

Arh. hig. rada, 26 (1975) 129.

USPOREĐIVANJE TOČNOSTI I PRECIZNOSTI
DVIJU METODA ZA ODREĐIVANJE
OLOVA U KRVI

KATA VOLODER, O. A. WEBER, N. IVIČIĆ, S. KOZAR
i B. MATIJEVIĆ

*Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada JAZU
i Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb*

(Primljeno 25. II 1975)

Uspoređene su dvije osjetljive, brze i pristupačne analitičke metode za određivanje olova u punoj krvi ljudi: apsorpcijsko-spektrofotometrijska ditizonska i voltometrijska metoda. Metode su bile razrađene u vlastitom laboratoriju i obje su pojedinačno objavljene. Spektrofotometrijska »jednobojna ditizonska metoda« za određivanje malih količina olova u krvi (5 ml) objavljena je 1952. god., a 1971. god. ona je donekle poboljšana i prilagođena za manje uzorke krvi (2 ml). Obje se metode osnivaju na reakciji ditizona s olovom pri dosta visokom pH (10,5). Elektrokemijskom akumulacijom i anodnom oksidacijom olova na visećoj Hg elektrodi, te voltamperijskim određivanjem pomoću d. c. polarografske tehnike može se postići osjetljivost od 5 μg Pb/100 ml u uzorku od svega 0,2 ml krvi. Analizirano je deset uzoraka krvi ljudi, koji nisu bili profesionalno izloženi olovu. Rezultati određivanja voltametrijskom metodom znatno su viši nego rezultati ditizonskog određivanja u koncentracijskom području do 10 μg Pb/100 ml krvi, a u području viših koncentracija slaganje s ditizonskom metodom zadovoljava.

Do sada su objavljene mnogobrojne analitičke metode za određivanje tragova olova u različitim materijalima. Unatoč znatnom napretku u analitičkoj instrumentaciji i metodama (1) određivanja, određivanje olova u krvi još je razmjerno velik problem za kliničkog kemičara, jer se metode opisane u literaturi međusobno prilično malo podudaraju s obzirom na rezultate koji se tim metodama dobivaju.

Svrha ovog rada bila je uspoređivanje točnosti i preciznosti dviju analitičkih metoda — apsorpcijsko spektrofotometrijske (Dz) i voltametrijske (ASV) — za određivanje olova u punoj krvi. Metode su razradili neki od sadašnjih autora i obje su pojedinačno objavljene (2—4).

EKSPERIMENTALNI DIO

Osnovni analitički zahtjev pri određivanju olova jest postizavanje najvišeg stupnja čistoće posuđa, reagensija i uzimanja uzoraka, a i samog postupka određivanja.

Spektrofotometrijski postupak sastoji se u tome da se mokrim spljivanjem krvi sa HNO_3 i H_2O_2 provede potpuno razaranje i eliminacija svih organskih komponenti biološkog materijala. Zatim se uklone ioni željeza 2%-tnom vodenom otopinom kupferona pri čemu nastaje Fe-kupferat koji se ekstrahira sa CCl_4 . Sadržaj olova određuje se spektrofotometrijski kao Pb-ditizonat nakon ekstrakcije s otopinom ditizona u tetraklormetanu iz mineralizirane otopine (2, 3).

Postupak primijenjen pri određivanju olova voltametrijskom metodom (4) sastoji se u slijedećem: krv se mineralizira sa HNO_3 i H_2O_2 , a ostatak od mineralizacije krvi otopi se u 25 ml 2M HCl i polarografira uz elektrodu viseće kapi (HMDE) i referentnu elektrodu (ZKE Ag/AgCl). Zatim se zabilježi voltametrijska krivulja oksidacije Pb iz amalgama, linearno mijenjajući potencijal (800 mV/min) od $-0,7$ V do $+0,2$ V. Na dobivenim voltamogramima val Pb kod $E_p = 0,45$ V proporcionalan je koncentraciji metala. Mjerenja se vrše pri $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$.

REZULTATI I DISKUSIJA

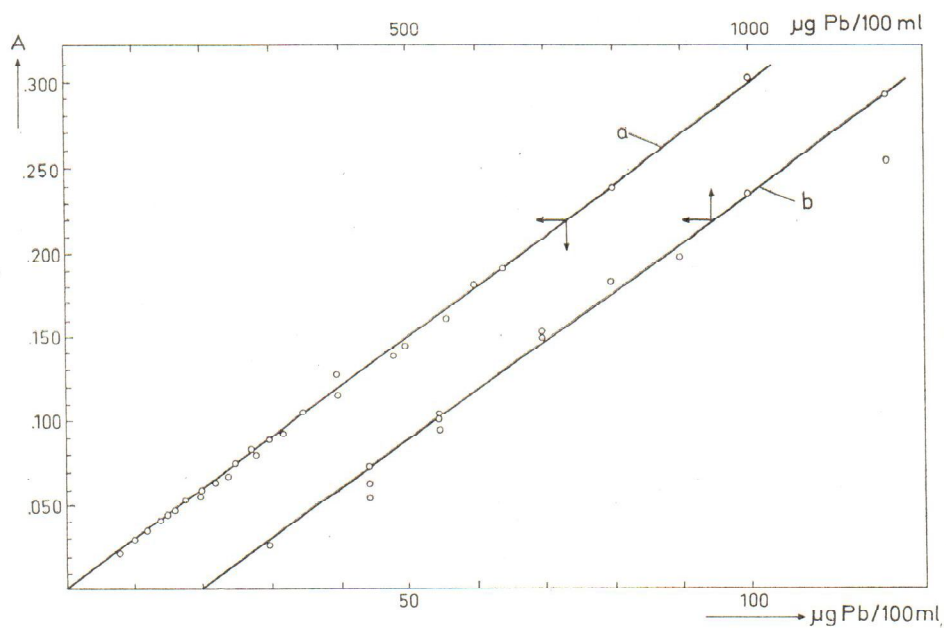
Spektrofotometrijska »jednobojna ditizonska metoda« za određivanje malih količina Pb u krvi (5 ml) objavljena je 1952. god. (2), a 1971. god. (3) ona je donekle poboljšana i prilagođena za manje uzorke krvi (2 ml) i za koncentracijsko područje od 10 do 100 $\mu\text{g}/100$ ml krvi. Obje se metode osnivaju na reakciji ditizona s ionima olova pri dosta visokom pH (10,5), ali modificirana metoda ima nekoliko prednosti u odnosu na izvornu:

1. Osjetljivost metode je povećana
2. Količina krvi potrebna za analizu je manja
3. Vrijeme potrebno za određivanje olova je kraće.

Iako je preciznost određivanja nešto smanjena s obzirom na izvornu metodu, modificirana je metoda dovoljno točna i jednostavna, te zadovoljava zahtjeve praktične toksikologije.

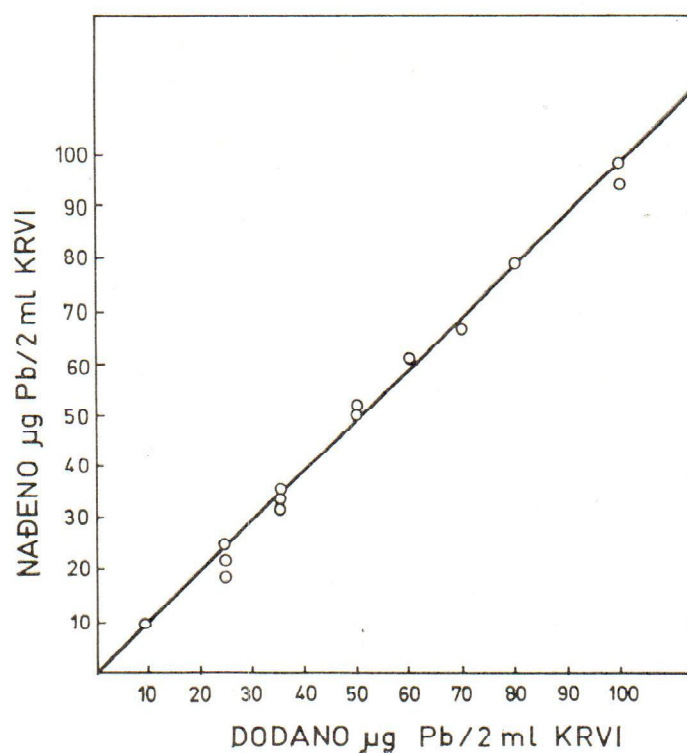
Dobiveni rezultati spektrofotometrijskog određivanja bili su podvrgnuti regresijskoj analizi, a prikazani su na sl. 1—3. i tablici 1.

Na slici 1. regresijski pravac (a) prikazuje rezultate mjerenja pripremljenih 26 vodenih otopina različitih koncentracija olova. Otopine nisu bile podvrgnute postupku mineralizacije pomoću HNO_3 , a nije bilo dodano ni željezo. Regresijski pravac prolazi kroz ishodište. Regresijski pravac (b) na istoj slici dobiven je za biološki materijal pri čemu je analizirano 15 uzoraka sa 2 ml iste krvi i 5 uzoraka s 1 ml krvi. Ti su podaci dobiveni metodom »unutrašnjeg standarda«.



Sl. 1. Baždarni pravac za određivanje olova u anorganskom (a) i biološkom (b) materijalu ditizonskom metodom

Na slici 2. prikazana je korelacija između dodane i nađene količine olova. Dobiveni koeficijent korelacije ($r = 0,997$) upućuje na veoma visoki stupanj korelacije.



Sl. 2. Odnos dodane i nađene količine Pb u krvi ditizonskom metodom

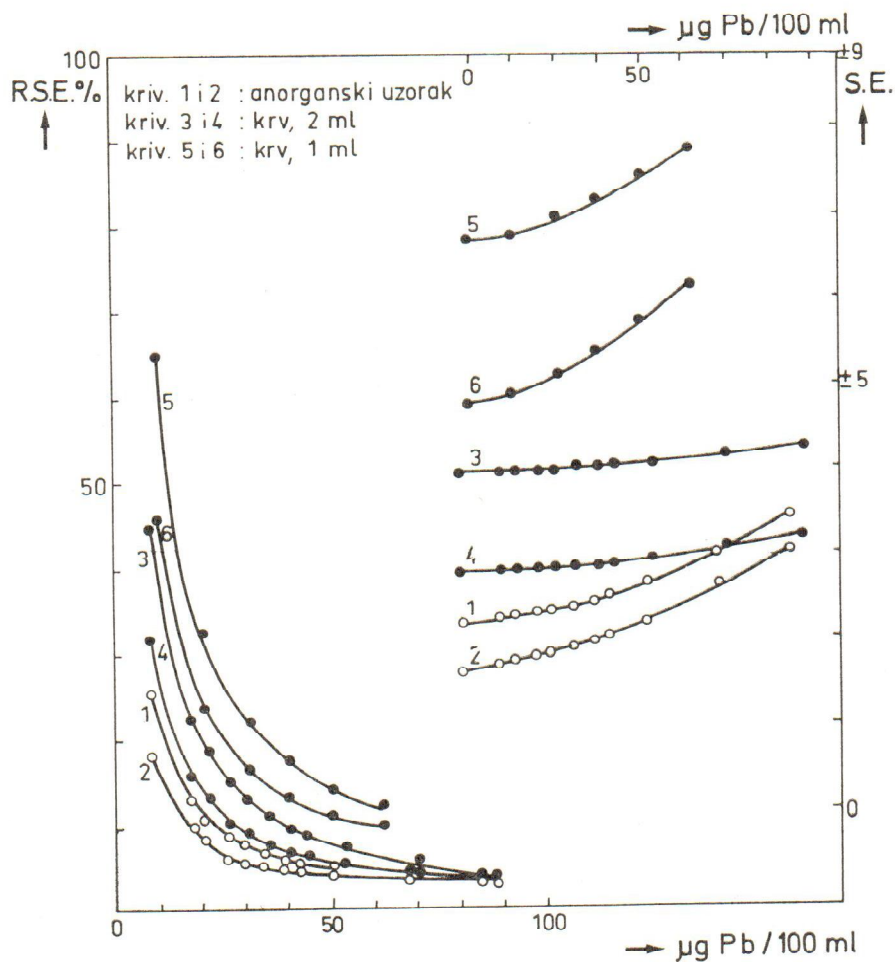
Tablica 1.

Nagibi regresijskih pravaca (b) i odgovarajuće standardne (SE) i relativne standardne pogreške (RSE) pri određivanju olova ditizonskom metodom

Uzorak	N	$10^3 b' \pm SE(b')$	SE(c) ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	RSE(%)
Anorganski	26	$0,2931 \pm 0,0081$	2,22—3,5 1,6 —3,1*	25—5 19—4*
Krv, 2 ml	15	$0,2827 \pm 0,0058$	3,9 —4,4 2,8 —3,3*	45—4 32—4*
Krv, 1 ml	6	$0,241 \pm 0,010$	6,7 —7,8 4,8 —6,3*	65—15 47—12*

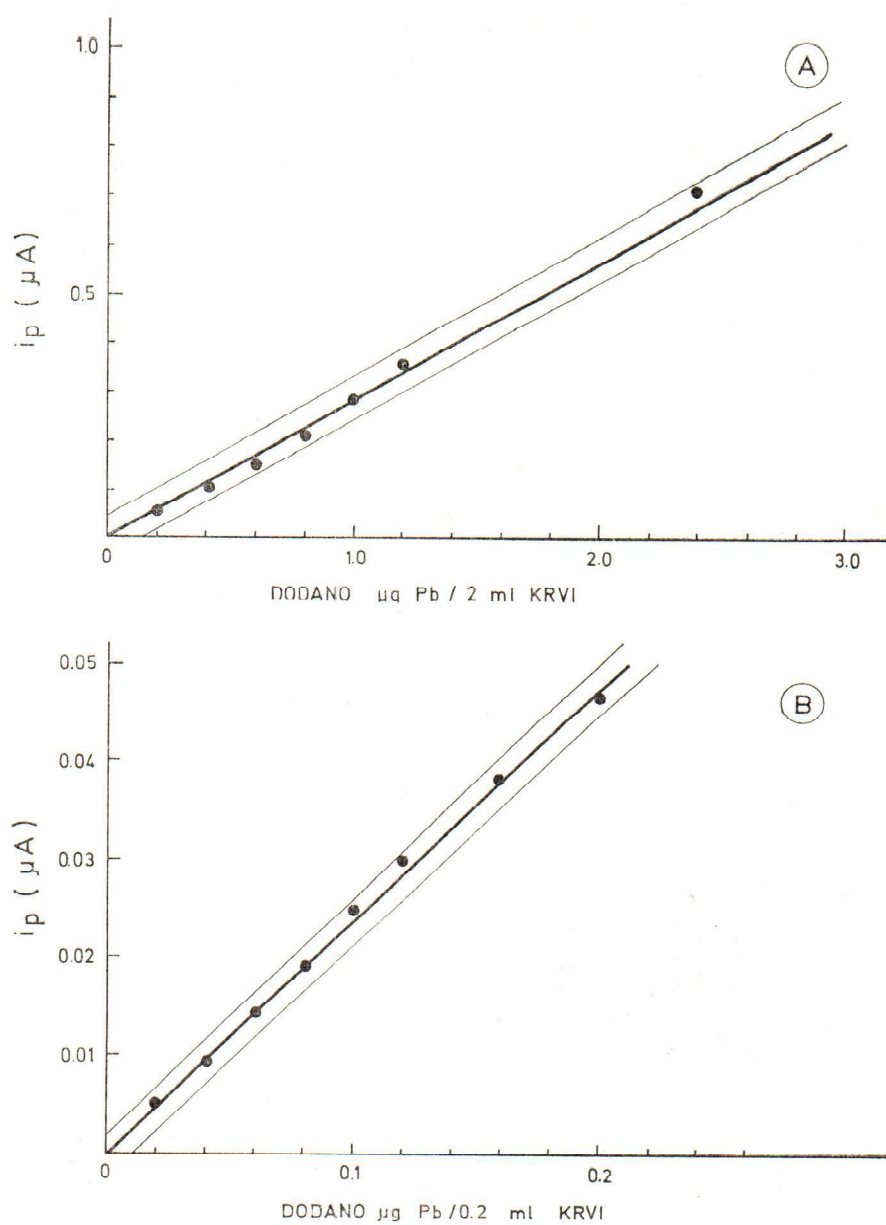
* Podaci za dva usporedna uzorka

U tablici 1. prikazani su parametri regresijskih pravaca. Tako se nagib pravca za uzorak krvi od 1 ml pojedinačno signifikantno razlikuje od nagiba drugih dvaju pravaca (anorganski materijal i uzorak krvi od 2 ml). Za sve praktične svrhe regresijski pravac za anorganski materijal može se upotrijebiti pri procjeni koncentracije Pb u krvi.



Sl. 3. Standardne pogreške (SE) i relativne standardne pogreške (RSE) određivanja Pb u anorganskom (o) i biološkom (●) materijalu ditizonskom metodom za koncentracijsko područje od 10 do 100 µg Pb/100 ml

Na slici 3. prikazane su standardne pogreške (SE) i relativne standardne pogreške (RSE) određivanja olova u anorganskom i biološkom materijalu spektrofotometrijskom metodom pri čemu se:



Sl. 4. Regresijski pravci (90% granica pouzdanosti) za struju vrha (i_p) u ovisnosti o količini dodanog olova u 2,0 ml krvi (pravac A) i 0,2 ml krvi (pravac B)

krivulje 1 i 2 odnose na anorganski materijal, a dobivene su analizom dvaju paralelnih uzoraka;

krivulje 3 i 4 odnose se na uzorke krvi od 2 ml kada su izvršena dva usporedna određivanja istog uzorka;

krivulje 5 i 6 odnose se na 1 ml krvi uz iste uvjete kao i za uzorke od 2 ml krvi.

Prednost pred ditizonskom metodom i nekim drugim analitičkim metodama ima voltametrijska (anodic stripping) metoda. Prednosti te metode jesu:

1. volumen potreban za analizu iznosi 0,2 do 2,0 ml krvi;

2. ne smetaju kationi koje normalno krv sadržava, npr. željezo, pa ih ne treba uklanjati iz mineraliziranog uzorka prije određivanja olova. Međutim, prisutnost i najmanjih tragova HNO_3 smanjuje osjetljivost određivanja, a može i potpuno poništiti mjerni signal;

3. reproducibilnost provjerena na mnogo uzoraka zadovoljava;

4. metoda je jednostavna, vrlo osjetljiva, zahtijeva malo vremena, a istodobno se unosi vrlo malo vanjskih onečišćenja u toku izvođenja postupka, jer je a) posuđe (silikonizirano, prano sa HNO_3 i isprano tetra-destiliranom vodom), b) upotrebljava se malo kemijskih reagensa (potrebno samo HNO_3 , HCl , H_2O_2 i Hg).

Rezultati dobiveni voltametrijskom metodom u anorganskom i biološkom materijalu (krv) prikazani su na sl. 4. i tablicama 2—4. Izrađeni su regresijski pravci za anorganski materijal u koncentracijskom području od 2×10^{-8} M do $2,4 \times 10^{-6}$ M i za krv, koji je volumen iznosio 0,2 ml odnosno 2,0 ml, i to metodom »unutrašnjeg standarda«. Rezultati dobiveni za anorganski materijal prikazani su u tablici 2, a rezultate dobivene za 2 ml i 0,2 ml krvi prikazuje sl. 4. Analizirano je 7 uzoraka po 2 ml krvi (pravac A) i osam uzoraka po 0,2 ml krvi (pravac B). Razlike između dodane i nađene količine olova leže unutar 95%-tnih granica pouzdanosti.

Tablica 2.

Regresijski pravac za polarografsko određivanje olova u anorganskom materijalu; struja vrha i_p (μA) u ovisnosti o koncentraciji olova (μg)

Standardna otopina PbCl_2	μg Pb u 25 ml elektrolita	Struja vrha μA
2×10^{-8} M	0,02	0,0051
	0,04	0,0107
	0,06	0,0152
	0,08	0,0200
	0,10	0,0267
1×10^{-7} M	0,14	0,0370
	0,18	0,0459
	0,20	0,0536
	0,40	0,0940
	0,60	0,1430
	0,80	0,1920
	1,00	0,2920
1×10^{-6} M	1,20	0,3660
	2,40	0,7280

Testiranjem nagiba dobivenih regresijskih pravaca utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između nagiba za anorganski materijal i nagiba pravca za 2 ml krvi.

Pri uspoređivanju točnosti i preciznosti ovih dviju analitičkih metoda analizirano je deset uzoraka pune krvi ljudi koji nisu bili profesionalno izloženi olovu.

Tablica 3.

Koncentracije olova u krvi čovjeka ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$) određene ditizonskom (Dz) i voltometrijskom (ASV) metodom

Uzorak br.	Analitička metoda	
	Dz	ASV
$\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$		
1	20,0	25,5
2	15,0	19,5
3	14,0	18,0
4	6,0	15,5
5	3,0	13,5
6	2,0	9,5
7	17,0	18,5
8	21,0	22,5
9	12,0	16,0
10	37,0	34,0

Isti uzorci krvi bili su analizirani ditizonskom (2 ml krvi) i ASV (0,2 ml krvi) metodom po dva usporedna uzorka za svaku metodu i izračunat je koeficijent korelacije između tih dviju metoda koji iznosi 0,968.

Dobiveni rezultati upućuju na činjenicu da ditizonska metoda u ovoj varijaciji, tj. za uzorak krvi od 2 ml, nije prikladna za koncentracije manje od $10\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ krvi jer je to granica osjetljivosti te metode, pa je u tom području već za male apsolutne razlike relativna pogreška velika. Za područje niskih koncentracija točnije i pouzdanije je voltometrijsko određivanje. Ako se ditizonska metoda mora primijeniti za područje niskih koncentracija, onda treba uzeti veći volumen krvi. U području viših koncentracija olova slaganje voltometrijskog određivanja s ditizonskim zadovoljava.

U tablici 4. zbirno su prikazani rezultati dobiveni obim metodama. ASV metoda omogućava rad s manjim uzorcima krvi što predstavlja veliku prednost pri primjeni za kliničko-biokemijske i toksikološke svrhe. Izračunati koeficijent korelacije pokazuje u prosjeku visok stupanj slaganja rezultata dobivenih spektrofotometrijskom i ASV metodom, uz napomenu da je slaganje u području veoma niskih koncentracija slabije, dok je, naprotiv, u području viših ili visokih koncentracija olova u krvi slaganje vrlo dobro.

Tablica 4.

Usporedba ditizonske (Dz) i voltametrijske (ASV) metode pri određivanju olova u krvi čovjeka

Red. br.	Analitički podaci	Analitička metoda	
		Dz	ASV
1.	Volumen krvi (ml)	2,0— 10,0	0,2 — 2,0
2.	Koncentracijsko područje ($\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$)	10 —100	5 —100
3.	Osjetljivost metode $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ krvi	10	5
4.	Standardna pogreška $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ krvi	2,2— 3,5	0,14— 0,24
5.	Koeficijent korelacije (anorg. i biol. mater.)	0,997	0,999

Koeficijent korelacije između ditizonske i ASV-metode iznosi 0,968, značajnost na razini $P < 0,001$.

Literatura

1. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation*, Interscience Publ., New York, Vol. 1/1960, 2/1963, 7/1968.
2. Weber, O. A., Voloder, K., Vouk, V. B.: *Arh. hig. rada*, 3 (1952) 296.
3. Voloder, K., Ivičić, N., Svirig, B.: *Microchimica Acta*, 341—347 (1971).
4. Voloder, K., Branica, M., Ivičić, N., Eder-Trifunović, J.: *Proceedings, International Symposium Environmental Health Aspects of Lead*, Amsterdam, 1972, Commission of European Communities, Luxemburg, 1973. 1091.

Summary

COMPARISON OF ACCURACY AND RELIABILITY OF TWO METHODS FOR THE DETERMINATION OF LEAD IN BLOOD

Two sensitive, fast and easily performed analytical procedures for the determination of lead in whole blood have been compared: spectrophotometric dithizone method and voltametric method. Both methods were developed and published separately by some of the present authors.

The spectrophotometric »monocolour« dithizone method for the determination of small amounts of lead in blood (5 ml) was published in 1952 and in 1971 it was improved and adapted for small blood samples (2 ml). In both methods the dithizone reaction is performed at a rather high pH value (10.5).

By electrochemical deposition followed by anodic oxidation of lead on the dropping mercury electrode and subsequent voltametric determination using a d. c. polarographic technique a sensitivity of $5\ \mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ in a sample of only 0.2 ml can be achieved.

Ten blood samples of humans with no known previous occupational exposure to lead were analyzed. The results obtained with the voltametric method were considerably higher than those obtained with the dithizone method in the concentration range up to $10\ \mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$. At higher concentrations the two methods showed a satisfactory agreement.

Institute for Medical Research and Occupational Health, and Rudjer Bošković Institute, Zagreb

Received for publication February 25, 1975