

Desenvolvimento e Validação de Método para Determinação de Elementos em Fluidos Biológicos por ICP-MS

Isabeli Cristina Cezarino*, Pedro Vitoriano Oliveira

Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

isabelicezarino@usp.br

Resumo: As técnicas analíticas mais utilizadas para o biomonitoramento e avaliação de exposição a elementos potencialmente tóxicos ou para avaliação de deficiências de elementos essenciais é a espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (FAAS) ou com atomização por forno de grafite (GF AAS). Entretanto, a espectrometria de absorção atômica tem uma grande deficiência, é monoelementar, o que aumenta em tempo e custo as suas aplicações. Sendo assim, cada vez mais os laboratórios de pesquisa da área clínica estão mudando seus métodos de análise para a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Esta técnica permite determinações elementares em diversas matrizes, numa ampla faixa de concentração (ng L^{-1} a mg L^{-1}), possibilita rapidez de análise, devido a sua capacidade de análise multielementar e proporciona limites de detecção menores que outras técnicas analíticas, sem utilizar recursos de pré-concentração. Todavia, ainda é limitado o número de métodos que propõem análise direta de fluidos biológicos por ICP-MS. Assim, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de método de análise direta em fluidos biológicos (sangue, plasma e urina) por ICP-MS para determinações de Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl e Zn.

Palavras-chave: impurezas elementares, contaminantes, fluidos biológicos, espectrômetro de massa, ICP-MS.

Development and Validation of Method for Elements Determination in Biological Fluids by ICP-MS

Abstract: The most widely used analytical techniques for biomonitoring and evaluating exposure to potentially toxic elements or for assessing deficiencies of essential elements is flame atomic absorption spectrometry (FAAS) or graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). However, atomic absorption spectrometry has one of major deficiency, it is monoelementary, which increases its applications in time and cost. Therefore, more and more clinical research laboratories are changing their analytical methods for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). This technique allows elements determination in several matrices and in a wide concentration range (ng L^{-1} to mg L^{-1}), allows rapid analysis due to its multielements analysis capability and provides lower detection limits than other analytical techniques, without using pre-concentration step. However, the number of methods that propose direct analysis of biological fluids by ICP-MS is still limited. Thus, the present work aims at developing a method for direct analysis in biological fluids (blood, plasma and urine) by ICP-MS for the determination of Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl and Zn.

Keywords: elemental impurities, contaminants, biological fluids, mass spectrometry, ICP-MS.

Introdução

A carência de elementos químicos essenciais para o ser humano pode causar sérios problemas de saúde, assim como a absorção em excesso.¹ O intervalo de concentrações que caracteriza a essencialidade e toxicidade para alguns elementos é relativamente curto, sendo necessário, para o controle nutricional e a compreensão de certas enfermidades, o monitoramento de muitos em fluidos e tecidos biológicos.² Os métodos mais utilizados no monitoramento e avaliação de exposição a elementos essenciais e potencialmente tóxicos é a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS) ou com atomização em forno de grafite (GF AAS). Entretanto, a espectrometria de absorção atômica tem algumas limitações, tais como a característica monoelementar e, portanto, a frequência analítica que pode ser limitada, sobretudo para a GF AAS, o que aumenta em tempo e custo as suas aplicações, especialmente quando se deseja analisar muitas

amostras ou determinar muitos elementos. Para superar essas limitações e atender a demandas específicas, os métodos mais amplamente recomendadas são aqueles que têm características multielementares e detecção simultânea como a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A técnica de ICP-MS é atualmente a mais indicada para as determinações de baixíssimas concentrações em amostras de diferentes naturezas. As principais vantagens do ICP-MS são a capacidade de análise de uma grande variedade de matrizes, ser multielementar, apresentar alta sensibilidade com capacidade de detecção em nível de ultra traço, espectro simples, ampla faixa de concentração e capacidade de fornecer informações isotópicas, quando necessário.³ Esta técnica possibilita a determinação dos elementos de interesse nutricional-toxicológico no plasma e sangue, em intervalos que variam de 0,1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Muitos desafios devem ser superados para se alcançar o sucesso em análises de amostras biológicas por ICP-MS. O preparo da amostra é uma etapa determinante e crítica, devendo obedecer aos mais cuidadosos procedimentos para evitar, principalmente, contaminações e perdas dos elementos de interesse.^{4,5} Segundo a literatura, os fluidos biológicos mais utilizados para avaliar o estado de saúde de pacientes são sangue, soro, plasma e urina⁶, o que, em princípio, possibilita a análise direta da amostra após diluição com solvente adequado. Este tipo de análise tornou-se preferida nos últimos anos, pelo fato da manipulação da amostra ser mínima, preparo simples e rápido, minimizando riscos de contaminação das amostras.⁷ Nessa abordagem, as amostras são geralmente diluídas em ácidos ou bases diluídas e introduzidas no equipamento. No Brasil, o monitoramento de elementos em fluidos e tecidos biológicos é uma prática relativamente nova, nesse sentido, existe grande necessidade de desenvolver ou adaptar métodos analíticos rápidos e simples que permitam operações em rotinas nos laboratórios clínicos e de pesquisa. A maioria dos métodos descritos para introdução direta de fluidos biológicos em ICP-MS está validado para determinação de poucos elementos ou tem baixa aplicação em rotina. Assim, a busca por métodos para determinações de diversos elementos de interesse nutricional ou toxicológico em fluidos biológicos com um preparo de amostras simples e rápido é assunto relevante para o laboratório clínico do futuro.

Experimental

As amostras de sangue, plasma e urina e os elementos de interesse fazem parte do portfólio de exames realizados por laboratórios parceiros do Hospital Israelita Albert Einstein, como apresentado na Tabela 1. Foram avaliadas as melhores condições de preparo de amostra, baseados em simples diluições, que permitiu o desenvolvimento de método multielementar para o maior número de elementos. Com o intuito de validar os métodos analíticos desenvolvidos, foram utilizados materiais de referência, tais como o Recipe[®] Clincheck Control for Trace Elements (CC) no plasma (8885, Level I e II), urina (8849 Level I e II) e sangue total (8843, Level I, II e III). Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, modelo Agilent 7850 (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), instalado em sala limpa no laboratório clínico do Hospital Israelita Albert Einstein. O instrumento possui amostrador automático Agilent SPS 4 (Santa Clara, EUA), é equipado com um gerador de RF de 27 MHz de estado sólido e um sistema ORS4[®] (Agilent Technologies, Tóquio, Japão) para remover interferências isobáricas por discriminação cinética (DEC/DIC), usando He de alta pureza (99,999% v v⁻¹) como gás de colisão. Soluções multielementares de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Ce, Co, Li, Tl e Y (Stock Tuning Solution)

foram utilizadas para otimização das condições operacionais do ICP-MS. Foram feitos experimentos de preparo utilizando diluições em soluções ácidas, neutras e alcalinas. Para todas as abordagens, as curvas analíticas de calibração foram preparadas com 12 pontos nos respectivos meios diluentes como brancos (0,1 ug L⁻¹; 0,25 ug L⁻¹; 0,5 ug L⁻¹; 1 ug L⁻¹; 5 ug L⁻¹; 10 ug L⁻¹; 50 ug L⁻¹; 100 ug L⁻¹; 250 ug L⁻¹; 500 ug L⁻¹ e 1000 ug L⁻¹) para Ag, Al, As, B, Cd, Co, Cr, Cu, I, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, V e Zn e com 8 pontos nos respectivos meios diluentes como brancos (0,1 ug L⁻¹; 0,25 ug L⁻¹; 0,5 ug L⁻¹; 1 ug L⁻¹; 5 ug L⁻¹; 10 ug L⁻¹; 50 ug L⁻¹ e 100 ug L⁻¹) para Hg, preparadas por diluições sucessivas das solução em estoque. Soluções multielementares de 10 µg mL⁻¹, 25 µg mL⁻¹ e 50 µg mL⁻¹ dos elementos Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Te foram utilizadas como padrão interno. Essa solução foi diluída em soluções ácidas, neutras e alcalinas.

Tabela 1. Matrizes e elementos a serem determinados

Matriz biológica	Elementos
Sangue	Ag, As, Co, Cd, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl e Zn
Plasma	Al, Cu, Zn
Urina	Al, Cd, Cr, Cu, I, Hg, Mn, Pb, Tl, Zn

Diluição em meio básico

As amostras foram diluídas 1:10 (v v⁻¹) em solução 4% (m v⁻¹) de 1-butanol, 0,01% (m v⁻¹) de EDTA (m/v), 0,01% (m v⁻¹) de Triton X-100 e 1% (m v⁻¹) de NH₄OH. Foram utilizados 300 uL dos Clinchecks de sangue total, plasma e urina e diluídos em 1,5 mL do padrão interno em diluente básico e 1,2 mL do diluente básico.

Diluente básico mais água

As amostras foram diluídas 1:10 (v v⁻¹) em solução 4% (m v⁻¹) de 1-butanol, 0,01% (m v⁻¹) de EDTA (m/v), 0,01% (m v⁻¹) de Triton X-100 e 1% (m v⁻¹) de NH₄OH. Foram utilizados 300 uL dos Clinchecks de sangue total, plasma e urina e diluídos em 1,5 mL do padrão interno em diluente básico e 1,2 mL de água.

Diluição neutra (utilizada apenas para alumínio)

As amostras foram diluídas 1:10 (v v⁻¹) em água. Foram utilizados 300 uL dos Clinchecks de sangue total, plasma e urina e diluídos em 1,5 mL do padrão interno em água e 1,2 mL de água.

Diluição em meio ácido

Foi preparada uma solução diluente ácida, contendo 0,5 % (v v⁻¹) de HNO₃ e 0,005% (v v⁻¹) de Triton X-100®, em que as amostras foram diluídas 1:10 (v v⁻¹) e 1:20 (v v⁻¹). Foram tomados 300 uL de Clincheck de urina e plasma (matrizes pretendidas para alumínio), 1,5 mL padrão interno em água e 1,2 mL do diluente ácido na diluição 1:10 e 300 uL de Clincheck, 3,0 mL padrão interno em água e 2,7 mL de diluente ácido. O padrão interno utilizado nesta abordagem foi o mesmo utilizado nos outros preparos, com a diferença que essa diluição aconteceu apenas em água.

Resultados e Discussão

O método que apresentou a melhor exatidão para todos os elementos, com exceção do alumínio, foi aquele cujo volume final foi completado com água. Os resultados das exatidões para esse preparo podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Exatidão das análises de Clinchecks com preparo em diluente básico (Recipe Clincheck Plasma Control, Recipe Clincheck Urine Control e Recipe Clincheck Whole Blood Control).

Elementos	Clincheck Control	Valor Teórico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intervalo de aceitação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão (%)
Cr (m/z=52)	Urine I	4,1	3,26 - 4,9	3,7	91
	Urine II	10,0	8,01 - 12	9,6	96
	Whole Blood I	2,2	1,67 - 2,78	2,1	92
	Whole Blood I	6,0	4,47 - 7,44	5,8	97
	Whole Blood I	11,1	8,88 - 13,3	10,9	98
Mn (m/z=55)	Urine I	4,1	3 - 5	3,8	93
	Urine II	10,0	8 - 12	9,9	99
	Whole Blood I	7,9	6,32 - 9 48	7,2	91
	Whole Blood II	14,6	11,7 - 17,6	13,9	95
	Whole Blood III	21,8	17,4 - 26,1	21,0	96
Co (m/z=59)	Whole Blood I	1,6	1,31 - 1,97	1,5	89
	Whole Blood II	7,3	5,81 - 8,72	6,6	91
	Whole Blood III	13,3	10,7 - 16	11,9	90
Ni (m/z=60)	Whole Blood I	2,1	1,64 - 2,63	1,9	91
	Whole Blood II	4,6	3,64 - 5,43	4,2	92
	Whole Blood III	12,7	7,06 - 15,2	11,9	94
Cu (m/z=63)	Plasma I	730,0	621 - 840	722,6	99
	Plasma II	1260,0	1070 - 1450	1288,1	102
	Urine I	58,2	47 - 70	59,5	102
	Urine II	115,0	92 - 138	112,3	98

continuação da Tabela 2

Zn (m/z=66)	Plasma I	1580,0	1350 - 1820	1543,0	98
	Plasma II	1960,0	1660 - 2250	1858,0	95
As (m/z=75)	Whole Blood I	3,0	2,24 - 3,62	2,4	81
	Whole Blood II	9,6	7,66 - 11,5	10,0	104
	Whole Blood III	19,2	15,4 - 23	19,5	102
Se (m/z=78)	Whole Blood I	83,1	66,5 - 99,7	83,0	99
	Whole Blood II	159,0	127 - 191	159,0	100
	Whole Blood III	202,0	161 - 242	199,0	98
Mo (m/z=92)	Whole Blood I	2,1	1,64 - 2,46	2,1	100
	Whole Blood II	4,6	3,64 - 5,47	4,2	91
	Whole Blood III	8,8	7,06 - 10,60	8,0	91
Ag (m/z=107)	Whole Blood I	1,9	1,39 - 2,32	1,9	102
	Whole Blood II	4,3	3,42 - 5,12	3,9	91
	Whole Blood III	8,5	6,80 - 10,20	7,5	88
Cd (m/z=111)	Urine I	2,6	2,0 - 3,0	2,3	91
	Urine II	14,7	12,0 - 17,7	13,6	93
	Whole Blood I	1,6	1,18 - 1,97	1,6	98
	Whole Blood II	3,5	2,83 - 4,24	3,5	98
	Whole Blood III	7,0	5,63 - 8,44	6,2	88
I (m/z=127)	Urine I	115,0	92 - 138	116,5	101
	Urine II	516,0	413 - 619	526,2	102
Hg (m/z=201)	Urine I	1,9	1,15 - 2,68	1,7	88
	Urine II	13,9	9,05 - 18,80	11,3	81
	Whole Blood I	2,9	2,03 - 3,78	2,4	82
	Whole Blood II	5,6	4,18 - 6,96	5,9	105
	Whole Blood III	13,2	10,6 - 15,9	14,2	107

continuação da Tabela 2

Tl (m/z=205)	Urine I	7,4	5,90 - 8,85	7,6	104
	Urine II	19,4	15,5 - 23,30	21,1	109
	Whole Blood I	0,9	0,72 - 1,08	1,0	114
	Whole Blood II	4,3	3,44 - 5,17	4,6	107
	Whole Blood III	8,6	6,9 - 10,3	9,1	106
Pb (m/z=208)	Urine I	26,4	21 - 32	25,7	98
	Urine II	51,7	41 - 62	60,3	117
	Whole Blood I	37,6	30,1 - 45,2	39,4	105
	Whole Blood II	95,6	76,5 - 115,0	106,2	111
	Whole Blood III	260,0	208,0 - 312,0	294,1	113

Uma vez que foi observada contaminação por alumínio pelos reagentes utilizados, foi avaliado o preparo, em meio aquoso. Os resultados obtidos com esse modo de preparo estão descritos na Tabela 3. Os preparos em diluente ácido e diluente básico sem adição de água não apresentaram boas exatidões para os elementos de interesse.

Tabela 3: Exatidão das análises de Clincheck Control para alumínio com preparo em meio aquoso (Recipe Clincheck Plasma Control, Recipe Clincheck Urine Control)

Elemento	Clincheck Control	Valor Teórico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intervalo de aceitação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão (%)
Al (m/z=27)	Plasma I	10,9	8 - 14,1	8,3	76
	Plasma II	48,7	37 - 60,9	46,1	95
	Urina I	33,4	27 - 40	27,3	82
	Urina II	82,2	66 - 98,7	75,8	92

Conclusões

As boas exatidões obtidas nas determinações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl e Zn nos materiais de referência de sangue, plasma e urina com apenas diluições das amostras em solvente básico diluído mostrou que o método de ICP-MS pode ser recomendado para o monitoramento desses elementos nestas amostras. A determinação de Al mostrou ser bastante crítica devido a possíveis contaminações. Os resultados obtidos para o Al demonstraram que a diluição das amostras com água é suficiente para as determinações deste elemento em plasma e urina, com moderada exatidão. No geral, os resultados para os materiais de referência apresentaram boas precisão e exatidão para o monitoramento dos elementos de interesse nos fluídos biológicos.

Referências

1. Cozzolino, S.M.F.; Cominetti, C., Bases Bioquímica e Fisiológicas da Nutrição nas Diferentes Fases da Vida, na Saúde e na Doença. 1ª Ed., 2013, Editora Manole, pp. 354 a 412.
2. Mohammed, N.A.; Chin, S.F.; Jamal R., Simultaneous analysis of 25 trace elements in micro volume of human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Practical Laboratory Medicine*, **18** (2020) e00142.
3. Becker, J. S., Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
4. Krug, F.J.; Rocha, F.R.P., Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar, 2ª Ed., *EditSBQ*, 2017.
5. St'astna, M.; I.Nemcová, I.; and J.Zýka, J. ICP-MS for the determination of trace elements in clinical samples. *Analytical Letters* **32** (1999) 2531-2543.
6. Heitland, P.; Koster, H.D., Human biomonitoring of 73 elements in blood, serum, erythrocytes and urine. *Journal Trace Elements in Medicine and Biology*, **64** (2021) 126706.
7. Abduljabbar, T.N.; Sharp, B.L.; Reid, H.J.; Barzegar-Befroeid, N.; Peto, T.; Lenguel, I., Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro- sampling ICP-MS and sample dilution. *Talanta*, **204** (2019) 663-669.