

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**CINKO KONCENTRACIJOS NUSTATYMO ŽMOGAUS KRAUJO SERUME
ATOMINĖS ABSORBCINĖS SPEKTROSKOPIJOS IR SPEKTROFOTOMETRIJOS
METODAIS PALYGINIMAS**

Magistrantė GERDA KIJAUŠKAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas

Doc. dr. D. Vitkus _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja

prof. habil. dr. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____
Registracijos Nr. _____

2016 m., Vilnius

TURINYS

1. ĮVADAS	3
2. LITERATŪROS APŽVALGA	5
2.1. CINKO REIKŠMĖ ŽMOGAUS ORGANIZMUI	5
2.2. CINKO TYRIMO METODAI	7
2.2.1. SPEKTROFOTOMETRINIAI TYRIMO METODAI	7
2.2.2. ATOMINĖ ABSORBCINĖ SPEKTROSKOPIJA	8
2.2.3. ATOMINĖ EMISINĖ SPEKTROSKOPIJA	12
2.2.4. INDUKTYVIAI SURIŠTOS PLAZMOS MASIŲ SPEKTROMETRIJA	13
2.2.5. INDUKTYVIAI SURIŠTOS PLAZMOS ATOMINĖ EMISINĖ SPEKTROMETRIJA	14
2.2.6. CHROMATOGRAFINIAI METODAI	15
3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS	16
3.1. KOLORIMETRINIS METODAS	16
3.2. ATOMINĖS ABSORBCINĖS SPEKTROFOTOMETRIJOS METODAS	20
4. REZULTATAI	24
5. IŠVADOS	37
6. SUMMARY	38
7. PRIEDAS NR. 1	39
8. LITERATŪROS SĄRAŠAS	43

1. ĮVADAS

Cinkas – gyvybiškai svarbus mikroelementas, žmogaus organizme egzistuojantis kaip kofaktorius apie 300 fermentų. Žmogaus organizmo ląstelėse cinkas atlieka daugybę biocheminių funkcijų, todėl jo stoka ar perteklius pasireiškia įvairiais sutrikimais. Taigi diagnozuojant įvairias ligas, svarbu tiksliai nustatyti cinko koncentraciją žmogaus organizme, o norint tai padaryti, reikia taikyti optimaliausią tyrimo metodą. Dažniausiai cinko nustatymui taikomas laboratorinis tyrimas – cinko koncentracijos nustatymas žmogaus kraujo serume (cinkas kraujyje sujungtas su alfa-2-makroglobulinu, albuminu bei su karbonine anhidraze, esančia eritrocituose). Tyrimui atlikti yra daugybė metodų, Lietuvoje dažniausiai taikomi optinės analizės metodai.

Šiuo metu Vilniaus universiteto Santariškių klinikų biochemijos laboratorijoje rutiniškai cinko tyrimai atliekami spektrofotetriniu metodu, naudojant *Agilent 8453* spektrofotometrą. Be šio metodo laboratorijoje yra galimybė taikyti ir kitą – atominės absorbcijos spektroskopijos metodą cinko koncentracijos nustatymui žmogaus kraujo serume.

DARBO TIKSLAS:

Nustatyti optimalias sąlygas cinkui identifikuoti bei kiekybiškai nustatyti atominės absorbcinės spektroskopijos metodu žmogaus kraujo serumo mėginiuose. Gautus rezultatus palyginti su spektrofotomerijos metodu gautais rezultatais.

DARBO UŽDAVINIAI:

1. Įsisavinti atominės absorbcinės spektroskopijos metodiką cinko nustatymui žmogaus kraujo serume;
2. Optimizuoti pasirinktą metodą ir apibendrinti gautus tyrimo rezultatus;
3. Įvertinti abiejų metodų tinkamumą cinko nustatymui, palyginant abiem metodais gautus tyrimo rezultatus.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1. CINKO REIKŠMĖ ŽMOGAUS ORGANIZMUI

Cinko biologijos tyrimus galima suskirstyti į tris fazes: 1) cinkas pripažintas kaip būtinas ir nepakeičiamas elementas visoms gyvybės formoms, 2) cinkas atrastas kaip fermentų ir kitų baltymų sudedamoji dalis (katalitinė ir struktūrinė funkcijos), 3) tiriama cinko jonų reikšmė ląstelės homeostazėje [1]. Pirmąjį cinko reikšmės įrodymą pateikė prancūzų botanikas ir chemikas Jules Raulin 1869 metais, kai jo eksperimentas parodė, jog grybas *Aspergillus niger* negali augti esant cinko trūkumui [2]. Nuo tada, vystantis ir tobulėjant tyrimo metodams, atrasta vis daugiau cinko funkcijų, patvirtinta jo svarba ne tik grybams ar augalams, bet ir žmogaus organizmui.

Cinkas – antras po geležies pagal gausumą mikroelementas žmogaus organizme. Ląstelės citoplazmoje tai dažniausias katalitinis metalo jonas [3]. Suaugusios moters organizme cinko atsargos yra apie 1,5 g, tuo tarpu vyro organizme – 2,5 g. Šis kiekis pasiskirstęs visuose audiniuose, beveik visur viduląstelinis [4].

Cinkas yra beveik 300 fermentų kofaktorius [5]. Ši biocheminė cinko tyrinėjimo kryptis prasidėjo 1939 m., kai buvo nustatyta, jog cinkas ne tik įeina į fermento karboninės anhidrazės sudėtį, bet ir yra būtinas jo biocheminiam aktyvumui [6]. Antrasis cinko atomų turintis fermentas buvo atrastas praėjus 15 metų nuo karboninės anhidrazės atradimo. Tai buvo pankreatinė karboksipeptidazė [7]. Vėliau analitinių metodų pažanga lėmė daugybės cinko fermentų atradimą, tarp kurių atstovai iš visų fermentų klasių: oksidoreduktazės, transferazės, hidrolazės, liazės, izomerazės ir ligazės [8].

Šios srities vystymuisi didžiulę įtaką turėjo *Xenopus laevis* transkripcijos faktoriaus IIIA stebėjimas. Šis faktorius sudarytas iš 9 pasikartojančių sekų, kurios yra iš cisteino ir histidino liekanų, taip pat į sudėtį įeina 9 prijungti cinko atomai [9]. Visa struktūra formuoja mažus baltyminius domenų, kurie sąveikauja su nukleorūgštimis, vizualiai tai atrodo lyg rankos pirštai, apglėbiantys lazda, todėl reiškinys tapo žinomas kaip „cinko pirštai“. Svarbiausia cinko funkcija juose yra struktūrinė, cinkas palaiko domeno stabilumą [10].

Tam, kad visi cinko fermentai gerai funkcionuotų, žmogus cinko privalo gauti su maistu. Ypač juo turtingos yra austrės, taip pat kiautuoti vėžiagyviai bei mėsa. Tuo tarpu augaluose jo

koncentracijos žymiai mažesnės. Subalansuota visavertė dieta itin svarbi, kadangi tokiuose produktuose kaip ryžiai, kukurūzai, grūdinės kultūros, yra junginio, vadinamo fitatu, kuris neigiamai veikia cinko absorbciją [11]. Norint palaikyti normalią organizmo cinko koncentraciją moterims reiktų gauti apie 8 mg cinko per dieną, o vyrams apie 11 mg per dieną [12].

Didžiausios cinko atsargos žmogaus organizme yra raumenyse (~60%) ir kauluose (~30%) [13]. Beveik visas kraujyje esantis cinkas yra sujungtas su baltymais – albuminais bei alfa-2-makroglobulinu, todėl glomerulų filtrate jo labai mažai. Per parą su šlapimu pašalinama tik ~0,5 mg cinko [14]. ~1 mg per parą netenkama su prakaitu, oda, plaukais, dar 1 mg – su išmatomis. Kiekvienos ejakuliacijos metu pasišalina apie 0,5 mg, manoma su prostatos sekretu [15].

Cinko koncentracija plazmoje yra ~70 – 120 µg/dL (10 – 18,4 µmol/L), iš šio kiekio trečdalis yra sujungtas į kompleksus su alfa-2-makroglobulinu, o likusi dalis – su albuminu. Apie 10 – 20% kraujyje esančio cinko yra plazmoje, likęs kiekis sujungtas su karbonine anhidraze, esančia eritrocituose [16].

Sumažėjus endogeninio ir egzogeninio cinko, organizme vystosi cinko deficitas. Dėl daugybės biocheminių cinko funkcijų žmogaus organizmo ląstelėse, jo deficitas pasireiškia itin plačiu sutrikimų spektru. Sutrikimų sunkumas varijuoja priklausomai nuo deficito dydžio. Organų sistemos, kurios pažeidžiamos trūkstant cinko, apima epiderminę, gastrointestinalinę, centrinę nervų, imuninę, skeleto ir reprodukcines sistemas [17].

Klinikiniai sunkaus cinko deficito požymiai pasireiškia pacientams, sergantiems *Acrodermatitis enteropathica*. Tai reta autosominiu recesyviniu būdu paveldima liga, kuri pasireiškia dėl sutrikusios cinko absorbcijos ir transporto. Simptomai – hiperpigmentuoti odos pažeidimai, plikimas, augimo sutrikimai, diarėja, antrinės infekcijos, letargija, irzlumas, depresija. Cinko koncentracija serume ar plazmoje yra <40 µg/mL. Oralinis cinko vartojimas sušvelnina simptomus. Negydant, ligos baigtis letali [18].

Mažesnių cinko deficitų klinikė išraiška ne tokia ryški, bet jie populiacijose labiau paplitę. Su šiais sutrikimais susiję pažeidimai:

- Augimo ir vystymosi. Vienas iš daugiausiai tirtų cinko deficito pažeidimų yra fizinis augimo ir vystymosi sutrikimas [19]. Tačiau pats mechanizmas iki šiol lieka ne iki galo supastas. Ryškiausi sutrikimai pasireiškia intensyvaus augimo metu – nėštumo, kūdikystės, brendimo – kai cinko poreikis yra didžiausias [20].

- Infekcijų rizika:
 - Diarėja. Ryšys tarp diarėjos ir cinko trūkumo manoma yra imuninės sistemos pažeidimas ir žarnyno gleivinės ląstelių transporto mechanizmų sutrikimas [21].
 - Pneumonija. Tyrimai parodė, jog vaikai, papildomai vartojantys cinko preparatus, statistiškai patikimai mažiau serga pneumonija besivystančiose šalyse [22].
 - Maliarija. Remiantis atliktais tyrimais, maliarijos sergamumas taip pat gali būti mažinamas vartojant cinko preparatus. Tačiau tam patvirtinti reikalingos tolesnės studijos [23].

Cinko perteklius žmogaus organizme pasitaiko retai. Įkvėpus cinko oksido garų pasireiškia metalo garų karštinė. Simptomai panašūs į gripo - nuovargis, šaltkrėtis, raumenų skausmai, kosulys, dusulys, leukocitozė, troškulys, metalo skonis [24].

2.2.CINKO TYRIMO METODAI

2.2.1. SPEKTROFOTOMETRINIAI TYRIMO METODAI

Spektrofotometrija – tai kiekybinis tyrimo metodas, paremtas medžiagos savybe atspindėti ar praleisti tam tikro ilgio šviesos bangas [25]. Kiekybinės analizės pagrindą sudaro Bugerio, Lamberto ir Bero dėsnis. Jei elektromagnetinė spinduliuotė sugerama pagal šį dėsnį, tai optinis tankis tiesiogiai proporcingas šviesą sugeriančių molekulių koncentracijai mėginyje [26]. Dažniausiai absorbcija matuojama leidžiant šviesos spindulį per nustatomos medžiagos tirpalu užpildytą indą (kiuvetę) ir matuojant praėjusios šviesos intensyvumą. Būtina sąlyga – nustatomas junginys turi absorbuoti to bangos ilgio šviesą, kuri naudojama matavimams. Norint pasiekti gerą metodo jautrį, metalų jonai paprastai yra surišami į spalvotus kompleksinius junginius, naudojant kompleksadarius junginius. Cinkas daugeliu atvejų nustatomas, sudarant spalvotus cinko chelatinus kompleksinius junginius (chelatus) [27].

Paprastas ir itin jautrus spektrofotometrinis metodas – cinkas sudaro junginį su 5,7-dibrom-8-dihidroksichinolinu (DBHQ). DBHQ reakcija su cinku vyksta šiek tiek rūgštinėje

aplinkoje ($0.000001\text{--}0.000007\text{ M H}_2\text{SO}_4$) ir sudaro švelniai geltonos spalvos chelatą, kurio absorbcijos maksimumas – 391 nm. Reakcija momentinė, absorbcija išlieka stabili 24 valandas. Lyginant su kitais metodais, šio tiesioginio metodo privalumai – jautrumas, atrankumas, paprastumas, greitis, termostabilumas, glaudumas, tikslumas, maža interferencija Tyrimo, atlikto šiuo metodu, rezultatai sutapo su AAS metodo rezultatais [28].

Kitas jautrus, vandenyje tirpus junginys, sudarantis chelatus su cinku yra 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)-fenolas (5-Br-PAPS). Tyrimui atlikti reikalinga tik 0,3 ml serumo. Palyginus rezultatus tarp šio ir AAS metodų buvo gauta gera koreliacija ($r = 0,98$, $p < 0,05$). Lyginant metodą su kitais kolorimetriniais metodais, šis nereikalauja kaitinimo, ekstrakcijos organiniais tirpikliais ar maskavimo cianidu [29].

Spektrofotometrijos būdu galima išmatuoti ir kolorimetrinę reakciją tarp cinko ir 4-(2-piridilazo) rezorcinolio. Šis metodas sudėtingesnis – pirmiausia naudojamas guanidino hidrochloridas, kuris išlaisvina cinką iš jo junginių su baltymais, toliau laisvas metalas sudaro kompleksą su cianidu. Chloro hidratas demaskuoja minėtus kompleksus, vėliau vykdoma kolorimetrinė reakcija su 4-(2-piridilazo) rezorcinoliu. Tai gana jautrus, vandenyje tirpus ligandas, jo komplekso su cinku absorbcijos maksimumas 497 nm. Pagrindinis metodo trūkumas, be sudėtingumo ir pavojaus operatoriui, yra tas, kad šis ligandas nėra specifinis cinkui, todėl būtina pašalinti kitų metalų jonų interferenciją [30].

Dar vienas jautrus reagentas, pasiūlytas cinko tyrimams – bis-[2,6-(2'-hidroksi-4'sulfo-1'-naftilazo)] piridino dinatrio druska (HSNP). Pastaroji naudojama tirti cinką pacientų kraujo serume. HSNP su cinku suformuoja violetinės spalvos kompleksą, kurio sugerties maksimumas – 565 nm. Šis metodas sėkmingai taikomas cinko nustatymui kraujo mėginiuose. Jo privalumai: patikimumas, maža interferencija, selektyvumas, paprastumas, mažos laiko sąnaudos. Metodas gali būti pritaikytas metalų tyrimams ir kitoje biologinėje medžiagoje [31].

Dar galima paminėti tokį reagentą kaip Zincon (2- karboksi- 2'-hidroksi- 5'-sulfoformazilbenzenas), [32] tačiau visgi vienas populiariausių junginių šiuolaikiniuose komerciniuose cinko nustatymo biologinėse matricose yra 5-Br-PAPS [26].

2.2.2. ATOMINĖ ABSORBCINĖ SPEKTROSKOPIJA

Atominė absorbcinė spektroskopija (AAS) – tai tyrimo metodas, naudojamas kiekybiniam cheminių elementų įvertinimui, pasitelkiant laisvų atomų, esančių dujinėje būsenoje, šviesos sugertį [33]. Tai itin jautrus metodas, mėginyje elemento koncentraciją galintis nustatyti milijardinėmis gramo dalimis [34].

19 amžiaus antrojoje pusėje atominė absorbcinė spektroskopija buvo pirmą kartą panaudota kaip analitinis metodas, o pagrindinius jo principus nustatė Vokietijos Heidelbergo universiteto profesoriai Robert Wilhelm Bunsen ir Gustav Robert Kirchhoff [35].

Atominės absorbcijos pagrindas - šviesos sugertis; atomas, esantis nesužadintoje būsenoje, sugeria tam tikro ilgio bangos energiją ir pereina į sužadintą būseną. Kuo daugiau atomų yra šviesos kelyje, tuo daugiau šviesos sugerama. Matuojant absorbuotos šviesos dalį, galima kiekybiškai išmatuoti analizę mėginyje. Naudojant specialius šviesos šaltinius ir pasirinkus tinkamą bangos ilgį galima tiksliai nustatyti individualių elementų koncentraciją mėginyje [36].

Elementų koncentracijoms nustatyti nežinomuose mėginiuose pagal absorbuotos šviesos kiekį naudojami žinomų koncentracijų etalonai.

Metodas naudojamas daugelyje sričių:

- Klinikinė analizė – biologiniuose skysčiuose, tokiuose kaip kraujas ar šlapimas, tiriami metalai.
- Aplinkos analizė - nustatinėjamos elementų koncentracijos vandens telkinių vandenyje, geriamajame vandenyje, ore, skystame kure, gėrimuose (vynas, alus, vaisvandeniai).
- Farmacija.
- Pramonė. [37]

Atominė absorbcinė spektroskopija – labai specifinis metodas, kuriam interferencija nėra itin būdinga. Tačiau esamą interferenciją galima suskirstyti į šešias kategorijas – cheminė interferencija, jonizacijos interferencija, terpės interferencija, emisinė interferencija, spektrinė interferencija ir foninė absorbcija. Kadangi visi interferencijų tipai yra žinomi ir tiksliai apibūdinti, nėra sudėtinga jas eliminuoti ar kompensuoti.

Pati dažniausia yra cheminė interferencija. Jei analizuojamame mėginyje yra termiškai stabilių komponentų, sujungtų su analite, ir jie nėra visiškai atskiriami liepsnos energijos, tokiu atveju atsiranda cheminė interferencija. Rezultatas – sumažėja atomų, galinčių absorbuoti šviesą, kiekis.

Jonizuojanti interferencija atsiranda tada, kai liepsnos temperatūra turi pakankamai energijos tam, kad pašalintų elektroną, ir taip atomas virsta jonu. Kai šis procesas sumažina nesužadintos būsenos atomų, atominė absorbcija sumažėja.

Terpės interferencija gali ir supresuoti ir padidinti analitės signalą. Ši interferencija atsiranda tada, kai mėginio ir etalono tirpalo fizinės savybės žymiai skiriasi (pvz klampa, paviršiaus įtempimas). Taip gali nutikti tuo atveju, jei mėginyje yra didelė ištirpusių druskų ar rūgšties koncentracija, kai mėginyje ir etalono tirpale yra skirtingi tirpikliai, arba kai radikaliai skiriasi mėginio ir etalono tirpalo temperatūros.

Kalbant apie foninę absorbciją, ją gali lemti dvi priežastys – šviesos išsklaidymas dėl liepsnoje esančių dalelių ir matricoje esančių nedisocijavusių molekulių šviesos absorbcijos.

Standartinės atominės absorbcijos sąlygos tiriant cinką - bangos ilgis – 213,9 nm; Rekomenduojama liepsna – oro-acetileno, oksiduojanti [36].

Pirmą kartą cinko tyrimas atominės absorbcinės spektroskopijos metodu buvo paskelbtas 1965m. [38]. Aprašytas paprastas mėginio paruošimas – serumas skiedžiamas distiliuotu vandeniu 10 kartų, tuo tarpu naudota aparatūra buvo sudėtinga ir vienetinė. Kitais metais Prasad su bendraautoriais [39] aprašė metodą, kuris buvo skirtas komercinei įrangai. Ruošiant mėginį, plazma buvo deproteinizuojama ir du kartus ekstrahuojama trichloracto rūgštimi. Dauguma kitų metodų, skirtų cinko nustatymui serume ar plazmoje atominės absorbcinės spektroskopija, buvo paremti įvairiu mėginio skiedimu arba skiedimu ir deproteinizacija trichloracto rūgštimi [40].

Ruošiant mėginį tyrimui buvo pastebėta, kad skiedžiant mėginį 20 kartų ir daugiau, žymiai sumažėja tyrimo jautrumas ir tikslumas [41]. Aptikta netikslumų ir vykdant tyrimą su 4 kartus ar mažiau skiestu mėginiu – skiriasi mėginio ir etalono tirpalo aspiracijos greičiai, kokybę blogina į liepsną patekusios kietos dalelės, tyrimui reikalingas itin didelis mėginio kiekis [42]. Neskiestas serumas ar skiestas tik du kartus gali būti analizuojamas tik tada, kai aspiratorius

pritaikytas taip, kad mėginio ir etaloninio tirpalo aspiracijos greičiai nesiskirtų [43] arba etalono tirpalo klampumas turi būti padidinamas pridėdant dekstranų ar baltymų [44].

Klinikinėse laboratorijose atominė absorbcinė spektroskopija cinkui nustatyti vertinama dėl specifiškumo, jautrumo, tikslumo, paprastumo ir palyginus mažos kainos. Prieš atsirandant AAS degiklių galvutėms, pritaikytoms mėginiams su kietomis dalelėmis matricoje, norint paruošti mėginį, plazmą reikėjo nusodinti ir ekstrahuoti. Tai buvo nepatogu ir užėmė daug laiko. Todėl dabar pirmenybė teigiama tiesioginiam matavimo metodui [45].

1965 m. Sprague ir Slavin [46] pasiūlė tiesioginį AAS metodą, skirtą cinko nustatymui serume – mėginys buvo ruošiamas serumą skiedžiant vandeniu lygiomis dalimis. Tyrimo tikslumas buvo mažas, reikėjo modifikuoti degiklio galvutę, norint išvengti kimšimosi. Dar vienas minusas buvo tas, jog etalono tirpalai buvo ruošiami su vandeniu, ir nebuvo pritaikyti klampumo skirtumui tarp mėginio ir etalono. 1969 m. Hackley ir kiti [47] aprašė AAS metodą cinkui plazmoje nustatyti, kur mėginys buvo skiedžiamas dejonizuotu vandeniu. Etalono tirpalus jie ruošė dekstrano tirpale (30g/l) tam, kad etalono ir plazmos klampa nesiskirtų. Po šio tyrimo buvo padaryta išvada – norint išvengti analizinių klaidų, etalono tirpalo ir mėginio klampumai turi būti panašūs. Taip pat Reinhold ir kiti [48] patvirtino, jog mėginio aspiracijos greitį lemia kapiliarinis vamzdelis, kuriuo mėginys aspiruojamas, ir pasiūlė mintį, kad taip yra dėl klampumo skirtumų. Jie teigė, jog siekiant tyrimo tikslumo, serumas turi būti skiedžiamas bent tris kartus.

Norint sumažinti klaidas dėl kimšimosi, jonų interferencijos ir klampumo tarp mėginio ir etalono tirpalų skirtumų, kai kurie autoriai siūlo skiesti mėginį 20 kartų [49]. Toks didelis skiedimas silpnina signalą, todėl reikalingi stiprinantys agentai – nitritinė rūgštis ar n-butanolis. Itin daug praskiedus mėginį, gali atsirasti pipetavimo klaidų. Optimalus skiedimas yra toks, kai nesikemša kapiliaras ir degiklio galvutė, ir gaunamas pakankamai stiprus signalas.

James R. Kelson ir kiti [50] palygino du cinko nustatymo atominė absorbcinė spektroskopija metodus – pirmajame serumą skiedė vandeniu 10 kartų, antrajame 1 mL serumo buvo sumaišyta su 3 mL 67 g/L trichloracto rūgšties tirpalu, centrifuguojama 20 min, paimtas ir analizuotas supernatantas. Abiems metodams buvo naudojamas etalono tirpalas (100 mg cinko ištirpinta 4 mL koncentruotos HCl ir praskiestas 1 L dejonizuoto distiliuoto vandens).

Buvo įvertintas tiesiškumas, tikslumas ir pakartojamumas. Kalibracijos pobūdis skiestam mėginiui buvo tiesinis, o trichloracto metodui esant didelei analitės koncentracijai –

užfiksuoti nukrypimai nuo tiesės. Koreliacija tarp dviejų metodų buvo beveik tiesinė, bet trichloracto rūgšties metodas parodė didesnius kiekvieno mėginio rezultatus (vidutinis skirtumas $91 \pm 28 \mu\text{g/L}$). Toks rezultatų skirtumas buvo aiškinamas tūrio pokyčiais, kuriuos gali sukelti baltymų nusodinimas: baltymo denatūracija ir nusėdimas aiškiai padidins bet kurio kito neišskritusio į nuosėdas serumo komponento koncentraciją. Baltymų nusodinimas 10 kartų skiestame mėginyje gali veikti tūrio pokyčius nuo 2 iki 4 %. Trichloracto rūgšties metode skiedžiama tik 4 kartus, todėl tūrio pokytis gali būti 2,5 karto didesnis. Taip pat manoma, kad skiedimo metodu galėjo būti gauti mažesni rezultatai dėl skirtingų aspiracijos greičių tarp mėginio, kuriame yra baltymų, ir etalono tirpalo, kurio sudėtyje baltymų nėra. Šis netikslumas neturėtų būti žymus skiedžiant mėginį 10 kartų, tačiau tai gali priklausyti ir nuo prietaiso [51].

AAS taip pat naudojama cinko kiekiui insulino-cinko heksameroose nustatyti [52]. Cinkas svarbus visose insulino metabolizmo stadijose, nuo produkcijos, sekrecijos, iki utilizavimo ir kaupimo. Cinkas saugo kasos beta ląsteles nuo sunaikinimo, o jo trūkumas paveikia ląstelių gebėjimą produkuoti ir sekretuoti insuliną. Gliukozės koncentracija kraujyje padidėja, jei kasa neprodukuoja ar nesekretuoja pakankamai insulino. Sumažėjusi cinko koncentracija organizme veikia jo jautrumą insulinui – insulino receptoriai, esantys ant beta ląstelių, yra inhibuojami [53].

Be AAS cinkui insulino-cinko heksameroose nustatyti naudojami ir kiti metodai – kolorimetrinis, neutronų aktyvacijos analizė, poliarografija, rentgeno fluorescencija, emisinė spektroskopija, fluorometrija. Būtent atominė absorbcinė spektroskopijai pirmenybė teikiama dėl metodo specifiškumo, jautrumo, tikslumo ir sąlyginai mažos kainos [54]. Optimizavus spektroskopines sąlygas etaloniniai tirpalai ir mėginys aspiruojami į liepsną ir fiksuojamos spektrogramos, absorbcija matuojama 213,9 nm, naudojama cinko tuščiaavidurio katodo lempa, oro-acetileno liepsna (degalų padavimo greitis 1600 mL/min). Gauti duomenys parodė, kad AAS metodas yra tikslus, stabilus ir rodo puikų tiesiškumą bei glaudumą. Naudotas tiesioginio skiedimo metodas reikalauja mažiau nei 2 min mėginio paruošimui. Metodas pigus ir gali būti naudojamas bet kurioj laboratorijoje. [52].

2.2.3. ATOMINĖ EMISINĖ SPEKTROSKOPIJA

Metodo principas: mėginys paduodamas į termiškai aukštos energijos aplinką tam, kad atomai pereitų į sužadintą būseną. Tokia aplinka sukurama naudojant liepsną arba plazmą. Kadangi sužadintas atomas yra nestabilios būsenos, jis spontaniškai grįžta į normalią būseną, ir tuo metu išspinduliuoja šviesą. Elemento emisinis spektras susideda iš emisinių spindulių rinkinio, vadinamo emisinėmis linijomis. Tokių linijų intensyvumas didėja, kai daugėja sužadintų atomų skaičius.

Yra keletas esminių skirtumų tarp emisinės ir absorbcinės spektroskopijos. Naudojant atominę emisiją, liepsna tarnauja dviem tikslams: ji konvertuoja mėginį į atomizuotus garus ir tada atomus termiškai perkelia į sužadintą būseną. Šie atomai, grįždami į normalią būseną, išskiria šviesą, kurią fiksuoja instrumentas. Išskirtos šviesos intensyvumas susijęs su elemento koncentracija mėginyje. Atominėje absorbcijoje vienintelė liepsnos funkcija yra paversti mėginį į atomizuotus garus, kurie gali absorbuoti šviesą iš šviesos šaltinio (tuščiavidurio katodo lempa ar beelektrodė iškrovos lempa) [36].

Nors atominė ir emisinė spektroskopija yra vienas kitą papildantys metodai, kiekvienas turi savo privalumų ir trūkumų. Emisinei spektrometrijai būdinga mažesnė tarpelementinė interferencija, kadangi naudojama aukštesnė temperatūra. Taip pat emisinis spektras gali būti gaunamas vienu kartu sužadinant atomus ir tuo pat metu gali būti fiksuojami keli elementai. Emisinės spektrometrijos multielementinei analizei reikalingas labai mažas mėginio kiekis. Naudojant plazmą, emisinė spektrometrija gali būti nustatomi ir nemetalai. Tuo tarpu atominei absorbcinei spektrometrijai reikalingi prietaisai pigesni, o tyrimo procedūra paprastesnė [55].

2.2.4. INDUKTYVIAI SURIŠTOS PLAZMOS MASIŲ SPEKTROMETRIJA

Induktyviai surištos plazmos masių spektrometrija – tai metodas, kuriuo galima nustatyti itin mažas metalų ir keleto nemetalų koncentracijas. Tai pasiekama mėginį jonizuojant induktyviai surišta plazma ir po to naudojant masių spektrometrą jonų kiekio atskyrimui ir įvertinimui. Lyginant metodą su atominės absorbcijos metodu, šis yra greitesnis, tikslesnis ir jautresnis. Tačiau palyginus su kitų tipų masių spektrometrija (pvz terminės jonizacijos masių

spektrometrija), induktyviai surištos plazmos masių spektrometrijai būdinga didesnė interferencija [56]. Induktyviai surištos plazmos masių spektrometrija sujungia aukštos temperatūros induktyviai surištos plazmos šaltinį ir masių spektrometrą. Induktyviai surištos plazmos šaltinis mėginyje esančius elemento atomus paverčia į jonus, kurie atskiriami ir nustatomi masių spektrometre [57].

Mėginį galima paruošti įvairiai, vienas iš tokių metodų – serumas ar plazma turi būti filtruojami ir praskiedžiami ieškomo elemento etalono tirpalu santykiu 1:9. Taip paruoštoje plazmoje ar serume galima tirti ne tik cinko, bet ir seleno bei vario koncentracijas [58]. Kitas, paprastesnis mėginio paruošimo būdas – tiriamąją medžiagą praskiesti nitritine rūgštimi. Tokiu nesudėtingu mėginio paruošimu siekiama išvengti užteršimo ir interferencijos. Mėginį reikia skiesti tam, kad išvengtume staigaus, taip vadinamo, „deglo“ užblokavimo. [59]. „Deglas“ – tai kvarco struktūra, pro kurią teka argono dujos, kurios vėliau, veikiant elektros srovei, virsta plazma, o pastaroji jonizuoja mėginyje esančius atomus [60].

Tai greitas, multielementinis metodas, jo produktuvymus gali būti prilygintas induktyviai surištos plazmos atominėi emisinei spektrometrijai, tačiau elementų aptikimo galimybės žymiai mažesnės [57].

2.2.5. INDUKTYVIAI SURIŠTOS PLAZMOS ATOMINĖ EMISINĖ SPEKTROMETRIJA

Metodas dar kitaip vadinamas optine emisine spektrometrija. Kaip ir induktyviai surištos plazmos masių spektrometrijoje, čia taip pat naudojama induktyviai surišta plazma atomų jonizavimui, tačiau antras metodo etapas skiriasi – sužadinti atomai ir jonai išskiria elektromagnetinę spinduliuotę, kurios bangų ilgis yra specifinis kiekvienam elementui, jis fiksuojamas ir taip identifikuojama dominanti analitė. Emisijos intensyvumas koreliuoja su elemento koncentracija mėginyje [61].

Šis metodas nėra toks jautrus kaip induktyviai surištos plazmos masių spektrometrija, tačiau jis žymiai tolerantiškesnis sunkioms mėginių matricoms. Mėginiui patenkus į induktyviai surištos plazmos prietaisą, daugybė fizinių parametrų ir cheminių reakcijų lemia emisinį signalą, todėl tiek mėginio charakteristikos, tiek pačio prietaiso nustatymai vaidina svarbų vaidmenį

tyrime [62, 63]. Klampumas, paviršiaus įtempimas, sudėtis, elemento koncentracija, homogeniškumas, suspenduotų dalelių kiekis – visos šios mėginio savybės savaip veikia emisinį signalą [64].

Mėginį tyrimui galima paruošti keliais būdais – mėginį galima skiesti distiliuotu vandeniu santykiu 1:10, arba mėginys gali būti skiedžiamas sieros rūgštimi: 1 ml sieros rūgšties sumaišoma su 1 g serumo mišinys 3 val šildomas vandens vonioje, vėliau atšaldomas ir praskiedžiamas distiliuotu vandeniu iki 10 g. Šiems būdams dažniausiai pasitaikančios sisteminės klaidos ir interferencijos: cheminė interferencija, matricos efektas, interferencijos, susijusios su mėginio padavimu į plazmos liepsną. Didelį pranašumą šis metodas turi esant poreikiui tuo pačiu metu nustatyti ne vieną, o visą grupę elementų [65].

2.2.6. CHROMATOGRAFINIAI METODAI

Tai dar viena metodų grupė, kuri naudojama mėginio komponentų ar analičių atskyrimui, šiuo atveju įvairių mikroelementų. Tam reikalingos dvi fazės – mobili ir stacionari. Mobili fazė gali būti skysta arba dujinė, tuo tarpu stacionari – kieta arba skysta [66]. Mus dominanti analitė keliauja kartu su mobilią faze per stacionarią fazę, kur vyksta adsorbcijos procesas, o vėliau analitė išplaunama ir detektuojama. Metalų jonų nustatymui paprastai naudojama skysčių chromatografijos rūšis – jonų mainų chromatografija [27]. Jonų mainų chromatografija – tai metodas, pagrįstas sąveika tarp priešingus krūvius turinčių molekulių [67]. Jonų mainų chromatografija dažnai naudojama nustatyti cinko ir vario kiekį kraujo plazmoje dializuojamiems ir kitiems pacientams [68].

Laboratorijose metodas naudojamas dėl greitumo, jautrumo, tikslumo, paprastumo, taip pat gali būti naudojamas diagnozuojant vėlyvas vėžio stadijas virškinamajame trakte [69]. Mėginiui judant per jonų mainų kolonėlę, metalų judrumas priklauso nuo afiniškumo ligandui. Stiprus metalokompleksinis kolorimetrinis reagentas įmaišomas į eliuentą. Metalai detektuojami matomos šviesos bangomis naudojant absorbcijos detektorius. Norint atskirti skirtingus metalus, tai galima padaryti keičiant eliuentą [70].

3. TYRIMO METODAI IR APIMTIS

Tyrimo metu žmogaus kraujo serume buvo tiriama cinko koncentracija. Iš viso buvo ištirti 108 mėginiai. Tyrimas pradėtas 2015 metų sausį, baigtas 2016 metų balandį. Mėginiai buvo tirti Vilniaus universiteto Santariškių klinikų Laboratorinės medicinos centro Biochemijos laboratorijoje. Cinko koncentracija žmogaus kraujo serume buvo tiriama dviem metodais – kolorimetriniu, nadojant spektrofotometrą, bei atominės absorbcinės spektroskopijos metodu. Rutiniškai mėginiai buvo tiriami laboratorijoje kolorimetriniu metodu, vėliau serumas buvo užšaldomas šaldiklyje, ir atšildytas tiriamas atominiu absorbciniu spektrofotometru. Abu metodai detaliau aprošomi toliau.

3.1. KOLORIMETRINIS METODAS

Principas

Tiriamajame mėginyje esantis cinkas sudaro chelatą su 5-Br-PAPS 2-(5-bromo-2-piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)-fenoliu, esančiu reagente. Susiformavęs kompleksas matuojamas 560 nm ilgio bangomis.

Mėginiai

Atliktame tyrime naudota tiriamoji medžiaga buvo žmogaus kraujo serumas. Iš viso ištirti ir tyrimui naudoti 108 mėginiai. Šiuo metodu taip pat gali būti tiriami kraujo plazma ir šlapimas. Tiriant kraujo plazmą, mėgintuvėlių su EDTA naudoti negalima.

Reagentai

- R1 – Deproteinizuojantis tirpalas (trichloracto rūgštis 370 mmol/L);
- R2a – spalvinis reagentas A pH 9,75 (natrio rūgštusis karbonatas 200 mmol/l, trinatricitratas 170 mmol/l, dimetilglioksimas 4 mmol/l, 5-Br-PAPS 0,08 mmol/l, Triton-X 100);
- R2b – spalvinis reagentas B pH 3,0 (salicilaldoksinas 29 mmol/l);
- Etalono tirpalas (koncentracija specifinė partijos Nr.) - 1 taško kalibracijai;

Darbinio reagento R2 paruošimas

Spalvinis reagentas A buvo sumaišytas su spalviniu reagentu B santykiu 4:1 (paruoštas reagentas stabilus išlieka 2 dienas, jei laikomas +15°C - +25°C, arba vieną savaitę, jei laikomas +2°C - +8°C temperatūroje).

Reikia atkreipti dėmesį, kad guminis komercinio kontrolinio serumo dangtelis ar mėgintuvėlio dangtelis gali lemti užteršimą cinku. Svarbu gerai sumaišyti mėginį po deproteinizuojančio reagento įdėjimo.

1. Deproteinizacija

- 500 µl dejonizuoto H₂O buvo sumaišyta su 500 µl 370 mmol/l koncentracijos trichloracto rūgšties (R1).
- 500 µl etalono tirpalo buvo sumaišyta su 500 µl 370 mmol/l koncentracijos trichloracto rūgšties (R1).
- 500 µl 370 mmol/l koncentracijos trichloracto rūgšties (R1) buvo sumaišyta su 500 µl tiriamo serumo ir centrifuguojama 10 minučių 10000 g išcentrine jėga. Gautas supernatantas buvo ištirtas ne vėliau nei per 2 valandas nuo centrifugavimo.

2. Cinko tyrimas

- 500 µl supernatanto buvo sumaišyta su 2,5 ml darbinio reagento (R2).
- Gautas tirpalas buvo inkubuojamas 5 minutes +25°C temperatūroje.
- Spektrofotometru matuojama etalono tirpalo (A_{etalono}), mėginio ($A_{\text{mėginio}}$) ir vandens absorbcija. Matuojama ne vėliau kaip 60 minučių po spalvinio reagento ir mėginio sumaišymo. Matuojama 560 nm ilgio šviesos bangomis, šviesos kelias (kiuvetės storis) – 1 cm.

Kiekvieno mėginio koncentracija buvo matuojama po vieną kartą. Po tyrimo likęs serumas buvo dedamas į šaldiklį, šaldomas –80°C laipsnių temperatūroje, ir vėliau tiriamas atominės absorbcinės spektroskopijos metodu.

Kokybės kontrolei naudotas „Randox Assayed Multisera“ 3 lygio kontrolinis serumas su žinoma Zn koncentracija. Kokybės kontrolė atlikta prieš kiekvieną mėginių seriją.

Laboratoriniai prietaisai

Tyrimui naudotas spektrofotometras - *Agilent 8453* spektrofotometras (Agilent, JAV) (2 pav.).

Spektrofotometro lempos: UV bangos ilgio spindulius generuoja deuterio lempa (1 pav. 2) su spindulio išėjimo anga. Lempa gali skleisti bangas nuo 190 nm iki 800 nm. Matomojo spektro bangoms skleisti spektrofotometre taip pat yra volframo lempa (1 pav. 1). Pastaroji generuoja 370 – 1100 nm ilgio bangas.

Pirminiai lęšiai (1 pav. 3) priima šviesą iš abiejų lempų ir nukreipia šviesos bangas lygiagrečia kryptim. Nukreipti spinduliai pereina per mėginį, esantį mėginių srityje.

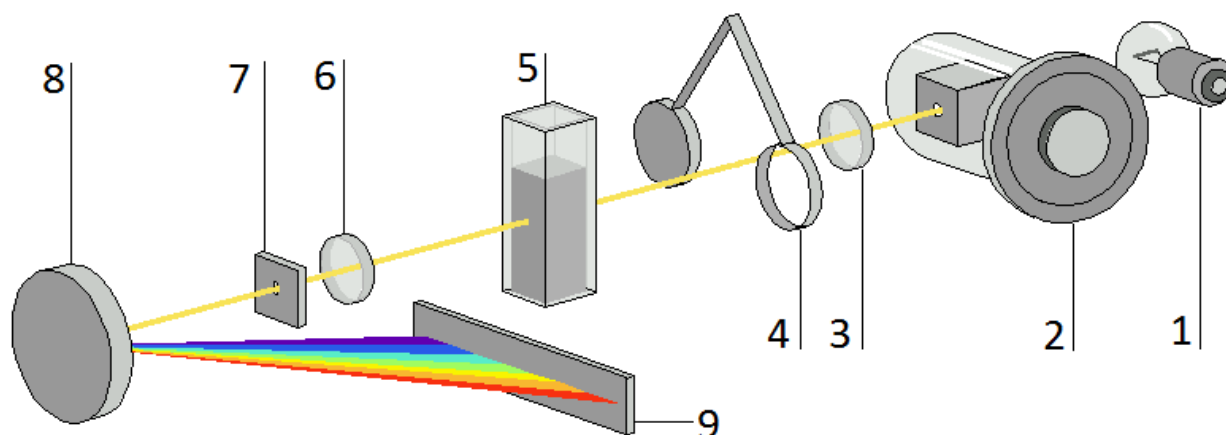
Užraktas (1 pav. 4) yra elektromechaniškai sužadintas. Jam atsidarius, šviesa gali praeiti per mėginį. Tarp skirtingų mėginių matavimų užraktas užsidaro, taip mėginys apsaugomas nuo pašalinio šviesos poveikio.

Spektrofotometras turi atvirą mėginių kamerą. Dėl optinio dizaino, dangtis šiai kamerai nėra reikalingas. Mėginių kameroje yra vienos celės laikiklis.

Spektrografo korpusas yra keramikinis tam, kad sumažintų terminius efektus. Jo pagrindiniai komponentai yra lęšiai (1 pav. 6), plyšys (1 pav. 7), gardelė (1 pav. 8) ir foto diodo rinkinys (1 pav. 9). Spektrografo lęšiai yra sumontuoti ant spektrografo korpuso. Jie refokusuoja šviesos srautą, praėjusį pro mėginį. Plyšys tai nedidelėje plokštelėje esanti 1 mm pločio anga. Ji yra tokio paties dydžio, kaip ir vienas iš foto diodų, esančių foto diodų rinkinyje. Limituodama ateinančios šviesos spindulį, ji užtikrina, kad kiekvienas spindulys pluoštas būtų projektuojamas į tinkamą fotodiodą. Dispersijos ir spektrinio vaizdavimo kombinacija gaunama naudojant įgaubtą holografinę gardelę. Gardelė išsklaido šviesą ant fotodiodų rinkinio. Fotodiodų rinkinys yra spektrografo “širdis”. Tai 1024 individualių fotodiodų ir kontrolinių schemų, esančių ant puslaidininkio lusto, sistema.

Norint gauti geriausius rezultatus šiuo spektrofotometru, buvo naudojama kvarco kiuvetė, vengiama pirštų atspaudų ar kitokių dėmių ant kiuvetės sienelės, tirpalai, esantys kiuvetėje, buvo be nuosėdų, tirpalai ir kiuvetės sienelės buvo be burbulų, trumpas laiko

intervalas tarp tuščio ir mėginio su analite matavimų, matuojant tuščią mėginį ir mėginį su analite kiuvetės padėtis buvo tokia pati.



1 pav. Optinė spektrofotometro sistema. 1 – volframo lempa; 2 – deuterio lempa; 3 – pirminis lęšis; 4 – užraktas; 5 – kiuvetė; 6 – spektrografo lęšis; 7 – plyšys; 8 – gardelė; 9 – foto diodų rinkinys;



2 pav. *Agilent 8453* spektrofotometras, naudotas tyrimui

3.2.ATOMINĖS ABSORBCINĖS SPEKTROSKOPIJOS METODAS

Mėginio paruošimas

Tiriamoji medžiaga (serumas) buvo išimama iš šaldiklio, kuriame buvo šaldoma -80°C temperatūroje, atšildoma kambario temperatūroje, vėliau skiedžiama dejonizuotu vandeniu santykiu 1:10.

Etalono tirpalo paruošimas

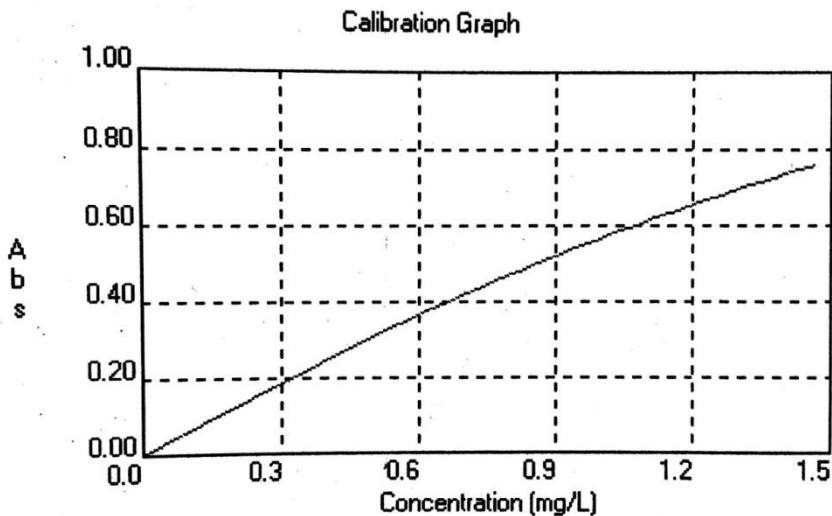
Etaloniniai žinomų koncentracijų tirpalai ruošiami naudojant Cinko atominės absorbcijos etaloną (*Agilent Technologies*, 1,000 mg/l 3% nitritinės rūgšties, partijos Nr. 4308063).

Atominės absorbcijos darbinės sąlygos

- Lempos srovė – 5 mA
- Kuras – acetilenas
- Liepsnos stoichiometrija – oksiduojanti
- Šviesos bangos ilgis – 213,9 nm

Cinko koncentracijos matavimas

Tyrimui paruošti mėginiai buvo tiriami serijomis po tris. Kadangi cinko koncentracija mėginiuose buvo pamatuota kolorimetriniu metodu, ji buvo žinoma, todėl etaloninių tirpalų koncentracijos parenkamos taip, kad mėginių koncentracijos tilptų į intervalą tarp mažesnės koncentracijos etaloninio tirpalo ir tarp didesnės koncentracijos etaloninio tirpalo koncentracijų (pvz. mėginių koncentracijos – 0,097 mg/l, 0,179mg/l, 0,133mg/l, tada etaloninių tirpalų koncentracijos 0,05mg/l ir 0,2mg/l). Pirmiausia matuojama mažesnės koncentracijos etalono tirpalo absorbcija, po jos matuojama trijų pasirinktų mėginių absorbcija, vėliau matuojama didesnės koncentracijos etalono tirpalo absorbcija. Visa procedūra kartojama tris kartus. Iš gautų duomenų, pamatavus dviejų koncentracijų etalono tirpalų absorbciją, brėžiama kalibracinė kreivė, gaunama lygtis, pagal kurią apskaičiuojama tiriamų mėginių cinko koncentracija. Gauti rezultatai lyginami su kolorimetriniu metodu gautais rezultatais.



3 pav. Kalibracinė cinko kreivė

Laboratoriniai prietaisai

Tyrimui naudotas AA spektroskopas – *Agilent 55B* AA spektroskopas (Agilent, JAV) (6 pav.).

Tai dvigubo spindulio liepsnos atominės absorbcijos spektroskopas. Instrumentas gali būti valdomas skystųjų kristalų ekranu ir specialia klaviatūra, tačiau tyrimo metu instrumentas buvo prijungtas prie stalinio kompiuterio ir valdomas naudojant *Agilent SpectrAA* programinę įrangą. Spektroskopas turi automatinį monochromatoriaus, plyšio pločio ir dujų parinkimą, dvi fiksuotas pozicijas tuščiaavidurio katodo lempoms, didelio intensyvumo deuterio fono reguliatorių.

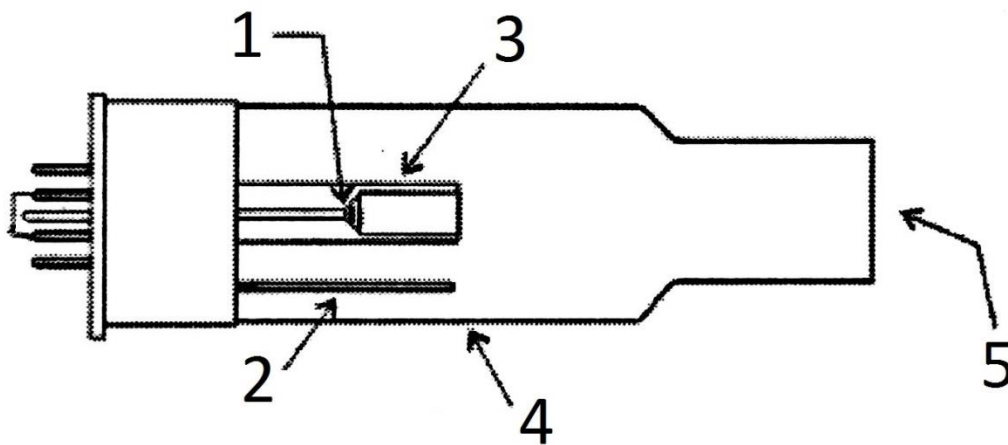
Norint užtikrinti optimalų spektroskopo analizinį veikimą, rekomenduojama laboratorijos temperatūra turėtų būti 20 – 25 °C, taip pat temperatūra turėtų būti pastovi ($\pm 2^\circ\text{C}$) visą darbo dieną. Tyrimo metu laboratorijos temperatūra pateko į rekomenduojamas ribas.

Tyrimo metu su *Agilent AA* sistema buvo naudojamas oro-acetileno degiklis. Rekomenduojamas oro slėgis sistemoje – 350 kPa, acetileno (C_2H_2) – 75 kPa, esant per mažam acetileno slėgiui gaunami netikslūs rezultatai. Normalus dujų tiekimo greitis: oro – 13,5 – 20 l/min, acetileno – 0 – 10 l/min. Mėginys atomizuojamas oro-acetileno liepsnoje, kur temperatūra siekia 2300 °C. Liepsną mėginys pasiekia tokiu keliu – iš mėgintuvėlio mėginį vamzdeliu

aspiruoja pneumatinis purkštuvas (5 pav.), kuriame mėginys paverčiamas aerozoliu. Aerozolis patenka į purkštuvo kamerą (5 pav. 6), kur yra sumaišomas su oro-acetilenų dujomis. Liepsną pasiekia tik aerozolio lašai, kurių dydis $< 10 \mu\text{m}$. Po šio proceso tik 5% aspiruoto mėginio patenka į liepsną. Likę 95% mėginio pašalinti per nuotekų vamzdelį. Vamzdelis atsiveria į skysčio rezervuarą, kuris saugo nuo dujų ištekėjimo nuotekų vamzdžiu.

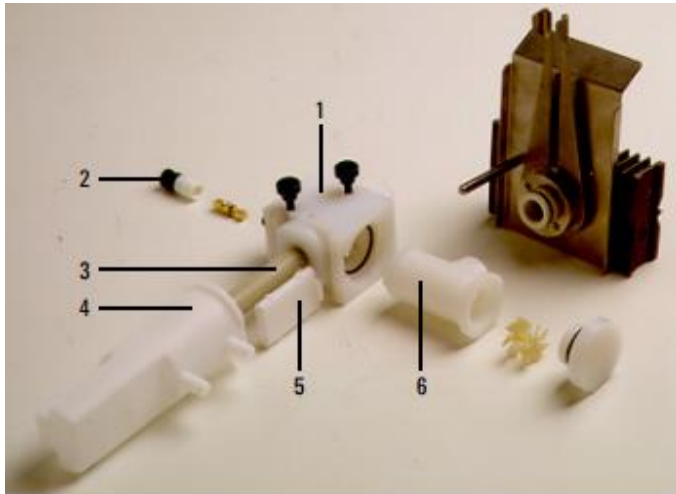
Degiklio padėtis optimizuojama taip, kad šviesos pluoštas kirstų liepsną per ilgiausią jos ašį. Norint užtikrinti didžiausią galimą jautrumą, degiklio aukštis nustatomas taip, kad šviesa kirstų liepsną toje vietoje, kur yra didžiausia atomų koncentracija. Tyrimui naudotas 10 cm vienos angos degiklis, angos plotis 0,54 mm.

Kaip išorinis spinduliuotės šaltinis naudota tuščiavidurio katodo lempa. *Agilent 55B AA* spektroskope galima naudoti vieno elemento arba multielementines lempas. Tyrimo metu naudota dviejų elementų lempa. Lempos viduje yra ir katodas ir anodas, šiuo atveju katodas yra iš cinko, o lempos vidus užpildytas inertinėmis dujomis. Kai tarp katodo ir anodo atsiranda įtampa, inertinės dujos jonizuojasi, teigiami jonai sužadina katodo atomus. Sužadinti atomai, grįždami į normalią būseną, išspinduliuoja norimo bangos ilgio spindulius.



4 pav. Tuščiavidurio katodo lempos sandara. 1 – katodas, 2 – anodas, 3 – stiklinis dangtis, 4 – stiklinis cilindras, 5 – kvarcinio stiklo langas

Šviesa, praėjusi per liepsną, patenka į monochromatorių. Monochromatorius atskiria tik 213,9 nm ilgio bangas, kurias sugeria mėginyje esantys cinko atomai. Bangos nukreipiamos į detektorį, kuris šviesos signalą konvertuoja į elektrinį signalą, proporcingą šviesos intensyvumui. Iš čia duomenys patenka į programinę įrangą.



5 pav. Purkštuvo sistema. 1 – purkštuvo blokas; 2 – purkštuvas; 3 – nuotekų vamzdelis; 4 – skysčio rezervuaras; 5 – plūdė; 6 – purkštuvo kamera;

Foninės absorbcijos koregavimui naudojamas didelio intensyvumo deuterio fono reguliatorius, kuris užtikrina trumpalaikių fono signalų korekciją.



6 pav. *Agilent 55B AA* spektroskopas naudotas tyrimui

Statistinė analizė atlikta naudojantis IBM SPSS Statistics, Microsoft Excel bei MedCalc programomis. Koreliacija tarp grupių nustatyta panaudojant Pearsono koreliacijos koeficientą. Metodų suderinamumas analizuotas vertinant Passing-Bablok ir Bland Altman analizes.

4. REZULTATAI

Pirmiausia cinko koncentracija mėginiuose buvo išmatuota kolorimetriniu metodu. Gauti duomenys išreikšti $\mu\text{mol/l}$, pagal formulę:

$$\text{Zn } (\mu\text{mol/L}) = ((A_{\text{mėginio}} - A_{\text{etalono}})/(A_{\text{etalono}} - A_{\text{vandens}})) \times \text{Etalono konc. } (\mu\text{mol/L})$$

Antrame etape kolorimetriniu metodu gauti rezultatai buvo perskaičiuoti į mg/l , pagal formulę:

$$C (\text{mg/l}) = C (\mu\text{mol/l})/15,3/10$$

$C (\text{mg/l})$ – cinko koncentracija miligramais litre;

$C (\mu\text{mol/l})$ – cinko koncentracija mikromoliais litre;

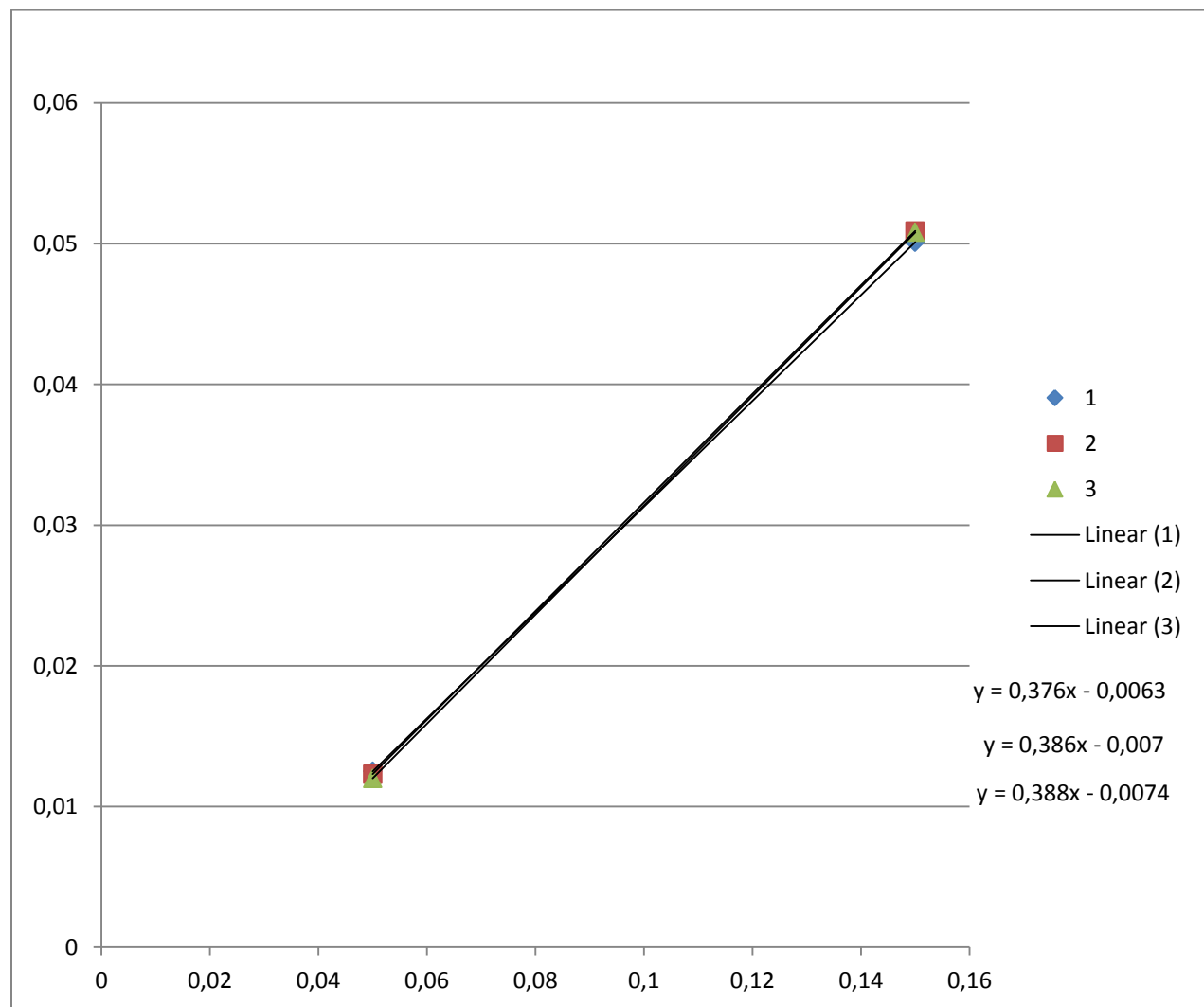
Vienetai buvo perskaičiuojami, norint pritaikyti etalono tirpalų koncentraciją AAS metodo kalibracijai atlikti, kadangi etaloninių tirpalų koncentracija išreiškta mg/l .

Etaloninių tirpalų absorbcijos matavimas vyko AAS metodu. Pamatavus etaloninių tirpalų absorbciją, gauti duomenys sudėti į lentelę (1 lentelė, 2 lentelė Pavyzdys). Pagal lentėje pateiktus duomenis buvo braižomos kalibracinės kreivės. Kadangi matavimai buvo kartojami tris kartus, todėl braižomos 3 kalibracinės kreivės (8 pav., 7 pav.). Pagal kalibracinę kreivę buvo gaunama lygtis ($y = ax - b$), o pagal ją skaičiuojama cinko koncentracija matuotame mėginyje.

Pirmieji matavimai buvo netikslūs. Pamatavus etaloninių tirpalų absorbciją ir mėginių absorbciją, mėginių absorbcijos duomenys netilpo į intervalą tarp mažesnės koncentracijos etaloninio tirpalo absorbcijos ir didesnės koncentracijos etaloninio tirpalo absorbcijos. Mėginiai buvo papildomai išmaišyti naudojant elektroninę pipetę ir absorbcija matuota iš naujo. Po to pamatavus etaloninių tirpalų ir mėginių cinko atominę absorbciją, mėginių absorbcijos duomenys tilpo į intervalą tarp etaloninių tirpalų absorbcijos duomenų.

1 lentelė. Etaloninių tirpalų absorbcijos matavimo duomenys.

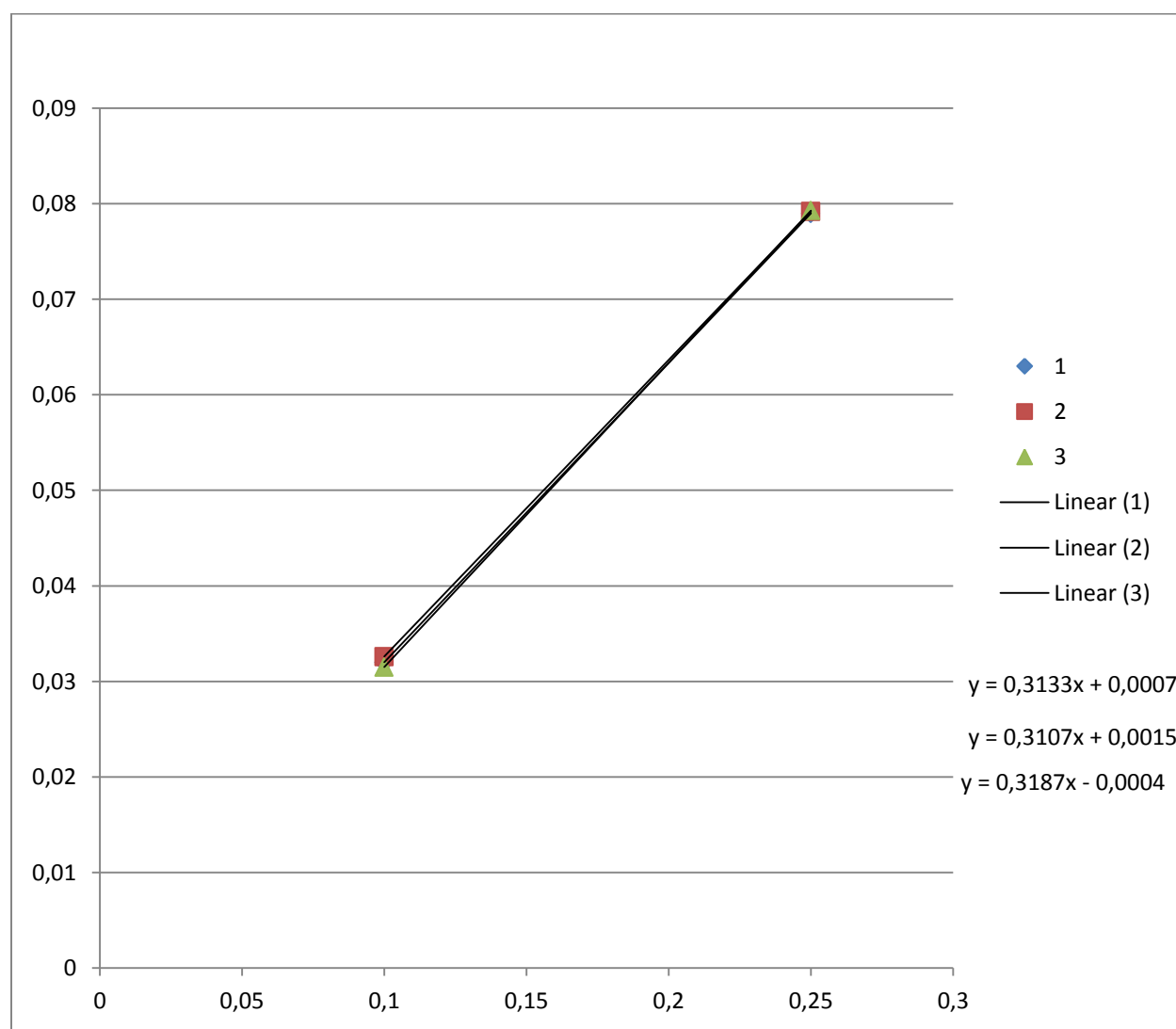
	Etalono tirpalas nr. 1 (0,05 mg/l)	Etalono tirpalas nr. 2 (0,15mg/l)
1	0,0125	0,0501
2	0,0123	0,0509
3	0,012	0,0508



7 pav. Pagal 1 lentelės duomenis nubrėžtos kalibracinės kreivės ir lygtys.

2 lentelė. Etaloninių tirpalų absorbcijos matavimo duomenys.

	Etalono tirpalas nr. 1 (0,1 mg/l)	Etalono tirpalas nr. 2 (0,25mg/l)
1	0,032	0,079
2	0,0326	0,0792
3	0,0315	0,0793



8 pav. Pagal 2 lentelės duomenis nubrėžtos kalibracinės kreivės ir lygtys.

Atominiu absorbciniu spektroskopu išmatavus mėginių absorbciją (3 lentelė, y1, y2, y3), ji įstatoma į formulę, gautą nubraižius kalibracinę kreivę (1 pav.) ir taip apskaičiuojama cinko koncentracija mėginyje mg/l (3 lentelė, x1, x2, x3). Kadangi kolorimetriniu metodu cinko koncentracija mėginiuose buvo apskaičiuota μmol/l, todėl ir AAS metodu gauti duomenys buvo perskaičiuoti į tokius pačius vienetus, kad būtų galima palyginti rezultatus. Tai apskaičiuojama pagal formulę:

$$C (\mu\text{mol/l}) = C (\text{mg/l}) * 15,3 * 10$$

C (μmol/l) – cinko koncentracija mikromoliais litre;

C (mg/l) – cinko koncentracija miligramais litre;

Cinko koncentraciją mėginyje gavus mikromoliais litre (4 lentelė, AAS1, AAS2, AAS3), buvo paskaičiuotas visų trijų matavimų vidurkis (4 lentelė, AAS vid.) pagal formulę:

$$\text{AAS vid.} = (\text{AAS1} + \text{AAS2} + \text{AAS3}) / 3$$

Gavus AAS vidurkį jis buvo lyginamas su kolorimetriniu metodu gautu rezultatu (4 lentelė, UV), paskaičiuojamas skirtumas (4 lentelė, Skirt.) pagal formulę:

$$\text{Skirt.} = \text{UV} - \text{AAS vid.}$$

3 lentelė. 3 matavimų cinko atominės sugerties ir koncentracijos duomenys.

y1	y2	y3	x1	x2	x3	AAS1	AAS2	AAS3
0,0253	0,0234	0,0243	0,0840	0,0788	0,0817	12,85851	12,04974	12,50026
0,0312	0,0319	0,0306	0,0997	0,1008	0,0979	15,25931	15,41891	14,98454
0,0413	0,0303	0,0286	0,1266	0,0966	0,0928	19,36915	14,78472	14,19588

4 lentelė. 3 cinko koncentracijos matavimų statistiniai duomenys.

AAS vid.	UV	UV - AAS	SD	U	CV (%)
12,4695	14	1,530497	0,405261	0,700415	3,250017
15,22092	18,1	2,879081	0,219718	0,376181	1,443525

16,11658	17,2	1,08342	2,832152	4,480186	17,57291
----------	------	---------	----------	----------	----------

Taip pat buvo apskaičiuotas gautų rezultatų standartinis nuokrypis (3 lentelė, SD) pagal formulę:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Iš AAS metodu gautų duomenų buvo skaičiuojama A tipo neapibrėžtis (3 lentelė, u) pagal formulę ($n < 10$):

$$u = (x_{\max} - x_{\min}) / 2\sqrt{3}$$

u – A tipo neapibrėžtis;

$x_{\max}$ – didžiausias rezultatas;

$x_{\min}$ – mažiausias rezultatas;

Paskaičiavus visų atominės absorbcinės spektroskopijos matavimų neapibrėžčių vidurkį gauta - 1,516 $\mu\text{mol/l}$. Bendras AAS metodu gautų koncentracijų vidurkis buvo 14,003 $\mu\text{mol/l}$, taigi bendra matavimų neapibrėžtis sudaro 10,8 % rezultato. Iš gautų duomenų buvo skaičiuota A tipo neapibrėžtis. Apskaičiavus AAS metodu gautų duomenų variacijos koeficientus (CV%) jie varijavo nuo 0,12% iki 34,27%, o vidurkis buvo 6,64%. Variacijos koeficientas skaičiuotas pagal formulę:

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$$

SD – standartinis nuokrypis;

$\bar{x}$ - matavimų rezultatų vidurkis;

UV metodo matavimų neapibrėžtis skaičiuota naudojant „Randox Assayed Multisera“ 3 lygio kontrolinio serumo cinko koncentracijos matavimo duomenis. Naudoti 2015m. gegužės – gruodžio mėnesio duomenys ($n = 34$). Gauta matavimų neapibrėžtis - 0,213 $\mu\text{mol/l}$. Bendras UV metodu gautų vidinės kokybės kontrolės cinko koncentracijos vidurkis – 37,129 $\mu\text{mol/l}$, taigi

matavimų neapibrėžtis sudaro tik 0,57%. Apskaičiavus vidinės kontrolės rezultatų variacijos koeficientą (CV%) gauta 3,34%. UV metodo matavimų neapibrėžtis skaičiuota naudojant formulę ($n > 10$):

$$u = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

u – A tipo neapibrėžtis;

s – standartinis nuokrypis;

n – matavimų skaičius;

Rezultatų, gautų AAS metodu, intervalas buvo nuo 6,1 $\mu\text{mol/l}$ iki 23,8 $\mu\text{mol/l}$, o intervalas rezultatų, gautų kolorimetriniu metodu buvo nuo 7,5 $\mu\text{mol/l}$ iki 26,6 $\mu\text{mol/l}$ (literatūroje pateikiamas sveiko suaugusiojo cinko konc. serume intervalas 11 - 24 $\mu\text{mol/l}$).

Skirtumas tarp kolorimetriniu metodu gautų rezultatų ir atominės absorbcinės spektroskopijos metodu gautų rezultatų (UV - AAS) varijavo nuo -2,539 iki 7,812, skirtumo vidurkis buvo 2,469. Rezultatai, gauti kolorimetriniu metodu buvo didesni, nei AAS metodu gauti rezultatai. Taip gali būti todėl, jog naudojant kolorimetrinį metodą, vykdoma deproteinizacija, cinkas atsiskiria nuo baltymų, su kuriais yra surištas į kompleksus, o vykdant AAS metodą, cinkas serume vis dar yra surištas su baltymais, todėl absorbuoja mažesnę kiekį spinduliuotės. Taip pat rezultatai gali skirtis ir dėl tūrio pokyčio: UV metode išsodinami baltymai, keičiasi mėginio tūris, todėl padidėja cinko koncentracija. Koreliacija tarp pasirinktų metodų buvo $r = 0,83258$ ($p < 0,05$).

Metodai palyginti naudojant *Passing-Bablok* regresiją (*MedCalc* programa).

Kintamasis X	UV
Kintamasis Y	AAS

Mėginių kiekis	108
----------------	-----

	Kintamasis X	Kintamasis Y
Mažiausia reikšmė	7,5000	6,1324
Didžiausia reikšmė	26,6000	23,7963
Aritmetinis vidurkis	16,4722	14,0026
Mediana	16,8500	13,8906
Standartinis nuokrypis	3,0457	3,2541
Standartinė vidurkio paklaida	0,2931	0,3131

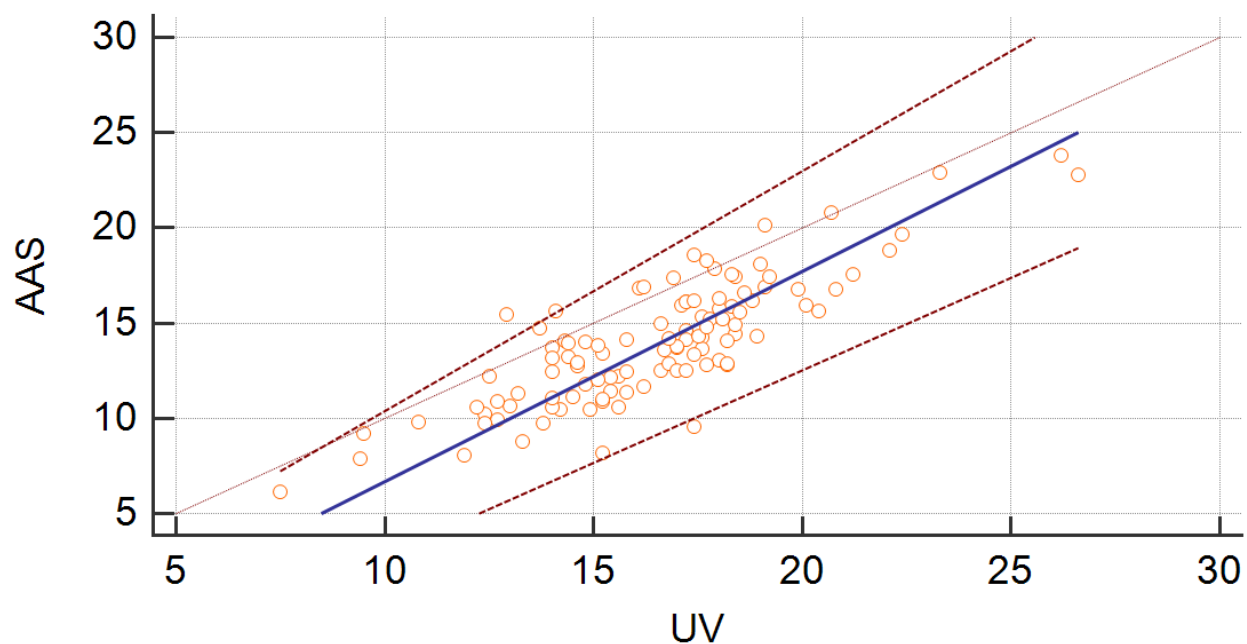
Regresinė lygtis

$y = -4,453600 + 1,107139 x$	
Sisteminiai skirtumai	
Atkirta A	-4,4536
95% Pasikliautinis intervalas	-7,0279 - -2,2227
Proporciniai skirtumai	
Nuolydis B	1,1071
95% Pasikliautinis intervalas	0,9766 - 1,2611
Atsitiktiniai skirtumai	
Likutinis standartinis nuokrypis (LSN)	1,3017
± 1.96 LSN intervalas	-2,5514 - 2,5514
Tiesiškumas	
Cusum tiesiškumo testas	Nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo (P=0,58)

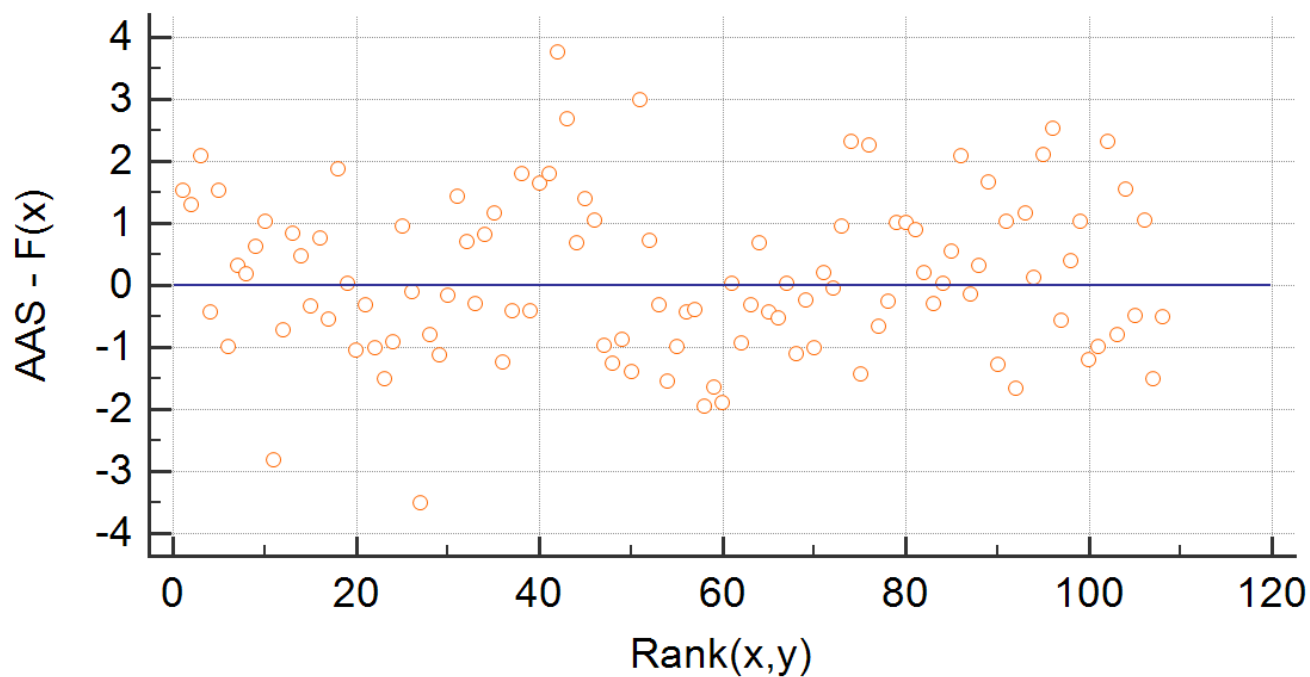
Pagal Passing-Bablok regresinę analizę, gauta regresijos lygtis $y = -4,4536 + 1,107139x$. Atkirta A = -4,4636, o jos 95% pasikliautinis intervalas nuo -7,0279 iki -2,2227. 0 į šį intervalą nepatenka, tai rodo jog gauta atkirta A reikšmingai skiriasi nuo 0 ($y = 1x + 0$), reiškia tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja proporcinis skirtumas. Gautas nuolydis B lygus 1,1071. Jo 95% pasikliautinis intervalas nuo 0,9766 iki 1,2611. Į šį intervalą patenka 1, tai rodo, jog nėra

reikšmingo skirtumo tarp gautos nuolydžio B reikšmės ir tarp 1 ($y = 1x + 0$), reiškia tarp dviejų lyginamų metodų nėra reikšmingo sisteminio skirtumo.

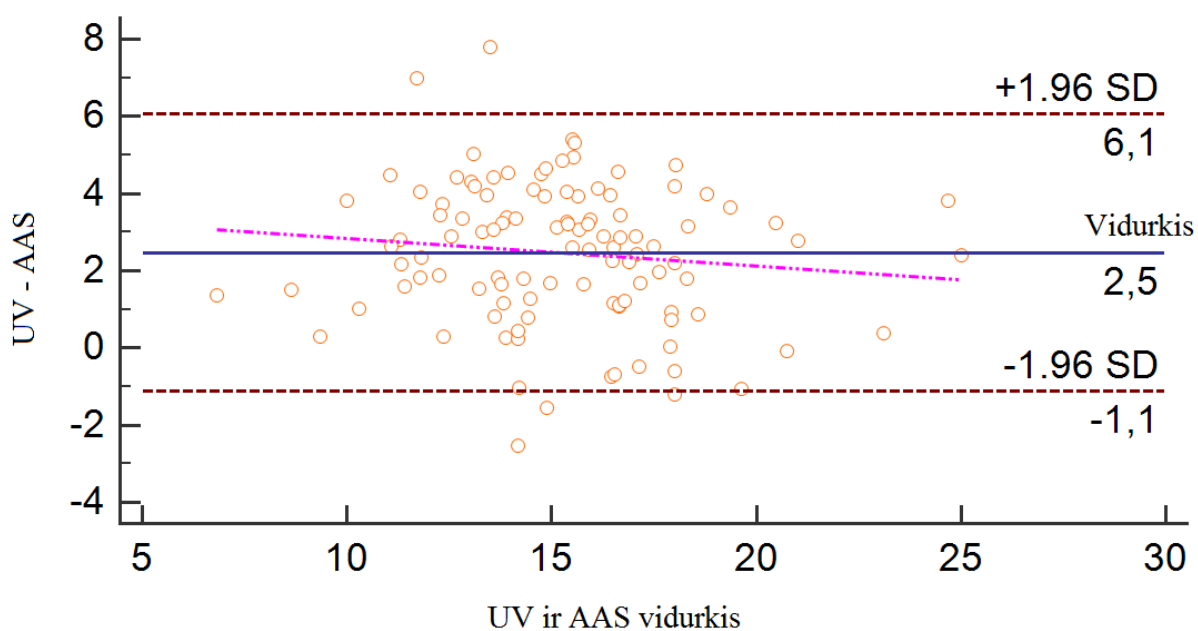
Tiesiškumas tarp dviejų metodų parodo, ar tarp jų egzistuoja tiesinė priklausomybė. Šiuo atveju *Cusum* testas (*cumulative sum control chart*) rodo, jog nėra reikšmingo nukrypimo nuo tiesiškumo, p reikšmė yra didesnė už 0,05 ($p=0,58$), tai reiškia tarp dviejų lyginamų metodų egzistuoja tiesinė priklausomybė.



9 pav. Passig-Bablok regresija: regresijos linija – mėlyna, regresijos linijos pasikliautinis intervalas – punktyrinės linijos, $x=y$ linija – violetinė linija.

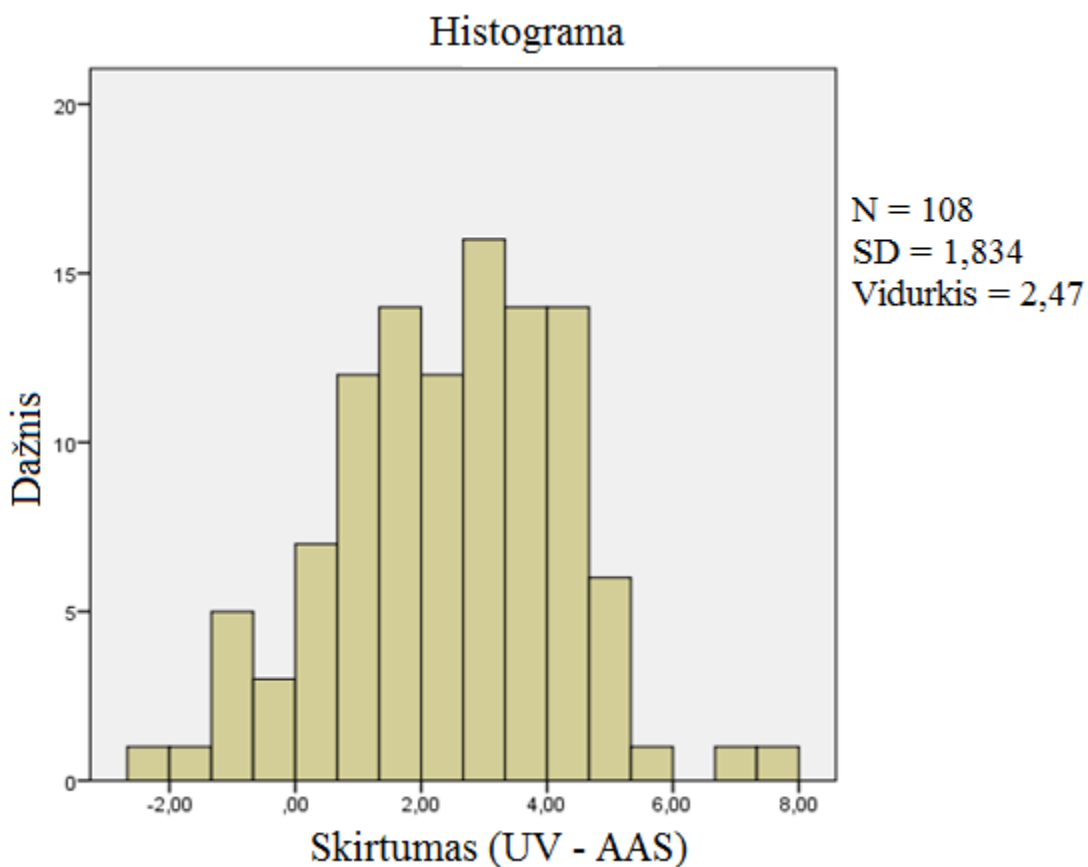


10 pav. Paklaidų (*residuals*) išsidėstymas.



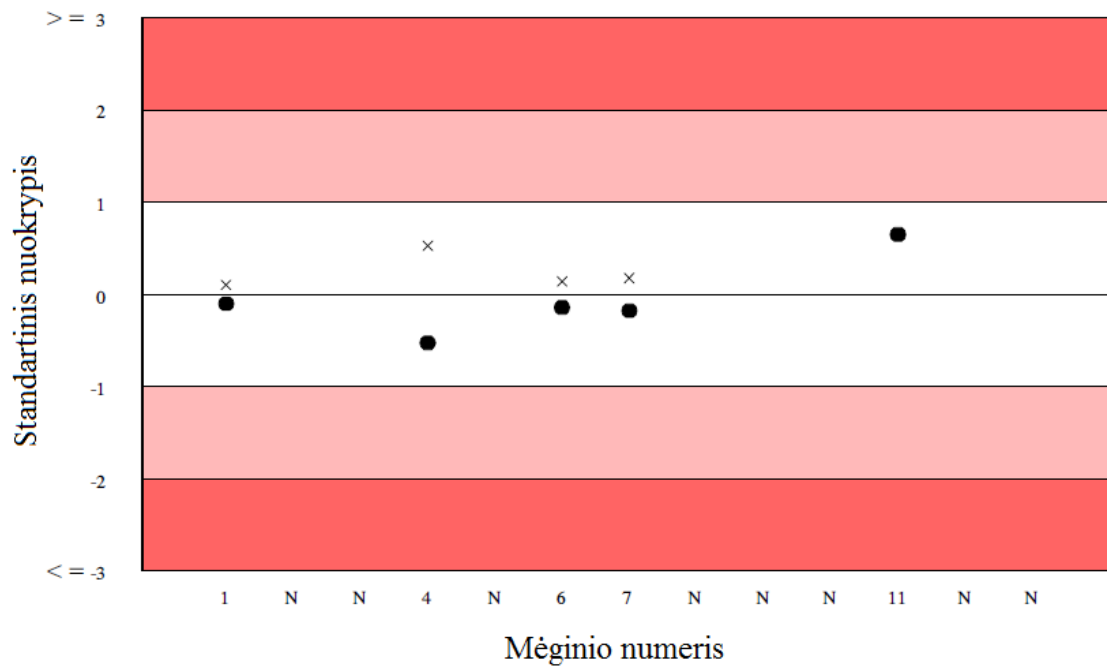
11 pav. Bland-Altman diagrama (x ašis – skirtumas tarp dviejų metodų matavimų (UV - AAS), y ašis – dviejų metodų vidurkis $((UV + AAS)/2)$, violetinė linija – skirtumų regresijos linija).

Atlikus Bland-Altman analizę (11 pav.) matyti, jog skirtumo aritmetinis vidurkis 2,4696, 95% pasikliautinumo intervalas nuo 2,1198 iki 2,8194. Apatinė riba = -1,1242, 95% pasikliautinumo intervalas nuo -1,7238 iki -0,5246, viršutinė riba = 6,0634, 95% pasikliautinumo intervalas nuo 5,4638 iki 6,6629. Diagramoje matyti, jog beveik visi taškai telpa į $-1,96SD$ - $+1,96SD$ ribas. Dviejų skirtingų matavimų skirtumai pasiskirstę pagal Gauso skirstinį (12 pav.).

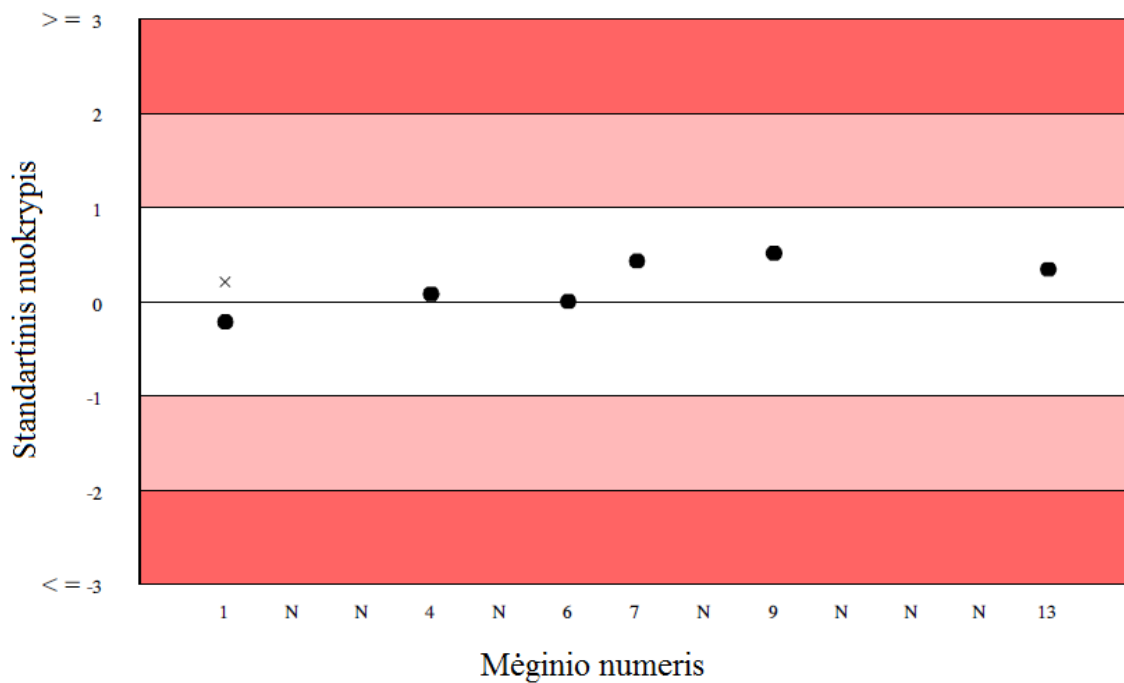


12 pav. Cinko koncentracijos matavimo skirtumų tarp metodų (UV – AAS) pasiskirstymas.

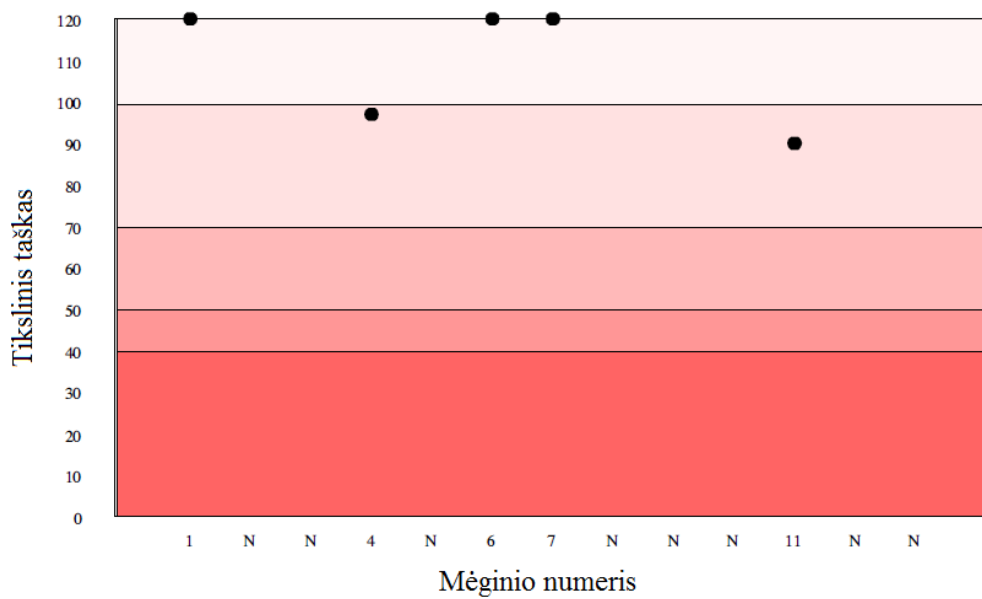
AAS ir UV metodų išorinės RANDOX RIQAS cinko kokybės kontrolės duomenys (klinikinės chemijos programa, 52 ciklas, 2015m. duomenys) pateko į ± 1 SD ribas (13, 14 pav.). Nuokrypiai nuo tikslinio taško buvo nedideli – visi UV metodo rezultatai (15 pav.) pateko į 100 – 120 intervalą (įvertinimas – puiku), AAS metodo (16 pav.) 3 taškai pateko į 100 – 120 intervalą (įvertinimas - puiku), 2 taškai pateko į 70 – 100 intervalą (įvertinimas - gerai). Abiejų metodų biologinė variacija 11%.



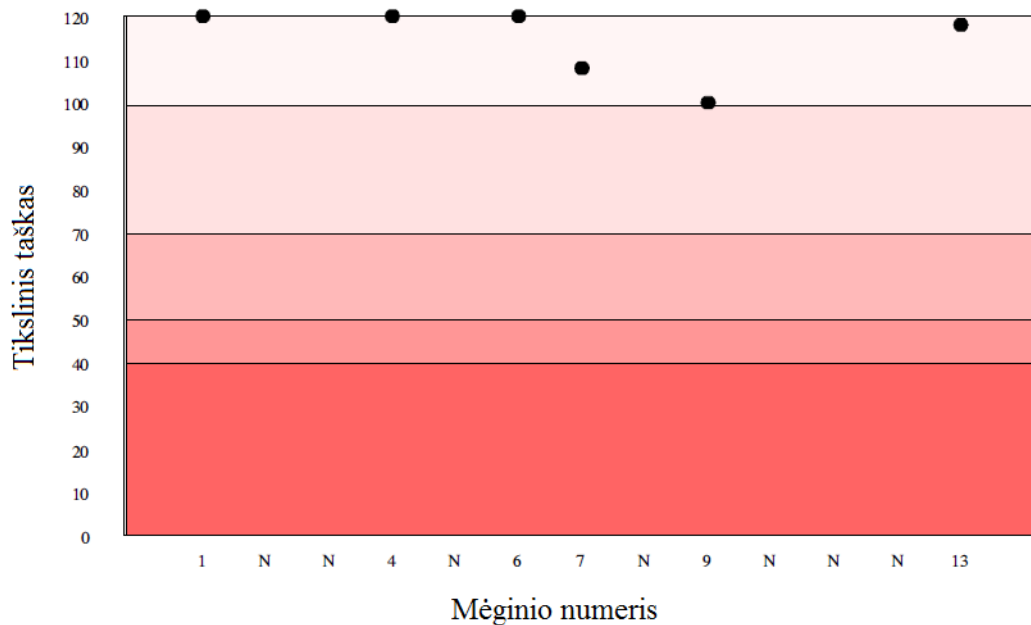
13 pav. AAS metodu gauti cinko išorinės kontrolės rezultatai Levey-Jennings grafike.



14 pav. UV metodu gauti cinko išorinės kontrolės rezultatai Levey-Jennings grafike.



15 pav. AAS metodu gautų cinko išorinės kontrolės rezultatų nuokrypis nuo tikslinio taško (*target score*).



16 pav. UV metodu gautų cinko išorinės kontrolės rezultatų nuokrypis nuo tikslinio taško (*target score*).

Metodai palyginti ir kainos, laiko bei operatoriaus energijos sąnaudų atžvilgiu. Rinkinio, skirto cinko koncentracijos nustatymui kraujo serume kolorimetriniu metodu, naudojant *Agilent 8453* spektrofotometrą kaina ~290 eurų. Šio rinkinio užtenka ~70 mėginių ištyrimui. Tai reiškia, kad vieno mėginio tyrimas kainuoja ~4,14 eurų. Tuo tarpu vieno mėginio tyrimas, naudojant *Agilent 55B AA* spektroskopą (AAS metodas) – apie 0,5 euro. Taigi kainos atžvilgiu, pigesnis yra atominės absorbcinės spektroskopijos metodas.

10 mėginių seriją ištirti *Agilent 8453* spektrofotometru (kolorimetrinis metodas) užtrunka ~2 valandas. Tai reiškia, jog laikas, reikalingas vieno mėginio ištyrimui vidutiniškai yra ~12 minučių. Tuo tarpu ištirti 10 mėginių seriją *Agilent 55B AA* spektroskopu (AAS metodas) užtrunka ~30 minučių. Tai reiškia, jog laikas, reikalingas vieno mėginio ištyrimui vidutiniškai yra ~3 minutės. Taigi laiko atžvilgiu 4 kartus greitesnis yra atominės absorbcinės spektroskopijos metodas.

Vertinant metodų paprastumą operatoriui, žymiai paprastesnis yra AAS metodas. Šiame metode mėginio paruošimą apima tik serumo skiedimas dejonizuotu vandeniu. Tuo tarpu naudojant kolorimetrinį metodą, mėginį, etalono tirpalą bei *blank* tirpalą (dejonizuotą vandenį) reikia deproteinizuoti, centrifuguoti, o po to visus tirpalus maišyti su spalviniu reagentu. Kadangi AAS metode mėginio paruošimas turi žymiai mažiau žingsnių, todėl labai sumažėja operatoriaus klaidos tikimybė.

Visi tyrimo rezultatai pateikiami priede nr. 1.

5. IŠVADOS

1. Įsisavintas atominės absorbcinės spektroskopijos metodas cinko koncentracijai nustatyti žmogaus kraujo serume.
2. Atominės absorbcinės spektroskopijos metodas optimizuotas cinko koncentracijai nustatyti:
 - a. kraujo serumas skiedžimas dejonizuotu vandeniu santykiu 1:10,
 - b. mėginiai atomizuojami oro-acetileno liepsnoje,
 - c. absorbcija matuojama 213,9 nm ilgo šviesos bangomis.
3. Statistinis gautų duomenų apdorojimas (Pearson koreliacija, Passing-Bablok regresija, Bland-Altman grafikas) parodė, kad kaip ir kolorimetrinis metodas, taip ir atominės absorbcinės spektroskopijos metodas yra tinkami cinko koncentracijos nustatymui žmogaus kraujo serume. Koreliacija tarp metodų buvo $r = 0,832588$, regresijos lygtis $y = -4,4536 + 1,107139x$. Atsižvelgiant į kainos, laiko bei operatoriaus energijos sąnaudas, AAS metodas yra optimaliausias, nei kolorimetrinis.

6. SUMMARY

Comparison of Determination of Zinc Concentration in Human Serum by Atomic Absorption Spectroscopy and Spectrophotometry Methods

Background: Zinc plays an important role in homeostasis of human body. It is a cofactor for approximately 300 metalloproteins, such as carbonic anhydrase, pancreatic carboxypeptidase or “zinc fingers”. It is also vital for insulin production and secretion. As it is such a big part of our body’s biochemical pathways, the lack or excess of zinc leads to a wide range of disfunctions. This is why it is so important to detect zinc level in blood specimen correctly. To do so, there are plenty of methods, but in this thesis 2 of them were investigated and compared.

Methods: 108 blood specimens were collected and zinc concentration was measured using atomic absorption spectroscopy and colorimetric method in Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos starting 2015 January and ending 2016 April.

Results: Atomic absorption spectroscopy method was optimized: blood serum has been diluted with deionized water ratio 1:10, samples have been atomized with air-acetylene flame, atomic absorption measured in 213,9 nm wavelength. Results were compared using Passing – Bablok regression and Bland - Altman analysis, it gave the following results: intercept = -4,4636 (95% CI -7,0279 to -2,2227), slope = 1,1071 (95% CI 0,9766 to 1,2611). Both methods showed good correlation $r = 0,83258$ ($p < 0,05$).

In conclusion, both methods are suitable for the accurate determination of zinc in human serum, although regarding price, time consumption and operator’s effort, atomic absorption spectroscopy did overcome the colorimetric method.

Key words: zinc, concentration, atomic absorption spectroscopy, colorimetry, spectrophotometer.

7. PRIEDAS NR. 1

Nr.	Mėg. Nr.	AAS1	AAS2	AAS3	AAS vid.	UV	UV-AAS	SD	U	CV (%)
1	321	11,07931	9,92709	10,93558	10,64733	13	2,352674	0,627869	0,997852	5,896963
2	878	10,39345	10,28528	10,69038	10,45637	14,2	3,743628	0,209753	0,350827	2,005979
3	913	8,124828	7,982609	8,483654	8,19703	15,2	7,00297	0,258208	0,433918	3,150021
4	103	14,09607	15,03891	13,66254	14,26584	17,6	3,334162	0,703714	1,191968	4,932859
5	206	15,24984	16,03106	15,70936	15,66342	20,4	4,73658	0,392632	0,676558	2,506683
6	148	14,84852	15,56109	15,60702	15,33888	17,6	2,26112	0,425281	0,656879	2,772568
7	631	15,94161	16,10792	15,69484	15,91479	20,1	4,185209	0,207843	0,35774	1,305975
8	227	12,14129	12,32079	12,14129	12,20112	15,6	3,398876	0,103635	0,155453	0,849392
9	836	13,81935	13,98713	13,37516	13,72721	17	3,272785	0,316217	0,529979	2,303579
10	461	17,32355	18,27921	17,02742	17,54339	21,2	3,656608	0,654211	1,084081	3,729102
11	139	10,61129	10,75545	10,31516	10,56063	14	3,439368	0,224471	0,381297	2,125545
12	338	19,14968	18,83465	18,55742	18,84725	22,1	3,25275	0,29633	0,512911	1,572271
13	055	15,40373	16,80845	15,34951	15,8539	18,3	2,446102	0,827111	1,263476	5,217084
14	765	12,24	13,03732	12,18058	12,48597	16,6	4,114031	0,478411	0,74196	3,831588
15	029	8,246441	8,673592	9,506796	8,808943	13,3	4,491057	0,640987	1,0915	7,276545
16	621	10,84909	11,32788	11,91589	11,36429	15,8	4,435712	0,534329	0,923873	4,701828
17	626	13,90909	15,10385	14,29907	14,43733	18,4	3,962666	0,609261	1,034688	4,220037
18	970	10,80273	10,73942	11,05794	10,8667	12,7	1,833302	0,168621	0,275847	1,551724
19	504	13,34579	14,15607	11,63258	13,04482	18	4,955182	1,288387	2,185407	9,87662
20	927	13,05981	12,34486	9,569663	11,65811	16,2	4,541888	1,843639	3,022559	15,81421
21	437	11,39159	11,34393	8,996629	10,57738	15,6	5,022619	1,369179	2,074096	12,9444
22	696	14,64139	13,18788	12,89434	13,57454	16,7	3,125464	0,935508	1,512991	6,891638
23	717	10,63907	9,530303	9,526415	9,898597	12,7	2,801403	0,641274	0,96359	6,478432
24	102	11,95629	10,71515	10,00755	10,893	15,2	4,307003	0,98647	1,687662	9,056
25	002	14,79154	15,40515	14,6392	14,9453	18,4	3,454701	0,405465	0,663334	2,712994
26	835	11,87946	12,61856	11,99601	12,16468	15,4	3,235325	0,39737	0,64008	3,266586
27	807	12,66526	13,35464	12,35183	12,79057	18,2	5,409426	0,513017	0,868461	4,010898

28	431	16,94295	16,51815	16,81987	16,76032	19,9	3,139676	0,21857	0,367888	1,304091
29	127	8,112081	7,747452	8,409934	8,089822	11,9	3,810178	0,331801	0,573726	4,101464
30	052	12,73289	11,25573	11,39901	11,79588	14,8	3,004125	0,814631	1,279252	6,906068
31	850	14,14243	15,09041	14,69003	14,64096	17,2	2,559041	0,47589	0,820972	3,250401
32	729	13,63914	13,99007	13,36844	13,66588	17,6	3,934116	0,311676	0,538347	2,28069
33	930	11,1227	11,5274	11,6402	11,4301	15,4	3,969902	0,272126	0,44817	2,380782
34	919	13,30828	13,005	12,21193	12,84174	17,7	4,858263	0,566119	0,949473	4,408432
35	914	13,48935	12,71813	12,35229	12,85326	16,8	3,946744	0,580447	0,984719	4,515956
36	014	13,26302	12,43125	11,79083	12,49503	17	4,504969	0,738166	1,274956	5,907673
37	790	11,39648	9,573684	9,700288	10,22348	12,4	2,176516	1,017815	1,578588	9,955658
38	930	10,54399	10,64737	10,27349	10,48828	14,9	4,411719	0,193065	0,323791	1,840773
39	096	13,50528	13,24211	13,27176	13,33971	17,4	4,060286	0,144148	0,227915	1,080591
40	713	12,18017	12,32006	12,83947	12,44657	15,8	3,353434	0,347382	0,570976	2,790988
41	020	11,02626	11,03023	11,00526	11,02058	15,2	4,179416	0,013417	0,021624	0,12174
42	008	14,01788	14,27703	14,09211	14,12901	17,2	3,070994	0,133461	0,224437	0,944591
43	027	10,69646	11,475	11,12727	11,09958	14	2,900422	0,390008	0,674235	3,51372
44	102	15,11947	15,11341	15,38693	15,20661	17,8	2,593395	0,156197	0,236873	1,027164
45	854	12,86283	12,87439	12,95284	12,89669	18,2	5,303312	0,048972	0,07795	0,379728
46	752	13,88839	14,36053	14,78374	14,34422	18,9	4,555779	0,447897	0,775395	3,122494
47	292	13,84286	13,55526	13,98589	13,79467	17	3,20533	0,21932	0,372933	1,58989
48	993	10,8375	10,46842	10,46595	10,59062	12,2	1,609376	0,213804	0,321771	2,018809
49	908	16,21703	14,30649	14,33802	14,95385	16,6	1,646149	1,094063	1,654577	7,316263
50	913	13,70726	9,736364	10,49012	11,31125	13,2	1,888754	2,108953	3,438893	18,64474
51	200	15,58959	11,32597	11,40629	12,77395	14,6	1,82605	2,438746	3,6924	19,09156
52	963	12,08378	12,20357	13,31239	12,53325	17,2	4,666753	0,677408	1,064001	5,404884
53	053	11,25676	10,92857	11,23233	11,13922	14,5	3,360782	0,182834	0,284217	1,641353
54	210	16,12703	16,11964	16,27069	16,17245	18,8	2,627545	0,085158	0,130815	0,526564
55	990	9,613274	9,891843	9,72567	9,752559	13,8	4,047441	0,140147	0,241247	1,437025
56	038	9,838938	9,33716	9,42789	9,588049	17,4	7,811951	0,267387	0,434552	2,788749
57	031	11,82478	12,24924	11,95642	12,03701	15,1	3,062988	0,217274	0,367598	1,805047

58	362	17,25319	16,51144	16,90583	16,89015	19,1	2,209847	0,371126	0,642378	2,19729
59	015	14,3234	13,95396	13,9172	14,06485	18,2	4,135145	0,224663	0,351782	1,597339
60	346	7,966864	7,695536	8,01	7,8908	9,4	1,5092	0,170474	0,272334	2,16041
61	629	16,25059	15,48214	15,615	15,78258	18	2,217422	0,410719	0,665496	2,602358
62	628	14,21361	14,07054	13,77	14,01805	14,8	0,781952	0,226415	0,384177	1,615164
63	867	14,03254	14,34375	14,49	14,28876	17,5	3,211235	0,233632	0,396168	1,635075
64	045	17,83491	17,57679	16,83	17,4139	19,2	1,786101	0,521882	0,870279	2,996927
65	010	15,1642	14,93571	14,31	14,80331	17,7	2,896695	0,442226	0,73976	2,987348
66	297	15,1642	13,79732	13,41	14,12384	15,8	1,676159	0,921557	1,519183	6,52483
67	019	23,53846	24,27054	23,58	23,79633	26,2	2,403668	0,411197	0,633995	1,727985
68	854	17,88018	16,62054	15,885	16,79524	20,8	4,004762	1,008996	1,727874	6,007634
69	887	12,85851	12,04974	12,50026	12,4695	14	1,530497	0,405261	0,700415	3,250017
70	880	15,25931	15,41891	14,98454	15,22092	18,1	2,879081	0,219718	0,376181	1,443525
71	966	19,36915	14,78472	14,19588	16,11658	17,2	1,08342	2,832152	4,480186	17,57291
72	048	10,79154	8,821622	7,978528	9,197228	9,5	0,302772	1,443629	2,436137	15,69635
73	926	17,65016	15,66757	14,45521	15,92431	17,1	1,175687	1,612871	2,766901	10,12835
74	840	13,42947	13,46216	13,32883	13,40682	15,2	1,793179	0,069489	0,115465	0,51831
75	053	14,54132	12,53256	12,60237	13,22542	14,4	1,174584	1,140142	1,739641	8,620844
76	005	15,63719	13,24419	12,60237	13,82791	15,1	1,272085	1,599403	2,628233	11,56648
77	067	13,49741	16,52188	11,19393	13,73774	14	0,26226	2,67209	4,614136	19,45073
78	070	17,93793	21,25	15,20224	18,13006	19	0,869944	3,028456	5,237517	16,70406
79	934	13,84914	16,46875	11,87827	14,06539	14,3	0,234612	2,302865	3,975468	16,37257
80	939	14,31743	15,35258	12,18984	13,95328	14,4	0,446718	1,612509	2,739014	11,55649
81	519	19,41743	20,45258	15,95213	18,60738	17,4	-1,20738	2,357041	3,897501	12,66724
82	561	19,08991	18,82268	14,44721	17,45327	18,4	0,946733	2,606746	4,020692	14,93558
83	050	13,62073	14,56894	10,62637	12,93868	14,6	1,66132	2,05788	3,41437	15,90487
84	917	5,690854	7,884983	4,821222	6,132353	7,5	1,367647	1,578876	2,653295	25,74666
85	939	16,04634	18,43311	15,39839	16,62595	18,6	1,974053	1,598227	2,628139	9,612845
86	755	14,81274	18,12544	15,98875	16,30897	18	1,691027	1,679404	2,868879	10,29743
87	733	14,71529	17,80557	15,79196	16,10427	17,2	1,095726	1,568638	2,676268	9,740507

88	994	11,88917	14,92683	12,7418	13,18593	14	0,814066	1,566774	2,630688	11,88216
89	086	8,666772	10,26777	10,4388	9,791114	10,8	1,008886	0,977456	1,534618	9,983095
90	800	16,26835	17,94319	18,47258	17,56137	18,3	0,738627	1,150646	1,908911	6,552139
91	555	10,6519	12,91096	13,04849	12,20379	12,5	0,296214	1,345732	2,075513	11,02717
92	741	17,19223	17,14655	16,15431	16,83103	16,1	-0,73103	0,586498	0,898858	3,484624
93	758	15,40813	14,45586	14,29036	14,71811	13,7	-1,01811	0,603271	0,968019	4,098833
94	182	18,38163	17,7269	17,50051	17,86968	17,9	0,030323	0,457583	0,76307	2,560665
95	213	18,13333	22,61506	21,59362	20,78067	20,7	-0,08067	2,348858	3,88129	11,30309
96	961	20,14242	24,54431	24,03511	22,90728	23,3	0,39272	2,407933	3,812143	10,51165
97	217	14,93939	18,75657	14,8117	16,16922	17,4	1,230779	2,241617	3,416354	13,86348
98	589	9,487987	8,26875	11,54717	9,767969	12,4	2,632031	1,657046	2,839195	16,96408
99	586	13,46201	11,30625	17,84038	14,20288	16,8	2,59712	3,32947	5,65872	23,44221
100	671	19,36598	20,17582	20,97	20,1706	19,1	-1,0706	0,802023	1,389123	3,976198
101	546	15,24742	15,48583	16,2	15,64442	14,1	-1,54442	0,495695	0,824956	3,16851
102	411	22,32095	21,91512	24,07958	22,77188	26,6	3,828117	1,15053	1,874474	5,052416
103	538	18,07937	19,42857	17,40476	18,30423	17,7	-0,60423	1,030473	1,75267	5,6297
104	977	24,25775	14,36492	13,55182	17,3915	16,9	-0,4915	5,960232	9,271611	34,27095
105	898	17	14,45509	14,86228	15,43912	12,9	-2,53912	1,367006	2,203957	8,85417
106	044	18,68549	15,57124	16,37492	16,87722	16,2	-0,67722	1,616745	2,697018	9,579451
107	457	19,26064	19,73478	19,90645	19,63396	22,4	2,766042	0,334504	0,559291	1,703702
108	699	15,74029	15,3	15,77647	15,60559	18,5	2,894414	0,265263	0,412636	1,699795

8. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Wolfgang M. Zinc Biochemistry: From a Single Zinc Enzyme to a Key Element of Life. *Advances in Nutrition. An International Review Journal* 2012.
2. Vallee B. L. A synopsis of zinc biology and pathology in zinc enzymes. (Bertini, I. & Gary, H. B., eds.) Birkhauser, Boston, 1986.
3. McPherson RA, Pincus MR. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. 427 p.
4. Keilin D, Mann T. Carbonic anhydrase. *Nature* 1939; 144: 442–3.
5. Vallee BL, Neurath H. Carboxypeptidase, a zinc metalloprotein. *J Am Chem Soc.* 1954; 76: 5006–7.
6. Vallee BL, Galdes A. The metallobiochemistry of zinc enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1984; 56: 283–430.
7. Miller J, McLachlan AD, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 1985; 4: 1609–14.
8. Krishna S. Sri, Majumdar I. and Grishin N. V. Structural Classification of Zinc Fingers. 532-550 *Nucleic Acids Research* 2003; Vol. 31, No. 2.
9. Lonnerdal B. Dietary Factors Influencing Zinc Absorption. *The Journal of Nutrition* 2000.
10. National Institute of Health, U.S. Department of Human Services. Zinc. Fact Sheet for Consumers. Interneto prieiga: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-Consumer/>
11. Hambidge KM. Zinc. In: Trace elements in human and animal nutrition. Mertz W. Orlando, Florida: Academic Press, Inc.; 1987. ed. 5th; Vol. 1., p.1-137.
12. Roohani N, Hurrell R, Kelishadi R, Schulin R. Zinc and its importance for human health: An integrative review. *J Res Med Sci.* 2013; 18(2): 144–157.
13. Sian L, Mingyan X, Miller L V, Krebs N F, Tong L, Hambidge K M. Zinc absorption and intestinal losses of endogenous zinc in young Chinese women with a marginal zinc intake. *Am. J. Clin. Nutr.* 1996; 63: 348–353.
14. McPherson RA, Pincus MR. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. 428 p.

15. Hambidge KM, Walravens PA. Disorders of mineral metabolism. Clin Gastroenterol. 1982; 11: 87–117.
16. Van Wouwe JP. Clinical and laboratory diagnosis of acrodermatitis enteropathica. Eur J Pediatr. 1989; 149: 2–8.
17. Brown KH, Peerson JM, Rivera J, Allen LH. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: A meta-analysis of randomized controlled trials. Am J Clin Nutr. 2002; 75: 1062–71.
18. Brown KH, Rivera JA, Bhutta Z, Gibson RS, King JC, et al. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. Food Nutr Bull. 2004; 25: S99–203.
19. Ghishan FK. Transport of electrolytes, water, and glucose in zinc deficiency. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1984; 3: 608–12.
20. Bhutta ZA, Black RE, Brown KH, Gardner JM, Gore S, Hidayat A, et al. Prevention of diarrhea and pneumonia by zinc supplementation in children in developing countries: Pooled analysis of randomized controlled trials. Zinc Investigators' Collaborative Group. J Pediatr. 1999; 135: 689–97.
21. Veenemans J, Milligan P, Prentice AM, Schouten LR, Inja N, van der Heijden AC, et al. Effect of supplementation with zinc and other micronutrients on malaria in Tanzanian children: A randomised trial. PLoS Med. 2011; 8: e1001125.
22. McPherson RA, Pincus MR. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. 429 p.
23. Allen D, Cooksey C, Tsai B. Spectrophotometry. Interneto prieiga: <http://www.nist.gov/pml/div685/grp03/spectrophotometry.cfm>
24. Mickevičius D. Cheminės analizės metodai, I dalis. Vilnius: Žiburio leidykla; 1998. 408p.

25. Daunoravičius Ž. Cinkas žmogaus organizme, jo reikšmė ir nustatymo metodai. *Laboratorinė medicina* 2015; t. 17, Nr. 3, p. 130-136.
26. Tazul Islam M, Jamaluddin Ahmed M. A Simple Spectrophotometric Method for the Trace Determination of Zinc in Some Real, Environmental, Biological, Pharmaceutical, Milk and Soil Samples Using 5,7- Dibromo-8-hydroxyquinoline. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 2013; Vol. 14, No. 1: 01 – 15.
27. Tetsuo M, Saito M, Horiguchi D, Kina K. A highly sensitive colorimetric determination of serum zinc using water-soluble pyridylazo dye. *Clinica Chimica Acta* 1982; 120: 127.
28. Johnson JD, Djuh Y, Bruton J, and Williams LH. Improved Colorimetric Determination of Serum Zinc. *Clin. Chem.* 1977; 23(7): 1321-1323.
29. Barman B, Barua S. Spectrophotometric determination of zinc in blood serum of diabetic patients using bis-[2,6-(2'-hydroxy-4'-sulpho-1'-naphthylazo)]pyridine disodium salt. *Archives of Applied Science Research* 2009; 1(1): 74-83.
30. Sabel EC, Neureuther MJ, Siemann S. A spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Analytical Biochemistry* 2010; 397: 218–226.
31. Welz B, Sperling M. *Atomic absorption Spectrometry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 1999.
32. The Royal Society of Chemistry Fine Chemicals and Medicinals Group. Atomic absorption spectrometry. Interneto prieiga:
<http://www.liskeard.cornwall.sch.uk/images/Liskeard-Sixth-Form/Atomic-Absorption-Spectrometry.pdf>
33. Broekaert JAC. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*, 3rd Edition. Weinheim, Germany: Wiley-VCH; 1998.
34. Perkin-Elmer. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy*. United States of America: The Perkin Elmer Corporation. 1996. 3-28p.
35. L'vov BV. Fifty years of atomic absorption spectrometry. *J. Anal. Chem* 2005; 60: 382–392.

36. Fuwa K, Pulido P, McKay R, Vallee, B L. Determination of zinc in biological materials by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Chem.* 1964; 36, 2407.
37. Prasad AS, Oberleas D, Halsted JA. Determination of zinc in biological fluids by atomic absorption spectrophotometry in normal and cirrhotic subjects. *J. Lab. Clin. Med.* 1965; 66, 508.
38. Sunderman FW Jr. Atomic absorption spectrometry of trace metals in clinical pathology. *Hum. Pathol.* 1973; 4, 549.
39. Dawson JB, Walker BE. Direct determination of zinc in whole blood, plasma and urine by atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta* 1969; 26, 465.
40. Momcilovic B, Belonje B, Shah BG. Effect of the matrix of the standard on results of atomic absorption spectrophotometry of zinc in serum. *Clin. Chem.* 1975; 21, 588.
41. Kurz D, Roach J, Eyring EJ. Direct determination of serum zinc and copper by atomic absorption spectrophotometry. *Biochem. Med.* 1972; 6, 274.
43. Hackley BM, Smith JC, Haisted JA. A simplified method for plasma zinc determination by atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem.* 1968; 14, 1.
44. Smith JC Jr. Direct Measurement of Zinc in Plasma by Atomic Absorption Spectroscopy. *Clin. Chem.* 1979; 25/8, 1487-1491.
45. Sprague S, Slavin W. Determination of iron, copper, and zinc in blood serum by an atomic absorption method requiring only dilution. *At. Absorp. Newslett.* 1965; 4, 228-233.
46. Hackley BM, Smith JC Jr, Haisted JA. A simplified method for plasma zinc determination by atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chem.* 1968; 14, 1-5.
47. Reinhold JG, Pascoe E, Kfoury GA. Capillary diameter and rate of aspiration as factors affecting the accuracy of zinc analysis in serum by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Biochem.* 1968; 25, 557-564.
48. Momcilovic B, Belonje B, Shah BG. Effect of matrix of the standard on results of atomic absorption spectrophotometry of zinc in serum. *Clin. Chem.* 1975; 21, 588-590.
49. Kelso RJ, Shamberger JR. Methods Compared for Determining Zinc in Serum by Flame Atomic Absorption Spectroscopy. *Clin. Chem.* 1978; 24/2, 240-244.

50. Reinhold JG, Pascoe E, Kfoury GA. Capillary diameter and rate of aspiration as factors affecting the accuracy of zinc analysis in serum by atomic absorption spectrophotometry. *Anal. Biochem.* 1968; 25, 557.
51. Ata S, Wattoo FH, Ahmed M, Sarwar Wattoo MH, Tirmiz SA, Wadood A. A method optimization study for atomic absorption spectrophotometric determination of total zinc in insulin using direct aspiration technique. *Alexandria Journal of Medicine* 2015; 51, 19–23.
52. Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, Paoli TD, et al. Zinc as an essential micronutrient. *Nutr Res* 2000; 20: 737–55.
53. Tanase IG, Popescu IL, Pana A. An analytical method validation for atomic absorption spectrometry analysis of total zinc from insulin. *Analele Universita Nii din Bucuresti – Chimie, Anul XV (serie noua)* 2006; 1: 45–50.
54. McPherson RA, Pincus MR. HENRY'S Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.
55. Atomic Emission and Atomic Fluorescence Emission Spectrophotometric Techniques. Interneto prieiga:
<http://www.philadelphictometrya.edu.jo/academics/ajaber/uploads/CHEM%20540-061-Atomic%20Emission%20Spectrophotometry.pdf>
56. Elemental Impurities – Procedures. Prieiga per internetą:
http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/c233_final.pdf .
57. Wolf RE, USGS/CR/CICT 2005. Prieiga per internetą:
http://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/What_is_ICPMS.pdf .
58. Kobayashi K, Katsuya Y, Abdulah R, Koyama H. Rapid and direct determination of selenium, copper, and zinc in blood plasma by flow injection-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Biological Trace Element Research* 2007; 115: 87 .
59. Vanhoe H, Vandecasteele C, Versieck J, Dams R. Determination of iron, cobalt, copper, zinc, rubidium, molybdenum, and cesium in human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 1989; 61: 1851.

60. Bazilio A, Weinrich J. The Easy Guide to: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS); 2012. Prieiga per internetą:
<http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/ICPMS/ICPMS%20quick%20guide.pdf>
61. Stefánsson A, Gunnarsson I, Giroud N. New methods for the direct determination of dissolved inorganic, organic and total carbon in natural waters by Reagent-Free Ion Chromatography and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2007; 582 (1): 69–74.
62. Ebdon L, Foulkes M, Sutton K. *Anal. At. Spectrom.* 1997; 12: 213.
63. Sharp BL, O'Connor C, in: S.J. Hill (Ed.). *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Oxford: Blackwell Publishing; 2007.
64. Sturgeon RE, Berman SS, Willie SN, Desaulniers JAH. *Analytical Chemistry* 1981; 53: 2337.
65. Herber RFM, Pieters HJ, Elgersma JW. A Comparison of Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry and Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry in the Determination of Copper and Zinc in Serum. *Fresenius Z Anal Chem* 1982; 313:103-107.
66. Giddings, JC. *Chromatography*. Prieiga per internetą:
<http://www.britannica.com/science/chromatography>
67. Sasnauskienė S, Firantienė R, Jablonskienė V. *Chromatografijos metodai ir jos taikymas. Laboratorinė medicina* 2012; t. 14, Nr. 1(53), 33–39 p.
68. Lane E, Holden AJ, Coward RA. Determination of copper and zinc in blood plasma by ion chromatography using a cobalt internal standard. *Analyst* 1999; 124, 245-249.
69. Ma E, Jiang Z. Ion-exchange chromatography (IC) in the determination of serum transition metals and its clinical application. *Chin Med Sci J.* 1992; 7(2): 98-100.

70. Determination of Transition Metals in Serum and Whole Blood by Ion Chromatography. Application Note 108. Prieiga per internetą:
http://www.dionex.com/en-us/webdocs/4201-AN108_LPN0692-01.pdf