

ODREĐIVANJE OLOVA U KRVI I MOKRAĆI
VIZUELNIM DOKAZIVANJEM DONJE GRANICE
OSETLJIVOSTI NA HROMATOGRAMU

A. VELJANOVSKI i PAVLINA SPASOVA

Higijensko-epidemiološki odred, Skoplje

(Primljeno 5. I 1977)

Prikazana je jednostavna metoda za određivanje olova u krvi i mokraći hromatografijom na tankom sloju (HTS) bez primene posebne aparature.

Mineralizovani ostatak od 0,5 ml krvi, odnosno 5 ml mokraće, rastvori se u 6N hlorovodičnoj kiselini i nanosi u progresivno rastućim količinama na tanki sloj mikrokristalne celuloze. Olovo od ostalih metala razdvaja se razvijanjem hromatograma u razvijaju: metanol, izopropanol, voda 6M HCl, koncentrirane HNO₃, hidrogen peroksid (3 + 2 + 4 + 0,5 + 0,5 + 1). Posle otkrivanja mrlja sa 4-(2-piridilazo)rezorcinolom (PAR), olovo se određuje dokazivanjem donje granice osetljivosti (DGO) kao poslednja jedva vidljiva mrlja na hromatogramu, u zavisnosti od broja mikrolitara (μ l) u kojima je ona dokazana.

Za određivanje olova u krvi i mokraći postoji relativno velik broj metoda (ditizonske-spektrofotometrijske, polarografske, atomsko-apsorpciono-spektrofotometrijske i dr.), koje se mogu primeniti u laboratorijama opremljenim odgovarajućom aparaturom.

Hromatografijom na tankom sloju (HTS) dokazuju se (1) i određuju (2) metali pretežno iz čistih rastvora. Određivanje metala HTS može se vršiti sa dve vrste metoda (3): ekstrakcijom razdvojenih metala iz sloja i određivanjem nekom drugom metodom i direktnim određivanjem na hromatogramu — upoređivanjem mrlja sa standardima metala, merenjem površina mrlja, denzitometrijski itd.

Za određivanje olova (katjon) u krvi i mokraći ne primenjuje se HTS iz sledećih razloga: Maksimalno dozvoljena koncentracija (MDK) olova u krvi iznosi 60 μ g u 100 ml, a 80 μ g u 1000 ml mokraće. Ako se razori 1 ml krvi ili 10 ml mokraće, a ostatak rastvori u 1 ml 6M HCl, sadržaj olova iznosi 0,6 μ g, odnosno 0,8 μ g. Ovo su količine koje se mogu di-

rektno odrediti na hromatogramu. Međutim, bilo bi potrebno da se cela količina nanese na jednu tačku, što je praktično neizvodljivo, jer se radi o kiselom vodenom rastvoru. Ukoliko se i nanese cela količina na jednu tačku, onda je neizvodljivo razdvajanje metala. Nanošenjem oko 25 μl , odnosno oko 40 puta manje količine od MDK (0,015 μg i 0,02 μg), moguće je razdvajanje olova od ostalih metala. Međutim, to su količine koje se navedenim metodama ne mogu odrediti. Treba napomenuti da su ove količine još manje kada je sadržaj olova ispod MDK. Moguće je određivanje olova u krvi metodom HTS na taj način što bi se posle mineralizacije izvršila ekstrakcija olova nekom kompleksirajućom materijom (4), a zatim se odredi kompleks ili olovo posle razaranja kompleksa.

Cilj rada je razrada jednostavne metode za određivanje olova u krvi i mokraći bez primene posebne aparature.

Za rešenje ovog zadatka pošli smo od pretpostavke da je moguće određivanje olova u krvi i mokraći HTS vizuelnim dokazivanjem utvrđene donje granice osetljivosti (DGO) na hromatogramu.

MATERIJAL I METODE

Osnovni rastvor olova sa sadržajem 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pripremljen je rastvaranjem olovnog nitrata. Od osnovnog pripremani su radni rastvori sa potrebnim sadržajem olova.

Pribor za HTS, postupak pripremanja hromatografskih ploča i tehnika hromatografisanja opisani su ranije (1).

Utvrdjivanje DGO: Pripremljen je radni rastvor sa sadržajem 0,2 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Ovaj rastvor nanosi se na 16 tačaka na hromatografsku ploču u rastućim količinama od 0,5 μl do 8 μl i od 5,2 μl do 8,2 μl . Na 16. tački nanosi se oko 0,2 μg olova. Posle razvijanja hromatograma i otkrivanja mrlja, vizuelno se dokazuje DGO kao poslednja jedva vidljiva mrlja.

Obrada uzoraka krvi i mokraće: 0,5 ml krvi ili 5 ml mokraće mineralizuju se dodavanjem nekoliko puta po 2—3 ml konc. HNO_3 a ostaci se rastvore u 0,75 ml, odnosno 1 ml 6M HCl. Mineralizovani uzorak krvi ekstrahuje se sa oko 5 ml etra mućkanjem oko pola min. Kada se slojevi odvoje, etar se baci, a kisela vodena faza se prenese u mikrošpic za nanošenje na hromatografske ploče.

Nanošenje rastvora na hromatografske ploče vrši se u količinama navedenim u tablici 1. Prvo se nanose količine navedene pod I, radi približnog određivanja sadržaja olova, odnosno određivanja količine rastvora u mikrolitrima u kojoj je dokazana DGO. Ovim se istovremeno vrši izbor količina rastvora koje treba naneti na hromatografsku ploču (II—VI) za određivanje olova. Na 16. tački nanosi se standard olova oko 0,2 μg .

Hromatogram se razvija u otvorenoj S-»komori« u razvijaču: metanol, izopropanol, voda, 6M HCl, konc. H_2O_2 , hidrogen peroksid (3 ml

Tablica 1.

Volumen rastvora (μl) koji treba nanositi na hromatografske ploče za određivanje olova u krvi i mokraći

Razvijanje hromato- grama	Tačke na hromatogramu															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
I.	1	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5	5,5	6	7	8	9	10	11	12
II.	2,2	2,4	2,6	2,8	3	3,2	3,4	3,6	3,8	4	5	6	7	8	9	10
III.	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2	5,4	5,6	5,8	6	7	8	9	10	11	12
IV.	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8	9	10	11	12	13	14
V.	8,2	8,4	8,6	8,8	9	9,2	9,4	9,6	9,8	10	11	12	13	14	15	16
VI.	10,2	10,4	10,6	10,8	11	11,2	11,4	11,6	11,8	12	13	14	15	16	17	18

+ 2 ml + 4 ml + 0,5 ml + 0,5 ml + 1 ml). Razvijanje hromatograma vrši se u trajanju oko 30 min (front 6—7 cm).

Otkrivanje mrlja: Posle razvijanja, hromatogram se suši vrućim vazduhom (fen) ili 5 min u sušnici na 105 °C. Kada se ploča ohladi, hromatogram se isprska 0,1 %-tnim rastvorom piridil-azoresoreinola (PAR) u 80 %-tnom etanolu i stavi u komoru zasićenu amonijačnim parama. Posle nekoliko minuta hromatogram se izvadi iz komore i odmah vizuelno dokazuje DGO kao poslednja jedva vidljiva mrlja.

U istim uzorcima krvi vršeno je i polarografsko određivanje olova (5).

Preračunavanje sadržaja olova:

a) Koncentracija olova u krvi:

$$\frac{[\text{Pb}]}{\mu\text{g}/100 \text{ ml}} = \frac{m_{\text{DGO}}/\text{ng}}{v_{\text{DGO}}/\mu\text{l}} \cdot \frac{v_{\text{a}}/\text{ml}}{v_{\text{uz}}/\text{ml}} \cdot 100$$

b) Koncentracija olova u mokraći:

$$\frac{[\text{Pb}]}{\mu\text{g}/1000 \text{ ml}} = \frac{m_{\text{DGO}}/\text{ng}}{v_{\text{DGO}}/\mu\text{l}} \cdot \frac{v_{\text{a}}/\text{ml}}{v_{\text{uz}}/\text{ml}} \cdot 1000$$

m_{DGO} — donja granica osetljivosti, izražena kao masa

v_{DGO} — volumen u kojemu je nađena m_{DGO}

v_{a} — volumen mineralizovanog ostatka

v_{uz} — volumen uzorka krvi ili mokraće

REZULTATI I DISKUSIJA

Utvrđivanje DGO olova: Izvršeno je po 20 određivanja olova vizuelnim dokazivanjem DGO na hromatogramu, posle nanošenja standardnog rastvora sa sadržajem olova 0,2 ng/ μl na 16 tačaka na hromatografskoj ploči u progresivno rastućim količinama od 0,5 μl do 8 μl i od 5,2 μl do 8,2 μl . Dobijeni rezultati prikazani su u tablici 2.

Iz prikazanih rezultata vidi se da je DGO olova dokazana jedan put u 5,5 μl , 11 puta u 6 μl , 7 puta u 6,5 μl i jedan put u 7 μl (od 11. do 14. tačke). Aritmetička sredina (\bar{x}), tj. DGO iznosi 1,24 ng sa greškom (2 KV) 11%.

Nanošenjem standardnog rastvora od 5,2 μl do 8,2 μl , DGO dokazana je 2 puta u 5,8 μl , 10 puta u 6 μl , 7 puta u 6,2 μl i jedan put u 6,4 μl (od 29. do 32. tačke). Standardna devijacija (0,03) i greška (4,65%) znatno su manje u odnosu na vrednosti dobijene kod dokazivanja DGO posle nanošenja rastvora od 0,5 μl do 8 μl , iz čega proizlazi da je utvrđena DGO (1,214 ng) tačnije određena.

Određivanje olova u krvi: Posle utvrđivanja DGO, određivano je olovo u krvi i mokraći radnika zaposlenih na mestima štetnim po zdravlje. Krv je uzimana iz vene, i to 5 ml za polarografsko, a 0,5 ml za određi-

Tablica 2.

Rezultati utvrđivanja donje granice osetljivosti olova na hromatogramu

Dokazana DGO		\bar{x} /ng	± 2 SD	± 2 KV
tačka na hromatogramu	m_{DGO}/ng			
11.	1 X 1,1	1,24	0,068	10,97
12.	11 X 1,2			
13.	7 X 1,3			
14.	1 X 1,4			
29.	2 X 1,16	1,214	0,028	4,65
30.	10 X 1,20			
31.	7 X 1,24			
32.	1 X 1,28			

Tablica 3.

Rezultati određivanja olova u krvi dokazivanjem utvrđene DGO na hromatogramu

Razvijanje	[Pb]			\bar{x}	± 2 SD	2 KV	μg Pb POLAR.
	$\mu g/100$ ml						
I	10.	2	X 30,35	34,49	4,27	12,39	33,2
	9.	8	X 33,11				
	8.	10	X 36,42				
Razrađeno sa 6M HCl 1 : 1							
VI	57.	2	X 31,40	32,35	1,18	3,64	"
	56.	7	X 31,94				
	55.	6	X 32,35				
	54.	5	X 33,10				
I	4.	1	X 60,70	74,05	13,69	18,49	70,72
	3.	17	X 72,84				
	2.	2	X 91,05				
Razređeno sa 6M HCl 1 : 1							
V	33.	1	X 65,04	69,96	4,12	5,73	"
	32.	3	X 67,44				
	31.	12	X 70,04				
	30.	4	X 72,84				

vanje olova dokazivanjem utvrđene DGO na hromatogramu. Da bi se ispitala pouzdanost i tačnost metode, izvršeno je po 40 određivanja olova u dva uzorka krvi: sa sadržajem olova ispod i iznad MDK. Rezultati određivanja olova prikazani su u tablici 3.

Iz prikazanih rezultata vidi se da je u krvi sa sadržajem olova $33,2 \mu\text{g}$ u 100 ml (polarografski), vizuelnim dokazivanjem DGO određivana količina olova od $30,4 \mu\text{g}$ do $36,4 \mu\text{g}$ u 100 ml krvi, kada se na hromatogramu nanose količine navedene u tablici 1. pod I. Budući da je greška iznad 10% (12,4%), dobijeni rezultati su polukvantitativni. Kada se ne raspolaže sa dovoljno vremena, ovi rezultati, iako polukvantitativni, mogu biti prihvatljivi, zato što se radi o sadržaju olova znatno ispod MDK. Iz iznetog proizlazi da se dobijaju dovoljno tačni rezultati i kod I razvijanja hromatograma, odnosno kada se dokazuje DGO od 8. do 10. tačke, te nije potrebno još jedno razvijanje hromatograma.

Za tačnije određivanje sadržaja olova neophodno je da se ispitivani rastvor razredi sa 6M HCl u odnosu 1 : 1. U zavisnosti od broja mikrolitara u kojima je dokazana DGO kod I razvijanja, odaberu se količine rastvora koje treba nanositi na hromatogram za drugo razvijanje (od II do VI). Od razređenog uzorka na hromatogram se nanose količine navedene u tablici 1. pod VI. Posle množenja rezultata sa dva, određivane količine olova kreću se od $31,4 \mu\text{g}$ do $33,1 \mu\text{g}$ u 100 ml krvi. Kod polarografskog određivanja olova u 5 ml krvi polarografski talas iznosi 19 mm ($1,66 \mu\text{g}$), tj. $33,2 \mu\text{g}$ u 100 ml krvi. Ukoliko se pogreši za 1 mm (18 ili 20 mm), određena količina bi iznosila $31,2 \mu\text{g}$ ili $37,2 \mu\text{g}$ olova u 100 ml, odnosno razlika iznosi $6 \mu\text{g}$. Kod određivanja olova vizuelnim dokazivanjem DGO razlika između 54. i 57. tačke iznosi svega $1,7 \mu\text{g}$ u 100 ml krvi. Iz iznetog proizlazi da je mogućnost za grešku manja kod određivanja olova vizuelnim dokazivanjem DGO, kada se na hromatogram nanose takve količine da se DGO dokazuje oko 55. tačke, pri čemu je devijacija rezultata mala a greška iznosi svega 3,6%.

U uzorku krvi sa sadržajem $70,72 \mu\text{g}$ olova u 100 ml (polarografski), određivana količina olova kod I razvijanja hromatograma kreće se od $60,7 \mu\text{g}$ do $91,5 \mu\text{g}$ u 100 ml krvi u zavisnosti od dokazane DGO na 2. ili 4. tački. Devijacija rezultata (13,7) i greška (18,5%) jesu velike te je i određivanje polukvantitativno. Budući da se radi o količinama olova iznad MDK, neophodno je da se izvrši drugo razvijanje hromatograma posle razređivanja ispitivanog rastvora. I u ovom slučaju izvršeno je razređivanje sa 6M HCl u odnosu 1 : 1, da bi se utvrdila greška kod nanošenja manjih količina rastvora sa većim sadržajem olova. Kod drugog razvijanja hromatograma nanose se količine rastvora navedene u tablici 1. pod III. Posle množenja rezultata sa dva, određivana količina olova kreće se od $65,04 \mu\text{g}$ do $72,84 \mu\text{g}$ u 100 ml krvi. U odnosu na razvijanje hromatograma sa nanosenim količinama navedenim u tablici 1. pod VI, devijacija rezultata i greška znatno su veće. S obzirom na to da je greška 5,7%, određivanje olova dokazivanjem utvrđene DGO oko 30. tačke je kvantitativno.

Iz iznetog se može zaključiti da se razređivanjem ispitivanih rastvora, odnosno nanošenjem većih količina rastvora na hromatogram, kod određivanja olova vizuelnim dokazivanjem utvrđene DGO na hromatogramu, dobijaju tačniji rezultati.

Budući da se radi o rastvoru olova u 6M HCl, nanošenje većih količina na hromatogram zahteva i više vremena, što ne bi bio slučaj kada se radi sa organskim rastvaračima. Ovaj nedostatak otklonjen je nanošenjem rastvora mikrošpicem (μl podeljen na 5 delova), tako da nanošenjem na sve tačke po 5 μl , a zatim po 0,2 μl u progresivno rastućim količinama, kada se DGO dokaže na 10. tački (5 μl + 10 X 0,2 μl), praktično to je 35. tačka.

Da bi se vizuelno DGO na hromatogramu dokazivala bez smetnji, neophodno je da se olovo razdvoji od ostalih metala iz normalnog sadržaja u krvi i mokraći. Ispitan je veliki broj razvijaača sa ciljem da se pronađe takav koji bi sve metale, osim olova, ostavljao na startu ili nosio sa frontom. Od raznih kombinacija rastvarača i kiselina razvijaač sastavljen od sledećih komponenata: metanol, izopropanol, voda, 6M HCl, konc. HNO_3 , hidrogen peroksid (3+2+4+0,5+0,5+1), sve metale iz normalnih sadržaja krvi i mokraće nosi bliže frontu razvijaača a olovo u sredini hromatograma.

Kada se na hromatogram nanose mineralizovani uzorci krvi bez prethodne ekstrakcije sa etrom i sa ovim razvijaačem, gvožđe stvara repove koji ometaju vizuelno dokazivanje DGO olova na hromatogramu. Zato je neophodno da se gvožđe, bar delimično, ukloni iz mineralizovanog ostatka krvi.

Nisu uspeli pokušaji da se pronađe razvijaač kojim bi se samo olovo diglo sa starta, a ostali metali iz normalnog sadržaja zadržali na startnim tačkama.

Hromatogram u otvorenoj S-»komori« razvija se u trajanju od oko 30 min, za koje se vreme front razvijaača podigne na 6—7 cm. Za ovo vreme drugi metali dovoljno se razdvoje od olova i moguće je nesmetano dokazivanje DGO na hromatogramu. Razvijanje hromatograma do 10 i više cm bilo bi gubljenje vremena, jer se na poslednjoj, 16. tački nanosi standard olova.

Otkrivanje mrlja na hromatogramu vršeno je i sa kalijum tiokarbonatom, međutim, on je nepogodan za određivanje olova u krvi i mokraći iz sledećih razloga: posle otkrivanja mrlja ovim reagensom, vizuelnim dokazivanjem DGO na hromatogramu iznosi 12,05 ng. Ukoliko se utvrđenim postupkom u ispitivanom uzorku DGO dokaže u 10 μl , najmanje bismo mogli da odredimo oko 180 μg olova u 100 ml krvi, što je oko 3 puta veća količina od MDK. Ispitivanjem većeg broja reagenasa za otkrivanje mrlja, najpogodniji se pokazao 0,1%-tni rastvor PAR u 80%-tnom etanolu. Ovim reagensom utvrđena DGO olova je oko 10 puta manja od utvrđene DGO posle otkrivanja mrlja kalijum tiokarbonatom (1,214 ng : 12,5 ng). Otkrivanjem mrlja PAR-om olovo se može odrediti u količinama od oko 10 μg u 100 ml krvi, odnosno 1000 ml mokraće.

ZAKLJUČCI

Razrađenim postupcima za prethodnu obradu uzoraka krvi i mokraće, nanošenje rastvora na hromatografske ploče, otkrivanje mrlja i dokazivanje DGO na hromatogramu zaključeno je:

1. Razvijatelj: metanol, izopropanol, voda, 6M HCl, konc. HNO₃, hidrogen peroksid (3 + 2 + 4 + 0,5 + 0,5 + 1), razdvaja olovo od ostalih metala iz normalnog sadržaja krvi i mokraće i omogućava vizuelno dokazivanje DGO na hromatogramu.

2. Otkrivanjem mrlja na hromatogramu PAR-om utvrđena DGO olova kao poslednja jedva vidljiva mrlja na hromatogramu iznosi 1,214 ng, čime je omogućeno određivanje olova u krvi i mokraći u količinama oko 6 puta manjim od MDK.

3. Razređivanjem ispitivanih rastvora i nanošenjem većih količina na hromatogram, odnosno dokazivanjem utvrđene DGO u većem broju mikrolitara, smanjuje se greška metode i kod dokazivanja DGO oko 55. tačke ona iznosi 3,6%.

4. Razrađena metoda za određivanje olova u krvi i mokraći vizuelnim dokazivanjem utvrđene DGO na hromatogramu zahteva mali broj hemikalija i pribor koji se može napraviti od priručnih sredstava, a nije potrebna posebna aparatura.

5. Metoda je jednostavna i pogodna za rad u slabije opremljenim laboratorijama i u terenskim uslovima rada.

6. Za određivanje olova u krvi i mokraći ovom metodom potrebno je 3—4 časa.

7. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je hipoteza postavljena u ovom radu dokazana.

Literatura

1. Veljanovski, A.: Vojnosanit. pregl., 33 (1976) 234.
2. Veljanovski, A.: Vojnosanit. pregl., 34 (1977) 25.
3. Fopiano, R., Brown, B. B.: J. Pharm. Sci., 54 (1965) 206.
4. Biala, D.: Bromatol. chem. Toksikol., 7 (1974) 63.
5. Jovanović, D., Stojadinović, Lj., Spasojević, B.: Vojnosanit. pregl., 24 (1967) 405.

*Summary*DETERMINATION OF LEAD IN BLOOD AND URINE BY
VISUAL IDENTIFICATION OF THE LOWER SENSITIVITY
LIMIT ON A CHROMATOGRAM

A simple method for the determination of lead in blood and urine by thin layer chromatography (TLC) without use of a special equipment is described.

A mineralized residue of 0.5 ml blood or 5 ml urine is dissolved in 6N hydrochloric acid and mounted in progressively increasing quantities to a thin layer of microcrystal cellulose. Lead is separated from other metals by devel-

opment of chromatograms in a solvent system: methanol — isopropanol — water — 6M HCl — conc. HNO₃ — hydrogen peroxide (3 — 2 — 4 — 0.5 — — 0.5 — 1). After the spots are detected with 4-(2-pyridylazo) resorcinol (PAR) lead is determined by means of the lower sensitivity limited as the last hardly visible spot on the chromatogram.

*Division of Hygiene and
Epidemiology, Škopje*

*Received for publication
January 5, 1977*