

# PRAKTYKA LABORATORYJNA

JAN ŻMUDZKI

## Oznaczanie zawartości ołowiu w materiale biologicznym metodą spektrofotometrii atomowo-absorpcyjnej

Z Zakładu Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach

Powszechnie jest wiadomo, że ołów i jego związki nagromadzają się w poszczególnych ogniwach łańcucha pokarmowego, są bardzo trwałe i utrzymujące się długo w środowisku. Stale wzrastające zagrożenie ludzi i zwierząt związkami ołowiu, zmusza do prowadzenia badań nad pozostałościami tego pierwiastka w żywności i środowisku. Naturalne stężenia ołowiu w materiale biologicznym są niskie i mieszczą się w granicach ułamków mg/kg. Oznaczanie tak małych ilości stawia duże wymagania metodom analitycznym, jakimi posługujemy się. Technika, która ze względu na dużą czułość i prostotę wykonania zdobyła szczególną popularność w ostatnich latach jest metoda spektrofotometrii atomowo-absorpcyjnej (AAS). W początkowym okresie stosowania tej metody sądzono, że jest to technika o minimalnym błędzie pomiaru i braku interferencji fizycznych i chemicznych. Obecnie coraz częściej pojawiają się doniesienia o możliwościach popełniania błędów analitycznych przy stosowaniu AAS, szczególnie przy oznaczaniu małych ilości ołowiu (1, 2). Ponieważ w piśmiennictwie krajowym jest mało danych na ten temat, a coraz częściej w wielu laboratoriach pojawiają się spektrofotometry absorpcji atomowej, chcielibyśmy się podzielić uwagami i wskazówkami metodycznymi, jakie nasunęły się nam w trakcie kilkuletnich badań pozostałości ołowiu w materiale biologicznym ze szczególnym uwzględnieniem materiału pochodzenia zwierzęcego.

Najprostsza analiza polega na bezpośrednim oznaczaniu ołowiu w spektrofotometrze absorpcji atomowej (AA) po zmineralizowaniu materiału biologicznego. Przeprowadzając jednak w ten sposób oznaczania uzyskuje się wyniki obciążone największym błędem analitycznym. Fletcher (2) analizując w podobny sposób materiał roślinny uzyskiwał często ponad 2-krotnie wyższe wyniki swoich oznaczeń. Natomiast po wprowadzeniu korekcji tła za pomocą lampy wodorowej uzyskiwał wartości porównywalne z wynikami uzyskanymi metodą kolorymetryczną. Występowanie podobnych błędów analitycznych, często nawet znacznie wyższych, stwierdziliśmy w początkach naszej pracy przy oznaczaniu metodą AAS zawartości ołowiu w mleku i tkankach zwierząt. W tab. 1 przedsta-

wiono wyniki oznaczania za pomocą AAS stężenia ołowiu w mleku kobiecym i nerkach wołowych przy zastosowaniu trzech różnych procedur analitycznych: a) oznaczania bezpośredniego po zmineralizowaniu próbki i rozpuszczeniu pozostałości a w  $\ln \text{HCl}$ , b) po zastosowaniu do analizy rozpuszczonego mineralizatu korekcji tła lampą wodorową i c) po związaniu ołowiu w związek kompleksowy z piroolidynokarbodwutentionianem amonowym i ekstrakcji ketonem izobutyłowometylowym. Szczególnie wysoki błąd pomiaru stwierdzono przy oznaczaniu bezpośrednim w spektrofotometrze AA mineralizatów próbek mleka kobiecego — przeszło 8-krotne zawyżenie wyników. W miarę wzrostu stężenia ołowiu w próbce, błąd jaki popełnia się w oznaczeniach bezpośrednich maleje. W nerkach wieprzowych i wołowych, gdzie stężenia ołowiu są na poziomie dziesiątych części mg/kg, błąd ten jest znacznie niższy i wynosi od 50 do 100% (tab. 1 i 2).

Tab. 1. Wyniki (mg/kg) oznaczania za pomocą AAS zawartości ołowiu w mleku kobiecym i nerkach wołowych przy zastosowaniu trzech różnych procedur analitycznych

Materiał	Li-czba próbek	Bezpośrednio w $\ln \text{HCl}$	Korelacja lampą $\text{H}_2$	Faza organiczna MIBK
Mleko kobiece	50	0,135±0,021	0,014±0,006	0,016±0,007
Nerki wołowe	40	1,529±0,524	0,887±0,500	0,885±0,562

W świetle przedstawionych faktów i danych z dalszego piśmiennictwa wydaje się, że wyeliminowanie poważniejszych błędów, jakie popełnia się w trakcie analizy AAS małych stężeń ołowiu w materiale biologicznym można uzyskać na drodze ekstrakcji ołowiu do fazy organicznej i korekcji tła za pomocą lampy wodorowej. W tab. 2. przedstawiono wyniki oznaczania zawartości ołowiu w nerkach wieprzowych przy zastosowaniu trzech procedur analitycznych w metodzie AAS w porównaniu z kolorymetryczną metodą ditizonową. Z porównania tego wynika, że zarówno przy stosowaniu korekcji tła lampą wodorową jak i ekstrakcji do fazy organicznej uzyskuje się wartości zbliżone do wyników oznaczeń kolorymetryczną metodą ditizonową. Różnice między średnimi uzyskanymi tymi metodami były niewielkie (0,49; 0,53; 0,54 mg/kg) i statystycznie nieistotne. Z dotychczasowych doświadczeń wynikałoby jednak, że technika z zagęszczeniem

do fazy organicznej jest najpewniejszą metodą, która pozwala uniknąć błędów analitycznych związanych z interferencjami związków towarzyszących. Z piśmiennictwa krajowego znana jest praca Sapka, w której autor opisuje oznaczenie ołowiu w glebie po ekstrakcji do fazy organicznej (3). W naszych pracach wstępnych nad doborem odpowiedniej metody oznaczenia ołowiu w materiale biologicznym za pomocą AAS wykorzystaliśmy podstawowe założenia metody Yeagera i wsp. (4), która w porównaniu z innymi metodami cechuje się względną prostotą, oszczędnością czasu i dobrą precyzją. Wydaje się, że metoda Yeagera i wsp., która w stosowanej przez nas wersji została sprawdzona w naszym Zakładzie w analizie kilku tysięcy próbek materiału biologicznego, godna jest opisanie i spopularyzowania w naszym kraju.

Tab. 2. Wyniki (mg/kg) oznaczania zawartości ołowiu w nerkach wieprzowych przy zastosowaniu trzech różnych procedur analitycznych w metodzie AAS w porównaniu z kolorymetryczną metodą ditizonową

Wskaźniki	AAS			Kolorymetrycznie
	Bezpośrednio w 1n HCl	Korekcja lampą H <sub>2</sub>	Ekstrakcja MIBK	
Liczba próbek (N)	15	15	15	15
Średnia arytm. ( $\bar{x}$ ), mg/kg	0,89*	0,49**	0,53**	0,54**
Zakres (min.-maks.) mg/kg	0,74—1,09	0,34—0,62	0,32—0,69	0,36—0,73
Odchylenie standardowe (S), mg/kg	0,09	0,09	0,10	0,12

Objaśnienia: \* =  $P < 0,001$  w porównaniu z pozostałymi średnimi; \*\* = brak statystycznie istotnych różnic między średnimi zaznaczonymi podwójną gwiazdką.

#### Zasada metody

Po zmineralizowaniu próbki na sucho w piecu elektrycznym, ołów ekstrahuje się do fazy organicznej i oznacza za pomocą spektrofotometru absorpcji atomowej.

#### Odczynniki

Wszystkie odczynniki powinny być wolne od związków ołowiu.

1. Cytrynian amonowy (bufor pH 8,5). Rozpuścić 500 g krystalicznego kwasu cytrynowego w 300 ml wody redestylowanej, dodać 500 ml wody amoniakalnej i doprowadzić wodą amoniakalną roztwór do pH 8,5. Przenieść do rozdzielacza, dodać 100 ml chloroformu i 5 ml 0,1% ditizonu i po dokładnym wytrząśnięciu usunąć warstwę chloroformu z ditizonem. Czynność wytrząsania powtarzać aż barwa ditizonu przestanie zmieniać się.

2. Cyjanek potasowy, 10% roztwór wodny (w przypadku zanieczyszczenia ołowiem wytrząsać z chloroformowym roztworem ditizonu jak w p. 1).

3. 1-pirolidynokarbodwutonian amonowy (APDC) — 2% roztwór wodny, przygotowany na świeżo.

4. Keton izo-butyłowometylowy (MIBK). Przed użyciem wysycić wodą wytrząsając 70 ml MIBK z około 30 ml redest.

5. Czerwień fenolowa — 0,1% roztwór wodny.

6. Kwas azotowy stężony.

7. Kwas azotowy, roztwór 1n.

8. Kwas solny, roztwór 1n.

9. Woda amoniakalna.

10. Roztwór wzorcowy. Rozpuścić 1 g ołowiu metalicznego w 200 ml 50% kwasu azotowego i uzupełnić do 1 l wodą redestylowaną (1 ml zawiera 1 mg Pb). Z tak sporządzonego roztworu podstawowego sporządzać odpowiednie roztwory wzorców roboczych o stężeniu od 0,1 do 2  $\mu\text{g/ml}$  przez rozcieńczenie w 1n kw. solnym lub azotowym.

#### Aparatura

1. Spektrofotometr AA wyposażony w lampę katodową na ołów i lampę wodorową. Oznaczanie prowadzi się przy długości fali 217 nm w płomieniu acetyleno-

wo-powietrznym. W pracy tej stosowano spektrofotometr AA firmy Varian Techtron model 1200.

2. Rejestrator potencjometryczny o zmiennym napięciu.

#### Postępowanie

##### Mineralizacja

Próbkę materiału zwierzęcego lub roślinnego o ciężarze 1—50 g (wielkość próbki zależna od spodziewanej zawartości ołowiu) dokładnie rozdrobnić, wymieszać i po zhomogenizowaniu umieścić w tyglu porcelanowym lub kwarcowym. Tygiel wraz z próbką wstawić do suszarki o temp. 120—160°C na okres 8—16 godz. Następnie przenieść do pieca elektrycznego i stopniowo podnosić temperaturę do 450°C. Czas przebywania

próbki w piecu jest zależny od rodzaju mineralizowanego materiału (przeciętnie 24 godz.). W celu przyspieszenia mineralizacji do częściowo spopielennej próbki w trakcie spalania dodać 1—2 ml stężonego kwasu azotowego. Spopieleną próbkę rozpuszcza się ilościowo w 1n kwasie solnym lub azotowym (przy zachowaniu stosunku 1 g próbki w 1 ml kwasu).

#### Ekstrakcja

Zmineralizowaną próbkę lub jej część przenieść ilościowo do 50 ml kolby miarowej zamykanej szklanym korkiem ze szlifem i dodawać kolejno: 2 krople czerwieni fenolowej, 5 ml cytrynianu amonowego, wody amoniakalnej aż do zmiany zabarwienia czerwieni fenolowej (czerwony kolor przy pH 8,5), 1 ml 10% cyjanu potasowego, 1 ml 2% roztworu APDC i 4 ml MIBK. Kolbę zamknąć szklanym korkiem i wytrząsać przez 30 sek. Dodać wody redestylowanej tak, aby faza organiczna MIBK znalazła się w wąskiej szyjce kolby. Podobną procedurę przeprowadzić z roztworami, tak aby w końcowej objętości MIBK znalazło się 0,1, 0,5, 1,0 i 2,0  $\mu\text{g/ml}$  ołowiu. Dla każdej serii oznaczeń należy sporządzić: a) próbkę odczynnikową (ślepa), w której znajdują się w odpowiednich ilościach wszystkie używane odczynniki (za wyjątkiem badanej próbki); b) próbkę badaną do której przed mineralizacją dodano określoną ilość wzorca roboczego (próbka fortyfikowana).

#### Oznaczanie

Po wyzerowaniu aparatu AAS wobec MIBK nasyconego wodą redestylowaną, aspirować badaną próbkę bezpośrednio z kolby. Otrzymaną wartość odczytu porównać z najbliższym wzorcem po wcześniejszej korekcji tła z użyciem lampy wodorowej.

#### Omówienie metody i ocena statystyczna

Przyjęty w przedstawionej metodzie sposób mineralizacji próbek „na sucho” w piecu elektrycznym ma dość przeciwstawne opinie wśród osób zajmujących się oznaczaniem ołowiu. Główny zarzut przeciwników

takiego postępowania sprowadza się do możliwości uwalniania się ołowiu w trakcie spalania, ponieważ przy temperaturze ponad 550°C następują duże straty ołowiu. Z naszej praktyki wynika, że można tego uniknąć jeżeli przestrzega się dokładnie temperatury spalania i nie przekracza się 500°C. Natomiast niewątpliwą zaletą metody mineralizacji na sucho jest znacznie mniejsza możliwość zanieczyszczenia próbki ołowiem, który często znajduje się w stężonych kwasach używanych w mineralizacji na mokro. Mniejszy jest również przy tym nakład pracy i kosztów mineralizacji.

W przypadku pobrania do mineralizacji większych próbek, np. 10–20 g, przedstawioną metodą można jeszcze oznaczyć 0,005 mg ołowiu/kg świeżej tkanki. W przypadku bardzo małych stężeń, można dla zwiększenia wykrywalności używać do ekstrakcji ołowiu z mineralizatu kolb 25 ml zmniejszając o połowę ilości poszczególnych odczynników. Podobnie dla większych próbek można używać 100 ml kolb z podwojoną ilością wszystkich odczynników. Powyższa metoda nadaje się również do oznaczania w tym samym ekstrakcie z mineralizatu próbki biologicznej (po wprowadzeniu jedynie drobnych modyfikacji) takich pierwiastków jak: bizmut, kadm, mangan, antymon, selen, tellur i tal. Z wymienionych pierwiastków kadm może interferować w oznaczaniu ołowiu jeżeli występuje w dużych stężeniach rzędu 100 mg/kg i więcej, powodując w połączeniu z cyjankiem potasowym zmętnienie fazy organicznej. Tak wysokie stężenia kadmu w materiale biologicznym występują jednak bardzo rzadko i w takich przypadkach zaleca się zmniejszyć ilość pobranej do analizy próbki do 1 grama.

Tab. 3. Ocena statystyczna wyników oznaczania metodą AAS ołowiu dodanego do mięsa wieprzowego

Wskaźniki precyzji i dokładność oznaczeń	Dodano ołowiu w mg/kg		
	0,10	0,50	1,00
Liczba oznaczeń (N)	10	10	10
Odzysk, %	91	98	91
Średnia arytm. ( $\bar{x}$ ), mg/kg	0,091	0,49	0,91
Zakres (min.-maks.), mg/kg	0,08–0,11	0,46–0,52	0,88–0,94
Odchylenie stand. (S), mg/kg	0,012	0,018	0,027
Współczynnik zmienności (V), %	13,19	3,67	2,97
Przedział ufności 95% (u), mg/kg	0,091±0,008	0,49±0,013	0,91±0,019

W tab. 3 przedstawiono ocenę statystyczną wyników oznaczania zawartości ołowiu w 30 próbkach mięsa wieprzowego, do którego dodano odpowiednie ilości ołowiu aby uzyskać stężenie 0,1, 0,5, 1,0 mg/kg. Obliczone współczynniki zmienności dla trzech poziomów stężeń ołowiu wynosiły odpowiednio: 13,19, 3,67 i 2,97 (przy założonym poziomie prawdopodobieństwa 95%), co mieści się w granicach przyjmowanych zwykle dla oznaczeń metodą AAS. Odzyski metody kształtowały się w zakresie 91–98%.

Wydaje się, że przedstawione dane pozwalają określić opisaną metodę jako dostatecznie precyzyjną i czułą. Metoda ta została z powodzeniem sprawdzona w licznych oznaczeniach ołowiu w próbkach nerek, wątroby, mięśni, krwi, mleka i sierści zwierząt a opisane w tej pracy trudności analityczne pozwolą może zainteresowanym uniknąć tych problemów i błędów, na które napotyka się zwykle przy doborze właściwej metody analitycznej.

#### Piśmiennictwo

1. Christian G. L., Feldman F. J.: Atomic Absorption Spectroscopy applications in agriculture, biology and medicine. Wiley-Interscience, 1970.
2. Fletcher K.: J. Sci. Fd Agric. 22, 260, 1971.
3. Sapek A.: Chem. Anal. 19, 687, 1974.
4. Yeager D. W., Cholak J., Henderson E. W.: Environ. Sci. Tech. 5, 1020, 1971.

Adres autora: lek. wet. Jan Żmudzki, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy.

#### Жмудзкі Я. — Определение содержания свинца в биологическом материале при помощи метода атомно-абсорбционной спектрофотометрии (AAS).

Для определения свинца в биологическом материале адаптировали метод Yeagera и сотр. (1971). Метод включает: минерализацию биологического материала в электрической печи в температуре 450°C, растворение остатка в растворе соляной или азотной кислоты с образованием свинца в комплексе с аммоний-пирроллидин-дитиокарбаматом (APDC) экстракцию этого комплекса метилизобутиловым кетоном и определение содержания свинца при помощи метода AAS. Установили что, представленный метод позволяет обнаружить 0,005 мг свинца/кг свежей ткани и использовать в среднем 93% исходного содержания свинца. В работе представили статистическую оценку метода, а также некоторые причины аналитических ошибок выступающих при определении свинца в биологическом материале при помощи описанного метода.

#### Żmudzki J. — Determination of lead in biological material by atomic absorption spectrophotometry (AAS).

The modified procedure for lead determination in biological material according to the Yeager et al. (1971) method has been described. The procedure consists of the digestion of biological samples in hydrochloric or nitric acid solutions, chelation of lead with ammonium pyrrolidino dithiocarbamate (APDC), extraction of the chelate into methyl isobutyl ketone and determination of the complex by atomic absorption spectrophotometry. The lead content in the amount of 0.005 mg/kg of fresh tissues may be determined. The average recovery of lead was found to be 91–98% at the level of 0.1–0.5 mg/kg. Statistical evaluation of the method and some causes of analytical errors in lead determinations in biological material by AAS method have been discussed.

#### HESS E., LOTT G., BREER C.: Zachowanie się salmoneli podczas peklowania i suszenia mięsa. (Zum Verhalten von Salmonellen während der Pökellung und Trocknung von Bindenfleisch). Fleischwirtschaft 56, 703, 1976.

Przeprowadzono badania nad przeżywalnością salmoneli w czasie peklowania i suszenia mięsa. W tym celu w pierwszej części doświadczenia zakażono mięso hodowlą *S. typhimurium* w ilości  $7 \times 10^4$  drobnoustrojów/g, a następnie poddano peklowaniu i suszeniu przez 11, 15, 20 i 22 tyg. Stwierdzono, że po 14 dniach peklowania liczba salmoneli obniżyła się do 10/gram zarówno w warstwie powierzchniowej jak i głębokiej. Po suszeniu, poczynając od 11 tyg. nie wykazano obecności salmoneli w mięsie. W drugiej części doświadczenia badano wpływ peklowania i suszenia na szybkość obumierania salmoneli (zakażenie wyjściowe  $10^5$  bakterii/g). Wykazano, że w przypadku poddania mięsa zarówno peklowaniu jak i suszeniu, liczba salmoneli obniżyła się gwałtownie. W przypadkach suszenia, bez uprzedniego peklowania, ilość ich zmniejszała się w sposób bardziej równomierny. W obu przypadkach wyizolowano salmonelle jeszcze po 22 tyg. suszenia. Gdy więc mięso poddano jedynie peklowaniu obniżanie się ilości salmoneli przebiegało powoli, a wym. drobnoustroje obecne były w mięsie jeszcze po 22 tygodniach.

a. a.