

Bestimmung von Blei in biologischen Materialien mit Hilfe der flammenlosen Atomabsorptionsspektrometrie

D. Behne, P. Brätter und W. Wolters

Hahn-Meitner-Institut für Kernforschung Berlin

Eingegangen am 5. Juni 1975

Determination of Lead in Biological Materials by means of Flameless Atomic Absorption Spectrometry. The samples were dissolved in nitric acid. The excess acid, which influences the lead absorption signal, was removed by the addition of formic acid. Both the heights and the areas of the absorption peaks were evaluated and the results compared. The precision and the accuracy of the method, which was tested by determining the lead content of a biological standard reference material, proved to be satisfactory.

Zusammenfassung. Für die Bleianalyse in biologischen Materialien mit Hilfe der flammenlosen Atomabsorption wurde eine Methode entwickelt. Die Proben wurden mit Salpetersäure gelöst. Die überschüssige Säure, durch die das Blei-Absorptionssignal beeinflusst wird, wurde durch Zugabe von Ameisensäure entfernt. Es wurden sowohl die Höhen als auch die Flächen der Absorptionspeaks ausgewertet und die Ergebnisse miteinander verglichen. Bei der Bestimmung des Bleigehalts eines biologischen Standardmaterials konnte gezeigt werden, daß die Methode ausreichende Reproduzierbarkeit und Genauigkeit besitzt.

Best. von Blei in Biolog. Material; Spektralphotometrie, Atomabsorption; flammenlos.

Einleitung

Eine geeignete Methode zur Bestimmung des Bleigehaltes in der Umwelt bzw. im Menschen ist die flammenlose Atomabsorptionsspektrometrie, deren Empfindlichkeit ausreicht, um Elementkonzentrationen im ppb-Bereich zu messen.

Bei dem Verfahren besteht grundsätzlich die Möglichkeit, feste Proben direkt zu analysieren. Die dabei erforderliche sehr kleine Probenmenge ist jedoch bei inhomogener Elementverteilung nicht repräsentativ für die Gesamtprobe. Weiterhin können bei Materialien, bei denen die Verbindungen des zu analysierenden Elementes nicht bekannt sind, Fehler durch den Einfluß der Bindungsform auf die Messung nicht vermieden werden.

Bei biologischen Proben empfiehlt es sich deshalb in den meisten Fällen, durch einen Aufschluß homogene Lösungen herzustellen, in denen das Element in einer definierten Verbindung vorliegt. Das Ziel dieser Arbeit war, bei der Bleibestimmung in biologischen Materialien einige Fehler zu untersuchen, die durch einen derartigen Aufschluß entstehen können, und ein geeignetes Verfahren zu entwickeln.

Methodik

Meßapparatur und Reagentien

Für die atomabsorptionsspektrometrischen Messungen stand ein Zweikanal-Spektrophotometer Perkin-Elmer 503 mit Deuteriumuntergrundkompensator zur Verfügung. Die flammenlose Atomisierung der Proben wurde in einer Graphitrohrküvette HGA 74 der gleichen Firma durchgeführt. Die Meßsignale wurden parallel durch einen Schreiber Perkin-Elmer 56 M und einen Speicherintegrator zur Peakflächenauswertung Perkin-Elmer SIP-1 registriert.

Die Standards für die Bleianalyse wurden durch Verdünnen einer wäßrigen Fixanal-Bleinitratlösung (Riedel-de Haen) mit bidest. Wasser hergestellt. Die Stammlösungen mit Elementkonzentrationen von 1 und 0,1 ppm und einem Säuregehalt von 0,01 N HCl wurden jeweils kurz vor den Messungen zu Standardlösungen mit einem Bleigehalt von 5–500 ppb verdünnt.

Außerdem wurden bei den Untersuchungen die folgenden Reagentien verwendet: 70%ige HClO₄ suprapur (Merck), 65%ige HNO₃ suprapur (Merck), HCOOH p.a. (Merck) und H₂C₂O₄ p.a. (Riedel-de Haen).

Entwicklung der Methode

Für die Veraschung der biologischen Matrix wurde ein Naßverfahren gewählt. Von Vorteil gegenüber dem trockenen Aufschluß im Ofen oder in aktiviertem

Sauerstoff sind die niedrige Veraschungstemperatur und die Möglichkeit, bei Bedarf die Proben in einem geschlossenen System aufzuarbeiten, wodurch die Gefahr des Elementverlustes durch Verflüchtigung verringert wird.

Für die Zerstörung des organischen Materials wurden HClO_4 und HNO_3 in Betracht gezogen. Auf die Verwendung von H_2SO_4 , die sich in Mischungen mit den beiden anderen Säuren oder mit H_2O_2 gut zur Veraschung eignet, wurde wegen der Möglichkeit der Mitfällung von PbSO_4 mit CaSO_4 bei Proben mit hohem Calciumgehalt verzichtet.

Einfluß der Aufschlußreagentien auf das Meßsignal

Um die Verwendbarkeit von Perchlorsäure und Salpetersäure als Aufschlußreagentien zu prüfen, wurde ihr Einfluß auf das Meßsignal bei der atomabsorptionsspektrometrischen Bleimessung untersucht. Aus Abb. 1 ist ersichtlich, daß durch Perchlorsäure der Absorptionspeak erniedrigt wird. Bei einem Säuregehalt von 2 N war die Peakhöhe im Vergleich zur säurefreien Lösung um 70% verringert. Außerdem vergrößerte sich die Standardabweichung für die Einzelmessung von 5 auf 20%. Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Perchlorsäure die Oberfläche des Graphits oxidativ angreift und dadurch eine reproduzierbare Verteilung der Probe im Graphitrohr nicht mehr möglich ist.

Auch durch Salpetersäure wird, wie in Abb. 2 dargestellt, die Peakhöhe stark erniedrigt. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt nur auf einer Verzögerung bei der Atomisierung des Elements beruht, wodurch der Absorptionspeak zwar erniedrigt aber dementsprechend verbreitert würde, wurde eine Bestimmung der Peakflächen durchgeführt. Aus den in der gleichen Abbildung aufgeführten Ergebnissen, die einen der Änderung der Peakhöhen entsprechenden Verlauf zeigen, geht jedoch hervor, daß es nicht möglich ist, den Säureeinfluß durch eine Auswertung der Signalfächen auszuschalten.

Somit kann ein Analysenfehler auftreten, wenn die Konzentration der Aufschlußreagentien, die von verschiedenen Parametern wie z. B. der Probenmenge und der Zusammensetzung der Matrix abhängt, in den gelösten Proben unterschiedlich ist. Eine Erhöhung des Säuregehalts auf den gleichen, reproduzierbaren Maximalwert hätte durch die große Signalerniedrigung eine Verringerung der Empfindlichkeit zur Folge. Außerdem würde durch die stärkere Oxidation der Oberfläche die Lebensdauer der Graphitrohre verkürzt werden. Es empfiehlt sich deshalb, das Aufschlußreagens aus der Probenlösung zu entfernen. Da dies bei Salpetersäure einfacher durchführbar ist als bei Perchlorsäure, wurde HNO_3 als Veraschungsmittel gewählt.

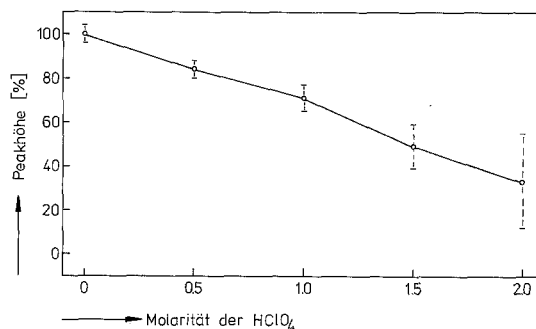


Abb. 1. Höhe des Blei-Absorptionspeaks (in Prozent des Anfangswertes) in Abhängigkeit von der HClO_4 -Konzentration

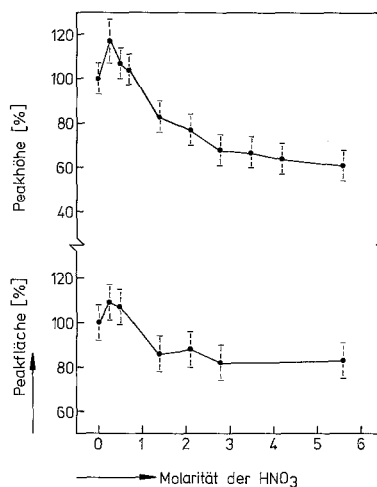


Abb. 2. Höhe und Fläche des Blei-Absorptionspeaks (in Prozent des Anfangswertes) in Abhängigkeit von der HNO_3 -Konzentration

Entfernen der Salpetersäure

Die Vertreibung der Säure durch Abrauchen kann die Bindung des Elements an unlösliche Probenbestandteile oder an die Gefäßwände fördern. Deshalb wurde die Salpetersäure durch Reduktion mit Ameisensäure zu nitrosen Gasen aus der Lösung entfernt. Da ein Teil der Ameisensäure zu Oxalsäure oxidiert wird [1], liegt die Probe nach der Reaktion in einer wäßrigen Lösung dieser beiden Säuren vor. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Peakhöhe von der Säurekonzentration zeigte, daß das Blei-Meßsignal weder durch HCOOH noch durch $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ beeinflusst wird.

Die Möglichkeit, die Reaktion von HNO_3 mit HCOOH direkt in der Graphitrohrküvette durchzuführen, wurde an Bleisalzösungen mit unterschiedlicher Salpetersäurekonzentration überprüft. Es gelang jedoch auch bei Zugabe eines großen Überschusses an Ameisensäure nicht, die Signalerniedrigung völlig aufzuheben.

Die Reduktion verläuft nach sehr verzögertem Beginn stark exotherm. Deshalb dürfen zu der HNO₃-Lösung zunächst nur kleine Mengen an Ameisensäure gegeben werden. Weiterhin ist, um den Vorgang kontrolliert ablaufen zu lassen, eine gute Kühlung notwendig. Ohne sie kommt es durch die Gasentwicklung zu einem heftigen Übersäumen. Im weiteren Verlauf der Reaktion muß, um die völlige Vertreibung der Salpetersäure zu erreichen, mit einem großen Überschuß an Ameisensäure gearbeitet werden.

Durchführung der Analyse

Probenaufbereitung. 100–200 mg des biologischen Materials werden mit der 7fachen Menge an 65%iger HNO₃ versetzt. Wenn die Gefahr des Bleiverlustes durch Evaporation leichtflüchtiger Verbindungen nicht besteht, wird der Aufschluß in staubfreier Luft in offenen Teflonbehältern durchgeführt, die in einem Sandbad auf 80°C erhitzt werden. Bei flüchtigen Bleiverbindungen wird die Veraschung in geschlossenen Teflongefäßen bei 170°C in einem Druckaufschlußgerät [3] vorgenommen, das durch Modifikation der Apparatur nach Tölg [2] den gleichzeitigen Aufschluß von 10 Proben gestattet.

Die Proben werden dann in ein kaltes Wasserbad gestellt, in dem sie geschüttelt werden. 30–60 min nach Zugabe von 200 µl HCOOH beginnt unter starker Gasentwicklung die Reduktion der Salpetersäure. Nach dem Abklingen der Reaktion werden noch zweimal weitere 200 µl zugegeben. Die vollständige Entfernung der HNO₃ wird mit einem Überschuß von 1 ml HCOOH durch Erhitzen des Wasserbades auf 80°C erreicht. Nach dem Auswägen der Lösung ist die Probe meßbereit.

Atomabsorptionsspektrometrische Messung. 20 µl der Probenlösung werden mit einer Finn-Pipette in die Graphitrohrküvette gegeben. Die Trocknung, thermische Zersetzung und Atomisierung wird mit dem folgenden Temperaturprogramm durchgeführt:

	Zeit sec	Temperatur	
		einstellbare Einheiten	vom Hersteller angegebene Werte ^a , °C
Programmschritt 1	30	55	70
Programmschritt 2	30	70	100
Gleitprogramm	120	5/205	500
Programmschritt 3	10	840	2400
Programmschritt 4	5	999	2700

^a Die Überprüfung der vom Hersteller angegebenen Temperatureinstellungen für die Küvette durch pyrometrische Messungen zwischen 700 und 2500°C zeigte, daß unterhalb 1500°C der Meßwert über der digital einstellbaren Soll-Temperatur lag, oberhalb 1500°C dagegen darunter. Die Abweichung betrug bei der Maximaltemperatur 200°C, der größte prozentuale Unterschied wurde mit 15% der Soll-Temperatur bei 700°C gefunden.

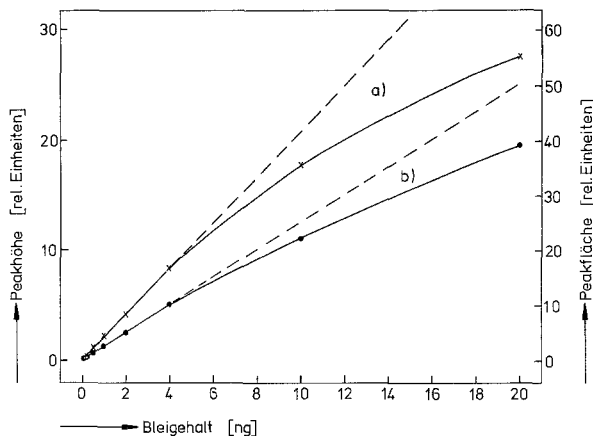


Abb.3. Eichkurve für wäßrige Pb-Lösungen. a Messung der Peakhöhe; b Messung der Peakfläche

Für die Bleianalyse wird die Resonanzlinie bei 283,3 nm benutzt, die spektrale Spaltbreite beträgt 0,7 nm. Die Höhe des Meßsignals wird mit einem Schreiber registriert, die Fläche wird mit Hilfe eines Peakflächenintegrators ausgewertet.

Zur Eichung der Messung werden einige der Probenlösungen geteilt. Ein definierter Teil von ca. 0,5 ml wird mit 50 µl der wäßrigen 1 ppm-Standardlösung versetzt, der andere Teil im gleichen Verdünnungsverhältnis mit Wasser. Aus der Differenz der Meßergebnisse für beide Teile kann nach der Additionsmethode der bekannten Bleimenge die entsprechende Peakhöhe und -fläche zugeordnet werden. Während einer Meßreihe wird der Zustand des Graphitrohres von Zeit zu Zeit mit einer wäßrigen Standardlösung überprüft.

Ergebnisse und Diskussion

Linearer Arbeitsbereich und Nachweisgrenze

Da die Additionsmethode nur dann angewendet werden kann, wenn alle Analysenwerte im linearen Bereich der Eichkurve liegen, ist es notwendig, dessen Grenzen zu bestimmen. Es wurden deshalb für wäßrige Standardlösungen mit Bleikonzentrationen zwischen 10 und 1000 ppb die Peakhöhen und die Peakflächen gemessen. Die sich aus je 10 Einzelmessungen ergebenden Mittelwerte sind in Abb.3 aufgetragen. Danach erstreckt sich der lineare Arbeitsbereich bis zu einer Bleimenge von 5 ng. Eine Erweiterung dieses Bereichs durch Auswertung der Peakflächen anstelle der Peakhöhen ist im Falle des Bleis nicht möglich.

Als Nachweisgrenze (Signal mit der doppelten Höhe des Untergrundrauschens) ergibt sich ein Wert von $6 \cdot 10^{-11}$ g Blei, wenn man bei der Atomisierung mit verminderter Durchflußgeschwindigkeit des Schutzgases durch das Graphitrohr arbeitet („Mini Flow“). Durch völlige Drosselung der Gaszufuhr während der Atomisierung („Gas Stop“) kann die Aufenthaltsdauer der Atome im Strahlengang ver-

längert werden und man erreicht dann eine Nachweisgrenze von $3 \cdot 10^{-11}$ g.

Reproduzierbarkeit und Genauigkeit

Die Reproduzierbarkeit der Meßwerte bei Verwendung verschiedener Graphitrohre wurde für eine wäßrige 100 ppb-Bleisalzlösung durch Bestimmung der Peakhöhen und Peakflächen bei 10 Rohren untersucht. Die Standardabweichung betrug für die Höhen 9% und für die Flächen 12%. Das Verhältnis von Fläche zu Höhe war von Rohr zu Rohr unterschiedlich. Es ist deshalb notwendig, bei jedem neuen Graphitrohr dessen Einfluß auf das Meßsignal mit Standardlösungen zu überprüfen und die Änderungen bei der Auswertung zu berücksichtigen.

Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der entwickelten Methode wurde mit Hilfe des biologischen Standardmaterial „Bovine Liver“ des National Bureau of Standards bestimmt. Die Proben wurden, da ein Elementverlust durch Verflüchtigung nicht festgestellt werden konnte, in offenen Behältern aufgeschlossen. Bei den Messungen wurde der Deuteriumuntergrundkompensator verwendet.

Bei der Bleianalyse, die bei 13 Proben des Standardmaterials durchgeführt wurde, wurden die Höhen und Flächen der Meßsignale ausgewertet. Die Standardabweichung, die sowohl Schwankungen aufgrund der Aufbereitung und Messung der Probe als auch

Inhomogenitäten des Materials einschließt, betrug bei beiden Auswerteverfahren 25%, während die atomabsorptionsspektrometrische Messung, wie durch 10-malige Konzentrationsbestimmung bei einer Probe gefunden wurde, mit einer Unsicherheit von 6% behaftet war. Durch Messung der Peakhöhen wurde, auf das Trockengewicht bezogen, ein Mittelwert von $(0,37 \pm 0,05)$ ppm Blei erhalten. Der Fehler ist für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% berechnet. Die Auswertung der Peakflächen ergab einen Wert von $(0,33 \pm 0,05)$ ppm. Beide Konzentrationen stimmen gut mit dem vom National Bureau of Standards angegebenen Wert von $(0,32 \pm 0,08)$ ppm überein [4]. Demnach ist bei der Bleianalyse keines der Auswerteverfahren dem anderen vorzuziehen.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Methode für die Bestimmung von Blei in biologischen Materialien ausreichende Reproduzierbarkeit und Genauigkeit besitzt. Da die Aufarbeitung des Materials mit relativ geringem Arbeitsaufwand bei einer größeren Probenzahl simultan erfolgen kann, ist das Verfahren auch für Reihenuntersuchungen geeignet.

Literatur

1. Ballo, M.: Ber. Deutsch. Chem. Ges. **17**, 6 (1884)
2. Kotz, L., Kaiser, G., Tschöpel, P., Tölg, G.: diese Z. **260**, 207 (1972)
3. Krause, C.: In Vorbereitung
4. LaFleur, P. D.: J. Radioanal. Chem. **19**, 227 (1974)