

SIMULTANEOUS DETERMINATION OF COPPER, CADMIUM AND LEAD IN BIOLOGICAL MATRIX

SOUČASNÉ STANOVENÍ MĚDI, KADMIA A OLOVA V BIOLOGICKÉ MATRICI

Hanuštiak P.¹⁾, Petřek J.²⁾, Potěšil D.^{1,3)}, Adam V.^{1,3)}, Havel L.²⁾, Zehnálek J.¹⁾, Babula P.⁴⁾, Kizek R.¹⁾

¹⁾ Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

²⁾ Ústav botaniky a fyziologie rostlin, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

³⁾ Katedra analytické chemie, PřF MU v Brně, Kotlářská 2, 611 37 Brno

⁴⁾ Ústav přírodních léčiv, FaF VFU Brno, Palackého 1/3, 612 46 Brno

E-mail: xhanustiak@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Heavy metals (cadmium, lead, zinc) determination in biological matrixes belongs to actual problems concerning food hygiene, foodstuffs quality and food chemistry. Cadmium, lead and chromium belong to heavy metals group characterised by high toxicity. Other important group of heavy metals is represented by essential components such as zinc, cuprum and cobalt, which are necessary for regular function of enzymes. In our work we used electroanalytical techniques for heavy metals determination in biological matrix (apple). In our recent works we found out that the electroanalytical techniques are effective tool to detect very low heavy metals concentrations even in the biological matrix. In addition, it is able to determine concentration of free heavy metal and after eventual sample mineralization also its fixed form by the mentioned techniques. It is very suitable to determine heavy metal concentration in single run (simultaneous determination) for routine analysis. We simultaneous determined cadmium, lead and cuprum by differential pulse anodic stripping voltammetry (DPAV) in the presence of acetate buffer (pH 4.6).

Keywords: simultaneous determination, heavy metals, cadmium, lead, cuprum, differential pulse anodic stripping voltammetry, biological matrix

ABSTRAKT

Mezi aktuální problematiku týkající se potravinářské hygieny, kvality potravin a potravinářské chemie patří stanovení těžkých prvků (kadmium, olovo, zinek) v biologických vzorcích. Kadmium, olovo či chrom patří do skupiny těžkých kovů vyznačujících se vysokou

toxicitou. Další významnou skupinu představují na druhou stranu esenciální prvky jako je zinek, měď a kobalt, které jsou nepostradatelné pro správnou funkci enzymů v organismech. Pro stanovení těžkých kovů (mědi, kadmia a olova) v biologické matrici (jablko) byly v této práci využity elektroanalytické přístupy. V předchozích pracích jsme zjistili, že elektroanalytické stanovení je efektivním nástrojem k určení velmi nízkých koncentrací těžkých kovů i ve velmi složité biologické matrici. Pomocí této techniky je možné stanovit koncentraci volného těžkého kovu a po případné mineralizaci vzorku také jeho vázané formy. Pro běžnou analýzu je velmi výhodné stanovit koncentraci těžkých kovů v jednom analytickém kroku (simultánní stanovení). Pomocí diferenční pulzní anodické rozpouštěcí voltametrie (DPASV) jsme simultánně stanovovali kadmium, olovo a měď v acetátovém pufru (pH 5,0).

Klíčová slova: současné stanovení, těžké kovy, kadmium, olovo, měď, diferenční pulzní anodická rozpouštěcí voltametrie, biologická matrice

ÚVOD

Znečištění životního prostředí těžkými kovy je výsledkem mnoha lidských aktivit, zejména však těžkého těžebního a výrobního průmyslu. Vliv těchto polutantů na ekosystémy má velmi závažné dopady na ekonomiku a lidské zdraví¹⁻⁴. A proto je výskytu těžkých kovů v životním prostředí ale i ve vstupních surovinách a produktech potravinářského průmyslu věnována značná pozornost^{5,6}. Těžké kovy vstupující do potravních řetězců všech živých organismů dělíme na dvě skupiny: toxické a esenciální.

Ionty toxických těžkých kovů jsou schopny vstupovat a narušovat tak mnoho důležitých metabolických procesů probíhajících v živých organismech, což může vést k mnoha závažným chorobám popřípadě i smrti organismu. Například vyšší obsahy olova, kadmia a rtuti zhoršují nutriční kvalitu potravin a tím ohrožují životní prostředí člověka⁷. Dále tolerovaná denní dávka olova pro dospělého člověka činí 500 µg, kadmia 67 – 83 µg. Vstřebané olovo a kadmium jsou transportovány krví do jater a ledvin, kde se tyto prvky kumulují. Při intoxikaci olovem nebo kadmiem mohou být tyto orgány poškozeny. Olovo navíc poškozuje nervový a kardiovaskulární systém. Kadmium vykazuje teratogenní a karcinogenní účinky, poškozuje pohlavní orgány a má vliv na krevní tlak⁸. Naopak v rostlinách může přítomnost toxických těžkých kovů narušit v respiraci, vyvolat poruchy funkce průduchů a zpomalit růst.

Naopak esenciální těžké kovy mají pozitivní význam jako složky mnoha enzymů a proteinů (umožňují vazbu na DNA – zinkové prsty)⁹. Měďnaté ionty jako součást aktivních

center enzymů, které se vyskytuje např. u cytochrom-*c*-oxidasy, superoxiddismutasy, β -hydroxylasy a řady dalších. Měď je také nezbytná pro efektivní využití železa a pro biosyntézu některých fyziologicky významných sloučenin (v plasmě se vyskytující metaloprotein ceruloplasmin, v mozkové tkáni zase cerebropuprein). Doporučené denní dietární dávky mědi jsou 0,4 až 0,7 mg pro děti do 1 roku, 0,7 až 2,0 mg pro děti od 1 roku do 10 let, 1,5 až 2,5 mg pro adolescenty a 1,5 až 3,0 mg pro dospělé jedince. Toxicita mědi pro savce je poměrně nízká (hodnota LD₅₀ pro perorální podání CuSO₄·5H₂O u krys je 300 mg (kg tělesné hmotnosti) ⁸.

Z těchto důvodů se jeví nesmírně důležité mít přesné analytické metody s nízkými limity detekce pro stanovení těžkých kovů v biologických, environmentálních i potravinářských vzorcích¹⁰⁻¹². Cílem této práce bylo optimalizovat diferenční pulsní anodickou rozpouštěcí voltametrii (DPASV) pro jednoduché a citlivé současné stanovení kadmia, olova a mědi. Dále jsme tuto elektroanalytickou techniku využili pro analýzu obsahu těžkých kovů v potravinách.

MATERIÁL A METODY

Chemikálie

CH₃COOH, CH₃COONa, Pb(NO₃)₂, KCl a CdCl₂ byly dodány firmou Sigma Aldrich Chemical Corp. (USA) v čistotě ACS. Cu(NO₃)₂ byla též čistoty dodaná firmou Fluka chemie AG (USA). Zásobní a pracovní roztoky byly připraveny v ACS vodě (Sigma).

Příprava reálného vzorku pro současnou analýzu těžkých kovů

Ovoce bylo zakoupeno v obchodní síti supermarketu ALBERT. Pro naše účely jsme použili jablka (*Malus sp.*), a to odrůdy Šampion, Spartan, Golden delicious a Rubín. Všechny odrůdy byly vypěstovány v ČR a byly II. jakosti. Vzorky před analýzou byly upraveny nejprve strouháním na umělohmotném struhadle a následným třením po dobu 5 min ve třecí misce. Z takto upraveného vzorku jsme odebrali 20 g homogenátu do umělohmotných kyvet. Byla provedena centrifugace – 15 min při 7 000 g; 20 °C (Janetzki T24). Získaný supernatant byl před další analýzou zamrazen na –20 °C.

Elektrochemická analýza

DPASV analýza byla prováděna pomocí elektrochemického analyzátoru AUTOLAB (EcoChemie, Netherlands) v zapojení s tříelektrodovou celou VA-Stand 663 (Metrohm, Switzerland). Byla použita pracovní elektroda – HMDE (plocha rtuťové kapky: 0.4 mm²),

referenční elektroda (Ag/AgCl, 3 M KCl) a platinový drátek jako pomocná elektroda. Získaná data byla upravena matematickou korekcí podle algoritmů navržených Savitzkym a Golayem implementovaných do GPES softwaru (EcoChemie). Experimenty byly prováděny při laboratorní teplotě. Měření bylo prováděno v potenciálovém rozsahu od $-1,2$ V do $+0,1$ V s těmito parametry: potenciálový krok $1,05$ mV, pulsní amplituda $25,05$ mV, časový interval $0,2$ s, doba akumulace 240 s, potenciál akumulace $-1,1$ V. Jako základní elektrolyty jsme použili acetátový pufr ($0,2$ M CH_3COOH + $0,2$ M CH_3COONa) a $0,1$ M KCl.

Návratnost

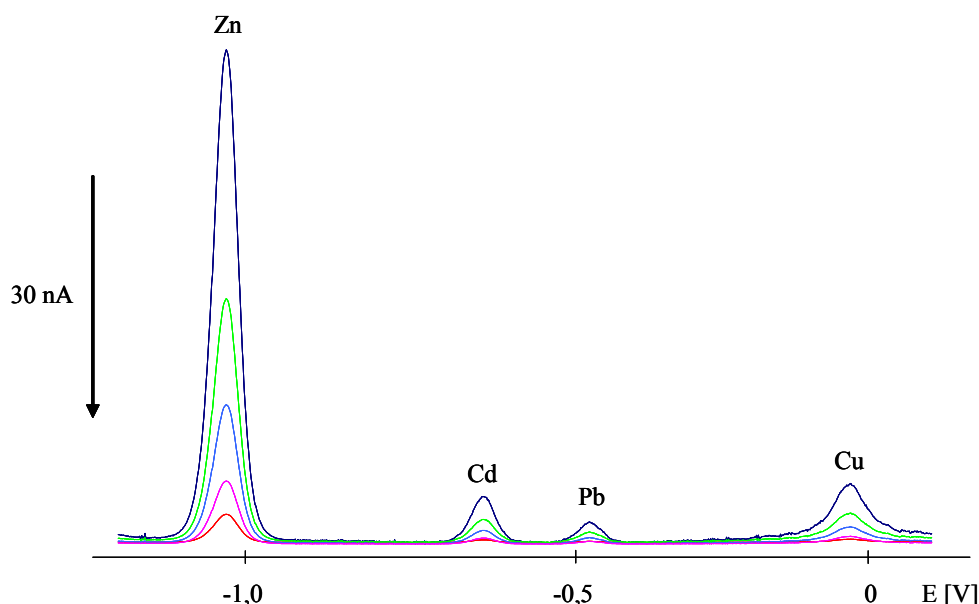
Návratnost byla vyhodnocena pomocí přídávku 100 μl standardu (koncentrace se pohybovala od 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ až po 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) k připraveným homogenátům (100 μl). Postup přípravy homogenátu viz. výše. Koncentrace těžkého kovu ve vzorku byla stanovena pomocí odečtu z kalibrační křivky.

Statistická analýza

STATGRAPHICS® (Statistical Graphics Corp®, USA) byl použit pro statistickou analýzu. Výsledky jsou vyjádřeny jako průměrná hodnota $\pm$ S.D. pokud není uvedeno jinak. Hodnota $p < 0,05$ byla označena jako signifikantní.

VÝSLEDKY

Analytickému stanovení těžkých kovů je věnována pozornost velmi dlouhou dobu. Nejběžněji využívané techniky jsou atomová absorpční spektrometrie s atomizací v plamenu a nebo v grafitové kyvetě^{13,14}. Pro velmi přesné stanovení se používá atomová adsorpční spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem¹⁵⁻¹⁹. Mezi vysoce senzitivní techniky také patří elektroanalytické postupy s detekčními limity v řádech nM a pM koncentracích. Diferenční pulzní voltametrie v kombinaci s adsorptivním rozpouštěním patří mezi nejcitlivější elektroanalytické metody využívané pro detekci těžkých kovů^{12,20}. Na obrázku 1 je ukázán voltamogram současného stanovení zinku, kadmia, olova a mědi ve čtyřech koncentracích (100 , 50 , 25 a $12,5$ nM). Jako základní elektrolyt byl pro současné měření použit acetátový pufr o $\text{pH} = 4,6$. Potenciály píků byly pro zinek $-1,010 \pm 0,005$ V, pro kadmium $-0,595 \pm 0,003$ V, pro olovo $-0,425 \pm 0,005$ V a pro měď $-0,010 \pm 0,003$ V.



Obr. 1: AdTS DPV voltamogram získaný po 60 s době akumulace zinku, kadmia, olova a mědi při 50 nM koncentraci

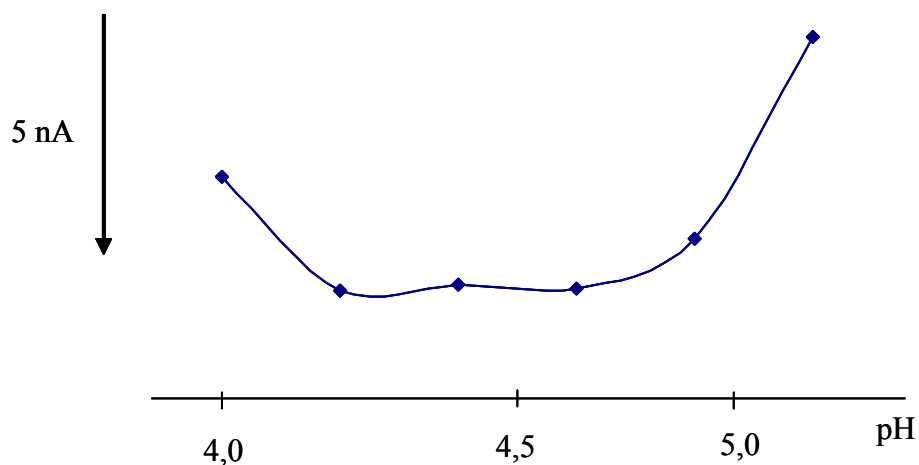
Optimalizace současného stanovení

Vliv základního elektrolytu

Pro co nejcitlivější současnou analýzu kadmia, olova a mědi byly studovány různé základní elektrolyty. Testovali jsme dva základní elektrolyty 0,1 M KCl a acetátový pufr. Pro současné stanovení výše zmíněných těžkých kovů nebyl jako elektrolyt 0,1 M KCl vhodný, protože signály stanovených kovů byly nízké a měření byla méně reprodukovatelná (není ukázáno). Naopak při použití acetátového pufru jako základního elektrolytu byly pozorované píky dobře separované a měření byla velmi dobře reprodukovatelná. Proto jsme pro další analýzu používali acetátový pufr.

Vliv pH acetátového pufru

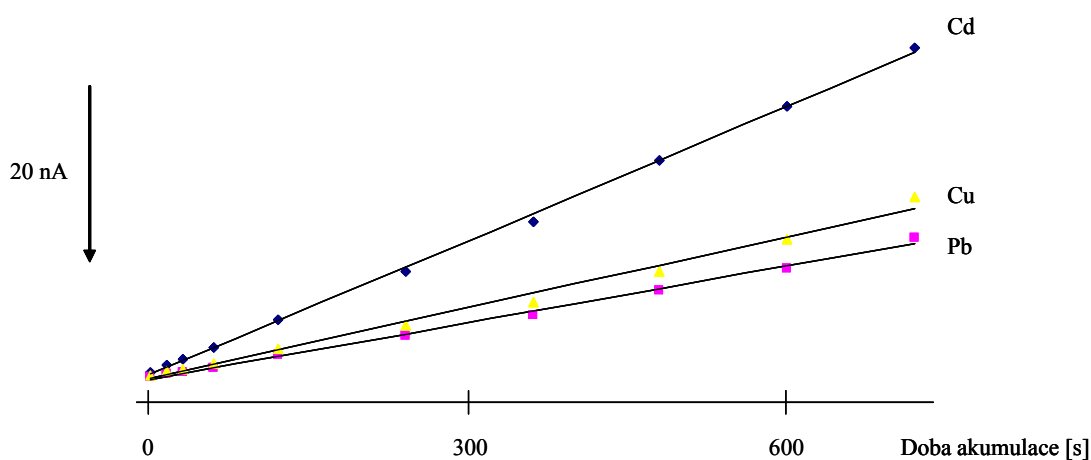
Dále jsme testovali vliv rozdílného pH acetátového pufru (4,0; 4,2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0) na výšku elektrochemické odpovědi při současném stanovení kadmia, olova a mědi. Zjistili jsme, že pro kadmium se výška signálu prakticky neměnila, ale u olova a mědi došlo k výraznému zvětšení píky při pH = 5,0. Na obrázku 2 je ukázána závislost výšky elektrochemické odpovědi na pH vypočtená pro všechny analyzované těžké kovy. Na základě zjištěného faktu jsme pro další stanovení používali acetátový pufr o pH 5,0.



Obr. 2: Závislost průměrné proudové odpovědi současně stanovovaných těžkých kovů v závislosti na pH

Vliv doby akumulace

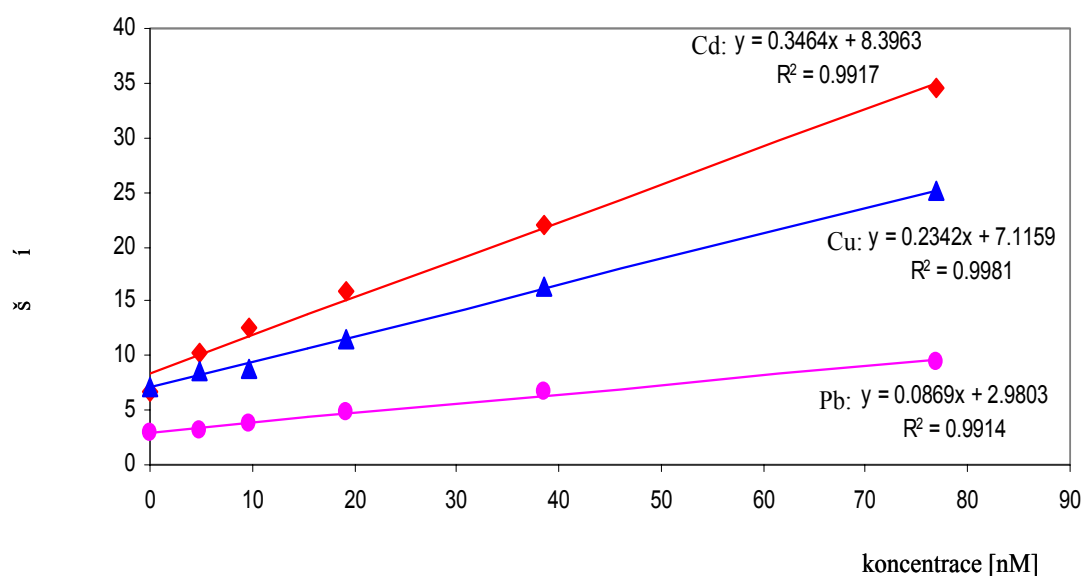
Výška signálu detekovaného pomocí techniky diferenční pulsní anodické rozpouštěcí voltametrie silně závisí na době akumulace. Doba akumulace je čas, po kterou se stanovovaná látka váže na rtuťovou kapkovou elektrodu. V našem případě je velmi dobře známo, že rtuť s těžkými kovy vytváří amalgámy. Takto vytvořená amalgáma kovu se může rozpouštět a její množství je přímo úměrné koncentraci přítomného kovu – výrazné zvýšení signálu. Na obrázku 3 je ukázána závislost doby akumulace na výšce signálu u námi studovaných různých těžkých kovů. Zjistili jsme, že výška signálu se s dobou akumulace lineárně zvyšuje. Pro další měření jsme použili dobu akumulace 240 s, aby elektroanalytické stanovení bylo vysoce senzitivní, ale doba analýzy nepřekročila 5 minut.



Obr. 3: Závislost proudové odpovědi současně stanovovaných těžkých kovů v závislosti na jejich době akumulace

Vliv koncentrace

Pomocí námi optimalizované elektroanalytické metody byla studována závislost změny proudových výšek signálů jednotlivých kovů na koncentraci. Koncentrační závislost byla stanovena pomocí ředění základní směsi kadmia, olova a mědi. Získané kalibrační křivky vykazovaly striktně lineární závislost a na obrázku 4 jsou ukázány pro jednotlivé kovy (R^2 (Cd) = 0,9917; R^2 (Pb) = 0,9914; R^2 (Cu) = 0,9981). Rovnice regrese byla pro kadmium $y = 0,3464x + 8,3683$, při limitu detekce (LOD 3SN) = 5,54 pM, pro olovo $y = 0,00869x + 2,9803$, LOD = 22,09 pM, pro měď: $y = 0,2342x + 7,1159$, LOD = 8,20 pM.



Obr. 4: Závislost proudové odpovědi současně stanovovaných těžkých kovů v závislosti na jejich koncentraci

Vliv biologické matrice

V další části práce byl studován vliv biologické matrice na studované signály těžkých kovů při jejich současném stanovení. Do základního elektrolytu byl přidán extrakt z jablek a koncentrace kadmia, olova a mědi (20, 50 a 75 nM). Zjistili jsme, že biologická matrice ovlivňuje současné stanovení těžkých kovů velmi málo (návratnost 96 – 103 %), jak je ukázáno v tabulce 1.

Stanovení kovů v jablkách

Metoda byla využita pro detekci těžkých kovů v jablkách různých odrůd zakoupených v obchodní síti. Do základního elektrolytu jsme přidali 3 % získaného jablečného extraktu,

až do jeho obsahu 15 %. V studovaném ovoci byl obsah toxických těžkých kovů olova a kadmia velmi nízký, ale obsah mědi byl detekovatelný (280 nmolu v 0,5 ml jablečného extraktu).

Tab. 1: Návratnost přidavku těžkých kovů (Cd, Pb a Cu) do biologické matrice (n = 5)

Vzorek ¹	Detekovaný kov	Výška píku [nA] ²	Výška píku [nA] ³	Výška píku [nA] ⁴	Návratnost [%]
jablko	Cd	nd*	15,8 ± 0,9	16,2 ± 0,9	103
	Pb	nd*	4,7 ± 0,3	4,5 ± 0,4	96
	Cu	16,1 ± 0,7	11,5 ± 0,5	26,8 ± 0,5	97

¹ ... výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± směrodatná odchylka

² ... výška signálu kovu v biologické matrici (jablko)

³ ... výška signálu 20 nM standardu kovu v základním elektrolytu

⁴ ... výška signálu kovu v biologické matrici po přidavku 20 nM jeho standardu

* ... množství kovu nebylo detekovatelné

ZÁVĚR

Diferenční pulzní voltametrie v kombinaci s adsorptivním rozpouštěním je velmi vhodná pro současné vysoce senzitivní stanovení kadmia, olova a mědi. Vyvinutou elektroanalytickou techniku je možné použít pro rychlou analýzu těžkých kovů v potravinách.

Poděkování

Příspěvek vznikl za podpory grantů FRVŠ 164/2004, IGA MZLU 3/2004, IGA FaF VFU IG342012, GAČR č. 525/04/P132 a výzkumného centra LN00A081

LITERATURA

1. Zehnálek, J., Adam, V. & Kizek, R. Influence of heavy metals on production of protecting compounds in agriculture plants. *Listy Cukrov* **120**, 222-224 (2004).
2. Zimmermann, S. et al. Trace analysis of platinum in biological samples: a comparison between sector field ICP-MS and adsorptive cathodic stripping voltammetry following different digestion procedures. *Anal. Chim. Acta* **439**, 203-209 (2001).
3. Zimmermann, S., Messerschmidt, J., von Bohlen, A. & Sures, B. Determination of Pt, Pd and Rh in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry as compared with adsorptive cathodic stripping voltammetry and total-reflection X-ray fluorescence analysis. *Anal. Chim. Acta* **498**, 93-104 (2003).
4. Zimmermann, S. & Sures, B. Significance of platinum group metals emitted from automobile exhaust gas converters for the biosphere. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **11**, 194-199 (2004).
5. Zehnálek, J., Vacek, J. & Kizek, R. Application of higher plants in phytoremediation of heavy metals. *Listy Cukrov* **120**, 220-221 (2004).
6. Zynio, S. A., Samoylov, A. V., Surovtseva, E. R., Mirsky, V. M. & Shirshov, Y. M. Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance. *Sensors* **2**, 62-70 (2002).
7. Pulkrábek, J. et al. Vliv stanoviště, ročníku, odrůdy a aplikace biologicky aktivních látek na obsah těžkých kovů v listech a bulvách cukrovky. *Listy cukrov.* **117**, 288-292 (2001).
8. Velíšek, J. *Chemie potravin 2* (OSSID, Tábor, 2002).
9. Matthews, J. M. & Sunde, M. Zinc fingers - Folds for many occasions. *IUBMB Live* **54**, 351-355 (2002).
10. Locatelli, C., Torsi, G. & Garai, T. Determination of heavy metals in environmental bio-indicators by voltammetric and spectroscopic techniques. *Fresenius J. Anal. Chem.* **363**, 662-666 (1999).
11. Locatelli, C. & Torsi, G. Voltammetric trace metal determinations by cathodic and anodic stripping voltammetry in environmental matrices in the presence of mutual interference. *J. Electroanal. Chem.* **509**, 80-89 (2001).
12. Locatelli, C. & Torsi, G. Simultaneous square wave anodic stripping voltammetric determination of Cr, Pb, Sn, Sb, Cu, Zn in presence of reciprocal interference: application to metal matrices. *Microchemical Journal* **78**, 175-180 (2004).

13. Onal, K. Vliv odpadních kalů na obsah těžkých kovů v cukrovce. *Listy cukrov.* **120**, 156-157 (2004).
14. Dandár, A., Karľa, V., Rippel, A. & Činžárová, M. Obsah vybraných kovů v konzumném cukru. *Listy cukrov.* **101**, 154-157 (1985).
15. Xu, F., Qiu, D. R., Yang, P. Y. & Hu, K. J. Review of chemical and biological speciation analyses for Se. *Spectroscopy and spectral analysis* **22**, 331-340 (2002).
16. Takeuchi, M., Mizuishi, K. & Hobo, T. Determination of organotin compounds in environmental samples. *ANALYTICAL SCIENCES* **16**, 349-359 (2000).
17. Szpunar, J. Bio- inorganic speciation analysis by hyphenated techniques. *Analyst* **125**, 963-988 (2000).
18. Fernandes, A. P., de Moraes, M. & Neto, J. A. G. Potentialities and applications of ammonium diethyl dithiophosphate in chemical analyses. *ECLETICA QUIMICA* **26**, 211-222 (2001).
19. Bi, S. P., Yang, X. D., Zhang, F. P., Wang, X. L. & Zou, G. W. Analytical methodologies for aluminium speciation in environmental and biological samples - a review. *FRESENIUS JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY* **8**, 984-996 (2001).
20. Vacek, J. et al. Electrochemical determination of lead and glutathione in a plant cell culture. *Bioelectrochemistry* **63**, 347-351 (2004).