تقدير عنصر الكروم في المواد البايولوجية باستخدام تقنية مطيافية الانبعاث الذري /بلازما الحث المقرن ICP/AES

سميرة حسين حمد و محمد عفان الحمداني
وزارة العلوم والتكنولوجيا كلية العلوم/جامعة بغداد

(NJC)

(تاريخ الاستلام 16 / 6 /2004) **(تاريخ القبول 22/6/2005)**

الخلاصة

تم استخدام عدد من الحوامض المركزة أو مزيجاتها من أجل إتمام هضم مادة مرجعية موثقة من نوع (MA-A1) Copped homogenate أستخدمت لغرض تثبيت طريقة قياس عنصر الكروم في أنسجة مرضى أورام الثدي باستخدام تقنية ال ICP/AES . ووجد أن أفضل حامض أعطى أعلى أسترجاعية هو المزيج الحامضي ($HClO_4$:H_2O_2) (1:1) وباسترجاعية مقدارها 98.19% وأعطى المزيج الحامضي (HCl:H_2O)(1:1) بعد الترميد في درجة حرارة مقدارها 450 ^{o}م وباسترجاعية مقدارها 90.91% .

تم تطبيق هذه الطريقة لتقدير عنصر الكروم في نماذج أنسجة أورام الثدي (السرطانية والحميدة) وفي أمصال المرضى لعشرين مريضة مصابة وبأعمار تتراوح بين (15-60) سنة , ولوحظ انخفاض واضح في تركيز العنصر في أمصال المرضى المصابين بالاورام السرطانية مقارنة مع الاورام الحميدة .

Abstract

Many concentrated acids or their mixtures were used to compelet the digestion of the certified reference material type(MA-A1) which was used for the determination of chromium in it using Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP/AES).

It was found that the mixture ($HClO_4$:H_2O_2)(1:1) was to be the best for chromium determination with recovery of (98.19)% and (HCl:H_2O)(1:1) as a second proper acid for chromium analysis .This method was applied on twenty tissue samples of patients with breast tumors aged (15-60) years to determine chromium concentration .

Chromium concentrations in sera samples of the same patients were also measured and deficiency in chromium concentration values were appeared in sera of patients with breast cancer compared with benign cases .

المقدمة

عنصر الكروم من العناصر المهمة في جسم الإنسان ويتواجد بكميات ضئيلة جدا في أنسجة وأمصال الدم البشرية , ويظهر الكروم بعدد من حالات الاكسدة , والحالات التأكسدية الشائعة له هي (0,+2,+3,+6).

أن الكروم عنصر مهم وأساس في أيض الكاربوهيدرات والشحوم وله دور واضح كمنضم لأيض السكر أذ يدخل ضمن العوامل الفعالة والخاصة بتنظيم مستوى السكر[1] .

ان بعض الدراسات اثبتت ان الكروم يمكن ان يوضح مستقبلات الانسولين وهكذا فهو يلعب دوراً مهماً في زيادة السكر في حالتي السكر المعتمد وغير المعتمد على الانسولين [3,2] . وأظهرت بعض الدراسات أن الكروم يزيد تخليق الحامض النووي RNA عند الاتحاد او التاصر مع ال DNAويزيد مرحلة البدء بالتكوين [2] .

ان النسبة المسموح بها عالميا من الكروم µg/day(200-50) [4], ومقدار ما يمتص منه اقل من 25%حيث يتم الامتصاص في الامعاء الدقيقة [5] وتكون الحالة التأكسدية السداسية للكروم هي أكثر خطورة وسمية من الحالة الثلاثية وان حامضية المعدة كفيلة بأختزال الكروم السداسي الى الحالة الثلاثية[4] ويمكن للكروم ان يتحول الى الحالة العضوية داخل الجسم عن طريق ارتباطه ببعض المركبات العضوية مثل الحامض الاميني الهستدين (Histidine) , وبعدها يخزن داخل أنسجة الجسم [6-5] وان التعرض الشديد الى كميات كبيرة منه يسبب التسمم به وخاصة عند التعرض بشكل مستمر في معامل الدباغة والاصباغ وغيرها من الصناعات حيث يسبب التهاب وسرطان الرئة [7] , وان عدد من النتائج أثبتت أن الكروم عنصر مسرطن[8] .

للأهمية الكبيرة لهذا العنصر ولوجوده بتراكيز واطئة في أنسجة وأمصال الجسم يتطلب اللجوء إلى أفضل الطرائق والتي تعطي التركيز الحقيقي لهذا العنصر المهم[16] .

وقد تعددت طرائق قياس عنصر الكروم إلا أن طريقة بلازما الحث المقترن /مطيافية الانبعاث الذري (ICP/AES)هي من الطرائق الحساسة جدا ولتراكيز واطئة من هذا العنصر[10-9] ويتطرق هذا البحث إلى اختيار مادة مرجعية موثقة معلومة التركيز لعنصر الكروم وقياس تركيزه باستخدام تقنية (ICP/AES).

الجزء العملي

الاجهزة : Aparastus

a. مطياف الانبعاث الذري-بلازما الحث المقرن من نوع Poly vace E970,Higher Analytical-England

b. مولد الترددات الراديوية من نوع RF-Generater; AMN-PS-1, plasma therm
c. منظومة الإدخال العمودي المباشر Vertical Direct Sample Introduction(VDSI)
d. مشكاة البلازما من نوع Fassel torch
e. مجانس للأنسجة الحيوية من نوع Cell Homogenizer MSK ,shaking action, 2000 and 4000rpm.
f. مجفف من نوع Lypholizer(GT_2)Leyold-Heraeus(LH)
g. فرن من نوع Heraeus type MR.170E,Temperature range(100-1000C^o)

المواد الكيمياوية : Chemicals

a. المادة المجهزة من قبل شركة Aldrichهي:
نترات الكروم Chromium nitrate $[Cr(NO_3)_2]$ (1000µg/ml)

b. المواد المجهزة من قبل شركة BDHهي :
1. Perchloric acid 60%
2. Nitric acid 70.5%
3. Hydrogen perxide 35%

c. المادة المجهزة من قبل شركة Fluka هي :
Hydrochoric acid 37%
d. مادة مرجعية موثقة معلومة التركيز لعنصر الكروم وهي من نوع Copped Homogenate (MA-A1) ومجهزة من قبل International Laboratory of Marine Radioactivity

طريقة العمل : Procedure

بعد وزن 0.5 غم من المادة المرجعية الموثقة وهضمها في كل مرة باستخدام الحوامض المناسبة والتي جربت أثناء البحث ,بعد إجراء الترشيح (إن تطلب ذلك) تم قياس عنصر الكروم باستخدام طريقة مطيافية الانبعاث الذري –بلازما الحث المقرن (ICP/AES), حيث تم اختيار الحامض المناسب والذي يعكس التركيز الحقيقي لعنصر الكروم في المادة المرجعية الموثقة , وبعد اختيار الحامض المناسب طبقت الطريقة على نماذج أنسجة الأورام [السرطانية والحميدة] .إذ وزن 0.5غم من النسيج وسحن باستخدام هاون زجاجي وتمت المجانسة في جهاز ال Homogenizerوبعدها التجفيف باستخدام جهاز ال Lypholizer ثم الهضم باستخدام الحامض المناسب والترشيح والتخفيف إلى 25 مل باستعمال الماء الاليوني ومن ثم قياس عنصر الكروم بتقنية ال ICP/AES وبالاستناد إلى منحني المعايرة القياسي في حدود تركيز (0.05-0.35)µg/mlومعامل ارتباط (r^2=0.9986)كما تم قياس عنصر الكروم في أمصال المرضى للمقارنة مع التركيز في الأنسجة.

النتائج والمناقشة

لوحظ أن هنالك صعوبات تحليلية في قياس عنصر الكروم ناتجة من التلوث الذي يأتي من التلوث الناتج من استخدام الحوامض المعدنية

مما يضيف جزء من الكروم إلى المادة البايولوجية الحاوية على تراكيز واطئة من الكروم وبالتالي يزداد التركيز عن التركيز الحقيقي[11] , والجدول رقم (1) يعرض الحوامض المركزة ومزيجاتها والمستخدمة في هضم المادة المرجعية الموثقة ويوضح الزيادة الحاصلة في تراكيز الكروم أثناء استخدام عدد من الحوامض المعدنية مما يوضح التلوث الحاصل بالكروم والمتأتي من المصادر الخارجية ,ولكن يلاحظ انه في حالة استخدام المزيج الحامضي (1:1) ($HClO_4:H_2O_2$) يتم الحصول على افضل استرجاعية ومقدارها (Rec%=98.19) والذي يؤكد انخفاض التلوث بالكروم إلى اقل حد ممكن , كما يعطي المزيج الحامضي (1:1)($HCl:H_2O_2$)تركيز جيد ومقبول للكروم وباسترجاعية مقدارها (Rec%=90.91)تحت درجة حرارة 450 ^{o}م , إذ ينخفض التلوث وتقل التداخلات الناتجة من العناصر الموجودة في المنشأ[12]

جدول رقم (1): تركيز الكروم في المادة المرجعية الموثقة باستخدام عدد من الحوامض المركزة

Type of acid or its mixture	Cr Conc. C.V=1.1 (ppm)			
	A.V (ppm) ± SD	E	E%	Rec%
Conc. HNO_3	1.99±0.1	0.89	80.9	119.1
(5:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.47±0.22	0.37	33.6	133.6
(4:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.6±0.12	0.5	45.4	145.4
(3:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.89±0.11	0.79	71.8	171.8
(2:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.73±0.15	0.63	57.2	157.2
(1:1) (HNO_3:$HClO_4$)	0.88±0.08	0.22	20.0	80.0
(1:1) (HNO_3:H_2O_2)	1.34±0.15	0.24	21.8	121.8
(1:1) ($HClO_4$:H_2O_2)	1.12±0.03	0.02	1.8	101.8
(4:1) (HNO_3:HCl)	1.57±0.11	0.47	47.2	142.7
(1:1) (HCl:H_2O) after ashing at 450°C	1.21±0.09	0.10	10	110.1
(4:1) (HNO_3:$HClO_4$) after ashing at 450°C	1.99±0.17	0.80	80.9	180.9
(1:1) (HNO_3:H_2O_2) after ashing at 450°C	2.03±0.12	0.93	84.5	184.5

C.V : Certified value
A.V : Analytical value
Rec%: Recovery %

تم في دراسة سابقة قياس لعنصر الكروم للمادة المرجعية ذاتها بتقنية الامتـصاص الـذري AAS [12]. والجدول رقم (2) يعرض مقارنة بين الطريقتين , طريقة الامتصاص الذري وطريقـة الانبعاث الذري قيد الدراسة , إذ يلاحظ انه فـي كـلا الطـريقتين المـزيج الحامـضي ($HClO_4$:H_2O_2) (1:1) والمـزيج الحامـضي (HCl:H_2O_2)(1:1)هما المفضلان على البقيـة عند قياس عنصر الكروم ,

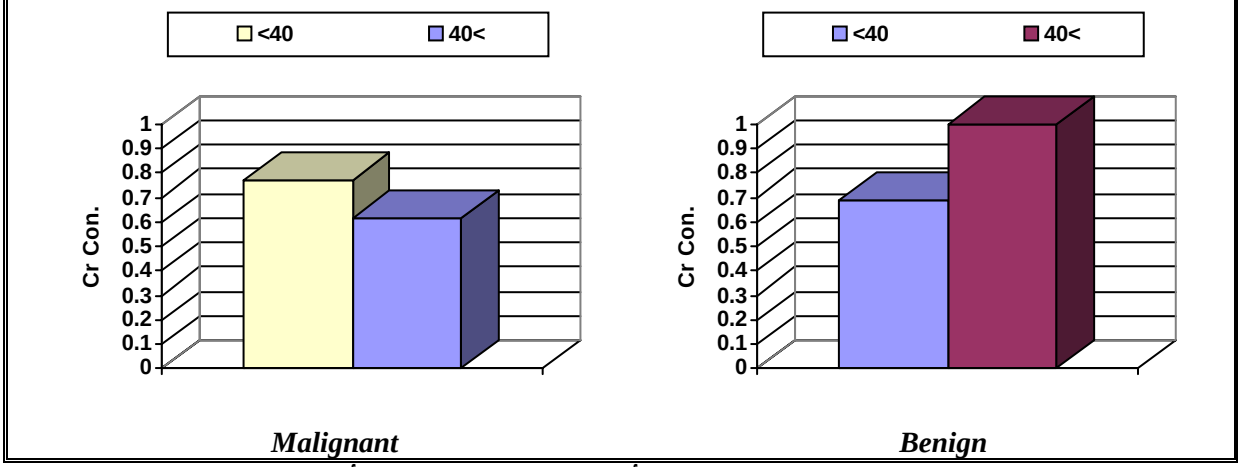
جدول رقم (2) : مقارنة تراكيز عنصر الكروم باستخدام تقنيتي AASو ICP/AES

Type of acid or its mixture	Cr Conc. C.V=1.1 (ppm)					
	A.V (ppm) ± SD by AAS	E	Rec%	A.V (ppm) ± SD by *ICP/AES*	E	Rec%
Conc. HNO_3	2.30±0.36	1.20	209.08	1.99±0.1	0.89	119.1
(5:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.40±0.36	0.30	127.27	1.47±0.22	0.37	133.6
(4:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.25±0.23	0.15	113.63	1.6±0.12	0.5	145.4
(3:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.62±0.16	0.52	147.27	1.89±0.11	0.79	171.8
(2:1) (HNO_3:$HClO_4$)	1.50±0.06	0.40	136.36	1.73±0.15	0.63	157.2
(1:1) (HNO_3:$HClO_4$)	0.71±0.10	0.61	155.75	0.88±0.08	0.22	80.0
(1:1) (HNO_3:H_2O_2)	1.37±0.36	0.20	118.18	1.34±0.15	0.24	121.8
(1:1) ($HClO_4$:H_2O_2)	1.05±0.05	0.05	98.45	1.12±0.03	0.02	101.8
(4:1) (HNO_3:HCl)	1.43±0.12	0.33	129.99	1.57±0.11	0.47	142.7
(1:1) (HCl:H_2O) after ashing at 450°C	1.00±0.1	-0.10	93.91	1.21±0.09	0.10	110.1
(4:1) (HNO_3:$HClO_4$) after ashing at 450°C	2.50±0.28	1.40	227.26	1.99±0.17	0.80	180.9
(1:1) (HNO_3:H_2O_2) after ashing at 450°C	1.92±0.11	0.82	174.54	2.03±0.12	0.93	184.5

وبعد تثبيت الحامض الأفضل وهو المزيج الحامضي (1:1) ($HClO_4$:H_2O_2) كمزيج حامضي مثالي لعنصر الكروم في المواد البايولوجية ؛تم قياس هذا العنصر في أنسجة أورام الثدي [السرطانية والحميدة] باستخدام مطيافية الانبعاث الذري /بلازما الحث المقرن (ICP/AES)ولوحظ وبصورة عامة عدم وجود اختلاف واضح في تراكيز عنصر الكروم بين الاورام الحميدة والسرطانية [13] وهذا يوضحه جدول رقم (3) ,ولكن لوحظ انخفاض واضح في في تراكيز الكروم في أمصال المرضى أنفسهم المصابين بالاورام السرطانية .جدول رقم (4). لقد أثبتت طريقة ICP/AES قدرة فائقة على عكس التراكيز الحقيقية للعناصر الاثرية بالمقارنة مع القيم الموثقة [14] وطريقة الامتصاص الذري اللهبي[15].

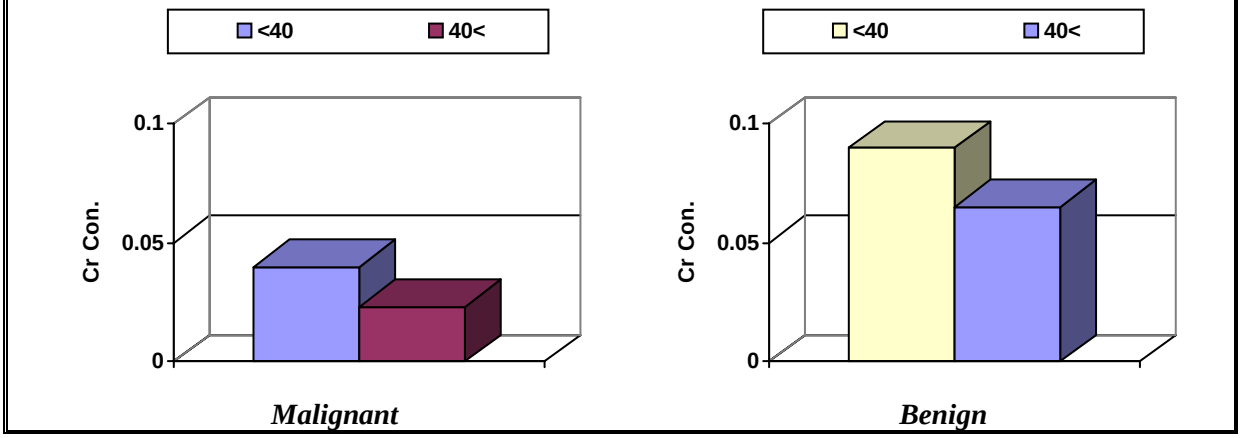
جدول رقم (3): تراكيز الكروم في أنسجة أورام الثدي

Age group	Malignant		Benign		ANOVA
	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	C.S
<40	5	0.773±0.121	8	0.687±0.120	2.642 S
40<	4	0.613±0.091	3	1.10±0.213	



جدول رقم (4): تراكيز الكروم في أمصال دم المرضى المصابين بأورام الثدي

Age group	Malignant		Benign		ANOVA
	N	Mean ± SD	N	Mean ± SD	C.S
<40	5	0.040±0.102	8	0.090±0.031	12.185 H.S
40<	4	0.023±0.011	3	0.065±0.009	



S: Significant
H.S: Highly significant

References

1. Richard C.T.; Albert B.; David H.; and Robert R. ***"Clinical Laboratory Medicine"***(London), 1992, **PP371**, 373.

2. Weatherall D.J.; "Oxford Textbook of Medicine" (New York)(1996) 3rd. Ed.,P1416-1426 .

3. Anderson R.A.; Polansky M.; and Bryden N., ***Am. J. Nutr***., 1991, **54**, 909.

4. John S.W.; and Christy M., "Minerals for Good Health" American Council on Pharmaceutical Education (ACPE) (2000),P83-91.

5. Timothy J.M.; "Chromium Containing Education Module"(ACPE) Oct.(1999).[Internet].

6. Mertzw R.E.; and Reba R., ***Am. J. Physiol.***, 1965, **209**, 489.

7. Carl A.B.; and Edward R., "Teitz Textbook of Clinical Chemistry "(1London)(1999)3rd. Ed. Vol.2 ,P1046-1050.

8. Sherif L.R.; and Howard H., ***Cancer Research*** , 1984, **44**, 5390.

9. Nobrega J. J. , ***Am. At. Spectrum,*** 1998, **12**, 1239.

10. Liu C.; Guo-Yiharg Z.; and Xiaoliang T., ***Journal Ca. Section,*** 1997, **16,** 78 .

11. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), Manual of analytical methods,(1994),4th. Ed.PP:316.

12. Samera H.H.; "A M.Sc. thesis submitted to the college of science, university of Baghdad"(2003).

13. Mulay I.L.; Roy R.; Knox B.; Suuhr N.; and Delaney W., ***J.Nati. Cancer Inst***., 1971, **47**, 1.

14. Mohamad A.AL-Hamadany, ***National J. of Chem,*** 2003, **12**, 610

15. Mohamad A.AL-Hamdany, R.K. AL-Kubaisy,Sameera H.H., ***National J. of Chem.***, 2004, **13**, 1.

16. M.A. Farajzadeh , A.B. Monji, ***Seporation and Purification Technology***, 2004, **38(3)**, 197.