

Ćwiczenie U3

**Analiza materiału biologicznego –
jednoczesne oznaczanie selenu i arsenu
metodą atomowej spektrometrii fluorescencyjnej**

Prowadzący: dr Renata Wietecha-Posłuszny

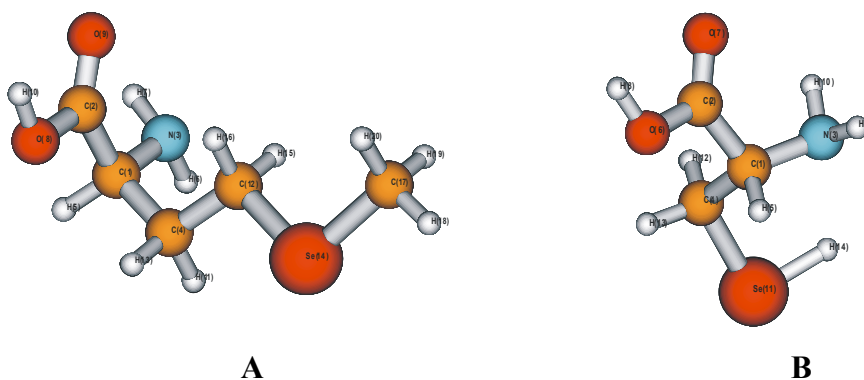
Wstęp

Prowadzone przez wiele lat, badania i obserwacje niejednokrotnie udowodniły znaczący wpływ pierwiastków na organizmy żywe. W zależności od roli, jaką pełnią wyróżniono trzy podstawowe grupy (wg. *The Food and Nutritional Board of The National Academy of Sciences USA*): makro- i mikroelementy oraz pierwiastki silnie toksyczne.

Pozytywny jak i szkodliwy wpływ składników mineralnych zależy przede wszystkim od stężenia danego pierwiastka oraz czasu jego działania. Fizjologiczna i terapeutyczna funkcja makro- i mikroelementów polega głównie na aktywowaniu procesów biochemicznych i wspomaganiu działalności enzymów. Niektóre spośród składników mineralnych (m.in. cynk, selen) pod postacią koenzymów lub jonów metali odgrywają bardzo istotną funkcję w układzie immunologicznym, chroniąc nasz organizm przed działaniem bakterii, wirusów, wolnych rodników.

Do wspomnianej grupy niewątpliwie należy selen – pierwiastek posiadający tzw. „dwa oblicza”. Prawdopodobnie żaden ze znanych pierwiastków nie był tematem tylu kontrowersyjnych opinii. Od początku lat trzydziestych do połowy lat 50 pierwiastek ten uważano za toksyczny i rakotwórczy! Późniejsze badania wykazały, że choć w odróżnieniu od innych mikroelementów selen charakteryzuje się niewielką rozpiętością między dawką terapeutyczną a toksyczną, jest on pierwiastkiem niezbędnym i bardzo istotnym do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Pula selenu, jaką dysponują organizmy żywe zawarta jest głównie w związkach organicznych, które nie wykazują toksyczności, a co ważniejsze spełniają ważne funkcje biologiczne. Większość biologicznie aktywnego selenu występuje w postaci dwóch bardzo ważnych selenoaminokwasów – selenometioniny i selenocysteiny rys 1.

Podobną historię posiada arsen. Związki arsenu, znane od starożytności, były głównie narzędziem spiskowców i przyczyną śmiertelnych zatruc wielu dostojników, przywódców państw i organizacji. Jednak rozszerzone badania biochemiczne w zakresie toksykologii arsenu ujawniły drugą stronę tego pierwiastka, pozwalając na stwierdzenie, że np. niektóre jego formy (arseniany(III)- AsO_2^-) w niewielkich, ściśle kontrolowanych ilościach pobudzają szpik kostny do produkcji czerwonych ciałek krwi zapobiegając anemii.



Rys. 1. Modele strukturalne aminokwasów: selenometioniny (A) i selenocysteiny (B).

Jak widać w świetle obecnych przeobrażeń współczesnej toksykologii w znacznym stopniu zmienia się spojrzenie na charakter zagrożeń i korzyści związanych z powszechnym wykorzystaniem takich pierwiastków jak selen i arsen lub ich związków chemicznych. Dawne problemy zatruc rozmyślnych, indywidualnych np. arsenem, pomimo nadal znaczącej ich liczby, tracą obecnie swoje zasadnicze znaczenie.

Najczęściej przyczynami współczesnych zatruc są: narażenie zawodowe na stanowiskach pracy w przemyśle i rolnictwie, chemizacja lecznictwa oraz gospodarstwa domowego, stąd problemem współczesnej toksykologii stają się również tzw. zatrucia przewlekłe. Charakteryzują się one podstępny, długotrwały, niezamierzony oddziaływaniem małych dawek pierwiastków lub związków chemicznych na duże populacje ludzkie.

Do badań pod kątem oznaczania pierwiastków śladowych stosuje się różne materiały biologiczne - najczęściej należą do nich płyny ustrojowe - krew, mocz, płyn z gałki ocznej oraz wycinki narządów wewnętrznych, które zostały pobrane podczas sekcji zwłok lub biopsji. W szczególnych sytuacjach, zwłaszcza w przypadkach podejrzenia o długotrwałe podawanie trucizny lub narażenie na nią, do analizy wykorzystuje się próbki włosów lub paznokci. Badany materiał poddaje się procesowi mineralizacji w celu zniszczenia matrycy organicznej i przeprowadzenie interesujących nas analiz w postaci jonowej.

Najczęściej w badaniach toksykologicznych dotyczących oznaczania śladowych metali w materiałach biologicznych wykorzystuje się techniki instrumentalne zapewniające bardzo dużą czułość, wysoką precyzję oraz szeroki zakres liniowości. Z całą pewnością do takich technik należy zaliczyć atomową spektrometrię fluorescencyjną połączoną z generacją wodoroków (HG-AFS). Technika HG-AFS jest stosunkowo nową techniką, ale już

powszechnie stosowaną w badaniach obejmujących oznaczanie śladowych ilości metali w różnorodnych próbkach z bardzo dużą czułością, niskim poziomem szumów umożliwiając przez to osiągnięcie granic wykrywalności na poziomie 0,1 ppt.

ATOMOWA SPEKTROMETRIA FLUORESCENCYJNA

1. Podstawy metody

Atomowa spektrometria fluorescencyjna jest metodą analizy ilościowej opartej na pomiarze natężenia promieniowania emitowanego (fluorescencji) przez wolne atomy danego pierwiastka.

Natężenie promieniowania fluorescencyjnego I_f jest funkcją wielu zmiennych, obejmujących wybrane właściwości atomów, parametry aparaturowe, a także warunki panujące podczas wzbudzania i rejestracji. Do celów analitycznych można stosować wzór:

$$I_f = \Phi I_0 KLN \quad (1)$$

gdzie: K jest wartością stałą, Φ – wydajnością kwantową procesu fluorescencji, I_0 – intensywnością promieniowania źródła światła, L – długością drogi optycznej, N – liczbą atomów w stanie podstawowym w jednostce długości, drogi optycznej.

Stąd I_f jest liniową funkcją stężenia pierwiastka w analizowanym roztworze (c)

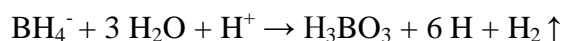
$$I_f = f(c) \quad (2)$$

Powyższe równanie jest w praktyce spełnione w szerokim zakresie niskich stężeń obejmującym kilka rzędów wielkości.

W metodzie atomowej spektrometrii fluorescencyjnej do atomizacji, podobnie jak w AAS najczęściej stosuje się technikę generacji lotnych wodorków. Jako pierwszy technikę generowania wodorków zaproponował Holak (1969), który w celu oznaczania arsenu wykorzystał klasyczną metodę Marsha do generowania arsenowodoru w połączeniu z atomową spektrometrią absorpcyjną. To innowacyjne rozwiązanie pozwoliło na znaczne obniżenie granicy wykrywalności oraz na wyeliminowanie wielu interferencji.

W odpowiednich warunkach pierwiastki takie jak: As, Se, Sb, Bi, Pb, Ge, Te, Sn reagują z wodorem *in statu nascendi*, powstającym w wyniku reakcji reduktora (np. NaBH₄, Zn/H⁺, Al/H⁺, SnCl₂) z kwasem, w wyniku czego dochodzi do redukcji jonów (Me^{m+}) i tworzenia w temperaturze pokojowej lotnych wodorków tj. AsH₃, H₂Se, SbH₃, BiH₃, PbH₄, GeH₄, H₂Te, SnH₄.

Reakcja tworzenia lotnych wodorków z zastosowaniem tetrahydroboranu sodu (NaBH₄) jako reduktora, zwykle zachodzi w specjalnym naczyniu tzw. reakcyjnym i przebiega zgodnie z równaniami:



gdzie Me jest badanym analitem.

Gazowe produkty reakcji, po oddzieleniu od mieszaniny poreakcyjnej, są przenoszone za pomocą obojętnego gazu nośnego (argonu, rzadziej helu) do atomizera spektrometru atomowej fluorescencji.

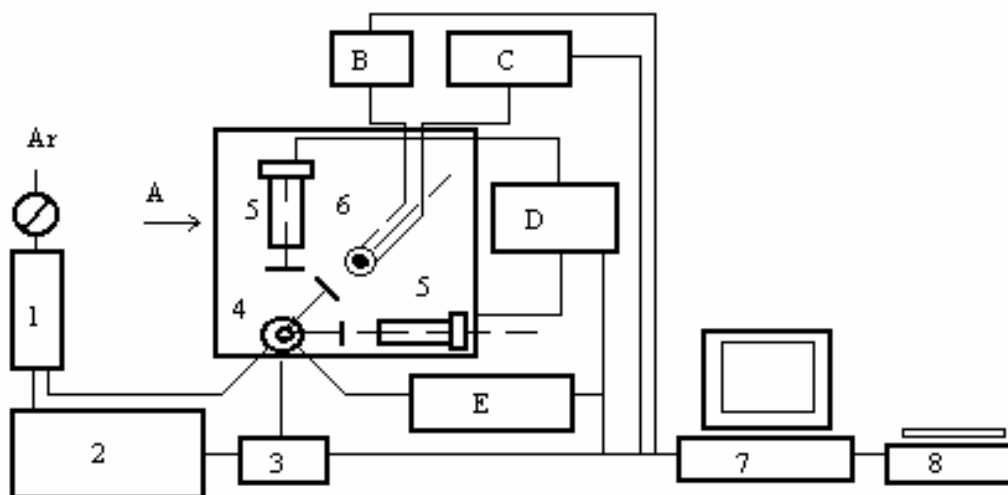
O wydajności generowania wodorków decydują: stopień utlenienia oznaczanego pierwiastka w roztworze (pierwiastki znajdujące się na najniższych stopniach utlenienia tworzą wodorki z największą wydajnością), stężenie i rodzaj reduktora, stężenie i rodzaj kwasu, rodzaj i konstrukcja reaktora oraz materiału, z którego zostały wykonane poszczególne części układu.

2. Budowa spektrometru

Rozwiązania konstrukcyjne w spektrometrii AFS są realizowane głównie na dwa sposoby. Należą do nich: system z dyspersją promieniowania fluorescencyjnego, wyposażonego w monochromator pomiędzy atomizerem a detektorem oraz system bezdyspersyjny (NDAFS) wprowadzony po raz pierwszy w 1974 roku przez Tsujii i Kuga.

W praktyce najczęściej stosuje się układ bezdyspersyjny gdzie umieszczono bardzo prosty układ optyczny, zapewniający maksymalną jasność i wykorzystanie całego sygnału promieniowania charakterystycznego, czego wynikiem z kolei jest stosunkowo duży stosunek sygnału do szumu.

Zasadniczymi elementami spektrometru fluorescencji atomowej są: specyficzne źródło promieniowania wzbudzającego, atomizer, detektor oraz rejestrator danych. Szczegółowy schemat spektrometru AFS na przykładzie innowacyjnego modelu AFS 230 firmy Beijing Haiguang Instrumental Company (Chiny), wraz z opisem układu poszczególnych części przedstawiono poniżej na rysunku 2.

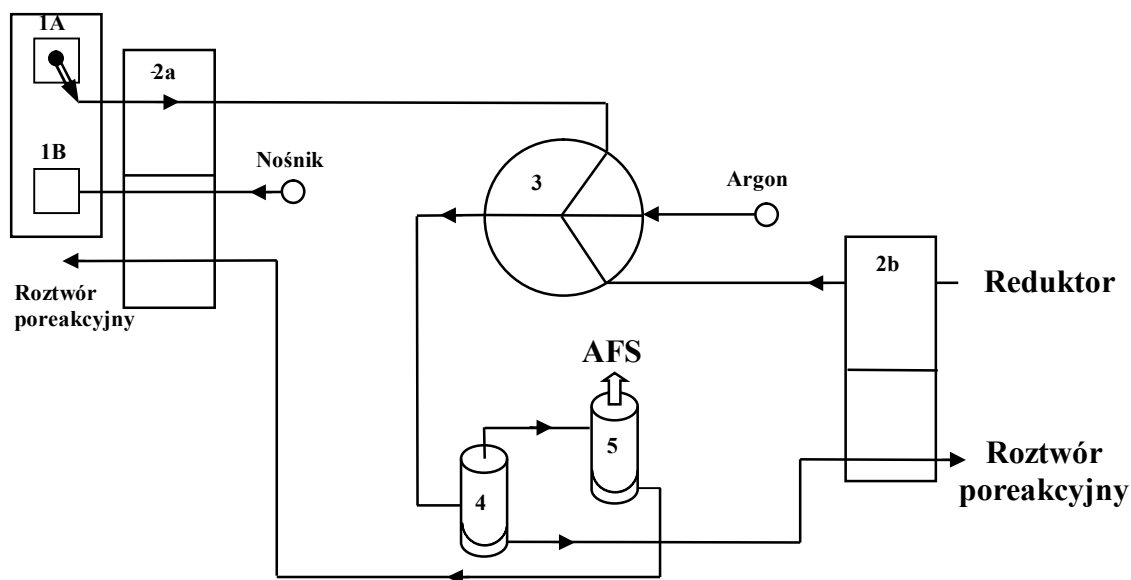


Rys. 2. Schemat aparatu AFS-230, firmy Beijing Haiguang Instrumental Company (Chiny), (1- przepływowy układ gazu, 2- autosampler, 3- układ generacji wodorków, 4- kwarcowy atomizer elektrochemiczny, 5- źródło promieniowania - lampa z katodą wnątkową (HCL), 6- fotopowielacz, 7- komputer, 8- drukarka, A- układ optyczny, B- wzmacniacz, C- układ wysokiego napięcia, D- zasilanie, E- zapalenie pieca).

W przedstawionym zestawie AFS-230 podajnik próbek, system z przerywanym przepływem i bezdyspersyjny spektrometr stanowią oddzielne moduły. W tym przypadku podajnik próbek nie tylko pełni rolę urządzenia umożliwiającego automatyzację oznaczeń lecz zasadniczo realizuje on techniką przepływową specjalny program tworzenia segmentów wzorcowych (próbki) – nośnik w metodzie generacji wodorków.

Na rysunku 3. w sposób schematyczny przedstawiono charakterystyczny dla tego modelu system z przerywanym przepływem (*ang. Intermittent Flow System*). System składa się z dwóch pomp perystaltycznych, naczynia reakcyjnego, dwóch separatorów gaz-ciecz oraz przewodów łączących. Dodatkowo przez spektrometr do systemu równocześnie doprowadzany jest argon, pełniący rolę gazu nośnego i osłonowego, z drugiej strony przez

automatyczny podajnik podawane są roztwory próbek lub wzorców na przemian z nośnikiem (w czasie zmiany pozycji podajnika próbek pompy są zatrzymywane). Szybkość pracy pomp, czas tworzenia segmentów oraz przerwy w pracy pomp są programowane i sterowane automatycznie. Powstający w układzie roztwór poreakcyjny również jest usuwany automatycznie przez pompy natomiast utworzone w reaktorze wodorki są przenoszone za pomocą argonu przez układ separacji gaz-ciecz do atomizera.



Rys. 3. Schemat układu (AFS-230) z przerywanym przepływem do generacji wodorków. 1– podajnik próbek segmentujący próbki nośnikiem, 1A– próbki, 1B– zbiornik nośnika, 2a, 2b– pompy perystaltyczne, 3– reaktor, 4, 5- separatory gaz-ciecz.

Atomizer składa się z dwóch współosiowych rurek, wykonanych z kwarcu. Wewnętrzną rurką dopływa mieszanina wodorków, argonu i wodoru z separatora, a zewnętrzną gaz osłonowy – argon. U wylotu rurki zewnętrznej umieszczona jest spirala elektryczna inicjująca proces atomizacji. Atomizer wraz z całym, symetrycznie zaprojektowanym układem optycznym umieszczony jest w światłoszczelnej komorze.

Źródłem promieniowania wzbudzającego są specjalnie skonstruowane lampy z katodą wnękową o zmienionej geometrii w porównaniu z klasyczną lampą HCL. Dzięki przejściu wiązki promieniowania przez dodatkową soczewkę o krótkiej ogniskowej jest ona skupiana na atomizerze. Lampy pracują impulsowo, a prąd zasilania w impulsie może osiągnąć maksymalną wartość do 150 mA. Oznaczenia jednopierwiastkowe można wykonywać w dwóch opcjach: z wykorzystaniem jednej lampy danego pierwiastka lub w przypadku bardzo

niskich stężeń z zastosowaniem dwóch takich samych lamp. Spektrometr umożliwia również analizę dwóch, różnych pierwiastków jednocześnie, poprzez umieszczenie lamp charakterystycznych dla danych pierwiastków w obu kanałach. W takim przypadku, impulsy obu lamp pojawiają się naprzemiennie w odpowiednich odstępach czasowych (1,5 ms), natomiast czas trwania pojedynczego impulsu wynosi 0,1 ms. Układ elektroniczny zasilania lamp rozpoznaje poszczególne impulsy i przesyła do fotopowielacza, gdzie sygnały ulegają wzmocnieniu a następnie zostają zmierzone i zarejestrowane. Dodatkowo cały układ jest wyposażony w system pochłaniająco - rozpraszający niezaabsorbowane promieniowanie. Układ detekcyjny stanowi fotopowielacz typu „solar blind”, który w sposób naturalny eliminuje część potencjalnych interferencji spektralnych.

Z analizy danych literaturowych wynika, że dziś atomowa spektrometria fluorescencyjna zwłaszcza w połączeniu z techniką generacji wodorków jest bardzo dobrym uzupełnieniem takich technik jak: AAS i AES. Szczególnie w przypadku oznaczeń dotyczących pierwiastków tworzących lotne wodorki (Se, As, Pb i innych) lub w przypadku oznaczania śladowych ilości rtęci. Ponadto z pewnością jest metodą konkurencyjną do wspomnianych technik, bowiem charakteryzuje się ona dużą selektywnością, prostoliniową zależnością sygnału od stężenia w szerokim zakresie stężeń, bardzo wysoką czułością i niskim poziomem szumu, umożliwiającym osiągnięcie granic wykrywalności na poziomie 0,1 ppt, a także relatywnie prostymi i tanimi wymogami aparaturowymi.

Na szczególną uwagę zasługuje, dodatkowy fakt coraz częstszego wykorzystania metody atomowej spektrometrii fluorescencyjnej, w roli specyficznego i bardzo czułego detektora w sprzężeniach z różnymi technikami instrumentalnymi. Najnowsze kierunki rozwoju atomowej spektrometrii fluorescencyjnej obejmują przede wszystkim analizę specjacyjną pierwiastków śladowych, niejednokrotnie bardzo toksycznych dla zdrowia ludzkiego. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień literaturowych, prezentujących opracowane procedury analizy poszczególnych form pierwiastków takich jak: selen, arsen i inne. W analizie specjacyjnej wspomnianych pierwiastków dużą rolę odgrywa sprzężenie techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej z atomową spektrometrią fluorescencyjną (HPLC-AFS), techniki chromatografii gazowej z detekcją fluorescencyjną (GC-AFS) oraz specjalnie konstruowanych bardziej zaawansowanych układów np. wysokosprawnej chromatografii cieczowej z rozkładem próbek (on-line) wspomaganym promieniowaniem mikrofalowym, generacją wodorków i atomową spektrometrią fluorescencyjną połączoną z generacją wodorków (HPLC-MW-HG-AFS).

Ćwiczenie

Analiza materiału biologicznego – jednoczesne oznaczanie selenu i arsenu metodą atomowej spektrometrii fluorescencyjnej

Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest praktyczne zapoznanie się z zagadnieniami dotyczącymi:

- oględzin i właściwego przygotowywania różnych materiałów biologicznych (płynów ustrojowych, wycinków narządów wewnętrznych, włosów itp.) pod kątem oznaczania lotnych pierwiastków śladowych (selenu i arsenu),
- zastosowania wysokociśnieniowej techniki mineralizacji „na mokro” wspomaganej mikrofalami w systemie zamkniętym,
- zastosowania techniki atomowej spektrometrii fluorescencyjnej połączonej z generacją wodorków i możliwością wykorzystania jej do analizy ilościowej równocześnie dwóch pierwiastków w szerokich zakresach stężeń (fizjologicznym i toksycznym),
- kalibracji i problemami analitycznymi (m.in. efektami interferencyjnymi) najczęściej pojawiającymi się podczas analizy materiałów biologicznych,
- stosowania materiałów referencyjnych z certyfikowanymi wartościami stężeń interesujących nas analitów,
- poprawnego sporządzania sprawozdania z przeprowadzonych oględzin badanego materiału dowodowego i jego analizy chemicznej oraz formułowania wniosków z badań, dla celów opinii sądowej.

Zakres materiału naukowego

- Podstawowe informacje dotyczące oznaczanych pierwiastków, ich korzystne jak i toksyczne działanie oraz bezpośredni wpływ na organizm ludzki.
- Metody przygotowania (homogenizacja, liofilizacja tkanek, procedury mycia w przypadku próbek włosów itp.) materiałów biologicznych do analizy pierwiastkowej oraz sposoby wyosabniania trucizn metalicznych (mineralizacja „na mokro”, „na sucho”, roztwarzanie mikrofalowe w systemie otwartym i

zamkniętym, mineralizacja UV, roztwarzanie ultradźwiękowe i inne). Wady i zalety każdego z nich.

- Zastosowanie techniki atomowej spektrometrii fluorescencyjnej z generacją wodorków do równoczesnej, dwupierwiastkowej analizy ilościowej (podstawy teoretyczne, zasada działania, budowa aparatu itp.) oraz znajomość technik pokrewnych wykorzystywanych do analizy pierwiastkowej.
- Metody kalibracji w przypadku analizy materiału biologicznego.

Literatura obowiązkowa

1. Seńczuk W. [red.], *Toksykologia*, PZWL, Warszawa, 1999, 437-509.
2. Kościelniak P., *Problematyka kalibracji w analizie chemicznej*, Chemia Środowiska cz.2, 277-301.
3. Namieśnik J.[red.], *Przygotowanie próbek środowiskowych do analizy*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 1999, 56-67.
4. Szczepaniak W.[red.], *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN, Warszawa 2004, 22-29.
5. Walas S., *Atomowa spektrometria fluorescencyjna (ASF) – cz I i II.*– Analityka, nr.: 2 i 3, 2002 odpowiednio 10-11 oraz 9-12.

Literatura uzupełniająca

1. Klewska A., *Przygotowanie materiału biologicznego do oznaczania śladów metali*, Z Zagadnień Kryminalistyki, 3, 1968, 62-67.
2. Stryer L., *Biochemia*, PWN, Warszawa, 2003, 280-360
3. Katz S. H., Chatt A. [red.], *Hair Analysis – Applications in the Biomedical and Environmental Sciences*, VCH, Weinheim 1988.
4. Sanz M., Romero F., Romero C., *Selenium and cancer: some nutritional aspects*, Review article, Nutrition, 16, 2000, 376-383

Odczynniki, materiały przyrządy

W ćwiczeniu zostaną wykorzystane następujące odczynniki i materiały: roztwór wzorcowy selenu o stężeniu 1 mg ml^{-1} Se (cz.d.a., Merck, Niemcy); roztwór wzorcowy arsenu o stężeniu 1 mg ml^{-1} As (cz.d.a., Merck, Niemcy); stęż. HNO_3 (cz.d.a., Merck, Niemcy); stęż. HCl (cz.d.a., POCh., Polska), 3 i 6 M roztwór HCl ; 30% stęż. NaOH (cz.d.a., POCh., Polska), 50% NaOH ; 98% NaBH_4 (cz.d.a., Sigma-Aldrich, Niemcy); aceton (cz. d. a., Merck, Niemcy); woda dejonizowana o przewodnictwie właściwym ok. $1 \mu\text{S cm}^{-1}$; materiały referencyjne włosów ludzkich GBW 07601 (GSM-1) (NRCG, Chiny), opatrzone certyfikatem określającym stężenie selenu i arsenu w próbce.

Dokładny sposób sporządzania poszczególnych roztworów przedstawiono w kolejnych rozdziałach części doświadczalnej.

Aparatura

W procesie przygotowania próbek biologicznych będą używane następujące urządzenia oraz sprzęt laboratoryjny:

- dwunastopozycyjny mineralizator mikrofalowy MARS 5X, firmy CEM (USA). Proces mineralizacji będzie prowadzony w teflonowych, wysokociśnieniowych naczyniach typu XP-1500 z możliwością równoczesnej, wewnętrznej kontroli temperatury (czujnik temperaturowy typu RTP-300 Plus) i ciśnienia (czujnik ciśnienia typu ESP-1500 Plus). Mineralizator ma możliwość pracy pod maksymalnym ciśnieniem 800 PSI oraz maksymalną mocą 1200 W w systemie otwartym lub zamkniętym. Warunki i szczegółowe parametry procesu mineralizacji, przedstawione zostały poniżej w tabeli 1.
- 6-Port Mini-Vap typu 22971, firmy Sigma-Aldrich (Niemcy); urządzenie służące do odpędzania tlenków powstałych podczas procesu mineralizacji, z nad mineralizatu gazem obojętnym;
- wytrzasarka typu LT-1, firmy Skalarny Avalier (Czechosłowacja);
- vortex typu TK 3S, firmy TecnoKartell (Polska);
- homogenizator do tkanek typu DI 25, firmy Yellow-Line IKA (Niemcy);

- pipety automatyczne oraz szkło laboratoryjne.

Do pomiaru sygnałów analitycznych dla poszczególnych próbek zostanie zastosowany:

- dwukanałowy spektrometr fluorescencji atomowej typu AFS-230, firmy Beijing Haiguang Instrumental Company (Chiny), wyposażony w 130-pozycyjny podajnik próbek oraz w system generacji wodorków realizowany metodą z przerywanym przepływem.

Schemat spektrometru wraz z opisem układu poszczególnych części przedstawiono w części teoretycznej ćwiczenia na rys 2 i 3.

Warunki

Tabela 1. Program mineralizacji – procedura K4W.

Procedura	Krok	Moc [%]	Temperat. [°C]	Ciśnienie [psi]	Czas grzania [min]	Czas utrzymania [min]
K4W	I	80	160	290	4,00	4,00
	II	80	180			
	III	90	200			

Tabela 2. Parametry pracy spektrometru.

Parametr	Równoczesne oznaczenie selenu i arsenu
Źródło promieniowania	lampy HCL: selenowa i arsenowa
Nośnik	3M HCl
Prędkość przepływu nośnika	11 ml min ⁻¹
Czynnik redukujący	2% NaBH ₄ w 0,5% (m/v) NaOH
Prędkość przepływu reduktora	6 ml min ⁻¹
Temperatura pieca	200 °C
Wysokość atomizera	8 mm
Natężenie prądu lampy	100 mA
Napięcie fotopowielacza	300 V dla wzorców od 0,0 do 10,0 µg l ⁻¹ 250 V dla wzorców od 0,0 do 100,0 µg l ⁻¹
Przepływ gazu nośnego (argon)	500 ml min ⁻¹
Przepływ gazu osłonowego (argon)	900 ml min ⁻¹

Uwaga!

Wszelkie czynności związane z manipulacjami materiałem biologicznym winny być wykonane z zachowaniem szczególnej ostrożności. Używać należy gumowych rękawic ochronnych oraz fartuchów laboratoryjnych.

Wykonanie ćwiczenia

1. Sporządzić 2% roztwór redukujący w tym celu odważyć 5 g NaBH₄, przenieść do kolby o poj. 250 ml, następnie dodać 2,5 ml 50% NaOH i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski.

2. Sporządzić roztwór pośredni selenu przez zmieszanie 100 μl roztworu podstawowego selenu o stężeniu 1 mg ml^{-1} i 1,5 ml stężonego kwasu solnego w kolbie o poj. 100 ml i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski.
3. Sporządzić roztwór pośredni arsenu przez dodanie do kolby o pojemności 100 ml 100 μl roztworu podstawowego o stężeniu 1 mg ml^{-1} i dopełnienie 5% roztworem kwasu solnego do kreski.
4. Sporządzić serię roztworów wzorcowych w kolbkach o obj. 25 ml, zawierających kolejno 0,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0 $\mu\text{g l}^{-1}$ selenu i 0,0; 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 $\mu\text{g l}^{-1}$ arsenu oraz po 12,5 ml 6 M kwasu solnego i uzupełnić wodą dejonizowaną do kreski.

Analiza materiału dowodowego:

5. Przeprowadzić dokładne oględziny materiału przeznaczonego do badania oraz sporządzić jego dokładny opis (m.in. uwzględnić rodzaj, miejsce i sposób zabezpieczenia dowodu).
6. W przypadku próbek włosów sprawdzić czy została ona pobrana zgodnie z zaleceniami *The Society of Hair Testing (SHT)* (minimalna grubość próbki powinna wynosić 0,5 cm z dokładnie oznaczonym początkiem kosmyka włosów – czynność szczególnie istotna w przypadku analizy sekwencyjnej).
7. Każdą próbkę włosów poddać procedurze dekontaminacji, zgodnie z zaleceniami *Międzynarodowej Agencji Energii Atomowej (IAEA)*, polegającej na przemywaniu próbki włosów w acetonie, trzy razy w wodzie i ponownie w acetonie.
8. Próbkę włosów wysuszyć, podzielić na odpowiednie odcinki następnie zhomogenizować.
9. W dalszej kolejności odważyć po 0,5 g próbki włosów (z każdego odcinka, jeśli planuje się wykonanie analizy sekwencyjnej) oraz pobrać 0,5 ml krwi lub innego materiału dowodowego zabezpieczonego w tej sprawie, przenieść do odpowiednio oznaczonych, teflonowych naczyń, następnie dodać 7 ml stężonego kwasu azotowego(V) i poddać mineralizacji zgodnie z programem zamieszczonym w tabeli 1.
10. W analogiczny sposób przygotować próbę ślepa (odczynnikową) oraz próbkę materiału referencyjnego.
4. Po zakończeniu procesu mineralizacji, ochłodzić próbki do temperatury pokojowej (uwaga: lotne pierwiastki!).
5. Każdą próbkę odstawić pod strumień azotu na ok. 10 min, następnie mineralizat przenieść do kolbki o poj. 25 ml, dodać 12,5 ml 6 M HCl i uzupełnić wodą do kreski.

6. Ustawić parametry spektrometru zgodnie z danymi zamieszczonymi w tabeli 2 i wykonać równoczesne pomiary sygnałów dla selenu i arsenu, kolejno dla roztworów wzorcowych a następnie dla próby ślepej, materiału referencyjnego i kolejnych badanych próbek.

Opracowanie wyników

1. Podkreślić cel , wykazać zasadność przeprowadzonych badań.
2. Sporządzić dokładny opis badanych dowodów rzeczowych.
3. Napisać zwięzłą część sprawozdawczą z przeprowadzonych badań (w tym również uwzględnić sposób przygotowania otrzymanych materiałów biologicznych do badań).
4. W części dotyczącej wykonania analiz podać dokładnie zastosowaną metodę analityczną (nazwę i parametry doświadczalne metody), a także model i producenta stosowanych aparatów.
5. Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczyć linie kalibracyjne dla selenu i arsenu, następnie wyznaczyć stężenia poszczególnych analitów.
6. Na podstawie danych literaturowych porównać uzyskane wyniki z poziomami fizjologicznymi i toksycznymi spotykanymi u ludzi. Ustosunkować się do otrzymanych wyników.
7. Sporządzić opinię biegłego dotyczącą podejrzenia o zatrucie arsenikiem lub związkami selenu.
8. Ocenić metodę atomowej spektrometrii fluorescencyjnej pod kątem przydatności w analizie materiału biologicznego.