

PRAKTYKA LABORATORYJNA

TERESA SZPRENGIER

Oznaczanie rtęci w materiale biologicznym

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr T. JUSZKIEWICZ

Wprowadzenie wielu różnorodnych związków chemicznych do rolnictwa w celu ochrony roślin i zwierząt przed szkodnikami okazało się jednym ze skuteczniejszych sposobów zwiększenia wydajności produkcji rolnej. Jednak stosowanie różnych chemicznie i silnie działających preparatów toksycznych stwarza niebezpieczeństwo przypadkowych zatruć, powstawania szkodliwych pozostałości związków chemicznych w produktach spożywczych i skażenia środowiska. Jedną z wielu grup związków stosowanych w celu ochrony roślin są połączenia organiczne rtęci. Problemy toksykologiczne związane ze stosowaniem w rolnictwie związków rtęci przedstawiono w pracy poprzedniej (23).

Pracownicy służby weterynaryjnej najczęściej mają do czynienia z konkretnymi przypadkami zatruć, gdzie chodzi o wiarygodne stwierdzenie przyczyny zatrucia zwierzęcia. Z racji niespecyficzności objawów chorobowych w przypadku związków rtęci, jedynym sposobem pozostaje zidentyfikowanie i ilościowe określenie związku toksycznego w organizmie. O ile stwierdzenie obecności rtęci jest stosunkowo łatwe i służy do tego celu szereg metod jakościowych, o tyle przy oznaczaniu ilościowym analityk napotyka na dość poważne przeszkody. Jak wiadomo, rtęć jest pierwiastkiem lotnym i mineralizacji materiału biologicznego w otwartej kolbie Kjeldahla towarzyszą bardzo duże straty. Dlatego większość opublikowanych metod oznaczania opiera się na spalaniu w układzie zamkniętym.

Metody oznaczania rtęci w materiale biologicznym można zasadniczo podzielić na dwa etapy: a) mineralizacja materiału biologicznego, b) oznaczanie rtęci. Mineralizacja może przebiegać na drodze spalania na mokro z kwasami: siarkowym, azotowym, nadchlorowym lub nadmanganianem potasowym (2, 4, 8, 9, 11, 12, 14, 19). Znane są także metody spalania próbek w tlenie z zastosowaniem kolby Schönigera (6), lub jej modyfikacji (3, 5, 16, 25). Opisano również sposób trawienia enzymatycznego materiału biologicznego (17). Oznaczanie rtęci w zmineralizowanym materiale opiera się w większości metod na reakcji z ditizonem i oznaczaniu spektrofotometrycznym ditizonianu rtęciowego. Dokładniejsze, ale bardziej skomplikowane są metody z zastosowaniem spektrofotometrii atomowo-absorpcyjnej, emisyjnej (1,

7, 15, 22) lub techniki izotopowej (13, 18, 20, 24).

Różnorodność stosowanych metod sprawia, że analityk stojący przed zadaniem oznaczania rtęci ma trudności z wyborem dogodnej i odpowiedniej metody. W warunkach laboratoriów diagnostycznych np. w pracowni toksykologicznej ZHW lub WIS, potrzebna jest metoda względnie prosta, pozwalająca wykryć i oznaczyć rtęć w paszy, treści przewodu pokarmowego i tkankach. Ponieważ Zakład nasz był wielokrotnie proszony o udostępnienie metody oznaczania ilościowego rtęci, postanowiliśmy opublikować doświadczenia i uwagi na ten temat. Poniżej opisaną metodę stosujemy w naszym Zakładzie i wydaje się, że jest ona stosunkowo prosta i łatwa do wykonania w warunkach każdego laboratorium.

Metoda opiera się na mineralizacji materiału biologicznego na mokro, ekstrakcji rtęci roztworem ditizonu i pomiarze wielkości absorpcji ditizonianu rtęciowego przy długości fali 486 m μ .

Aparatura

1. Zestaw do mineralizacji na mokro AL-9 (prod. Zakład Doświadczalny Chemii Gospodarczej „Polle-na”, Wydział Produkcji Aparatury Laboratoryjnej, Gliwice) lub podobny wg załączonego rysunku (ryc. 1.)

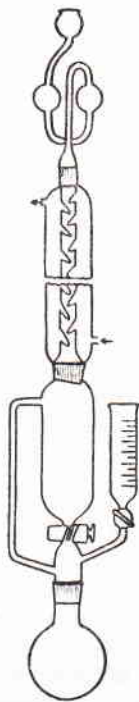
2. Rozdzielacze, cylindry, pipety i inne typowe szkło laboratoryjne.

Przed użyciem zestaw i szkło laboratoryjne powinno być umyte kwasem azotowym i dokładnie opłukane wodą redestylowaną.

3. Spektrofotometr lub fotokolorometr. W naszym Zakładzie stosujemy spektrofotometr Beckman DU lub spektrokolorometr Spekol.

Odczynniki

1. Kwas siarkowy, c. wł. 1,84
2. Kwas siarkowy, roztwór 1 N
3. Kwas azotowy, c. wł. 1,42
4. Amoniak, roztwór 25%
5. Kwas octowy, roztwór 30%
6. Kwas solny, roztwór 0,1 N
7. Chloroform redestylowany, stabilizowany alkoholem absolutnym w ilości 10 ml alkoholu etylowego na 1 litr chloroformu.
8. Chlorowodorek hydroksyloaminy, roztwór 20%. Sporządzony roztwór wodny wytrząsnąć w rozdzielaczu z około 5 ml rozcieńczonego roztworu ditizonu, a następnie przepłukać kilkoma porcjami chloroformu, aż do usunięcia śladów ditizonu.
9. Azotyn sodowy, roztwór 5%
10. Mocznik, roztwór 10%



Ryc. 1. Zestaw szklany do mineralizacji materiału biologicznego.

11. Wersenian dwusodowy (EDTA), roztwór 2,5%
12. Ditzion, roztwory chloroformowe:

a) roztwór podstawowy około 0,05%. Rozpuścić 0,1 g ditizonu w 150 ml chloroformu i wytrząsać przez 10 min., przesączyć przez twardy sączek do rozdzielacza i wytrząsać z trzema 100 ml porcjami rozcieńczonego amoniaku (1:100). Połączone roztwory amoniakalne zobojętnić 1 N kwasem siarkowym i dodać nadmiar około 10 ml tego kwasu. Dodać 200 ml chloroformu i silnie wytrząsać przez 2 minuty. Po rozdzieleniu faz, przesączyć warstwę chloroformową przez suchy sączek do czystej butelki z ciemnego szkła i przechowywać w lodówce w temperaturze około 3°C. Trwały około 6 miesięcy.

b) roztwór rozcieńczony około 0,001% — 2 ml roztworu podstawowego rozcieńcza się chloroformem do 100 ml, przygotować bezpośrednio przed użyciem.

13. Roztwory wzorcowe chlorku rtęciowego:

a) roztwór podstawowy — 0,1354 g $HgCl_2$ rozpuścić w 1 litrze 0,1 N HCl (1 ml roztworu zawiera 100 μg Hg).

b) roztwór rozcieńczony — 10 ml podstawowego uzupełnić do 1 litra 0,1 N HCl (1 ml roztworu zawiera 1 μg Hg).

Wszystkie odczynniki używane w metodzie powinny być analitycznie czyste, najlepiej cz.d.a. Woda stosowana do sporządzania roztworów powinna być redestylowana w szklanym aparacie.

Mineralizacja

Wspomniany zestaw do mineralizacji może służyć do spalenia 5 g suchego materiału roślinnego (zboże, ryż) lub 25 g tkanek o większej zawartości wody. Rozdrobnione próbki zboża zemieć, tkanki zwierzęce zhomogenizować i umieścić w kolbie reakcyjnej dodając jednocześnie kilka szklanych granulek lub kawałeczki tłuczonej porcelany. Materiał suchy należy zwilżyć 10 ml wody. Zmontować zestaw uszczelniając szlify stężonym kwasem siarkowym. W rurce fermentacyjnej umieścić 2–3 ml 0,1 N kwasu solnego. Dodać przez wkraplacz 5 ml stężonego kwasu siarko-

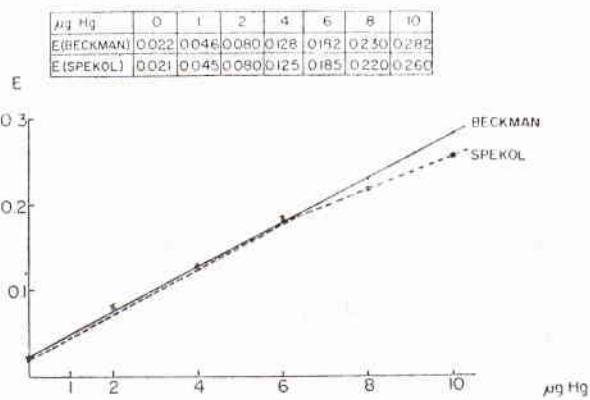
wego i 30 ml stężonego kwasu azotowego i pozostawić bez ogrzewania aż do ustania burzliwej reakcji (najlepiej na całą noc). Następnie przy otwartym kurku kondensora ogrzewać kolbę początkowo bardzo ostrożnie, a po ustaniu pienienia coraz silniej. Po zniknięciu części stałych w kolbie, zamknąć kurek i oddestylować do kondensora wodę (około 10 ml) po czym odprowadzić zebrany destylat do 200 ml kolby miarowej. Ogrzewać dalej przy zamkniętym kurku kondensora. W miarę zagęszczania się i ciemnienia mieszaniny, zbierający się kwas azotowy wprowadzić porcjami spowrotem do kolby, nie dopuszczając do zwęglenia substancji organicznych. Proces mineralizacji jest zakończony z chwilą pojawienia się białych dymów kwasu siarkowego nad nie ciemniejącą, bezbarwną lub żółtawą cieczą w kolbie. W przypadku przedłużenia się mineralizacji, kiedy spuszcza z kondensora kwas azotowy nie powoduje przejścia pynu w kolbie, zużyty kwas należy usunąć przez kranik z tyłu kondensora i dołączyć do przedestylowanej wody, znajdującej się w kolbie miarowej, a przez wkraplacz dodać świeżą porcję kwasu azotowego. Po ochłodzeniu wlać przez chłodnicę do kolby zawartość rurki fermentacyjnej i około 20 ml wody redestylowanej, a następnie silnie ogrzewać do pojawienia się białych dymów. Przepłukać chłodnicę i kondensor wodą. Po całkowitym ochłodzeniu mineralizat przesączyć przez wilgotny sączek z bibuły Whatman 42 do kolby miarowej (w której już znajduje się przedestylowana woda) i uzupełnić wodą redestylowaną do kreski.

Wykonanie oznaczenia

Mineralizat lub jego część (zależnie od spodziewanego stężenia Hg) przelać do zlewki, zneutralizować stężonym amoniakiem tak, aby uzyskać środowisko 1 N kwasu (pH ok. 0), dodać 10 ml 20% roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy i pozostawić na 15 minut. Przelać do rozdzielacza i ekstrahować wytrząsając przez 1 min. z kilkoma 10 ml porcjami rozcieńczonego roztworu ditizonu, aż do uzyskania niezmiennego się zielonego zabarwienia warstwy ditizonowej. Połączyć ekstrakty ditizonowe w 100 ml rozdzielacza i przemyć 25 ml 0,1 N kwasu solnego i 5 ml chlorowodoru hydroksyloaminy. Oddzielić warstwę ditizonową do kolejnego 100 ml rozdzielacza jednocześnie z 2–3 ml chloroformu użytego do popłukania poprzedniego rozdzielacza. Dodać 10 ml 0,1 N kwasu solnego i 1 ml 5% wodnego roztworu azotynu sodu i wytrząsać mieszaninę przez 1 min., odrzucić warstwę chloroformową. Przepłukać warstwę wodną 2–3 ml chloroformu, popłuczynny odrzucić. Dodać 1 ml 20% roztworu chlorowodoru hydroksyloaminy, zmieszać i pozostawić na 15 min. od czasu do czasu wytrząsając. Dodać 1 ml 10% roztworu mocznika, 1 ml 2,5% roztworu EDTA i 3 ml 30% kwasu octowego oraz 10 ml rozcieńczonego roztworu ditizonu. Wstrząsać mieszaninę przez 1 minutę. Odczekać do rozdzielenia się warstw i spuścić roztwór ditizonowy przez zwitek suchej waty umieszczonej w nóżce rozdzielacza do 1 cm kuwety spektrofotometru. Odczytywać ekstynkcję wobec rozcieńczonego roztworu ditizonu przy długości fali 486 m μ . Ilość wyekstrahowanej rtęci odczytać z krzywej wzorcowej i przeliczyć na zawartość w całej próbce.

Sporządzanie krzywej wzorcowej

Do 7 rozdzielaczy odmierzyć z biurety rozcieńczony roztwór wzorcowy rtęci w ilościach odpowiadających 1, 2, 4, 6, 8, 10 μg Hg i dopełnić 0,1 N kwasem solnym do 10 ml. Do wszystkich rozdzielaczy dodać po 1 ml roztworu wersenianu sodowego, 1 ml roztworu mocznika, 3 ml roztworu kwasu octowego i 10 ml rozcieńczonego roztworu ditizonu. Wytrząsać przez minutę, zmierzyć ekstynkcję ekstraktów ditizonowych używając jako odnośnika roztworu rozcieńczonego ditizonu. Wykreślić krzywą zależności ekstynkcji od stężenia.



Ryc. 2. Krzywe wzorcowe otrzymane przez pomiar ekstynkcji na fotokolorymetrze Spekol i spektrofotometr Beckman DU.

Na ryc. 2 porównano krzywe wzorcowe otrzymane przez pomiar ekstynkcji na fotokolorymetrze Spekol (S) i spektrofotometr Beckman DU (B). Krzywe w początkowym odcinku pokrywają się, natomiast przy wyższych stężeniach, wartości ekstynkcji na fotokolorymetrze Spekol są nieco niższe. Nie stanowi to jednak przeszkody w dokonywaniu pomiarów na Spekolu, należy tylko przy odczytach uwzględnić odchylenie krzywej stężeń.

Sprawdzenie odzysków

W celu sprawdzenia odzysków rtęci z materiału biologicznego, mineralizowano próbki pszenicy i nerek bydłych postępując według opisanej metody. Przed spaleniem dodano do próbek różne ilości roztworu wzorcowego chlorku rtęciowego odpowiadające ilościom 5, 10 i 20 µg rtęci. Wyniki oznaczeń zestawiono w tab. 1 i 2.

Tab. 1. Odzyski rtęci dodanej jako chlorek rtęciowy do próbek pszenicy o ciężarze 5 g

Dodano µg	Odzyskano		
	µg	%	średnia, %
5,0	3,2	64	69,3
5,0	3,6	72	
5,0	3,6	72	
10,0	7,8	78	76,6
10,0	7,8	78	
10,0	7,4	74	
20,0	16,6	83	81,3
20,0	16,2	81	
20,0	16,0	80	

Omówienie wyników

Opisana metoda umożliwia całkowite zmineralizowanie próbki materiału biologicznego w czasie około 5 godzin. Zastosowanie zamkniętego układu kondensacyjnego zapewnia utrzymanie lotnych par rtęci. Najmniejsza wykrywalna ilość rtęci w próbce wynosi 0,5 µg, pozwala to na wykrycie stężeń 0,1 ppm w materiale suchym, 0,02 ppm w materiale biologicznym o większej zawartości wody. Stosowanie aparatu do mineralizacji z kolbą o większej pojemności

Tab. 2. Odzyski rtęci dodanej jako chlorek rtęciowy do próbek nerek bydłych o ciężarze 25 g

Dodano µg	Odzyskano		
	µg	%	średnia, %
5,0	3,8	76	73,3
5,0	3,6	72	
5,0	3,6	72	
10,0	7,7	77	75,2
10,0	8,0	80	
10,0	7,0	70	
20,0	16,0	80	84,0
20,0	16,2	81	
20,0	18,2	91	

pozwoлиłoby na spalenie większych próbek, a zatem na uzyskanie wyższych wykrywalności.

Dużym udogodnieniem jest możliwość stosowania do oznaczeń fotokolorymetru Spekol, który praktycznie znajduje się w wyposażeniu każdego laboratorium. Sprzyjającym jest także fakt, że używane w metodzie zestawy szklane do mineralizacji są produkowane u nas w kraju i nabycie ich nie stanowi większego kłopotu.

Przy opracowywaniu opisanej metody oparto się na oficjalnej metodzie Komitetu Metod Analitycznych W. Brytanii (2) oraz na metodzie stosowanej przez Instytut Ekspertyz Sądowych w Krakowie (10).

Piśmiennictwo

1. April R. W., Hume D. N.: Science, 170, 849, 1970.
2. Analytical Methods Committee: Analyst, 90, 515, 1965.
3. Belisle J., Green C. D., Winter L. D.: Anal. Chem., 40, 1006, 1968.
4. Epps A. E.: JAOAC, 49, 793, 1966.
5. Fujita M., Takeda Y., Terao T., Hoshino O., Ukita T.: Anal. Chem., 40, 2042, 1968.
6. Gutenmann W. H., Lisk D. J.: J. Agr. Food Chem., 8, 306, 1960.
7. Hath W. R., Ott L. W.: Anal. Chem.: 40, 2085, 1968.
8. Jeffus T., Elkins J. S., Kenner C. T.: JAOAC, 53, 1172, 1970.
9. Kimura Y., Miller V. L.: Anal. Chim. Acta, 27, 325, 1962.
10. Klewska A., Kobylecka K., Różycka D., Strycharska M.: Z zagadnień kryminalistyki, 3, 86, 1968.
11. Legatowa B., Horodyńska S., Kaszycka A.: Roczniki PZH, 21, 21, 1970.
12. Lindstedt G.: Analyst, 95, 264, 1970.
13. Ljunggren K., Westermark T.: Pure Appl. Chem.: 1, 127, 1960.
14. Mayer J.: Bull. Environ. Cont. Toxicol.: 5, 383, 1970.
15. Munns R. K., Holland D. C.: JAOAC, 54, 202, 1971.
16. Pappas E. G., Rosenberg L. A.: JAOAC, 49, 782, 1966.
17. Piechocka J.: Roczniki PZH, 19, 291, 1968.
18. Sjöstrand B.: Anal. Chem., 36, 814, 1964.
19. Smart N. A., Hill A. R. C.: Analyst, 94, 143, 1969.
20. Smith H.: Anal. Chem.: 35, 635, 1963.
21. Stolman A.: Progress in Chemical Toxicology, vol. IV, Academic Press, New York and London, 1969.
22. Suzuki T., Miyama T., Katsunuma H.: Bull. Environ. Cont. Toxicol., 5, 502, 1970.
23. Szprengier T.: Med. Wet., 27, 82, 1971.
24. Underdal B.: Nord. Vet.-Med.: 20, 9, 1968.
25. White M. N., Lisk D. J.: JAOAC, 53, 530, 1970.

Adres autora: mgr Teresa Szprengier, Puławy, Al. Partyzantów 57. Instytut Weterynarii.

Шпренгер Т. — Определение ртути в биологическом материале.

В работе описана методика определения микроколичества ртути в растениях и в тканях животных. Минерализацию органического вещества проводили при помощи серной и азотной кислот в стеклянной установке. Ртуть определяли в минера-

лизованной субстанций колориметрическим методом с применением дитизона. Сравнительные определения провели при помощи спектрофотометра и фотоколориметра. Чувствительность метода — 0,1 мг/кг зерна и 0,02 мг/кг ткани животных. Процент выявленной ртути при количествах 1—10 μg составляет 70—84%.

Szprengier T. — **The determination of mercury in biological material.**

The method for the determination of microgram amounts of mercury in plant and animal tissues has

been described. The digesting procedure was performed by means of sulphuric and nitric acids in the glass apparatus. After digestion the solution was treated with dithizone, and mercury content determined spectrophotometrically. The results obtained with spectrophotometer and photocolourimeter were compared. The sensitivity of the method equaled 0,5 μg of mercury in the sample. It was possible to find 0.02—0.1 ppm of mercury depending upon the investigated material. The recoveries of 70—84% in the samples containing 1—10 μg of mercury have been confirmed.

MARIA ROMANOWSKA

Wykrywanie Foschloru w materiale biologicznym metodami Pokrowskiego i chromatografii cienkowarstwowej

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Lublinie

Kierownik: dr T. DĄBROWSKI

Jednym z najczęściej stosowanych w Polsce insektycydów fosforoorganicznych jest Foschlor (Neguvon, Bayer L 13—59, Chlorofos, Trichlorofon), zawierający dipterex (o:o-dwumetylofosfonian-2,2,2-trójchloro-1-hydroksyetylu), zaliczony do III klasy toksyczności. Jego dawka DL_{50} per os dla szczura wynosi 450—650 mg/kg. Foschlor stosowany jest w ochronie roślin m.in. do niszczenia gąsienic motyli, chrząszczy, a w postaci preparatu Neguvon do zwalczania larw gza bydłęcego. Z uwagi na dużą trwałość tego insektycydu należy zachować ostrożność przy wykorzystywaniu roślin traktowanych tym preparatem. Dopuszczalna zawartość Foschloru w trawie łąkowej i naci buraczanej wynosi 3 mg/kg. W trakcie przeprowadzonych z zastosowaniem tego preparatu masowych akcji stwierdzono u zwierząt około 0,02% padnięć (1).

Materiały pochodzące od zatrutych zwierząt dostarczane są do analizy najczęściej w ciągu kilku dni po przeprowadzeniu ich sekcji. Dlatego też celowym było, co jest tematem niniejszej pracy, ustalenie w warunkach *in vitro* okresu trwałości Foschloru w materiałach biologicznych, co pozwoliłoby na ustalenie dogodnego terminu (zakresu czasu), przed upływem którego należy wykonać analizy.

Materiał i metody

Użyty do badań zawierający 50% dipterexu Foschlor R-50 (produkcji Zakładów Chemicznych „Azot w Jaworznie”) który po 10 mg dodawano do 100 g treści:

a) zvacza krowy, b) żołądka świni, c) żołądka konia.

Próby przechowywano w szklanych słoikach typu Wecka w temperaturach od -10° do $+40^{\circ}$. Celem uzyskania odpowiedniego pH dodawano do prób 10% HCl względnie 10% NH_4OH .

Do wykrywania Foschloru zastosowano zmodyfikowaną metodę Pokrowskiego (3) oraz zaadoptowaną przez autora metodę chromatografii cienkowarstwowej wg Zadrozińskiej (4, 5, 6). 10 g badanego materiału 3-krotnie ekstrahowano (po 20 ml) chloroformem i po-

łączone ekstrakty odparowywano na łaźni wodnej ($+40^{\circ}$) do sucha. Pozostałość rozpuszczano w 5 ml wody destylowanej, uzyskany roztwór sączono, 3-krotnie przemywano (po 5 ml) eterem naftowym. Warstwę eterową wytrząsano 3-krotnie (po 5 ml) nasycionym wodnym roztworem chlorku sodowego, połączone wodne wyciągi przemywano 5 ml eteru naftowego i 3-krotnie (10 ml i 2×5 ml) chloroformem. Zebrane chloroformowe wyciągi suszono bezwodnym siarczanem sodowym i zagęszczano na łaźni wodnej ($+40^{\circ}$) do objętości 1 ml. Zagęszczony wyciąg nakrapiano na płytki szklane pokryte żelazem krzemionkowym (grubość warstwy 0,2 mm), aktywowane w temperaturze $+110^{\circ}$ w ciągu 1/2 godziny. Chromatogramy na odległość 10 cm rozwijano w układzie chloroform + metanol (9:1), a na odległość 14 cm w benzenie. Po wysuszeniu (w $+20^{\circ}$) płytki lekko spryskiwano monoetanoloaminą i ogrzewano ok. 1 godziny w suszarce ($+70^{\circ}$) do zaniku zapachu amoniaku, spryskiwano roztworem azotanu srebrowego (3 cz. 0,1 n wodnego roztworu $\text{AgNO}_3 + 1$ cz. stęż. HNO_3) i następnie lampą kwarcową w odległości 10 cm od źródła światła naświetlano do momentu uzyskania — w razie obecności w badanej próbce Foschloru — na płytkach na wysokości 5,65 cm ($R_f = 0,565$) szaro-niebieskich plam. Wykrywalność Foschloru wynosi 0,25 mg/kg.

Do półilościowych oznaczeń wykorzystano jak wyżej uzyskany chloroformowy wyciąg, oczyszczony sposobem wg Bubienia (2). W tym celu wyciąg po odparowaniu przemywano metanolem (5 ml), naftowym eterem (30 ml), wodą destylowaną (25 ml). Oddzieloną z popłuczyn eterową warstwę 3-krotnie przemywano (po 15 ml) chloroformem. Odparowany do objętości 10 ml wyciąg chloroformowy przepuszczano przez kolumnę o średnicy 0,8 cm (wypełnioną 1 g aktywowanego węgla) z szybkością 60 kropli na minutę i eluowano ją 50 ml chloroformu. Uzyskany eluat zagęszczono do objętości 1 ml i jego określone objętości наносono na płytki szklane jak wyżej z żelazem krzemionkowym przygotowane, a chromatogramy rozwijano i wywoływano w podany już sposób. W celu określenia zawartości Foschloru w badanej próbce wielkość (średnicę) uzyskanych plam porównywano z wielkością (średnicą) plam otrzymanych podczas badania różnych określonych objętości wzorcowego roztworu Foschloru, zawierającego 50 mg tego związku w 50 ml chloroformu. W kontrolnych badaniach, których wynik był negatywny, w identyczny sposób analizowano same materiały biologiczne bez dodatku Foschloru.