

HENRYK ARCIUCH

Zastosowanie anodowej woltamperometrii inwersyjnej w oznaczaniu ołowiu w mleku spożywczym

Ośrodek Badań Weterynaryjnych Wojskowego Instytutu Higieny i Epidemiologii
ul. Lubelska 1, 24-100 Puławy

Bezpieczeństwo ludzi pozostających w kontakcie z różnymi substancjami chemicznymi wymaga stałego poszerzania wiedzy z zakresu prewencji, w tym także doskonalenia metod wykrywania i oznaczania ilościowego tych substancji. Mimo tego, że jednym z pierwszych, dokładniej poznanych czynników toksycznych był ołów, jego oznaczanie na szerszą skalę nadal stanowi zagadnienie kłopotliwe zarówno w sensie technicznym, jak i ekonomicznym.

Metody oznaczania ołowiu stosowane w analizie rutynowej materiałów biologicznych wymagają wstępnego utlenienia substancji organicznej, co — obok trudności metodycznych — z reguły wiąże się z użyciem wysokiej jakości, drogich odczynników chemicznych. Nowoczesne techniki analityczne, takie jak między innymi: fluorescencja rentgenowska, aktywacyjna analiza neutronowa, czy bezplomierowa absorpcyjna spektrometria atomowa pozwalają wprawdzie częściowo zmniejszyć koszty wstępnego przygotowania próbek, związane są jednak ze znacznymi wydatkami na aparaturę, co ogranicza powszechność ich stosowania.

Woltamperometria inwersyjna, efektywna w przypadku oznaczania ołowiu oraz innych metali dobrze rozpuszczalnych w rtęci (14) nie znalazła dotychczas szerszego zastosowania w kraju, chociaż badania porównawcze wykazują dobrą zgodność wyników z uzyskiwanymi za pomocą kclorometrycznej metody diti-zonowej, techniki płomieniowej atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ASA) oraz innych metod uznawanych za referencyjne (5, 6, 7, 10, 11). Istnieją liczne opracowania, w tym normalizacyjne, dotyczące zastosowań ASA. Znacznie uboższa jest lista opracowań poświęconych praktycznemu wykorzystaniu najnowszych tanich technik elektrochemicznych. Dotyczy to zwłaszcza oznaczania metali ciężkich w materiale biologicznym metodą anodowej woltamperometrii inwersyjnej (ASV).

Z punktu widzenia rozmiaru potrzeb w zakresie powszechnych badań profilaktycznych, nadzoru sanitarno-higienicznego i weterynaryjnego oraz monitoringu skażeń środowiska, oparcie detekcji ołowiu na bardzo kosztownej aparaturze wydaje się mało realne, a aktualny profil krajowego dorobku w dziedzinie metodyki analitycznej nie w pełni trafny.

Po zapoznaniu się z szeregiem publikacji wskazujących na możliwość oznaczania ołowiu całkowitego bez wstępnej mineralizacji, przy silnym zakwaszeniu próbki i prowadzeniu oznaczeń przy pH 1,5—2 (1, 2, 5, 9, 12), w ślad za próbą oznaczania ołowiu w niemineralizowanym moczu (4), podjęto próbę opracowania szybkiej, przeglądowej techniki oznaczania ołowiu w niemineralizowanym mleku metodą ASV.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano świeże mleko spożywcze butelkowane, o znormalizowanej zawartości tłuszczu — 2% (PN-75/A-86003).

Przygotowanie próbki do oznaczeń. Za pomocą mikro- i makropipet półautomatycznych do zlewki poj. 25 cm³ ze szkła PYREX wprowadzono 10 cm³ badanego mleka oraz 4 × 10⁻¹ cm³ 6 mol/dm³ HCl specjalnej czystości, a następ-

nie ogrzewano przez 30 minut w temperaturze 60°C. Po ostudzeniu, zawartość zlewki przenoszono do polietylenowego naczynia wirówkowego. Wirowanie prowadzono przez 20 minut przy prędkości obrotów odpowiadającej sile około 45 × g (3 tys. obrotów dla wirówki MPW-340). Za pomocą makropipety ostrożnie, unikając przypadkowego pobrania powierzchniowej warstwy tłuszczowej, pobierano 5 cm³ serwatki, którą umieszczano w naczynku stanowiska pomiarowego. Zawartość naczynka uzupełniano z kolei dodatkami 5 cm³ wody redestylowanej Ultranal R.

Oznaczenia zawartości ołowiu w próbkach wykonywano za pomocą mikroprocesorowego analizatora woltamperometrycznego produkcji Spółdzielni Pracy „RADIUS” z zamontowanym trójelektrodowym potencjostatem opartym na nasyconej elektrodzie kalomelowej (NEK), jako elektrodzie odniesienia.

Jako elektrodę roboczą zastosowano elektrodę rtęciową wytworzoną elektrochemicznie na impregnowanej elektrodzie grafitowej stanowiącej standardowe wyposażenie analizatora. Po nagromadzeniu rtęci przy potencjale -1100 mV wzgl. NEK elektrodę roboczą uwalniano z przypadkowych zanieczyszczeń ołowiem przez przyłożenie potencjału -110 mV na okres 20 sekund. Przed wykonywaniem pomiarów elektrodę przechowywano w naczyniu z wodą redestylowaną, chroniąc jej aktywną powierzchnię przed kontaktem z powietrzem.

Woltamperometryczne pomiary ekstremum prądu utleniania oznaczanego ołowiu wykonywano z automatycznym odejmowaniem prądu ła.

Parametry cyklu pomiarowego:

- czas elektrolizy 60 sek
- potencjał elektrody roboczej w czasie elektrolizy -1100 mV
- początkowy potencjał kontroli utleniania -750 mV
- końcowy potencjał kontroli utleniania -110 mV
- szybkość zmiany potencjału elektrody 0,3 V/s

Oceny stężenia oznaczanego ołowiu dokonywano metodą dodatku standardu.

Odczynniki i sprzęt

- 6 mol/dm³ kwas solny specjalnej czystości (Ultranal R Cheman Raszyn)
- 5% kwas azotowy specjalnej czystości (Ultranal R Cheman Raszyn)
- stężony kwas solny cz. d. a. (POCH Gliwice)
- stężony kwas azotowy cz. d. a. (POCH Gliwice)
- woda redestylowana do analiz ślad. (Ultranal R Cheman Raszyn)
- 0,02 mol/dm³ roztwór chlorku rtęci (II) cz. d. a. (POCH Gliwice)
- standard Pb 1 g/dm³ (roztwór wodny Pb(NO₃)₂ P.K.N.M. i J.)
- woda redestylowana
- makropipeta półautomatyczna medyczna 5 cm³ (Plastomed)
- mikropipeta półautomatyczna nastawna 2 × 10⁻³ do 2 × 10⁻¹ cm³ (Plastomed)
- mikropipeta półautomatyczna 10⁻² cm³ (Plastomed)
- mikropipeta półautomatyczna 5 × 10⁻² cm³ (Plastomed)
- wirówka laboratoryjna horyzontalna o pojemności naczyni ok. 20 cm³ oraz prędkości obrotów odpowiadającej sile odśrodkowej = 45 g (np. M.P.W. 340)
- łaźnia wodna
- zlewki a 25 cm³ ze szkła Pyrex
- bagietki szklane
- naczynia wirówkowe z polietylenu wysokociśnieniowego.

Roztwór roboczy standardu Pb 2 × 10⁻² g/dm³ przygotowano ze standardu PKNMiJ wg (3).

Roboczy roztwór chlorku rtęci (II) do nanoszenia rtęci na impregnowaną elektrodę grafitową przygotowano w następujący sposób: do naczynka pomiarowego wprowadzono 5 × 10⁻² cm³ 0,02 mol/dm³ roztworu chlorku rtęci, 2 × 10⁻¹ cm³ 6 mol/dm³ HCl specjalnej czystości oraz 10 cm³ H₂O redestyl. Ultranal R. Mycie szkła oraz naczyń z polietylenu.

Naczynka pomiarowe wchodzące w skład wyposażenia stanowiska pomiarowego MAW, bagietki szklane oraz zlewki po wstępnym umyciu napełniano na okres 24 godzin ok. 30% roztworem HNO₃, następnie płukano dwukrotnie 0,1 mol/dm³ roztworem HCl cz. d. a. w wodzie redestylowanej i jeden raz 0,1 mol/dm³ roztworem HCl specjalnej czystości. Tak umyte szkło do chwili użycia, to jest przez 2-3 godziny, przechowywano napełnione gorącym (60°C) 0,1 mol/dm³ roztworem HCl specjalnej czystości. Tuż przed użyciem wylewano roztwór kwasu solnego, a szkło jeden raz płukano wodą redestylowaną do analiz śladowych.

Naczynia z polietylenu wysokociśnieniowego myto ciepłym roztworem detergenu za pomocą szczotki z miękkiego włosa, następnie kilkakrotnie płukano 0,1 mol/dm³ roztworem HCl cz. d. a. w wodzie redestylowanej i jeden raz 0,1 mol/dm³ roztworem HCl specjalnej czystości. Do chwili użycia postępowano analogicznie jak ze szkłem.

- Badania eksperymentalne objęły następujące zagadnienia:
- zależność ekstremum prądu utleniania (wysokość pików) od stężenia oznaczanego ołowiu w serwatce,
 - zależność ekstremum prądu utleniania od czasu wstępnej koncentracji oznaczanego Pb na elektrodzie roboczej,
 - wpływ czasu elektrolitycznego nanoszenia rtęci na czułość elektrody roboczej,
 - mikroskopowy obraz aktywnej powierzchni elektrody,
 - precyzję pomiaru prądu utleniania oznaczanego ołowiu w przygotowanej próbce serwatki, przy różnych stężeniach Pb w mleku,
 - ocenę statystyczną precyzji metody oraz
 - ocenę zateżenia jonów Pb w próbce na skutek wydzielania, przez wirowanie, w warunkach niskiego pH frakcji kazeinowej i tłuszczu (odzysk Pb w serwatce).

Wyniki i omówienie

Wielokrotne dodawanie roboczego roztworu standardu Pb do przygotowanej, jak opisano wyżej, próbki pozwoliło stwierdzić liniową zależność przyrostu wysokości pików utleniania ołowiu od jego stężenia. Badanie przeprowadzono w zakresie stężeń Pb w przygotowanej do oznaczeń próbce od $3,2 \times 10^{-6}$ g/dm³ do $88,4 \times 10^{-6}$ g/dm³. Obliczony współczynnik korelacji wyniósł 0,9995. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1.

Zmiana czasu nagromadzania oznaczanego pierwiastka przy zachowaniu nie zmienionych pozostałych parametrów pomiaru woltamperometrycznego dawała ściśle skorelowane zmiany wysokości pików utleniania Pb. Obliczony współczynnik korelacji wyniósł 0,9994. Uzyskane wyniki zamieszczono w tab. 1.

Stwierdzono nieliniową zależność czułości elektrody

Tab. 1. Wyniki pomiaru prądu utleniania Pb w metodzie ASV w zależności od stężenia ołowiu oraz czasu nagromadzania z serwatki

Stały czas nagromadzania 60 sek.		Stałe stężenie Pb ok. $6 \text{ g} \times 10^{-6} / \text{dm}^3$	
stężenie Pb w serwatce	maks. natęż. prądu utlen.	czas nagr. Pb	maks. natęż. prądu utlen.
$\text{g} \times 10^{-6} / \text{dm}^3$	$\text{A} \times 10^{-6}$	(sek.)	$\text{A} \times 10^{-6}$
5,21	0,80	10	0,31
7,20	1,84	20	0,61
11,18	2,87	30	0,92
15,12	3,88	40	1,23
19,05	4,87	50	1,51
22,97	5,82	60	1,75
26,89	6,77	70	1,99
30,78	7,70	80	2,28
34,66	8,90	90	2,57
38,51	9,86	100	2,92
68,99	17,40	110	3,13
88,41	22,40	120	3,54
—	—	130	3,80
—	—	140	4,05
—	—	150	4,31
—	—	160	4,73

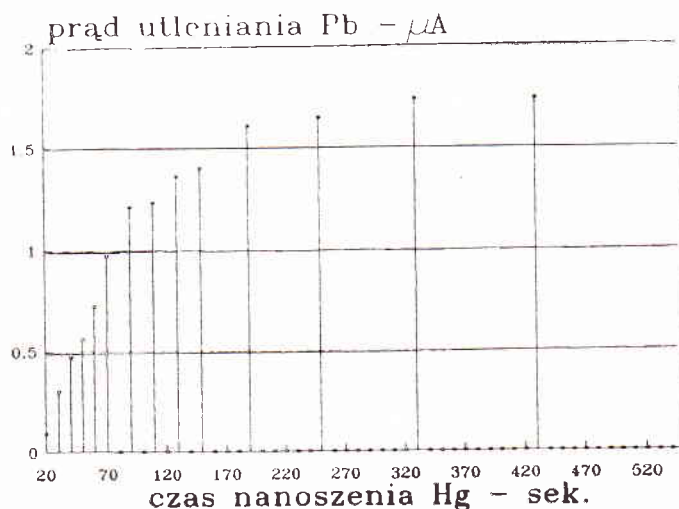
od ilości nagromadzonej rtęci przy elektrolizie roboczego roztworu chlorku rtęci (II) w przedziale czasu od 10 do 540 sekund. Jej maksymalną oraz stabilną czułość dla oznaczanego ołowiu uzyskiwano dopiero po nanoszeniu rtęci przez okres 500 i więcej sekund. Graficzny obraz relacji — czas nanoszenia Hg/czułość elektrody — przedstawia ryc. 1.

Badaniem mikroskopowym stwierdzono drobnokropelkową strukturę warstwy rtęci wydawnie zwiększającą powierzchnię aktywnego kontaktu elektrody z badaną serwatką.

Analiza statystyczna wyników dziesięciu serii po osiem pomiarów woltamperometrycznych prądu utleniania Pb, który występował w serwatce w stężeniu od $2,7 \times 10^{-6}$ g/dm³ do $143,3 \times 10^{-6}$ g/dm³ dała następujące rezultaty: dla n = 8 współczynnik zmienności kształtował się w przedziale od 0,86% do 2,03% przy średniej wartości 1,58%. Zależności precyzji pomiarów od stężenia Pb w materiale badanym nie stwierdzono. Wyniki przedstawiono w tab. 2.

Dla trzech próbek mleka, w których stwierdzono najniższe stężenia Pb wykonano odpowiednio trzy serie niezależnych szesnastu oznaczeń. Analiza statystyczna wyników dała następujące rezultaty:

- n = 16, średnia = $2,6364 \times 10^{-6}$ g/dm³, min. wyn. = $2,2404 \times 10^{-6}$ g/dm³, maks. wyn. = $2,9691 \times 10^{-6}$ g/dm³, współcz. zmien. = 8,9%,
- n = 16, średnia = $2,4598 \times 10^{-6}$ g/dm³, min. wyn. =



Ryc. 1. Relacja — czas nanoszenia Hg/czułość elektrody roboczej (wyniki pomiarów met. ASV t_{el} = 60 sek., E_{el} = -1100 mV wzgl. NEK, prędkość przemieszczania E = 0,3 V/sek.)

Tab. 2. Precyzja pomiaru prądu utleniania Pb w metodzie ASV (n = 8)

Wyniki pomiarów			Współcz. zmien. %	Stężenie ołowiu $\text{g} \times 10^{-6} / \text{dm}^3$
średni $\text{A} \times 10^{-6}$	minimal. $\text{A} \times 10^{-6}$	maksymal. $\text{A} \times 10^{-6}$		
4,4139	4,34	4,47	1,09	7,3
4,4200	4,27	4,51	2,01	6,8
17,9625	17,40	18,50	2,03	143,3
18,6375	18,00	19,00	1,69	150,0
0,8063	0,78	0,83	1,98	4,3
0,8225	0,81	0,84	1,26	4,5
0,5825	0,56	0,59	1,78	2,7
0,6125	0,60	0,62	1,16	2,8
0,9375	0,92	0,95	0,86	5,1
0,8144	0,78	0,84	1,90	4,4

Tab. 3. Wyniki oznaczeń Pb w trzech próbkach mleka — $g \times 10^{-6}/dm^3$

	Data oznaczania *		
	28.03.91	08.04.91	11.04.91
3,2500	2,6176	2,7094	
4,1473	2,6500	2,6383	
3,6089	2,8631	2,5239	
3,0389	2,2505	2,2584	
3,3730	2,8732	2,2222	
4,0262	2,4623	2,3824	
3,5739	2,4901	2,1822	
4,0137	2,2404	2,2880	
3,1341	2,9287	2,5915	
3,5856	2,7191	2,6288	
3,5069	2,5090	2,6879	
3,5828	2,9691	2,6419	
4,0666	2,9157	2,3534	
3,7205	2,7380	2,3933	
3,2807	2,5170	2,4003	
3,1021	2,4378	2,4541	

Objaśnienie: * — każdy wynik odpowiada pełnej procedurze analitycznej.

Tab. 4. Wyniki badania zmian stężenia Pb w próbce na skutek wstępnej obróbki mleka — odzysk Pb

Nr bad.	1	2	3	4	5	6	7
Wynik %	101,3	100,9	103,7	89,2	95,9	108,9	93,8
Nr bad.	8	9	10	11	12	13	14
Wynik %	100,8	108,8	93,6	100,7	102,3	105,2	94,3

= $2,1822 \times 10^{-6} g/dm^3$, maks. wyn. = $2,7094 \times 10^{-6} g/dm^3$, współcz. zmien. = 7,1%,
— n = 16, średnia = $3,5632 \times 10^{-6} g/dm^3$, min. wyn. = $3,0389 \times 10^{-6} g/dm^3$, maks. wyn. = $4,1473 \times 10^{-6} g/dm^3$, współcz. zmien. = 10,1%.

Wyniki zamieszczono w tab. 3.

Ocena zateżnienia jonów Pb w próbce dokonana metodą dodatku standardu Pb do badanego mleka dała następujące wyniki:

— n = 14, średnia wartość odzysku Pb = 99,96%,
— minimalna wartość odzysku Pb = 89,2%,
— maksymalna wartość odzysku Pb = 108,9%,
— współcz. zmien. = 5,89%.

Wyniki zamieszczono w tab. 4.

Stwierdzony liniowy charakter zależności wysokości pików od stężenia oznaczanego ołowiu w serwatce pozwa-

la na oznaczenie ołowiu w mleku, opisaną metodą, w zakresie stężeń od ok. $6 \times 10^{-6} g/dm^3$ do około $180 \times 10^{-6} g/dm^3$.

Zmiana czasu nagromadzania może być stosowana jako dogodny środek doboru optymalnych parametrów pomiaru metodą ASV, a przyjęty w metodyce czas wstępnej elektrolizy próbki może być zmieniany w szerszym zakresie.

Drobnokropelkowy charakter powierzchni elektrody roboczej tłumaczy zwiększenie się jej czułości wraz z przyrostem masy nagromadzonej rtęci. Obok bezwzględnego przyrostu powierzchni kontaktującej się z materiałem badanym, istotnym wydaje się także jej stosunek do masy rtęci.

Trafne użycie nazwy dobrze opisujące charakter zastosowanej elektrody roboczej, odpowiadające nazewnictwu stosowanemu w literaturze fachowej napotyka na trudności. Impregnowana elektroda grafitowa, pokryta faktycznie mikrokroplami rtęci, w podręcznikach zwana jest bowiem błonkową elektrodą rtęciową (13, 14).

Wspomniany na wstępie dane literaturowe dotyczące możliwości oznaczania ołowiu całkowitego oraz uzyskane zadowalające parametry precyzji wykonanych oznaczeń zachęcają do podjęcia badań międzylaboratoryjnych nad odtwarzalnością wyników proponowanej metody.

Piśmiennictwo

1. Almestrand L., Betti M., Chi Hua, Jagner D., Renman L.: Anal. Chim. Acta 209, 339, 1988.
2. Almestrand L., Jagner D., Renman L.: Talanta 33, 991, 1986.
3. Anon.: Official Methods of Analysis, A.O.A.C., Arlington, VA, 1980, metoda Nr 25.080.
4. Arciuch H.: Medycyna Wet. 47, 41, 1991.
5. Daniele S., Baldo M. A., Ugo P., Mazzocchin G. A.: Anal. Chem. Acta 219, 9, 1989.
6. Daniele S., Baldo M. A., Ugo P., Mazzocchin G. A.: Anal. Chem. Acta 219, 19, 1989.
7. Grupa robocza WHO: Kryteria zdrowotne środowiska, T. 3, OŁOW, PZWL, Warszawa, 1982.
8. Höhl C., Seiler M., Seiler H. G.: Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. 89, 100, 1988.
9. Kemula W., Kublik Z.: Nature 189, 57, 1961.
10. Koops J., Klomp H., Westerbeeck D.: Neth. Milk Dairy J. 42, 69, 1988.
11. Stoppler M., Mohl C., Ostapczuk P., Goedde M., Roth M., Waismann E.: Fresenius'Z. anal. Chem. 317, 252, 1984.
12. Teisinger J.: Gigiena i Sanitarija 3, 28, 1954.
13. Vydra F. i wsp.: Electrochemical Stripping Analysis, Ellis Horwood, Chichester, 1976.
14. Wang J.: Stripping Analysis, VCH Publishers Inc., Deerfield Beach, 1985.

Adres autora: lek. wet. Henryk Arciuch, ul. Wojska Polskiego 3/10, 24-100 Puławy

KONDO T., HATTORI H., KODAMA H., ONUMA M., MIKAMI T.: Określenie właściwości dwóch przeciwciał monoklonalnych rozpoznających różne subpopulacje limfocytów T u kurcząt. (Characterization of two monoclonal antibodies which recognize different subpopulations of chicken T lymphocytes). Jpn. J. Vet. Res. 38, 11—17, 1991 (1)

Przebadano występowanie i właściwości dwóch subpopulacji limfocytów T krwi obwodowej kurcząt posiadających antygeny powierzchniowe rozpoznawalne przez przeciwciała monoklonalne Lc-4 i Lc-6. Badania w odczynie immunofluorescencji wykazały, że antygeny te występują wyłącznie w limfocytach T krwi obwodowej. Nie posiada ich natomiast subpopulacja limfocytów B krwi obwodowej kurcząt. Antygen Lc-4 jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 35 Kd w warunkach zredukowanych o masie 65 Kd w warunkach niezredukowanych. Pod wieloma właściwościami biochemicznymi jest on zbliżony do antygeny CD8 ssaków.

G.

BOCKLISCH H., KREUSEL S., BRYŚ A., PFUTZNER H.: Doświadczalne zakażenie gruczołu mlekowego owiec My-

coplasma bovis. (Experimental infection of the udder of ewes due to Mycoplasma bovis). J. Vet. Med. Bm 38. 385—390, 1991 (5)

Dwanaście owiec w początkowym okresie laktacji zakażono do kanału strzykowego lewej połówki wymienia 5 ml (10^6 — 10^7 cfu/ml) hodowli Mycoplasma bovis namnożonej na zmodyfikowanym podłożu Hayflicks. U wszystkich zwierząt rozwinęło się zapalenie gruczołu mlekowego z typowymi objawami miejscowym i gorączką. Zarazek izolowano z mleka zakażonej połówki wymienia. Proces zakaźny przenosił się też na drugą połówkę wymienia. Od owiec zakażonych eksperymentalnie zakażały się na drodze kontaktowej zdrowe owce i jagnięta. Swoiste przeciwciała wykrywalne w odczynie hemaglutynacji pośredniej pojawiały się w surowicy zakażonych owiec pomiędzy 2 a 3 tygodniem po zakażeniu i osiągały maksymalne miano (1:256) 3 tygodnia po zakażeniu. U owiec poddanych ubojowi pomiędzy 20—25 dniem po zakażeniu oprócz obrzęku tkanki gruczołowej występowały drobne ogniska martwicze. Węzły nadwymienicowe zakażonej połówki wymienia były około dwukrotnie powiększone, o powierzchni przekroju czerwono-szarej.

G.