "precision"u yüzünden¹⁵, ekstraksiyon metodlarını da bulaşma tehlikesi fazla olduğu ve zaman kaybına yol açtığı için²⁰ kullanmadık.

Nitrik asitle "digestion" işlemine tabi tutulan yöntemde, Triton X-100 yöntemine göre non-atomik absorpsiyonun azaldığı söylenmektedir^{21,22}. Ama bu yöntemde de 60-70°C lik bir fırın ve analiz için en az 1 saatlik zaman gerekmesi istenmeyen durumlardır.

Triton X-100 yöntemi tam kan veya eritrositlerdeki kurşun miktar belirtimi için bir çok çalışmada kullanılan ve önerilen indirekt bir yöntemdir. Biz de AAS cihazımız için en uygun olan bu yöntemi çalışmamızda kullandık.

Çeşitli araştırmalarda, değişik laboratuvarlara gönderilerek yapılan kalite kontrol çalışmalarında kan kurşun değerlerine ait ortalama CV değeri % 3.5, %30.68, % 14.75 olarak bulunmuştur^{8,23,24}. Bizim % CV ortalama değerimiz ise % 20.5 tu. CV değerini yüksek bulmamızın sebeplerinden birisi, kullandığımız lambaların yaşından dolayı çok sabit bir emisyon verememesi, diğeri ise pipetleme hatası olabilir.

Grafit tüplü AAS ile kan kurşunu tayininde aşağıdaki noktaların önemli olduğu sonucuna vardık.

Bulaşma tehlikesini azaltmak için kullanılan bütün malzemelerin temizliğine ve kimyasal maddelerin saflık oranlarına dikkat edilmelidir.

Grafit tüpe numune verilirken küçük hacimleri çok iyi ölçen ve numuneyi tüpe eksiksiz ve bulaşma olmadan verebilecek özellikte otomatik pipet seçilmelidir.

Matriks interferansı, kurşun analizinde en büyük sorundur. Numune hacmi, argon gazı akış hızı, küllendirme ve atomizasyon sıcaklıkları bu sorunu azaltan önemli parametrelerdir.

AAS de iyi bir kurşun analizi için en az bidistile su kullanılmalıdır.

AAS cihazları sadece analizin yapılacağı ortamı hazırlamaktadır. Cihaza ait çeşitli parametreler ve deneysel işlem, kaynak verileri, cihazın özellikleri ve belki hepsinden önemlisi bu ikisinin birleştirildiği deneme çalışmalarısıyla tespit edilmelidir.

Biz, Triton X-100 ile hemoliz prensibine dayanan yöntemi analiz süresinin kısa olması, bulaşma tehlikesini azaltması ve tatmin edici sonuçlar vermesi yüzünden tercih ettik. Bulgularımızda kaynak araştırmalarımız sonucu elde ettiğimiz bulgulara uygunluk gösterdi.

KAYNAKLAR

1. TIETZ, N.W. (ed): Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, 1986, p: 1712-1717.
2. ACKERMAN, P.G.: Electronic Instrumentation in the Clinical Chemistry. Little Brown Company, Boston, 1972, p: 69-80.
3. VARLEY, H., BELL, M.: Practical Clinical Biochemistry. 5 th ed., Vol. 16, William Heinemann Medical Books Ltd., London, 1984, p: 188-201.
4. APHA, AWWA, WPCF: Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (Editorial Board: Greenberg, A, Trussel R.R, Clesceri, L.S.) 16 th Ed. APHA, 1015 Fifteenth Str. NW, Washington DC 20005, 1985, p: 145-223.
5. ZINTER HOFER, L.J.M., JATLOW, P.I., FAPPIANO, A.: A direct determination method of lead in blood. J.Clin. Med., 78: 664-667, 1971.

6. SVEHLA, G. (ed): *Comprehensive Analytical Chemistry*. Vol. 4, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York, 1975, p: 21-229.
7. BRATJEL, M.P., READ, A.J.: *Microsampling for blood-lead analysis*. *Clin. Chem.* 20, 2 : 217-221, 1973.
8. EVENSON, M.A., PENDERGAST, D.D.: *Rapid ultramicro direct determination of erythrocyte lead concentration by atomic absorption spectrophotometry, with use of a graphite tube furnace*. *Clin. Chem.* 20.2 : 163-171, 1974.
9. KILROE, T.A.: *Linear working graphs in blood lead determination with the "Beckman" flameless atomic absorption cuvet*. *Clin. Chem.*, 21.4 : 630-632, 1975.
10. WHITE, W.L., ERICKSON, M.M., STEVENS, S.C.: *Practical Automation for the Clinical Laboratory*. 2 nd ed., The C.V. Mosby Company, Saint Louis, 1972, p: 141-162.
11. BENDER, G.T.: *Chemical Instrumentation a Laboratory Manual Based on Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1972, p: 71-91.
12. FERNANDEZ, F.J.: *Micromethod for lead determination in whole blood by atomic absorption, with use of the graphite furnace*. *Clin. Chem.*, 21.4: 558-561, 1975.
13. THARELL, B.L., DROSCHKE, J.M., DZIUK, T.W.: *Analysis for lead in undiluted whole blood by tantalum ribbon atomic absorption spectrophotometry*. *Clin. Chem.*, 24.7: 1182-1185, 1978.
14. MARCUS, M., HOLANDER, M., LUCAK, R.E., PFEIFFER, N.C.: *Micro-scale blood lead determination in screening: Evaluation of factors affecting results*. *Clin. Chem.*, 21,4: 533-536, 1975.
15. KUBASIK, N.P., VOLOSIN, M.T.: *Use of the carbon rod atomizer for direct analysis of lead in blood*. *Clin. Chem.*, 20.2: 300-301, 1974.
16. ZEIND, A.S., Schulert, A.R.: *Atomik absorption assays of blood lead: Delves cup vs. graphite furnace*. *Clin. Chem.*, 22,7: 1209, 1976.
17. EALY, J.A., BOLTON, N.E., Mc ELHENY, R.J., MORROW, R.W.: *Determination of lead in whole blood by atomic absorption spectrophotometry*, *A. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 35: 566-570, 1974.
18. LATNER, A.L.: *Advances in Clinical Chemistry*. (ed: Bodansky, D.), Vol. 18. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1976, p: 289-326.
19. STEVENS, B.J.: *Clinical Applications of Atomic Absorption Spectroscopy*. Varion Techtron Pty. Ltd., 1970, p: 1-33.
20. VOLOSIN, M.T., KUBASIK, N.P., SINE, E.H.: *Use of the carbon rod atomizer for analysis of lead in blood: Three methods compared*. *Clin. Chem.*, 21, 13: 1986-1987, 1975.
21. GARYNS, V.P., MATOUSEK, J.P.: *Correction for spectral interferans with determination of lead in blood by non flame atomic absorption spectrometry*. *Clin. Chem.*, 21,7: 891-893. 1975.
22. BRODIE, K.G., ROUTH, M.W.: *Trace analysis of lead in blood, aluminium and manganese in serum and chromium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Clin. Biochem.*, 17:19-26, 1984.

23. BOONE, J., HEARN, T., LEWIS, S.: Comparison of interlaboratory results for blood lead with results from definitive method. *Clin. Chem.*, 25, 3:389-393, 1979.
24. PAULEV, P.E., SOLGAARD, P., JIJELL, J.C.: Interlaboratory comparison of lead and cadmium in blood, urine, and aqueous solutions. *Clin. Chem.*, 24, 10: 1797-1800, 1978.