

POLAROGRAFSKO ODREĐIVANJE KADMIJUMA U BIOLOŠKOM MATERIJALU

D. JOVANOVIĆ, L. J. STOJADINOVIĆ, B. SPASOJEVIĆ,
J. BUGARIĆ

Higijenski institut, Ujnomedicinska akademija, Beograd

(Priljeno 16. II 1968)

Opisana je polarografska metoda za direktno određivanje kadmijuma u mokraći i krvi. Kadmijum se u mokraći kvantitativno taloži kalcijum hloridom u slabo kiselj sredini. Talog se odvaja centrifugovanjem. Organske materije u talogu mineralizuju se perhlornom kiselinom. Uzorak krvi delimično se mineralizuje azotnom kiselinom, gvožđe prevede u hlorid i ekstrahuje etiletrom zajedno sa masnim materijama. Potpuna mineralizacija vrši se sumpornom i perhlornom kiselinom.

Mineralizovani ostatak rastvori se u 1 M NaCl i kadmijum odredi polarografski.

Kadmijum može dospeti u organizam pri izloženosti dejstvu ovog metala u industriji ili, u manjoj meri, sa vodom za piće i životnim namirnicama.

O trovanju kadmijumom u industriji postoji niz podataka, dok su mogućnosti unošenja veoma malih količina u organizam putem vode i hrane manje poznate.

Lim za trajno konzervisanje namirnica sadrži izvesne količine kadmijuma, usled čega se u takvim namirnicama često nađe oko 0,05 mg/kg kadmijuma (1). U superfosfatu, veštačkom đubrivu čija je primena u poljoprivredi veoma raširena, utvrđeno je prisustvo oko 7 mg/kg kadmijuma (2), što može dovesti do pojave ovog metala u nekim namirnicama biljnog porekla. Iz vodovodnih cevi od galvanizovanog gvožđa ili od plastičnih masa izvesne količine kadmijuma mogu preći u vodu za piće. Sem navedenih, postoje i druge mogućnosti unošenja kadmijuma u organizam (3).

Mehanizam dejstva kadmijuma nije u potpunosti razjašnjen, ali je prihvaćeno mišljenje da ovaj metal deluje kao opšti inhibitor fermentnih sistema. Eksperimentima na pacovima utvrđeno je da se pod utica-

jem kadmijuma smanjuje oksidacija fenola i usporava stvaranje glikogena u dijafragmi. Sem toga, dejstvom ovog metala onemogućena je oksidativna fosforilacija u mitohondrijama jetre eksperimentalnih životinja. Kadmijum se smatra antimetabolitom cinka (4). Prema istim podacima, stalno unošenje kadmijuma putem vode za piće u koncentraciji 0,005 mg/l izaziva u 80% pacova trajnu hipertenziju.

Određivanje kadmijuma u biološkom materijalu veoma je značajna mera u kontroli izloženosti dejstvu ovog metala na radnom mestu. Bilo bi međutim svakako korisno pratiti nivo kadmijuma i u lica profesionalno neizloženih ali koja unose kadmijum u svoj organizam vodom i hranom.

Za određivanje kadmijuma u biološkom materijalu koriste se nefelometrijske (5), spektrografske (6) kao i spektrofotometrijske metode, kojima se određuje intenzitet boje kompleksa kadmijuma sa organskim reagencijama, npr. ditizonom (7, 8). Novije metode koriste atomsku apsorpcionu spektrofotometriju (9). Veoma je malo polarografskih metoda (10) opisano u literaturi, premda je kadmijum najpogodniji metal za polarografsko određivanje. Prethodna ekstrakcija kadmijuma iz mineralizovanog materijala, obično ditizonom, koji se i u polarografskim metodama primenjuje, umanjuje prednosti ove tehnike.

Iz navedenih razloga ispitali smo mogućnost direktne primene polarografije, bez prethodne ekstrakcije ditizonom, za određivanje kadmijuma u mokraći i u krvi.

EKSPERIMENTALNI DEO

Aparatura: Polarograf Polariter PO-4. Promer kapilare 0,06 mm, brzina kapanja 3,5 sek/kap, visina Hg stuba 400 mm, opseg napona od 0 do - 4 V, radni napon od - 0,5 do - 0,75 V. Kao anoda upotrebljena je normalna kalomel elektroda.

Reagencije: Koncentrovane kiseline p. a.: azotna, sumporna, perhlorna i hlorvodonična.

Razblažene kiseline: azotna 4 : 100, hlorvodonična 1 : 1. Etiletar p. a.: pre upotrebe ispere se u levku za odvajanje kraćim mućkanjem sa istom zapreminom vode. Rastvor kalcijumhlorida: 10 g bezvodnog CaCl_2 rastvori se u vodi i dopuni do 100 ml.

Rastvor natrijumfosfata: 10 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ rastvori se u vodi i dopuni do 100 ml.

Standardni rastvor kadmijuma: 2,1813 g $\text{Cd SO}_4 \cdot 8/3 \text{H}_2\text{O}$ rastvori se u vodi, doda 1 ml konc. sumporne kiseline i dopuni vodom do 1000 ml. Odgovarajućim razblaživanjem pripremi se rastvor koncentracije 1 μg Cd/ml.

METODE

Određivanje kadmijuma u mokraći:

U kiveti za centrifugu 50 ml ispitivane mokraće dovede se, dodatkom potrebne količine N, rastvor NaOH, na pH 6,5-7,5. U mokraću se zatim doda 0,5 ml rastvora kalcijum hlorida, pomeša a zatim još i 3 ml rastvora natrijum fosfata. Tečnost se dobro izmeša i ostavi da stoji na sobnoj

temperaturi 1 sat. Nakon toga talog se odvoji centrifugovanjem na 3000 o/m u toku 10 minuta. Tečnost se baci a kiveta se stavi otvorom nadole na filter papir da bi se talog što bolje ocedio.

Talog se razblaženom azotnom kiselinom kvantitativno prenese u čašu od 100 ml u koju se doda 2 ml perhlorne kiseline. Čaša se zagreva na temperaturi od oko 120° C, a kada se pojave guste bele pare, čaša zaklopi satnim staklom i zagrevanje nastavi dok se ova kiselina ne ispari.

Na ohlađeni ostatak doda se 2 ml koncentrovane HCl i tečnost ponovo ispari. Na taj ostatak doda se 2 do 3 ml vode, koja se takođe ispari. Ovaj postupak ponovi se još dva puta.

Ostatak u čaši rastvori se u 4 ml polarografskog osnovnog rastvora i prenese u ćeliju polarografa. Kroz tečnost se propušta struja vodonika tokom 10 minuta a zatim rastvor polarografiše od -0,5 do -0,75 volti.

Određivanje kadmijuma u krvi:

5 ml sveže ili heparizovane krvi pomeša se u čaši od 100 ml sa 10 ml azotne kiseline, dobro izmeša kružnim kretanjem čaše i pažljivo zagreva dok se ne dobije homogena tečnost. U čašu se sada doda 5 ml koncentrovane HCl i tečnost upari na zapreminu oko 2-3 ml. Ohlađenoj tečnosti doda se 10 ml HCl 1:1 i zatim se nastala emulzija ekstrahuje 3 puta sa po 10 ml etiletra. Etar se baci a vodeni sloj vrati u čašu, doda 1 do 2 kapi sumporne i 2 ml perhlorne kiseline i nastavi zagrevanje. Kada se pojave guste bele pare, čaša se poklopi satnim staklom. Ukoliko tečnost počinje da tamni, u poklopljenu čašu unese se nekoliko kapi azotne kiseline. Postupak se ponavlja sve dok tečnost i pri razvijanju gustih belih para ne ostane bezbojna. Tada se satno staklo ukloni i višak kiseline dokraja ispari. Na ohlađeni ostatak doda se 2-3 ml vode koja se zatim otpari. Postupak se ponovi još 2 do 3 puta.

Mineralizovani ostatak rastvori se u 4 ml osnovnog polarografskog rastvora i polarografiše kao što je navedeno za mokraću.

Količina kadmijuma u ispitivanom materijalu određuje se prema baždarnom dijagramu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Dijagrami prikazani na sl. 1 dobijeni su na taj način što su na ordinatu nanete visine (mm) polarografskih talasa koje daju količine od 1 do 10 μ g kadmijuma unetih direktno u osnovni rastvor (prava I), odnosno u uzorke mokraće od po 50 ml koji su zatim obrađeni na opisani način (prava II). Apscisa predstavlja količine kadmijuma od 0 do 10 μ g u 4 ml osnovnog rastvora, tj. 1 M rastvora NaCl.

S obzirom na to da je zapremina od 4 ml osnovnog rastvora najpogodnija za rastvaranje ostataka nakon mineralizacije krvi ili obrade mokraće, na apscisu nanete su količine kadmijuma u toj zapremini, a ne koncentracije.

Svaka tačka na dijagramu predstavlja srednju vrednost od najmanje pet određivanja.

Funkcionalna zavisnost visine polarografskog talasa (y) od količine kadmijuma (x) pri direktnom dodavanju u osnovni rastvor data je jednačinom

$$y = 5x. \quad (1)$$

Kada se određuje kadmijum dodat u mokraću, regresiona jednačina je

$$y = -0,2 + 4,9x. \quad (2)$$

Nagib prave je 4,9 a varijacija nagiba $\sim 0,1$.

Kao što se vidi, prava koja vredi pri određivanju kadmijuma iz mokraće leži nešto ispod one za čiste rastvore, što se objašnjava gubicima kadmijuma u postupku. Iz jednačina (1) i (2) proizlaze sledeći gubici u odnosu na dodate količine kadmijuma:

Dodata količina kadmijuma [μg]	Gubitak u %
1	6
2	4
3	3,3
4	3
5	2,8
6	2,6
8	2,5
10	2,4

Za srednju tačku prave II ($5 \mu\text{g}$ u 50 ml mokraće) gubitak iznosi $2,8\%$.

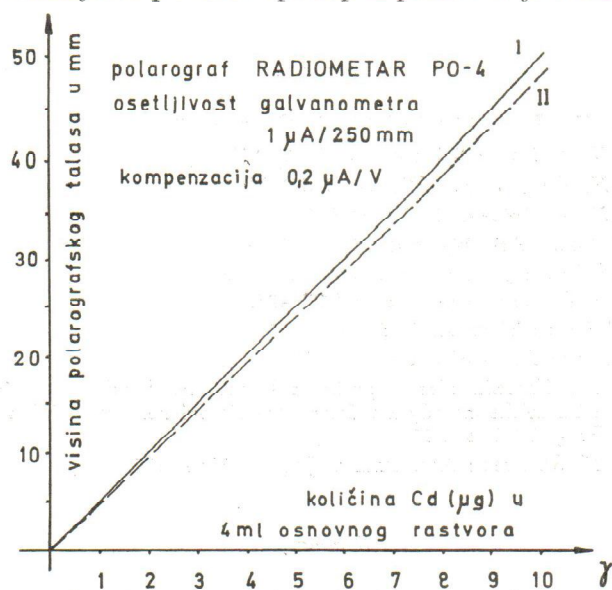
Tačnost metode utvrdili smo na sledeći način:

U 1000 ml mokraće dodato je $100 \mu\text{g}$ kadmijuma. Posle dobrog mešanja, ukupna količina podeljena je na 20 uzoraka od po 50 ml , tako da u svakom uzorku bude po $5 \mu\text{g}$ kadmijuma, te je u svakom uzorku određena količina kadmijuma na opisani način. Na osnovu ovih određivanja utvrđeno je da standardna devijacija iznosi $\pm 0,126 \mu\text{g}$ a koeficijent varijacije $2,5\%$.

Na sličan način proveren je i postupak za određivanje kadmijuma u krvi te je nađeno da standardna devijacija iznosi $\pm 0,136 \mu\text{g}$ a koeficijent varijacije $2,6\%$; prema tome pravac II na sl. 1 može se praktički koristiti i za određivanje kadmijuma u krvi.

Donja granica osetljivosti za naš postupak iznosi $0,5 \mu\text{g}$ kadmijuma u 50 ml mokraće, odnosno u 5 ml krvi. Primenom novijih polarografskih tehnika (square wave, pulsna polarografija, visćea živina elektroda itd.) osetljivost se može znatno povećati. U tehnici koju smo mi primenili osetljivost se može povećati obradom većih uzoraka (100 ml mokraće ili 10 ml krvi).

Kao što je poznato, pri određivanju mikrokoličina metala u mokraći najveću teškoću predstavljaju isparavanje velikih zapremina uzorka i razaranje organskih materija. Primenom koprecipitacije obe ove teškoće otpadaju. Tečnost nad talogom se odbacuje a u talogu nalaze se male količine organskih materija. Kao što se sa dijagrama na sl. 1 vidi, koprecipitacija kadmijuma po našem postupku praktično je kvantitativna.



Sl. 1.

Tehniku koju smo primenili za razaranje organskih materija u krvi razradili smo ranije za polarografsko određivanje olova u krvi (11).

Polutaladni potencijal kadmijuma u 1 M rastvoru NaCl, kao osnovnom rastvoru, iznosi $-0,63$ V kako kod čistih rastvora tako i pri obradi materijala.

Određivanje kadmijuma u krvi na opisani način traje oko 3 časa, a u mokraći oko 2 časa. Olovo i bakar u materijalu ne smetaju, zbog razlike u polutaladnim potencijalima, a gvožđe se iz krvi uklanja ekstrakcijom.

Opisana obrada uzoraka krvi i mokraće može se koristiti i za druge metode određivanja kadmijuma u biološkom materijalu.

ZAKLJUČAK

Koprecipitacijom na opisani način moguće je kvantitativno izdvajanje kadmijuma iz mokraće, čime se izbegava dugotrajno isparavanje, a razaranje organskih materija, kojih u talogu ima veoma malo, znatno olakšava.

Ekstrakcijom etiletrom uklanjaju se, pored gvožđa, i masne materije, čime se brzina potpunog razaranja organskih materija znatno povećava. Ostatak se lako rastvara u osnovnom polarografskom rastvoru te je pogodan za polarografsko određivanje kadmijuma.

Zbog svoje jednostavnosti i pouzdanosti opisani postupci mogu korisno poslužiti kao rutinska metoda u kontroli izloženosti dejstvu kadmijuma.

Literatura

1. *Westoo, G.*: Var Foda, 15 (1963) 73, cit. CA 61 : 7599 d.
2. *Schroeder, H. A.* i sar.: Science 140 (1963) 819.
3. *Schroeder, H. A.*: J. Chron. Dis. 14 (1961) 236.
4. *Schroeder, H. A.*: Ibidem, 18 (1965) 647.
5. *Truhaut, R.* i sar.: Arh. hig. rada, 3 (1954) 19.
6. *Perry, H. M.* i sar.: J. Chron. Dis. 14 (1961) 259.
7. *Saltzman, B. E.*: Anal. Chem., 25 (1953) 493.
8. *Smith, J. C.* i sar.: Biochem. J., 61 (1955) 698.
9. *Pulido, P.* i sar.: Anal. Biochem., 14 (1966) 393.
10. *Buchalova, D.*: Zbornik sjezdu prakt. polarografije, Bratislava 1952, u knjizi Teisinger, J.: Chemické metody k vyšetrovani biologického materialu v prumyslove toxikologii, Prag, 1956, str. 22.
11. *Mokranjac, M. St.* i sar.: Acta Pharm. Jug., 4 (1954) 177.

Summary

POLAROGRAPHIC DETERMINATION OF CADMIUM IN BIOLOGICAL MATERIAL

A polarographic method for direct determination of cadmium in urine and blood is described. In urine cadmium is quantitatively precipitated by calcium chloride in a weakly acid medium. The precipitate is separated by the procedure of centrifugation. The content of organic matter in the precipitate is mineralized by perchloric acid. A blood sample is partly mineralized by nitric acid, iron is transformed into chloride and extracted by means of ethyl ether together with the fat matter. Complete mineralization can be done with sulphuric and perchloric acid.

The mineralized residue is dissolved in 1 M NaCl and cadmium is determined by polarography.

*Institute of Hygiene,
Military Medical Academy,
Belgrade*

*Received for publication
February 16, 1968*