

MIKROVLNNÁ MINERALIZACE TĚLNÍCH TEKUTIN

TOMÁŠ NAVRÁTIL^a, ZDENA DLASKOVÁ^b,
MILOSLAV KOPANICA^c a LADISLAV NOVOTNÝ^a

^aÚstav fyzikální chemie J. Heyrovského, Akademie věd České republiky, Dolejškova 3, 182 23 Praha 8, Navratil@jh-inst.cas.cz, ^bKlinika nemocí z povolání, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Toxikologická laboratoř, Na Bojišti 1, 128 00 Praha 2, ^cUNESCO satelitní centrum pro stopové prvky na Karlově univerzitě, Praha

Došlo dne 11.X.1999

Klíčová slova: voltametrie, biochemie, intoxikace olovem, analýza moči, krve, stolice

Úvod

K otravě těžkými kovy může u člověka dojít při profesionální expozici (nemoc z povolání) nebo jiným způsobem (např. sebevražednými pokusy, působením kontaminovaného životního prostředí, apod.). Míra intoxikace pacienta olovem se určuje stanovením až čtyř (někdy i pěti) parametrů – koncentrace olovnatých iontů v krvi, v moči a ve stolici a dále stanovením kyseliny δ -aminolevulové (popř. porfyrinů) v moči¹.

Vzorky moče, analyzované v této práci, byly odebírány při pravidelných preventivních prohlídkách osobám, vystavených olovu v pracovním prostředí.

Provádění všech uvedených analýz podle předepsaných postupů^{2,3} je značně časově i instrumentálně náročné. Doba kompletní analýzy všech čtyř základních ukazatelů přesahuje 13 hodin (z toho asi 8–12 hodin se spotřebuje na mineralizaci vzorku a tudíž doba samotné analýzy je proti tomu zanedbatelná). Je nutné vzít v úvahu, že v případě použití voltametrie je nutné provést mineralizaci důkladněji, než je tomu při užití AAS, jak plyne i z literatury⁴.

Vzhledem k tomu, že po vyšetření pacienta je nutno v co nejkratší lhůtě rozhodnout o způsobu léčby, je rychlé dodání výsledků analýz velmi důležité. Aktuální je proto hledání způsobů, jak zrychlit a popřípadě i zjednodušit potřebné analytické postupy.

Podle některých pramenů lze nahradit mineralizaci moči vícenásobným ředěním demineralizovanou vodou okyselenou kyselinou dusičnou⁵, avšak tento postup je jen stěží aplikovatelný při užití voltametrických metod, kde přítomnost organických látek působí rušivě a hlavně tyto látky na sebe mohou vázat stanovený kov.

Je známo, že na trhu se vyskytuje mnoho typů specializovaných mineralizačních systémů, avšak jejich cena se pohybuje v řádech statisíců korun, což si vzhledem k ekonomické situaci našeho zdravotnictví může dovolit jen málokterá laboratoř.

Experimentální část

Přístroje

Podle klasifikace literatury⁶ by měla být mikrovlnná mineralizace označována jako podtyp mokrého rozkladu, avšak pro jednoduchost je v této práci označována pouze jako „mikrovlnná“ a mineralizace na mokré cestě za atmosférického tlaku jako „mineralizace na mokré cestě“.

Mineralizace vzorků na mokré cestě byla prováděna za pomoci topného hnízda a vodní lázně.

Mikrovlnná mineralizace byla prováděna v mikrovlnném mineralizačním zařízení (Polaro-Sensors, spol. s r.o., Praha) (max. výkon 1000 W). Maximální počet současně mineralizovaných vzorků na vnitřním rotoru byl šest. Maximální přípustný tlak v zařízení je 4 MPa, při jeho překročení (exploze) dojde k proražení pojistky (ochranného víčka) a tlak je přepouštěn z nádoby přepadem do expanzní nádoby.

Pro voltametrická měření byl užit počítačem řízený Eco-Tribo Polarograf (Polaro-Sensors, spol. s r.o., Praha). Pracovní metodou byla diferenční pulsní anodická stripping voltametrie. Pro odstranění vzdušného kyslíku sloužilo vyublání dusíkem.

Chemikálie

Pro přidávky olovených iontů byly používány standardní roztoky Astatol (Analytika, spol. s r.o., Praha) o základní koncentraci 1 mg.ml⁻¹, které byly podle potřeby ředěny 1:10 až 1:100. Kyselina chlorovodíková, kyselina dusičná i peroxosíran sodný (Na₂S₂O₈) (Lachema Brno) byly čistoty p. a.

Mineralizace na „mokré cestě“

Konkrétní postup včetně homogenizace byl popsán hlavně v literatuře^{1,2,7}.

Mineralizace moči na mokré cestě^{7,8} byla prováděna tak, že 100 ml moči bylo smícháno se 30 ml koncentrované kyseliny dusičné a roztok byl odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 5 ml 30 % H₂O₂ a odpařen znovu do sucha. Tento proces byl opakován až do vzniku bílého odparku. K němu bylo přidáno 5 ml 10 % KI a 3–5 ml koncentrované HNO₃ a odpařování bylo opakováno až do vzniku bílého odparku, který byl rozpuštěn v destilované vodě a zředěn na 10 ml. Následovalo srážení pomocí 2 ml 1 M-(NH₄)₃PO₄, 2 ml 1 M-NH₄OH a 20 ml 30 % H₂O₂. Následoval sedimentační proces (30 min) a centrifugace při 2500 s⁻¹ po dobu 10 min. Sraženina byla promyta suspendováním v 10 ml destilované vody s přidávkem 2–3 kapek čpavku a celý proces centrifugace včetně promytí se opakoval ještě dvakrát. Nakonec se sediment rozpustil v 0,5 ml koncentrované HCl a roztok se doplnil na 10 ml destilovanou vodou.

„Mikrovlnná“ mineralizace

Ke 20 ml vzorku moči bylo přidáno 80 ml destilované vody. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno do mikrovlnné mineralizační nádoby 5 ml, přidáno 5 ml destilované vody a 100 mg peroxosíranu sodného. Nádobka byla po uzavření vložena do mineralizační jednotky, byl nastaven výkon v intervalu mezi 500 W až 1000 W. Testovaná doba sepnutí byla

mezi 15 s a 2 minutami. Pro úplnou mineralizaci bylo zkušeno i opakované provedení mikrovlnného rozkladu, které se provádělo po úplném vychladnutí nádoby (cca 15–20 min). Po vyjmutí nádoby byl mineralizát kvantitativně převeden do kádinky, přidáno 100 mg peroxosíranu sodného, provedeno odpaření do sucha. Mineralizát byl kvantitativně převeden do 25 ml odměrné baňky, přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné a doplněno redestilovanou vodou po rysku.

Postup stanovení

25 ml mineralizátu bylo převedeno do voltametrické nádoby. Měření bylo prováděno metodou anodické diferenční pulsní voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě⁹ (počáteční potenciál $E_{in} = -800$ mV, konečný $E_{fin} = +150$ mV vs. nasycená kalomelová elektroda SKE, rychlost scenu 20 mV.s⁻¹). Pík olova byl registrován u -375 mV vs. SKE. Současně bylo možno vyhodnocovat i pík kadmia při -550 mV a mědi při $+50$ mV. Po přidání EDTA lze stanovit i thalium u -400 mV.

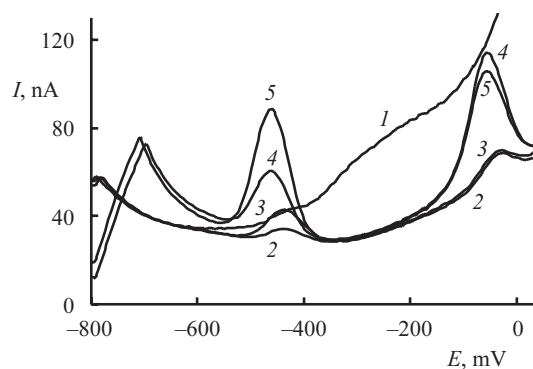
Výsledky a diskuse

Optimalizace postupu mikrovlnné mineralizace

Jako vhodné oxidační činidlo byl zvolen peroxosíran sodný. Na rozdíl od jiných obdobně účinných látek (např. peroxidů) nevykazuje takovou aktivitu, která by vedla k enormnímu nárůstu tlaku v mineralizátoru. 10 ml roztoku vzorku v nádobce je maximální přijatelné množství.

Regulovatelný výkon byl nastavován mezi 500 W až 1000 W (maximální nastavitelná hodnota zařízení). Testovaná doba sepnutí byla mezi 15 s a 2 min. Pokud se prodloužila doba mineralizace přes 1 minutu, docházelo asi ve 30 % pokusů k překročení maximálního povoleného tlaku. Pravděpodobnost překročení maximálního přípustného tlaku narůstá i se vzrůstajícím výkonem mineralizační jednotky. Při době mineralizace 2 minuty došlo k překročení mezního tlaku téměř v 80 % případech.

V souladu s poznatkami cit.⁶ se jako optimální jevílo užití výkonu 500 W, max. 700 W. Jak se však ukázalo, u některých vzorků nedošlo po 60 s mineralizace k úplnému rozkladu a výsledky byly asi o 10–15 % nižší než u mineralizace na mokré cestě. Proto se jeví jako vhodné provést ještě jednu mineralizační proces. Mineralizační zařízení pracuje ve spínaném režimu a nelze zaručit, že v okamžiku vypnutí není přímo v činnosti. Proto okamžitě zapnutí by ve výsledku odpovídalo podstatně vyššímu výkonu a zvýšilo by to pravděpodobnost překročení horní hranice přípustného tlaku téměř k 80 %. Ukázalo se jako optimální nechat nádobku vychladnout po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Pak již postačovalo při stejném výkonu provádět rozklad znovu po dobu 30 s. Zbylé malé procento přítomných organických látek v mineralizátu bylo možno odstranit jeho povařením 100 mg peroxosíranu sodného a následným odpařením do sucha. Odparek byl převeden do 25 ml odměrné baňky, bylo přidáno 0,5 ml koncentrované kyseliny dusičné a doplněno redestilovanou vodou. Nutnost povaření mineralizátu s peroxosíranem je patrná z obr. 1, kde je vidět značné potlačení píku olova



Obr. 1. Srovnání voltamogramů při stanovení olova v moči: 1 – bez mineralizace, 2 – po mikrovlnné mineralizaci bez povaření s peroxosíranem, 3 – po mikrovlnné mineralizaci bez povaření s peroxosíranem s přidavkem $5 \mu\text{g Pb}^{2+}$, 4 – po mikrovlnné mineralizaci a povaření s peroxosíranem, 5 – po mineralizaci a povaření s peroxosíranem s přidavkem $5 \mu\text{g Pb}^{2+}$

Tabulka I

Srovnání výsledků stanovení olova v moči při mineralizaci na mokré cestě a mikrovlnnou mineralizací (výsledky mikrovlnné mineralizace považovány za 100 %)

Pacient	Pb [mg.l^{-1}]		Rozdíl [%]
	mokrá cesta	mikrovlnná mineralizace	
1	0,050	0,055	-9,1
2	0,083	0,087	-4,6
3	0,075	0,079	-5,1
4	0,059	0,055	7,2
5	0,019	0,021	-9,5
6	0,022	0,025	-12,0
7	0,021	0,023	-8,7
8	0,070	0,074	-5,4
9	0,037	0,037	0,0
10	0,017	0,019	-10,5

zbývající organickou maticí. Stejně tak je možno usuzovat z obr. 1, že ředění doporučované v cit.⁵, jen ztěžá nahradit mineralizaci.

Výsledky srovnání obou výše zmíněných mineralizačních postupů jsou uvedeny v tab. I. Z nich je patrné, že hodnoty koncentrací získaných mineralizací na mokré cestě jsou v průměru o 5–10 % nižší než při aplikaci mikrovlnného rozkladu, což dokazuje větší důkladnost rozkladu.

Uvedený postup mikrovlnné mineralizace lze aplikovat nejen při stanovení olova, ale i ostatních prvků, které poskytují anodický pík ve voltametrickém měření společně s olovem. Jedná se především o kadmium, měď a po přidání EDTA i o thalium. Při klasické mineralizaci na mokré cestě výše uvedeným způsobem bylo nutno u kadmia postupovat odlišným způsobem, jiným opět pro stanovení mědi. Mikrovlnný postup mineralizace se ukazuje jako univerzální, vhodný pro všechny v tomto odstavci uvedené prvky.

Výsledky stanovení indikátorů otravy

Při vyhodnocení voltametrických měření byla použita metoda standardního přídatku. Každé měření bylo třikrát opakováno a při užití verze Polar Pro 1.0 for Windows¹⁰ byla pro výpočet užitá všechna tři měření se třemi přídatky. Standardní relativní odchylka^{11,12} samotného měření byla nižší než 1 % (vypočtena přímo programem Polar Pro¹⁰). Měření probíhala za laboratorní teploty 298±0,5 K. Reprodukovatelnost záznamů byla lepší než ±1 %. Roztoky byly připraveny s použitím redestilované vody. Měření byla prováděna nezávisle na obou pracovištích zúčastněných autorů, přičemž mezilaboratorní rozdíly mezi získanými výsledky nebyly pozorovány. Tím byla testována i reprodukovatelnost stanovení, která se pohybovala v rozmezí ±15 %.

Závěr

Je popsán postup mikrovlnné mineralizace vzorků moči, případně stolice jako náhrada za mineralizaci na mokré cestě. Tento nový způsob mineralizace je prováděn za přídatku peroxosíranu sodného, při tlaku menším než 4 MPa, a to dvakrát po sobě opakovaně po dobu 60 s a 30 s. Pro kompletní rozklad je třeba mineralizát ještě jednou povařit s peroxosíranem sodným a následně odpařit do sucha. Výsledky obdržené z analýzy po mikrovlnné mineralizaci jsou asi o 5–10 % vyšší než po mineralizaci klasické, což indikuje důkladnější rozklad matrice. Doba potřebná k mikrovlnné mineralizaci (cca 30 min) je podstatně kratší nežli doba potřebná ke klasické mineralizaci na mokré cestě. Stejný způsob mineralizace lze aplikovat při stanovení několika kovů v moči najednou (např. kadmia, thalia, mědi a olova).

Autoři děkují za grantovou podporu IGA MZ ČR reg. čís. grantu 4238-3/97 a GA ČR reg. č. grantu 203/98/P239.

LITERATURA

1. Bardoděj Z., David A., Šedivec V., Škramovský S., Teisinger J.: *Expoziční testy v průmyslové toxikologii*. Avicenum, Praha 1980.

2. De Medinilla J., Espigares M.: *J. Soc. Occup. Med.* 41, 107 (1991).
3. Grabecki J., Haduch T., Urbanovica H.: *Int. Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.* 23, 226 (1967).
4. Mader P., Čurďová E.: *Chem. Listy* 91, 227 (1997).
5. Spěváčková V., Knotková J.: *Chem. Listy* 92, 287 (1998).
6. Mader P., Čurďová E.: *Chem. Listy* 91, 227 (1997).
7. Goldfrank L. R., Flomenbau N. E.: *Goldfrank's Toxicologic Emergencies*. Appleton and Lange, New York 1994.
8. Dlasková Z., Navrátil T., Novotný L., Pelclová D., Mádllová P.: *Chem. Listy* 93, 142 (1999).
9. *Metodiky k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*. Polaro-Sensors, Praha 1994–98.
10. *Manuál k počítačovému Eco-Tribo Polarografu PC-ETP*. Polaro-Sensors, Praha 1994–98.
11. Eckschlager K.: *Chemometrie*. Karolinum, Praha 1991.
12. Meloun M., Militký J.: *Statistické zpracování experimentálních dat*. Edice Plus, Praha 1994.

T. Navrátil^a, Z. Dlasková^b, M. Kopanica^c, and L. Novotný^a (^a*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic*, ^b*Clinic of Occupational Diseases, Toxicological Laboratory, 1st Faculty of Medicine, Charles University*, ^c*UNESCO Trace Element Satellite Centre, Charles University, Prague*): **Microwave Mineralization of Body Fluids**

A procedure is described for microwave mineralization of urine or faeces samples as replacement for wet mineralization. The new method uses a sodium peroxosulfate solution at pressures lower than 4 MPa in two consecutive mineralizations for 60 and 30 s. For complete decomposition, it is necessary to boil the mixture once again with a sodium peroxosulfate solution and evaporate it to dryness. The results obtained are about 5–10 % higher than those from classic mineralization, which indicates a more thorough decomposition of the matrix. The time required for microwave mineralization (ca. 30 min) is substantially shorter than that for wet mineralization. The same method can be used in determination of metals in urine simultaneously (e.g. cadmium, thallium, copper, and lead).