

O. A. WEBER, K. VOLODER i V. B. VOUK

PRILOG ODREĐIVANJU MALIH KOLIČINA OLOVA U KRVI

Opisana je »jednobojna« metoda za određivanje malih količina olova u krvi s pomoću ditizona. Glavne razlike između predložene metode i uobičajenih postupaka su ove: 1. Ekstrakcija olova vrši se kod razmjerno visoke pH vrijednosti (10,5), 2. Željezo se uklanja nakon mineralizacije krvi, a prije ekstrakcije ditizona. Za odstranjivanje željeza upotrebljen je kupferon.

Baždarne krivulje obrađene su statistički. Rezultati pokazuju, da je tako modificirana ditizonska metoda pouzdana, osjetljiva i precizna. Standardna pogreška pojedinog određivanja nije veća od $\pm 7 \mu\text{g}$ za koncentracije olova od 25 do 500 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ krvi, ako se mjerenje ekstinkcije vrši Beckmanovim spektralnim fotometrom kod valne dužine od 520 m μ . Ako paralelno analiziramo po dva uzorka iste krvi, standardna se pogreška može smanjiti na $\pm 5 \mu\text{g}$.

UVOD

Kod primjene nekih ditizonskih metoda za određivanje olova u biološkom materijalu na određivanje olova u krvi javljaju se poteškoće. Tako smo na pr. pokušali direktno primijeniti na krv metodu, koju su objavili VESTERBERG i SJÖHOLM (1951), ali bez uspjeha. Ta metoda daje prema navodima autora vrlo dobre rezultate kod određivanja olova u urinu. Te poteškoće su nas navele da istražimo neke faktore, koji bi mogli utjecati na osjetljivost i preciznost ditizonskih metoda uopće, a naročito smo pažnju obratili utjecaju željeza. Prema navodima nekih autora (na pr. FISCIER i LEOPOLDI, 1931; FABRE i LEM, 1936; KRAFT-STRÖM, WULFERT i SYDNES, 1937) velike količine željeza smetaju kod ekstrakcije metala s pomoću ditizona. Kako se krv razlikuje od drugog biološkog materijala upravo po velikom sadržaju željeza, može se očekivati, da je željezo važan faktor, koji utječe na preciznost, osjetljivost i pouzdanost ditizonske metode za određivanje malih količina olova u krvi.

Pokušat ćemo, da na osnovu nekih poznatih činjenica iz fizikalne kemije ditizona i metalnih ditizonata* objasnimo razloge, koji su nas naveli da modificiramo Vesterberg-Sjöholmovu metodu.

* Odličan prikaz fizikalno-kemijskih osnova upotrebe ditizona u analitičkoj kemiji može se naći u knjizi: E. B. SANDELL, Colorimetric determination of traces of metals, 2nd. Ed. New York, 1950. – Vidi također: H. IRVING, Solvent extraction and its application in inorganic analysis, Chem. Soc. Quart. Rev. 5 (1951) 200–206.

1) Pod određenim uvjetima (kisele i slabo alkalne otopine, $pH < 12$) ditizon (difeniltiokarbazon) ponaša se kao jednobazična kiselina. U vodenoj otopini disociira ovako:



(HDz je oznaka za ditizon, a Dz^- za jednovalentni ditizonat-ion.)

Konstanta disocijacije može se izračunati iz jednadžbe:

$$\frac{[H^+]_w [Dz^-]_w}{[HDz]_w} = K_d \quad (2)$$

(Uglate zagrade označavaju koncentraciju, a indeks w vodenu fazu. K_d je konstanta disocijacije ditizona.)

Ako otopinu ditizona u kloroformu, tetraklormetanu ili kojem drugom prikladnom organskom otapalu dovedemo u uski kontakt s vodom, ili s vodenom otopinom neke kiseline ili baze, raspodijelit će se ditizon u vodenu i organsku fazu prema jednadžbi:

$$\frac{[HDz]_o}{[HDz]_w} = P_d \quad (3)$$

(P_d je koeficijent raspodjele, a indeks o označava organsku fazu.)

Iz jednadžbe (2) i (3) lako se izvede ova relacija (SANDELL i KOLTHOFF, 1941)

$$\frac{[HDz]_o}{[HDz]_w + [Dz^-]_w} = \frac{P_d [H^+]_w}{[H^+]_w + K_d} \quad (4)$$

koja pokazuje, kako utječe koncentracija vodikovih iona na raspodjelu ditizona u obje faze. U alkalnim otopinama $[HDz]_w$ i $[H^+]_w$ su malene, pa se mogu zanemariti u poređenju sa $[Dz^-]_w$ i K_d . Tako jednadžba (4) dobiva jednostavniji oblik:

$$\frac{[HDz]_o}{[Dz^-]_w} = \frac{P_d [H^+]_w}{K_d} = F [H^+]_w \quad (5)$$

Vrijednost konstante F je za tetraklormetan kao otapalo približno $7 \cdot 10^8$, a za kloroform $3.6 \cdot 10^{10}$. Jednadžba (5) pokazuje, da se smanjenjem koncentracije vodikovih iona odnos $[HDz]_o / [Dz^-]_w$ smanjuje, t. j. više ditizona prelazi u vodenu fazu. Tako je na pr. kod $pH = 8$ odnos između koncentracije ditizona u organskoj fazi (tetraklormetan) i koncentracije jednovalentnih ditizonat-iona u vodenoj fazi

$$[HDz]_o / [Dz^-]_w = 7 \cdot 10^8 \times 10^{-8} = 7.$$

Ako povećamo pH na 10.5, smanjuje se taj odnos za više od 100 puta:

$$[HDz]_o / [Dz^-]_w = 7 \cdot 10^8 \times 10^{-10.5} = 0.02.$$

Ta je činjenica od velike važnosti, ako se za određivanje olovnog ditizonata upotrebi t. zv. »jednobojna« spektralno fotometrijska metoda,

t. j. ako se u posljednjoj fazi analize mjeri samo ekstinkcija otopine olovnog ditizonata. Kod tog je postupka važno, da u otopinama, kojima mjerimo ekstinkciju, ne bude ni tragova slobodnog ditizona, koji bi nam dao t. zv. »miješanu boju«. Odstranjivanje posljednjih tragova nevezanog ditizona vrši većina autora pranjem otopine olovnog ditizonata prije mjerenja ekstinkcije razrijeđenom otopinom amonijaka (1:100 ili 1:200) ili otopinom kalium-cijanida. To pranje je često izvor znatnih pogrešaka i nejednoličnosti rezultata (CLIFFORD i WICHMANN, 1936). Ako se, međutim, posljednja ekstrakcija olova (vidi »Eksperimentalni dio«) vrši kod $pH=10,5$, a ne kod $pH=8$, kako se to obično čini, pranje amonijakom ili kalium-cijanidom postaje suvišno.

U Tablici I navodimo naše rezultate, koji pokazuju, kako utječe pranje razrijeđenim amonijakom na jednoličnost rezultata mjerenja ekstinkcije, a i na osjetljivost metode. Rezultate iznesene u Tablici I dobili smo na ovaj način. Priredili smo niz otopina olova iste koncentracije i proveli normalni analitički postupak. Dobivene otopine ditizonata podijelili smo na dva dijela. Jedan dio fotometrirali smo odmah bez pranja, a drugi dio prali smo vodenom otopinom amonijaka (1:100).

Tablica 1

Ekstinkcija	
uz pranje s amonijakom 1:100	bez pranja
0.162	0.247
0.175	0.249
0.178	0.248
0.192	0.249

Istražili smo također, da li puferovana otopina (vodena otopina amonijaka, amonium-citrata i kalium-cijanida), koju upotrebljavamo kod analitičkog postupka (vidi str. 305), jednako dobro odstranjuje nevezani ditizon iz organske faze kao i razrijeđena otopina amonijaka. Rezultate pokusa pokazuje Tablica II.

Tablica 2

Otopina za fotometriranje	Ekstinkcija	
	$\lambda=620 m\mu$	$\lambda=520 m\mu$
(a) Otopina ditizona u CCl_4 prije mućkanja . .	1.120	0.230
(b) 10 ml otopine (a) izmućkano sa 50 ml amonijaka 1:100	0.007	0.011
(c) 10 ml otopine (a) izmućkano sa 25 ml pufer-otopine (amonium-hidroksid + amonium-citrat + kalium-cijanid)	0.014	0.011

2) Mučkamo li otopinu ditizona u tetraklormetanu ili kloroformu s vodenom otopinom nekog metalnog iona, nastaje intenzivno obojen kompleksni spoj, koji je razmjerno dobro topljiv u organskom otapalu. Reakcija je reverzibilna, pa se uspostavlja ravnoteža, koja se može predočiti za dvovaljani metalni ion (Me^{++}) ovom jednadžbom:



Polazeći od te jednadžbe lako se izvede izraz za ekstraktibilnost metala u zavisnosti od koncentracije vodikovih iona i koncentracije ditizona (KOLTHOFF i SANDELL, 1941):

$$\frac{[MeDz_2]_o}{[Me^{++}]_w} = K \frac{[HDz]_o^2 \cdot f_{Me^{++}}}{[H^+]_w^2 \cdot f_{H^+}} \quad (7)$$

($f_{Me^{++}}$ i f_{H^+} su koeficijenti aktiviteta metalnih i vodikovih iona.)

Jednadžba (7) pokazuje, da ekstraktibilnost metala (t. j. odnos između koncentracije metalnog ditizonata u organskoj fazi i koncentracije metalnog iona u vodenoj fazi) raste s kvadratom ravnotežne koncentracije ditizona (koncentracije suvišnog ditizona) u organskoj fazi, a pada s kvadratom koncentracije vodikovih iona u vodenoj fazi. Konstanta K uključuje koeficijente podjele ditizona i metalnog ditizonata, i konstantu disocijacije ditizona. Ta jednadžba vrijedi u području pH vrijednosti, gdje ne dolazi do hidrolize metalnog iona.

Prema jednadžbi (7) trebalo bi da omjer $[MeDz_2]_o / [Me^{++}]_w$ stalno raste s porastom pH vrijednosti (uz konstantnu koncentraciju ditizona). Neki su ditizonati doista stabilni i kod vrlo visokih pH vrijednosti (na pr. ditizonat kadmiuma, kobalta, nikla, bakra, žive i srebra). Neki se naprotiv raspadaju, ako pH vrijednost postane previsoka. Tako podaci CLIFFORDA i WICHMANNNA (loc. cit.) pokazuju, da za olovni ditizonat postoji optimalno područje pH vrijednosti, u kojem je ekstraktibilnost najveća. To područje donekle zavisi od koncentracije suvišnog ditizona u organskoj fazi, a kreće se (za kloroform) od pH vrijednosti 9 do 10.5 (25% suvišnog ditizona), odnosno od 8.5 – 10.5 (50% suvišnog ditizona). Kad prijeđemo vrijednost pH=10.5, ekstraktibilnost ponovno opada.

Clifford i Wichmann su mjerili ekstraktibilnost olova tako, da su poznati volumen otopine ditizona mučkali određeno vrijeme s vodenom otopinom olovnog iona, i odredili ekstinkciju tako dobivene otopine olovnog ditizonata. Ako se, međutim, ekstrakcija ponavlja nekoliko puta uvijek sa svježom otopinom ditizona, može se u principu ekstrahirati čitava količina olova i kod nižeg pH. Većina autora i radi tako. Tu, međutim, treba spomenuti jedan faktor, kojemu se po našem mišljenju ne obraća dovoljno pažnje. To je brzina ekstrakcije, koja također zavisi od pH vrijednosti. U alkalnim i slabo kiselim otopinama ekstrakcija je vrlo brza. U kiselim otopinama, naprotiv, proces ekstrakcije teče vrlo polako. To se lijepo vidi iz podataka H. BARNESA (1946). On je opazio, da je ekstrakcija bakarnih iona otopinom ditizona u kloroformu kod pH 1.4 nepotpuna još nakon mučkanja od 25 minuta.

Brzina uspostavljanja raspodjelne ravnoteže zavisi također od koncentracije reaktanata i od otapala (IRVING, ANDREW i RISON, 1949). Pod istim uvjetima reakcija je brža u tetraklormetanu nego u kloroformu. Naša opažanja o brzini ekstrakcije olovnih iona slažu se s opažanjima spomenutih autora i pokazuju, da je brzina reakcije kod $pH=10.5$ otprilike za 30% veća od brzine reakcije kod $pH=8.0$.

Prema tome ekstrakcija olova s pomoću otopine ditizona u tetraklormetanu kod visokog pH (10.5) ima dvije prednosti pred ekstrakcijom kod niskog pH (8):

a. Nepotrebno je pranje otopine olovnog ditizonata prije mjerenja ekstrakcije, ako se upotrebljava »jednobojna« metoda. Tako se izbjegavaju pogreške, koje nastaju zbog ponovnog uspostavljanja raspodjelne ravnoteže, kad otopina olovnog ditizonata dođe u doticaj s otopinom za pranje, u kojoj uopće nema olova, a isto tako i pogreške, koje mogu nastati zbog raspadanja ditizonata (pomaka ravnoteže), ako se iz nepažnje prekorači područje pH vrijednosti, u kojem je olovni ditizonat stabilan. Brzina ponovnog uspostavljanja raspodjelne ravnoteže kod pranja zavisi od koncentracije olovnog ditizonata u organskoj fazi, od koncentracije vodikovih iona u otopini za pranje, od odnosa volumena obiju faza, t. j. organske i vodene, i od vremena mućkanja. Sve te faktore trebalo bi uskladiti za svaki pojedini slučaj, da se izbjegnju pogreške. To je u praksi vrlo teško provesti.

b. Brzina ekstrakcije mnogo je veća, pa se za isto vrijeme mućkanja ekstrahira veća količina olova. Na taj se način povećava osjetljivost metode.

3) Ekstrakcija olova kod visoke pH vrijednosti ima i negativnih strana.

Iako ditizon reagira sa čitavim nizom metala, reakcija se može učiniti specifičnom na olovo, ako se ekstrakcija izvodi kod prikladne pH vrijednosti, i ako se doda reagens, koji s metalima, koje ne želimo ekstrahirati, stvara kompleksne spojeve. Podpuno odjeljivanje olova od ostalih metala može se još poboljšati tako, da se ekstrakcija provede u dva navrata. Prva ekstrakcija vodene faze izvrši se kod određenog pH (u našem slučaju 10.5) uz dodatak otopine kalium-cijanida i amonijum-citrata, ili kojeg drugog reagensa za stvaranje kompleksnih spojeva. Organska faza, koju na taj način dobijemo, može osim olovnog ditizonata sadržavati i ditizonate nekih drugih metala (Bi, Sn, Th). Nakon toga izmućka se organska faza s vodenom fazom prikladnog pH (vodena otopina dušične kiseline, $pH=1-3$ ili acetatni pufer, $pH=4.5$ (Vesterberg i Sjöholm, loc. cit.)). Pri tome postupku raspada se olovni ditizonat, i olovni ioni prelaze u vodenu fazu, a ostali ditizonati ostaju u organskoj fazi. Ta metoda daje vrlo dobre rezultate, ako u materijalu za analizu nema željeza. (Vidi rezultate naših analiza anorganskog materijala bez željeza.)

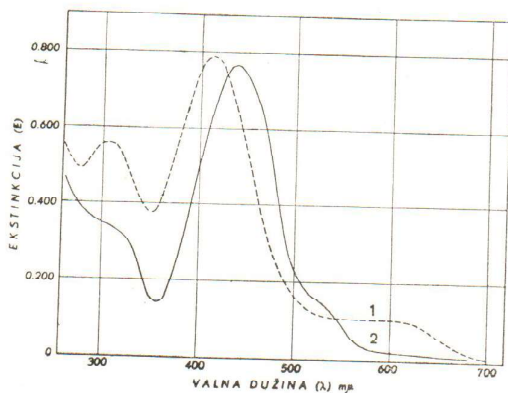
Mnogi autori tvrde, da vodena otopina kalium-cijanida i citrata, odnosno reagens, koji sadržava tartarat-ione (Fischer i Leopoldi, loc. cit.), zadržava i ione trovalentnog željeza u kompleksnom spoju, ako se ekstrakcija ne izvodi kod previsokog pH (pH treba da bude oko 8).

Prema našem iskustvu taj postupak nije vrlo pouzdan i teško je izvesti reakciju tako, da se kompleks za vrijeme izmučavanja djelomično ne raspadne, naročito ako se ekstrakcija ne provodi vrlo brzo, i ako se radi u nepuferovanoj otopini. Osim toga, kako smo prije spomenuli, radeći kod pH 8 ne iskorištavamo potpuno osjetljivost ditizonske reakcije.

Smetnje, koje uzrokuje željezo, postaju očigledne, ako se ekstrakcija vrši kod visokog pH (10.5). Djelovanje željeza na otopine ditizona u lužnatom mediju nije potpuno jasno. Prema WELCHERU (1947) trovalentno željezo oksidira ditizon, naročito u lužnatim otopinama, koje sadržavaju citrata, tartarata ili cijanida, stvarajući žuti difeniltiokarbodiazon:



DAWSON (1948) naprotiv tvrdi, da i dvovalentno i trovalentno željezo u lužnatom mediju reagira s ditizonom. Ta reakcija nije kvantitativna, a nastali žuti produkt sadržava 15% željeza. Njegova se svojstva razlikuju od svojstava metalnih ditizonata. Da bismo dobili neki uvid, radi li se o oksidaciji ditizona i stvaranju difeniltiokarbodiazona ili o stvaranju nekog spoja između željeza i ditizona, kako to tvrdi Dawson, izmjerili smo apsorpcijska spektra otopine difeniltiokarbodiazona u tetraklormetanu i otopine reakcionog produkta, koji nastaje, ako se ekstrakcija olova vrši kod pH=10.5 uz prisutnost željeza. Kako se iz priloženog grafičkog prikaza apsorpcijskih spektara u području od 260–700 m μ vidi, (sl. 1), radi se o otopinama različitih supstancija.



Sl. 1. Spektar apsorpcije difeniltiokarbodiazona (1) i reakcionog produkta željeza i ditizona (2). Otopalo: tetraklormetan; Beckmanov spektralni fotometar; širina spektralne vrpce: 3 m μ »Corex« kiveta 1.002 cm

Da bismo smetnje, koje uzrokuje željezo, definitivno uklonili, odlučili smo da odstranimo željezo prije nego vršimo ekstrakciju olova ditizonskom otopinom. Kupferon (amonijeva sol N-nitrozo, N-hidroksil-

amina) pokazao se najpogodnijim reagensom za odstranjivanje željeza. U kiseloj vodenoj otopini ($pH=1$), kupferon kvantitativno reagira sa željezom dajući unutarnji kompleks, željezni kupferat, koji je vrlo dobro topljiv u tetraklormetanu. U tetraklormetanu dobro se topi i kupferon. U kiselim otopinama kupferon ne reagira s olovom. Produkt topljivosti željeznog kupferata (PINKUS i MARTIN, 1927) tako je malen, da je koncentracija otopljenog željeznog kupferata u vodenoj fazi neznatna. Topljivost kupferona i željeznog kupferata u tetraklormetanu može se iskoristiti za odstranjivanje taloga željeznog kupferata i suvišnog kupferona iz vodene faze. Sam postupak za odstranjivanje željeza iz vodene faze opisan je u eksperimentalnom dijelu.

Odstranjivanje željeza taloženjem s pomoću kupferona prije ekstrakcije olova nema nikakva utjecaja na osjetljivost i preciznost određivanja olova ditizonskom metodom. To se vidi iz Tablice 3, koja daje podatke o ekstinkciji otopine olovnog ditizonata, koja je dobivena ekstrakcijom iste količine olova (1) bez prisutnosti željeza, (2) bez prisutnosti željeza, ali uz obradu s kupferonom i (3) uz prisutnost željeza, koje je odstranjeno kupferonom. Koncentracija željeza bila je 1000 puta veća od koncentracije olova. Ekstinkcija je ista u granicama eksperimentalne pogreške u sva tri slučaja.

Tablica 3

Uzorak	Ekstinkcija
Anorganska otopina Pb bez dodatka kupferona	0.282
Ista otopina Pb s dodatkom kupferona	0.280
Ista otopina Pb s dodatkom Fe, koje je naknadno odstranjeno kupferonom	0.278

EKSPERIMENTALNI DIO

REAGENCIJE

Sve reagensi moraju biti naročito čiste (p. a.). One kemikalije, koje su hlapljive, treba redestilirati u aparaturi od kvalitetnog stakla. One, koje nisu hlapljive, a mogu se zalužiti, treba u alkalnom mediju izmuckati s koncentriranom otopinom ditizona i na taj način očistiti od tragova olova. Jedino se tako može postići gotovo bezbojna slijepa proba.

Otopina ditizona (0.01%)

25 mg ditizona otopi se u 25 ml kloroforma u lijevku za odjeljivanje. Doda se 500 ml amonij-hidroksida (1:4) i mućka 5 minuta. Sloj kloroforma se otpusti i crveno smeđoj vodenoj fazi doda se toliko 10% -ne solne kiseline, da se boja promijeni u zelenu. Nakon toga dodaje se

250 ml tetraklormetana u malim obrocima. Pojedini se ekstrakti skupe u drugom lijevku za odjeljivanje, nekoliko puta isperu redestiliranom vodom i stave u tamnu bocu, koju treba čuvati na hladnom mjestu.

Ditizon reagens

Uzme se 10 ml otopine ditizona (0.01%) i nadopuni tetraklormetanom na 50 ml.

Olovni standard (1000 µg/ml)

Fino smrvljeno olovo (p. a.) opere se najprije octenom kiselinom (1:1), zatim vodom i osuši acetonom. Neposredno iza sušenja odvagne se 1.000 g, otopi u 5 ml dušične kiseline uz zagrijavanje i nadopuni redestiliranom vodom na 1000 ml. Od te otopine razrjeđivanjem se pripreme otopine manjih koncentracija.

Tetraklormetan i kloroform

Tetraklormetan (ili kloroform) najprije se destilira uz dodatak 20%-ne otopine natrium-hidroksida i nekoliko kristala natrium-tiosulfata. Zatim se ponovno destilira uz dodatak malo tiosulfata i osuši bezvodnim natrium-sulfatom. Nakon toga se pažljivo destilira u vakuumu (treba izbjegavati jako sunčano svjetlo). Nakon vakuum-destilacije kloroformu se doda 1 vol.% apsolutnog alkohola. Oba se otapala spremaju na tamnom i hladnom mjestu. Tetraklormetanu ne treba dodati etanola za konzerviranje (BIEFFELD i PATRICK, 1942). Pri upotrebi kloroforma kao otapala treba paziti, da se kod ponavljanog čišćenja ne dodaje suviše etanola, jer takve otopine postaju mutne.

Acetat-pufer (pH = 4.5–5.0)

U lijevak za odjeljivanje stavi se 100 ml 1 n kalium-hidroksida, doda 2–3 kapi timolftalcinske otopine i toliko 1 n octene kiseline, da indikator upravo izgubi boju. Ta se otopina ekstrahira malim količinama ditizona do nepromijenjene zelene boje. Zatim se doda ostatak (do 200 ml) 1 n octene kiseline i otopina nadopuni na 1000 ml redestiliranom vodom. Ditizon, koji se pri dodavanju octene kiseline izluči u fino dispergiranom stanju, treba odstraniti mućkanjem s čistim tetraklormetanom.

Amonium-hidroksid, koncentrirani, 24%, sp. t. 0.91, redestiliran.

Citrat otopina

200 g citronske kiseline ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) otopi se u 200 ml tople vode, doda 2–3 kapi timolftaleina i koncentriranog amonijaka, dok se ne pojavi modra boja, i zatim se ekstrahira s malim količinama ditizona. Otopina se nadopuni redestiliranom vodom na 1000 ml.

Kalium-cijanid (10%)

50 g kalium-cijanida otopi se u vodi i ekstrahira ditizonom, dok ditizon ne prestane mijenjati boju. Vodena faza se razrijedi redestiliranom vodom na 500 ml.

Pufer otopina: kalium-cijanid + citrat + amonium-hidroksid

Uzme se 100 ml otopine citrata, 200 ml otopine kalium-cijanida, 20 ml koncentriranog amonium-hidroksida i nadopuni redestiliranom vodom na 1000 ml. Tu otopinu treba svaki dan svježe pripremiti u onim količinama, koje su potrebne za analizu.

Hidroksilamin-hidroklorid otopina

200 g hidroksilamin-hidroklorida (p. a.) otopi se u otprilike 200 ml redestilirane vode, doda nekoliko kapi timolftaleina i alkalizira koncentriranim amonium-hidroksidom (modra boja). Ekstrahira se ditizonom. Poslije ekstrakcije ditizonom zakiseli se koncentriranom solnom kiselinom i razrijedi redestiliranom vodom na 1000 ml. Ditizon, koji se izluči pri dodavanju solne kiseline, treba ekstrahirati mućkanjem sa čistim tetraklormetanom.

Solna kiselina, koncentrirana, sp. t. 1.19, p. a., redestilirana.

Dušična kiselina, koncentrirana, sp. t. 1.40, p. a., redestilirana.

Timolftalein, 0.1%

0.1 g timolftaleina otopi se u 100 ml 90%-nog etanola.

Kupferon, 2%-na otopina

2 g kupferona (Merck) otopi se u 100 ml redestilirane vode, filtrira u lijevak za odjeljivanje, alkalizira amonium-hidroksidom i izmućka s koncentriranom otopinom ditizona. Otopinu treba čuvati na tamnom mjestu i treba je često svježe pripravlјati.

Vodikov peroksid, p. a.

APARATURA

Mjerenje ekstinkcije: Beckmanov spektralni fotometar, model DU. Mjerenja su izvršena kod 520 m μ uz širinu pukotine od 0.08 mm (To odgovara nominalnoj širini spektralne vrpce od 2.8 m μ); »modra« fotostanica; »Corex« kivete dužine 1.002 cm.

Fisherov elektrofotometar, A. C. model; zeleni filter s optičkim težištem kod 525 m μ ; okrugle kivete promjera 1.2 cm.

Staklena aparatura i posude: Jena, Pyrex ili Wirag staklo.

Mineralizacija krvi i uklanjanje željeza

Krv se mineralizira grijanjem s dušičnom kiselinom (RUŽDIĆ, 1941). U Kjhldahlovu tikvicu (100 ml) otpipetira se 5 ml krvi. Tikvica se stavi na pješčanu kupelj i doda se 15–20 ml koncentrirane dušične kiseline u obrocima od po 5 ml. Novi obrok dušične kiseline treba dodati tek onda, kad je stari obrok isparen do suha. Kad sadržaj tikvice postane potpuno bistar, doda se 20 ml vodikova superoksida. Tikvica se ponovo stavi na pješčanu kupelj, ugrije do vrenja, skine s pješčane kupelji i ostavi stajati, dok se ne završi burna reakcija. Nakon toga ispari se sadržaj tikvice gotovo do suha i ispiranjem redestiliranom vodom prenese u lijevak za odjeljivanje (125 ml s kratkom cijevi). Zatim se doda 2 ml 20/0-ne vodene otopine kupferona (Pazi, da kod dodavanja kupferona otopina bude hladna; otopina, kojoj se dodaje kupferon, ne smije sadržavati više od 1–2 ml slobodne dušične kiseline na 25 ml otopine; najpovoljnije je, ako se taloženje kupferona vrši kod $pH=1$). Talog željeznog kupferata ekstrahira se tetraklormetanom tako dugo, dok nekoliko uzastopnih ekstrakata ne ostane potpuno bez boje. Nakon toga se vodena faza prenese u istu Kjhldahlovu tikvicu, u kojoj smo vršili razaranje, i uz dodatak malo dušične kiseline ispari do suha. Na taj način razori se suvišni kupferon.

Ekstrakcija olova

Nakon završenog razaranja kupferona doda se u Kjhldahlovu tikvicu 10 ml otopine hidroksilamin hidroklorida. Sadržaj se tikvice ugrije do vrenja, i ostavi da kuha 10 minuta. U vruću otopinu doda se 10 ml citratne otopine i otopina prenese u lijevak za odjeljivanje. Zatim se doda koncentriranog amonijum-hidroksida do modre boje timolftaleina i 20 ml svježe pripremljenog kalium-cijanid-citrat-amonijum-hidroksid-puferu. Na taj se način postiže pH 10.5.

Ekstrakcija olova vrši se malim obrocima ditizon-reagensa. Prva ekstrakcija izvrši se sa 5 ml, a ostale sa po 2 ml. Ekstrakcija se nastavlja tako dugo, dok posljednji obrok ditizon-reagensa ne ostane zelen. Svi se ekstrakti skupe u drugom lijevku za odjeljivanje. Nakon svakog otpuštanja organske faze treba cijev lijevka isprati vodom, da ne dođe do gubitka ditizonata. Isto tako treba paziti, da pri otpuštanju organske faze u drugi lijevak za odjeljivanje ne otpustimo zajedno s organskom fazom pjenu, koja se skuplja na granici organske faze i vodene faze.

Nakon završene ekstrakcije organska se faza čvrsto izmućka sa 50 ml acetatnog pufera. Pri tome olovo ponovo prelazi u vodenu fazu. Ako se i kod izmućkavanja s acetatnim puferom pojavi pjena, treba vodenu fazu nekoliko puta isprati malim količinama tetraklormetana, koji pokupi pjenu. Prije svakog ponovnog izmućkavanja s tetraklormetanom treba paziti, da ostatak pjene ne ostane u lijevku, nego u pipcu ili u cijevi lijevka. Na taj se način dobije potpuno čista i bistra vodena faza. Treba također paziti, da odjeljivanje vodene faze i tetra-

klormetana bude što potpunije, jer se inače kod dodatka alkoholne otopine timolftaleina vodena otopina zamuti i promjena boje timolftaleina teško opazi.

Vodenoj se fazi ponovo doda amonijum-hidroksida, dok timolftalein ne poprimi modru boju (obično je dovoljno oko 10 kapi koncentriranog amonijum-hidroksida), i 20 ml svježeg kalium-cijanid + citrat + amonijum-hidroksid-pufera. Ekstrakcija olova ditizon-reagensom izvrši se na isti način kao i prvi put, a pojedini ekstrakti skupljaju se u epruvetu za centrifugiranje. Nakon svakog otpuštanja ekstrakta, cijev lijevka ispere se malom količinom tetraklormetana. Otopina ditizonata se centrifugira* radi odstranjivanja vode iz organske faze (3000 okretaja na minutu), prenese u suhu odmjernu tikvicu od 25 ml i nadopuni do oznake čistim tetraklormetanom.

Mjerenje ekstinkcije vrši se na Beckmanovom spektralnom fotometru, Fisherovom elektrofotometru ili na kojem drugom fotometru, pod uvjetima, koji su prije opisani.

BAZDARNI PRAVCI

Anorganski materijal

Priredili smo 14 vodenih otopina olovnog nitrata različitih koncentracija razrjeđivanjem olovnog standarda (1000 $\mu\text{g/ml}$) i odredili ekstinkciju otopina olovnog ditizonata, koje smo dobili ekstrakcijom prema prije opisanom postupku. Kod tih pokusa nismo vodene otopine olova podvrgli postupku mineralizacije s pomoću dušične kiseline, a nismo ni dodavali željeza. Ekstinkciju smo odredili na Beckmanovom spektralnom fotometru. Rezultati su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4

Koncentracija olova u otopini za fotometriiranje $c \mu\text{g/ml}$	Ekstinkcija E	Srednja vrijednost ekstinkcije \bar{E}
0.32	0.099 0.101	0.100
0.48	0.149 0.148 0.150 0.168	0.149
0.64	0.201 0.199 0.195 0.197	0.198
0.80	0.247 0.249 0.248 0.249	0.248

* U organskoj fazi se često pojavljuje zamućenje, koje potječe od sitnih kapljica vode. IRWING (1949) tu pojavu tumači na ovaj način: Za vrijeme izmućavanja često se temperatura otapala povisi iznad sobne temperature, pa se zbog toga povisi i topljivost vode u organskom otapalu. Kad se otopina kasnije iz bilo kojeg razloga ohladi, topljivost se smanji, a suvišak vode pojavljuje se u obliku sitnih kapljica, koje uzrokuju pogreške kod mjerenja ekstinkcije. Da bi spriječili štetno djelovanje te pojave, neki autori preporučuju sušenje sa Na_2SO_4 , filtriranje preko suhog filter papira ili dodatak nekoliko kapi metanola, odnosno etanola. Nama se čini, da je kod centrifugiranja mogućnost pogreške najmanja.

Uokvireni rezultat (0.168) nismo uzeli u obzir, jer je statistička analiza pokazala, da je pri tome određivanju učinjena gruba (sistematska) pogreška.*

Na posebnom nizu otopina olovnog nitrata istražili smo utjecaj mineralizacije dušičnom kiselinom i utjecaj dodatka i odstranjivanja željeza kupferonom na rezultate ekstinkcije (Tablica 3).

Krv

Priredili smo 59 uzoraka krvi s različitim sadržajem olova. Kod svih određivanja upotrebili smo istu krv, koju smo nabavili od stanice za transfuziju krvi u Zagrebu, uz dodatak različitih količina standardne otopine olova. Analize smo izvršili prema naprijed opisanom postupku.

Pri izvođenju slijepih proba proveli smo čitav analitički postupak (uključivši postupak mineralizacije dušičnom kiselinom i uklanjanje željeza kupferonom) samo bez dodatka krvi.

Rezultati mjerenja ekstinkcije prikazani su u Tablici 5.

Vrijednosti ekstinkcije, koje su unesene u Tablicu 5, dobili smo tako, da smo od izmjerene vrijednosti odbili ekstinkciju slijepe probe i vrijednost ekstinkcije, koju smo dobili analizom krvi bez dodatka standardne otopine olova. Ta je korektura iznosila 0.100 (Beckmanov spektralni fotometar), odnosno 0.074 (Fisherov elektrofotometar). To su srednje vrijednosti ekstinkcije dobivene iz analiza 11 uzoraka iste krvi bez dodatka standardne otopine olova. Kod većine je analiza količina krvi iznosila 5 ml. Kod nekih analiza uzeli smo 10 ml krvi, a rezultate za ekstinkciju preračunali na 5 ml. Uokvirene rezultate odbacili smo na osnovu Pierce-Chauvenetova kriterija.

STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Pregledavajući literaturu o ditizonskim metodama dobili smo dojam, da su objavljeni podaci o preciznosti ditizonskih metoda vrlo nepozndani. Zbog toga smo izvršili detaljnu statističku analizu rezultata.

NAČIN IZRACUNAVANJA

Kako je po Beerovu zakonu zavisnost između koncentracije (c) i ekstinkcije (F) linearna, proveli smo samo linearnu regresionu analizu

* Ako se pojedina mjerenja toliko razlikuju od ostalih mjerenja te iste veličine, može se to mjerenje odbaciti s opravdanom sumnjom, da je pri mjerenju učinjena gruba (sistematska) pogreška. Pri odbacivanju takvih rezultata primjenjuje se Pierce-Chauvenetov kriterij: Izračuna se vjerojatna pogreška pojedinačnog mjerenja uzevši u obzir sva mjerenja (pa i ono sumnjivo). Ako je razlika između sumnjivog mjerenja i srednje vrijednosti svih mjerenja, odnosno razlika između sumnjivog mjerenja i odgovarajuće vrijednosti na regresionom pravcu, 5 puta veća od vjerojatne pogreške pojedinačnog mjerenja, može se takvo mjerenje odbaciti. Vjerojatnost, da je tolika razlika nastala slučajno i da je uvjetovana metodom mjerenja, a ne zbog grube pogreške eksperimentatora, iznosi samo 1:1000. (Vidi na pr. MARGENAU and MURPHY: The Mathematics of Physics and Chemistry, New York, 1943, str. 499, ili CRUMPLER and YOE: Chemical Computations and Errors, New York, 1940, str. 189.

Tablica 5

1	C µg na 100 ml	40	64	80	100	104	120	144	160	200	240	300	320	400	480
2	c µg/ml	0.08	0.128	0.16	0.20	0.208	0.24	0.288	0.32	0.40	0.48	0.60	0.64	0.80	0.96
3	E _B	0.023 0.020 0.018	0.034 0.038 0.040	0.050 0.048 0.050	0.078 0.058	0.090 0.053	0.076 0.072 0.078	0.088 0.080 0.093	0.090 0.095 0.100	0.116 0.123 0.118	0.146 0.143 0.146	0.178 0.223	0.192 0.190	0.246 0.240 0.250	0.294 0.288
4		0.020	0.038	0.049	0.058	0.053	0.074	0.084	0.096	0.118	0.145	0.178	0.191	0.246	0.291
5	E _F	0.015 0.013 0.008	0.023 0.026 0.031	0.028 0.031 0.033	0.055 0.039	0.065 0.043	0.052 0.047 0.052	0.065 0.058	0.063 0.070 0.068	0.087 0.082 0.087	0.106 0.100 0.106	0.127 0.153	0.140 0.137	0.173 0.183 0.182	0.208 0.206
6		0.012	0.027	0.032	0.039	0.043	0.050	0.062	0.069	0.085	0.104	0.127	0.139	0.179	0.207

1. redak: Dodatak olova preračunat na 100 ml kivi
2. redak: Dodatak olova preračunat na 1 ml otopine za fotometriiranje
3. redak: Ekstinkcija otopine olovnog diizonata mjerena na Beckmanovom spektralnom fotometru; dužina kivete 1.002 cm; $\lambda = 520 \text{ m}\mu$; pukotina 0.08 mm
4. redak: Srednje vrijednosti podataka iz 3. redka (unesene u sl. 2)
5. redak: Ekstinkcija otopine olovnog diizonata mjerena na Fisherovom elektrofotometru; okrugle kivete promjera 1.2 cm; zeleni filter (težište 525 m μ)
6. redak: Srednje vrijednosti rezultata iz 5. redka (unesene u sl. 2)

rezultata iznesenih u Tablici 5. Najprije smo izračunali jednadžbu najboljeg pravca kroz eksperimentalne točke metodom najmanjih kvadrata bez obzira na uvjet, da pravac treba da prolazi kroz ishodište. Konstante a i b u jednadžbi pravca $E = a + b \cdot c$ izračunali smo iz ovih relacija:

$$b = \frac{n \sum c \cdot E - \sum c \cdot \sum E}{n \sum c^2 - (\sum c)^2} \quad (8)$$

$$a = \bar{E} - b \cdot \bar{c} \quad (9),$$

gdje je $\sum c$ zbroj svih koncentracija, $\sum c \sum E$ zbroj produkata odgovarajućih koncentracija i ekstinkcija, i t. d.; n je broj određivanja, a

$$\bar{E} = \frac{\sum E}{n}, \quad \bar{c} = \frac{\sum c}{n} \quad (10)$$

Izračunali smo također i jednadžbu najboljeg pravca uz uvjet, da pravac treba da prolazi kroz ishodište. U tom je slučaju $E = b' \cdot c$, a

$$b' = \frac{\sum c \sum E}{\sum c^2} \quad (11).$$

Jednadžbe, koje služe za izračunavanje koncentracije iz izmjerene ekstinkcije glase:

$$c = \frac{E - a}{b} \quad (12),$$

odnosno

$$c = \frac{E}{b'} \quad (13).$$

Standardne pogreške koncentracije (s_c) izračunane iz izmjerenih vrijednosti ekstinkcije s pomoću jednadžba (12) i (13) izračunali smo iz ovog izraza (DAVIES, 1949)

$$s_c = \frac{s^2}{b^2} \left\{ \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right) + \frac{E - \bar{E}}{b^2 \sum (c - \bar{c})^2} \right\}^{1/2},$$

gdje je s^2 varijanca ekstinkcije E s obzirom na regresioni pravac $E = a + b \cdot C$, a izračunava se ovako:

$$(n - 2) s^2 = \sum E^2 - \frac{(\sum E)^2}{n} - \frac{(\sum E \cdot c - \frac{\sum c \sum E}{n})^2}{\sum c^2 - \frac{(\sum c)^2}{n}} \quad (14).$$

m je broj paralelnih određivanja, iz kojih je dobiven podatak o ekstinkciji. Ako se na pr. pri svakom određivanju analiziraju paralelno 3 uzorka (i iz dobivenih podataka izračuna srednja vrijednost ekstinkcije), onda je $m = 3$. n je ukupni broj nezavisnih analiza, na osnovu kojih je izračunan regresioni pravac.

Na sličan način može se izračunati standardna pogreška koncentracije c , koja je izračunana iz jednadžbe pravca kroz ishodište:

$$s'_e = \left\{ \frac{s'^2}{b'^2} \left(\frac{1}{m} + \frac{E^2}{b'^2 \Sigma c^2} \right) \right\}^{1/2} \quad (15).$$

s'^2 je varijanca ekstinkcije E s obzirom na regresioni pravac kroz ishodište:

$$(n - 1) s'^2 = \Sigma E^2 - \frac{(\Sigma c \cdot E)^2}{\Sigma c^2} \quad (16).$$

Standardne pogreške koeficijenata smjera b' izračunali smo iz ovog izraza:

$$s_{b'} = \sqrt{\frac{\Sigma s'^2}{\Sigma c^2}} \quad (17)$$

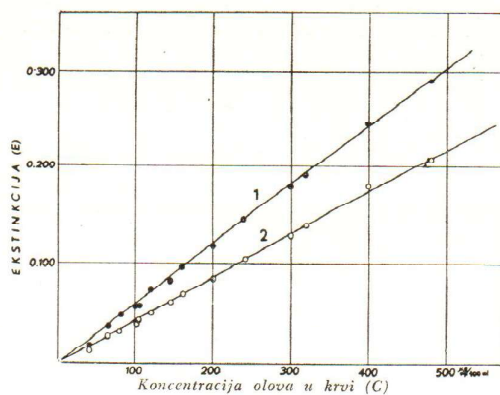
DISKUSIJA

Rezultati izračunavanja izneseni su u Tablici 6 i na slikama 2, 3 i 4. Tablica 6 daje podatke o broju n nezavisnih analiza, na osnovu kojih su izračunani regresioni pravci, o koeficijentima smjera b' za pravce, koji prolaze kroz ishodište, o standardnim pogreškama koeficijenata smjera, i jednadžbe, koje služe za direktno izračunavanje koncentracije olova u $\mu\text{g}/100$ ml krvi iz izmjerenih vrijednosti ekstinkcije otopina olovnog ditizonata. Podatke o konstantama a i b za pravce, koji ne prolaze kroz ishodište, nismo unijeli u tablicu, jer se konstanta a nije ni u jednom slučaju značajno razlikovala od nule.

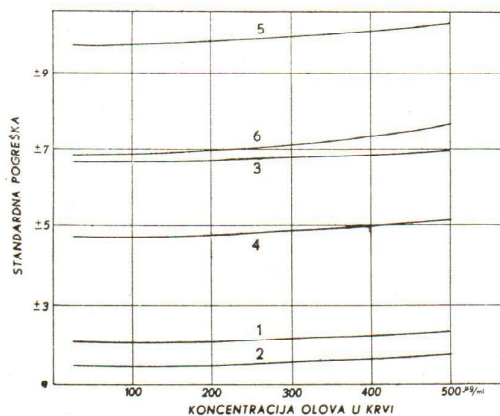
Tablica 6

	n	b'	S.P. (b')	$C = \frac{500}{b'} E$
Anorganski materijal (Beckman)	13	0.3101	0.572×10^{-3}	$C = 1612 \cdot E$
Krv (Beckman)	45	0.3023	1.39×10^{-3}	$C = 1654 \cdot E$
Krv (Fisher)	45	0.2171	1.45×10^{-3}	$C = 2303 \cdot E$

Slika 2 prikazuje regresione pravce kroz ishodište za određivanje olova u krvi, ako je ekstinkcija mjerena na Beckmanovom spektralnom fotometru, odnosno na Fisherovom elektrofotometru. Slika 3 je grafički prikaz zavisnosti standardne pogreške određivanja olova od koncentracije i broja paralelnih određivanja. Te vrijednosti izračunali smo iz jednadžbe (15). Pojedine krivulje odnose se na anorganski materijal, krv (Beckmanov spektralni fotometar) i krv (Fisherov elektrofotometar).



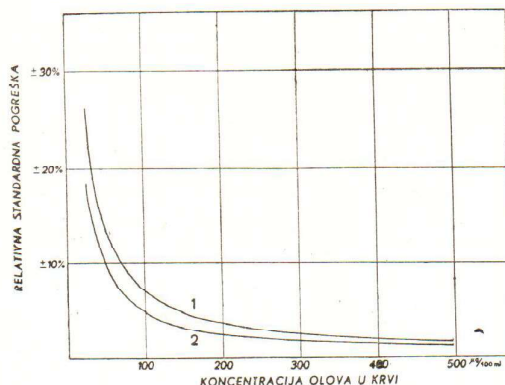
Sl. 2. Regresioni pravci: koncentracija olova u krvi (μg na 100 ml) – ekstinkcija otopine olovnog ditizonata za Beckmanov spektralni fotometar (1) i Fisherov elektrofotometar (2). Unesene točke označavaju srednje vrijednosti pojedinih određivanja (vidi tablicu 5). Jednadžba pravca (1): $C=1654.E$; jednadžba pravca (2): $C=2303.E$. Eksperimentalni uvjeti mjerenja ekstinkcije: Beckmanov spektralni fotometar: «Corex» kiveta 1.002 cm; širina pukotine 0.08 mm; valna dužina $\lambda=520 \text{ m}\mu$. Fisherov elektrofotometar: okrugle kivete promjera 1.2 cm; zeleni filter (525 $\text{m}\mu$)



Sl. 3. Standardne pogreške pri određivanju olova u krvi. Krivulja 1: anorganski materijal; krivulja 2: isto za dva paralelna određivanja; krivulja 3: krv (Beckmanov spektralni fotometar); krivulja 4: isto za dva paralelna određivanja; krivulja 5: krv (Fisherov elektrofotometar); krivulja 6: isto za dva paralelna određivanja. Vrijednosti standardnih pogrešaka izračunane su iz jednadžbe (15)

Slika 4 prikazuje odnos između relativne standardne pogreške i koncentracije olova u krvi (Beckmanov spektralni fotometar).

Svi se rezultati prikazani na dijagramima odnose na koncentracije olova u krvi od 25–500 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$. Koncentracije niže od 25 μg rijetko dolaze u obzir.



Sl. 4. Relativna standardna pogreška pri određivanju olova u krvi. Ekstinkcija izmjerena na Beckmanovom spektralnom fotometru. Krivulja 1: pojedinačni uzorci; krivulja 2: dva paralelna uzorka

Iz analize baždarnih pravaca mogu se razabrati ove činjenice:

1. Koeficijenti smjera b' baždarnog pravca za vodene otopine olovnog nitrata (koje nisu bile podvrgnute procesu mineralizacije dušičnom kiselinom i u kojima nije bilo željeza) i baždarnog pravca, koji je dobiven dodavanjem poznatih količina olova u krv razlikuju se doduše statistički značajno, ali za praktične potrebe ipak se može pri izračunavanju koncentracije olova u krvi upotrebiti baždarna krivulja dobivena na anorganskom materijalu. Dakako, da se iz baždarne krivulje dobivene na anorganskom materijalu ne može zaključiti na preciznost određivanja olova u krvi. Zbog toga treba, bar prvi puta, odrediti baždarnu krivulju na nizu uzoraka krvi, kojima je dodana poznata količina olova.

2. Koeficijent smjera b' baždarnog pravca za Fisherov elektrofotometar manji je od koeficijenta smjera baždarnog pravca za Beckmanov fotometar. Njihov odnos je 0.72. To znači, da je osjetljivost opisane metode za određivanje olova u krvi za 30% manja, ako se mjerenje vrši na Fisherovom fotometru.

Donju granicu osjetljivosti opisane metode možemo ocijeniti na ovaj način. Ako pretpostavimo, da se na Beckmanovom instrumentu mogu s dovoljnom točnošću izmjeriti razlike u vrijednosti ekstinkcije od 0.010, onda je najmanja koncentracija olova u krvi, koju još možemo odrediti, $16.5 \pm 5.1 \mu\text{g}/100\text{ ml}$. Povećavanjem dužine optičkog puta (duža kiveta) možemo doduše povećati točnost mjerenja ekstinkcije, zato što se apsolutna vrijednost ekstinkcije pomiče u povoljnije područje očitavanja,

i zato što se povećava razlika između vrijednosti ekstinkcije probe i slijepe probe. (Ekstinkcija slijepe probe iznosi obično oko 0.050. Ta razmjerno visoka vrijednost vjerojatno potječe od vodikova peroksida, koji, iako čistoće p. a., često sadržava dosta olova. Budući da je čišćenje vodikova peroksida dosta komplicirano, moramo se u praksi zadovoljiti tom visokom vrijednosti slijepe probe.) Nažalost preciznost samog određivanja olova ne poboljšava se na taj način, jer standardna pogreška, koja uglavnom zavisi od kemijskih operacija, a ne od mjerenja ekstinkcije, ostaje ista. Prema tome, ako želimo s dovoljnom preciznosti odrediti koncentracije olova u krvi, koje su manje od $15 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, treba da povećamo broj paralelnih analiza ili da povećamo uzorak krvi (na 10 ml).

3. Ako se za izračunavanje koncentracije olova u krvi poslužimo jednačbama $C=1654 E$, (Beckman), odnosno $C=2303 E$ (Fisher), onda se standardne pogreške za koncentracije od 25 do $500 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ kreću od ± 6.7 do $\pm 7.0 \mu\text{g}$, odnosno od ± 9.7 do $\pm 10.3 \mu\text{g}$. Ako se kod svakog određivanja analiziraju paralelno dva uzorka i uzme njihova srednja vrijednost, onda se standardne pogreške smanje na ± 4.7 do $\pm 5.1 \mu\text{g}$, odnosno ± 6.9 do $\pm 7.6 \mu\text{g}$. Standardne pogreške za »anorganski materijal« znatno su niže (od ± 1.0 do $\pm 1.5 \mu\text{g}$).

Vidi se, dakle, da metoda, koju smo opisali, potpuno zadovoljava u pogledu preciznosti i osjetljivosti. Čini nam se, također, da je pouzdanija od ostalih metoda, kod kojih se prije ekstrakcije olova željezo ne odstranjuje.

*Institut za higijenu rada.
Zagreb*

SUMMARY

DETERMINATION OF LEAD IN BLOOD

A »mono-colour« dithizone method for determination of lead in blood is described. The main points in which the proposed method differs from the usual dithizone methods are the following:

(1) the extraction of lead with dithizone solution is performed at rather high pH values (10.5),

(2) the iron is removed after mineralization of blood by means of a 2% aqueous cupferron solution.

The modification (1) increases the sensitivity of the method and at the same time dispenses with the necessity of washing lead-dithizonate solution to remove the excess dithizone before measuring the extinction. The cupferron extraction eliminates all the possible sources of error which are connected with the presence of iron.

The statistical treatment of calibration curves showed that the proposed method is reliable, sensitive and precise. The standard error of a single determination is not more than $\pm 7 \mu\text{g}$ for lead concentrations from 25 to $500 \mu\text{g}$ per 100 ml blood if the measurement of the optical density is performed with Beckman spectrophotometer at $520 \text{ m}\mu$. If two parallel determinations are made in each analysis the standard error may be reduced to $\pm 5 \mu\text{g}$.

*Institute of Industrial Hygiene.
Zagreb*

LITERATURA

1. *Barnes, H.*: J. Marine Biol. Assoc. United Kingdom, 26 (1946) 305 - citirano iz Sandel (14)
2. *Briefeld, L. P. and Patrick, T. M.*: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 14 (1942) 275-278
3. *Clifford, P. A. and Wichmann, H. J.*: J. Assoc. Official Agre. Chem. 19 (1936) 130
4. *Davies, O. L.*: Statistical Methods in Research and Production, London 1949
5. *Dawson, E. C.*: Analyst 73 (1948) 618
6. *Fabre, R. and Lem, F.*: Ann. méd. legale criminal. pol. sci. 16, 433, (1936)
7. *Fischer, H. und Leopoldi, G.*: Ztschr. f. d. ges. exper. Med. 97, 819, (1936)
8. *Irving, H. M.*: Nature 161, 805 (1948)
9. *Irving, H., Andrew, G., and Risdon, E. J.*: J. Chem. Soc. (1949) 541
10. *Kolthoff, I. M. and Sandell, E. B.*: J. Am. Chem. Soc. 63 (1941) 1906
11. *Krafft-Ström, H., Wulfert, K., und Sydnes, O.*: Biochem. Z. 290, 382 (1937)
12. *Pinkus, A. i Martin, F.*: J. Chim. phys. 24 (1927), 83-102 i 137-168
13. *Ruždić, I.*: Farm. Vjesnik 14-15 (1941) 299
14. *Sandell, E. B.*: Colometric Determination of Traces of Metals, Interscience Publishers, New York, 1950, str. 388
15. *Uesterberg, R. and Sjöholm, O.*: Mikrochem. ver. Mikrochim. Acta 38, 81 (1951)
16. *Welcher, F. J.*: Organic Analytical Reagents, Volume III., D. Van Nostrand Comp. Inc. 1947.