

ATOMİK ABSORPSİYON SPEKTROFOTOMETRİSİ İLE KANDA KURŞUN MİKTARI TAYİNİ

ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF LEAD IN BLOOD

Ömer ERSOY*

SUMMARY

In this study a method is described which was developed for quantitative determination of lead in whole blood. This method is consisted of extraction with dithizon and quantitative determination of lead by flame atomic absorption spectrophotometry (FAAS). After precipitating the blood proteins with a solution of trichloroacetic acid, lead was extracted with dithizon. The lead-dithizonate complex was dissociated with diluted hydrochloric acid and lead was determined by means of FAAS. This method could be used to determine the blood lead levels of either non—exposed or professionally lead exposed people.

ÖZET

Bu çalışmada kanda kurşun miktarı tayini için geliştirilen yöntemde ditizon ile ekstraksiyon, kurşunun alevli atomik absorpsiyon spektrofotometrisi ile miktar tayiniyle kombine edilmiştir. Kanın proteinleri triklorasetik asid ile çöktürüldükten sonra kurşun sulu çözeltilerden ditizon yardımıyla ekstre edilmiştir. Kurşun ditizonat kompleksi seyreltik hidroklorik asid etkisiyle bozularak kurşun alevli atomik absorpsiyon spektrofotometrisi ile tayin edilmiştir. Bu yöntem gerek normal bireylerin, gerekse meslekleri dolayısıyla kurşuna maruz kalmış kimselerin kan kurşunu seviyelerinin ölçülmesinde kullanılabilir.

* M.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

GİRİŞ

Gerek filizlerinin çıkarılması, öğütülmesi ve metalin elde edilmesi, gerekse birçok sanayi kolunda kullanımı esnasında mesleki zehirlenmelere sebep olan kurşun, bu işletmelerden ve daha önemlisi motor benzine katılması sonucunda eksoz gazları ile havaya atılması nedeniyle de geniş çapta çevre kirlenmesine yol açmaktadır. Oluşan parçacıklar atmosfer olayları ile çevreye dağılmakta, solunmakta ve yiyecek olarak kullanılan bitkileri yüzeysel olarak kirletmektedir.

Normal bireyler arasında çoğunlukla önemsiz olmakla birlikte özellikle endüstride, kurşuna maruz kalma teknik veya diğer sebepler dolayısı ile değişkenlikler gösterdiğinden ve kontrol altına alınması güç olduğundan, maruz kalan bireylerin durumlarının güvenilir yöntemler ile kontrolleri son derece gereklidir.

Etkileri göz önünde tutularak, kurşuna maruz kalmanın saptanmasında yararlanılan kistaslar şöylece sıralanabilir:

- 1) Kanda kurşun miktarı tayini,
- 2) İdrarda kurşun miktarı tayini,
- 3) İdrarda δ -aminolevulinik asid (ALA) miktarı tayini,
- 4) İdrarda koproporfirin-III (KP-III) miktarı tayini,
- 5) Eritrositlerde protoporfirin-IX (PP-IX) miktarı tayini,
- 6) Eritrositlerin ALA-dehidrataz (ALA-D) aktivitesinin tayini.

Bu kistaslar arasında kanda kurşun miktarı tayininin en iyi ve en güvenilir olduğu hususunda genellikle birleşilmektedir (1-5).

Kanda kurşun miktarı tayini için spektrografi (6,7), polarografi (8,9), halka fırın tekniği (10) ve atomik fluoresans spektroskopisi (11) yöntemleri de kullanılmış olup, spektrofotometri (12-15) ile alevli (16-32) ve alevsiz (33-40) atomik absorpsiyon spektrofotometrisi (AAS) en çok başvurulan yöntemlerdir.

Kurşun miktarı tayininde ditizon'un (1, 5-difeniltiyokarbazon) özel bir yeri vardır. Bu madde yardımıyla spektrofotometrik tayin çeşitli şekillerde yapılabilmektedir (12). Bu çalışmada kanda kurşun miktarı tayini için önerilen yöntemde kurşunun ditizon yar-

dımıyla ekstraksiyonu alevli düzenekte atomik absorpsiyon spektrofotometresinde miktar tayini ile kombine edilmiştir.

MATERYEL VE YÖNTEM

Kullanılan çözeltiler:

Triklorasetik asidin sudaki % 5'lik (a/h) çözeltisi (TKA çöz.), sodyum sitratın sudaki % 25'lik (a/h) çözeltisi (sodyum sitrat çöz.), ditizonun karbontetraklorürdeki % 0.02'lik (a/h) çözeltisi (ditizon çöz.) ve 0.5 N hidroklorik asid çözeltisi (0.5 N HCl). Kurşun stok çözeltisi 1.598 g kurşun nitratın 1000 ml % 1'lik nitrik asid (h/h, sulu) içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Düşük konsantrasyondaki çözeltiler ise stok çözeltilerden seyreltme ile, taze hazırlanmış ve uzun süre saklanmamıştır. Kullanılan kimyasal maddeler E. Merck firmasının ürünleridir.

Kan materyeli olarak taze sığır kanı kullanılmıştır. Katım deneylerinde kurşunun eritrositlere bağlanmasını, dolayısıyla gerçek duruma benzemesini, sağlamak için izotonik kurşun standard çözeltileri hazırlanarak katımlar bu çözeltilerden yapılmış ve örnekler 37°C'de bir saat inkübasyona tabi tutulmuşlardır (41). Anti-koagulan olarak sodyum sitrat (4-5 mg/ml kan) kullanılmıştır.

Aletler

Atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS): Perkin-Elmer, Model 370 A, alev düzenegi, «Intensitron» kurşun oyuk katod lambası ve döteryum arkli «Background Correction» ile donatılmış. Oyuk katod lamba akım şiddeti 10 mA, kullanılan ışının dalga boyu 283.3 nm, «Slit» 0.7 nm, sinyal TC 2, çalışma şekli ABS. Gazlar: Asetilen, Habaş İst. Tüpten çıkışı 0.56 kg/cm², aletin akış hızı ölçerinde 32, hava, kompresörden (Gast, Michigan-A.B.D.) çıkışı 2.8-5.2 kg/cm², aletin akış hızı ölçerinde 55. Santrifuj aleti: Janetzki T 32 C, kapalı rotor, 4X100 ml başlıklı.

Yöntem

a) Kan örneklerinin analize hazırlanması

Kapağı sıkı kapanabilen polietilen kaplarda 5-10 ml kan örneği üzerine 20 ml TKA çöz. ilâve edilip kap içindekiler arada bir dairesel hareketlerle karıştırılarak 2 saat bekletilir. Santrifüje

edildikten sonra (santrifüj işlemleri 4.000 devirde 5 dakika olarak yapılmıştır) sıvı kısım ayrı bir kaba alınarak çökeltiliye 10 ml daha TKA çöz. ilâve edilip 3 dak. şiddetle çalkalanır. Santrifüje edilerek sıvı kısım bir evvelki ile birleştirilir. Bu çözeltiye 2 ml sodyum sitrat çöz. katıldıktan sonra çözeltinin pH'si konsantre amonyak ile 9.3'e getirilir. Çözelti 100 ml'lik bir ayırma hunisine aktarılır. Ortama 5 ml etil alkol katılır. Kurşunun ekstraksiyonu için 25 ml ditizon çöz. eşit olmayan iki porsiyon halinde kullanılır. Ayırma hunisindeki çözelti önce büyük porsiyon (15-20 ml) ditizon çöz. ile 2 dak. çalkalanır ve fazların ayrılmasından sonra organik faz bir polietilen kaba alınır. Bu kere sulu kısım geri kalan ditizon çöz. ile 2 dak. çalkalanır. Organik faz bir önceki ile birleştirilir. Sulu kısmın bütünüyle uzaklaştırılması için polietilen kapta santrifüje edilir ve organik faz sulu çözüldüden kurtarılır. Organik fazın başlangıç hacminin (25 ml) 9/10'u (22.5 ml) 50 ml'lik bir ayırma hunisinde, beklenen kurşun konsantrasyonuna göre 2.0 veya 3.0 ml 0.5 N HCl ile 1 dak. çalkalanır. Seyreltik asidli faz küçük bir cam tübe alınarak AAS'de ölçme bu çözelti ile yapılır.

b) Atomik absorpsiyon spektrofotometresinde ölçmeler

AAS de elde edilen değerler ile 0.05-20.00 $\mu\text{g Pb/ml}$ alanında absorptans-konsantrasyon ilişkisinin doğrusal olduğu bulunmuştur ($r = 0.99978$). Tayin sınırı da AAS de bilinen şekilde (42) saptanmıştır (0.07 $\mu\text{g Pb/ml}$).

Her bir grup analizde reaktiflerin analizde kullanılan miktarlarıyla kör değer saptanmış ve bu değer örneklerinkinden çıkarılarak gerçek absorptans değerleri elde edilmiştir. Ölçmelerde sonucun hesaplanmasında 1 $\mu\text{g Pb/ml}$ 'lik standard çözelti ile elde edilen absorptans değerinden yararlanılmış ve bu işlem için şu formül kullanılmıştır:

$$\frac{E_1 \times V_1 \times 100 \times 25}{E_2 \times V_2 \times V_3} = \mu\text{g Pb}/100 \text{ ml kan}$$

E_1 = Örneğin gerçek absorptansı

V_1 = Ekstraksiyonda kullanılan 0.5 N HCl miktarı (ml)

E_2 = 1 $\mu\text{g Pb/ml}$ 'lik standard kurşun çözeltisinin absorptansı

V_2 = Analizde kullanılan kan örneği miktarı (ml)

V_3 = 25 ml ditizon çöz. nin geri ekstraksiyon için alınan miktarı (ml)

DENEYSEL BÖLÜM

Yöntemin geri kazanma oranı ve tekrar edilebilirliği, 10 ml distile suya çeşitli miktarda kurşun katılıp incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 1'de verilmektedir. Bu adımda uygun sonuçlar alındıktan

TABLO 1

Kurşunun sulu çözeltiden geri kazanılma oranı					
Katılan kurşun (μg)	Analiz sayısı	Ortalama sonuç	Std. sapma	% Değişme katsayısı	Geri kazanma oranı (%)
2	5	2.03	∓ 0.11	5.4	102
4	5	3.97	∓ 0.11	2.8	99
8	5	7.98	∓ 0.22	2.8	100
12	5	11.58	∓ 0.37	3.2	97

sonra kendisi de 10 ml'de 3.7 μg Pb içermekte olan sığır kanı materyeli ile katım ve geri kazanma deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla 10'ar ml kan örneklerine izotonik olarak hazırlanmış standard kurşun çözeltisi ile 1, 4, 8, 12, 16 μg kurşun katılarak, bu örnekler 37°C'de 1 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra analiz edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmektedir.

TABLO 2

Sığır kanı ile yapılan katım deneylerinde kurşunun geri kazanılma oranı						
Analiz sayısı	Katılan kurşun ($\mu\text{g}/10$ ml) kan	Total kurşun miktarı (μg)	Ortalama sonuç ($\mu\text{g}/10$ ml) kan	Std. sapma	% Değişme katsayısı	% Geri kazanma oranı
15	—		3.70	∓ 0.18	4.9	
10	1	4.70	4.68	∓ 0.21	4.5	100
5	4	7.70	7.48	∓ 0.17	2.3	97
5	8	11.70	11.93	∓ 0.24	2.0	102
5	12	15.70	14.54	∓ 0.26	1.8	93
5	16	19.70	18.60	∓ 0.34	1.8	94

Elde edilen sonuçların karşılaştırılabilmesi için, kanda kurşun miktarı tayini için çok kullanılan HESSEL'in yöntemi (18) ile çalışılmıştır. Bu yöntemin uygulanmasında 40 µg Pb/100 ml kan örnekleri için (n = 9) 43.0 ± 1.8 (% 108 geri kazanma), 80 µg Pb/100 ml kan örnekleri için (n = 8) 78.2 ± 3.1 (% 98 geri kazanma) µg Pb/100 ml kan sonuçları alınmıştır. Önerilen yöntemde elde edilen sonuçların bu sonuçlarla uygunluk içinde bulunduğ u görülmektedir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Kanda kurşun miktarı tayininde hangi yöntemin uygulanacağı değil, uygulayacak personelin daha önem taşıdığı bilinir. Personelin gerekli bilgi ve deneyim ile donatılmasının önemi yanında, personeiden doğacak hatalar da, daha az sayıda ve miktarda reaktif katılmasına gerek duyulan ve daha az sayıda mekanik ve kimyasal işlemleri içeren yöntemlerin seçimi ile azaltılabilir.

Bu çalışmada kanda kurşun miktarı tayini için önerilen yöntemde, bu alanda sık sık başvurulan ditizon ile ekstraksiyonun kurşun için spesifik olmama dezavantajı, bu ekstraksiyonu kurşunun spesifik olan atomik absorpsiyon spektrofotometresinde miktar tayini ile kombine ederek ortadan kaldırılmıştır. Kanın proteinlerinin triklorasetik asitle çöktürülüp, kurşunun amonyum pirolidinditiyokarbamat/metilzobutilketon ile ekstre edilmesi ve kurşunun bu organik çözücüdeki çözeltisinin alevli AAS de miktar tayini için kullanılması daha önce uygulanmıştı (23-25). Bazı araştırmacılar doğrudan doğruya triklorasetik asidli çözeltiyi kurşun miktarı tayini için kullandılar (16, 17). K. Schmidt (43) ise kurşunun bu çözeltiden ekstraksiyonunu ditizon yardımıyla yapmayı denemiş, fakat çalışmalarını yayınlamamıştır. Bu çalışmada gerekli bazı değişikliklerle bu yöntem geliştirilmiştir. Başta temel AAS aletine genellikle pahalı olan diğer bir düzenek ilâvesine gerek olmayışı, diğer taraftan kullanılan reaktiflerin kolayca temin edilebilir olması, kullanılan organik çözücünün metilzobutilketon kullanılan yöntemlerde olduğu gibi sarfedilmeyip geri kazanılması da bu arada gözönüne alınan hususlar olmuştur. Ancak karbon-tetraklorünün yüksek olan zehirliliği çalışma esnasında unutulmamalı ve havalandırılması iyi olan yerlere çalışılarak bu konuya dikkat edilmelidir.

Yöntemin güvenilirliğini kontrol etmek amacıyla sulu çözeltide ve kanda katma ve geri kazanma deneyleri yapılmış ve sonuçlar bu alanda çok kullanılan bir başka AAS-yönteminde elde edilenler ile uygunluk göstermiştir. Sulu çözeltide geri kazanma oranları 20-120 $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ için % 97-102 iken, kanda yapılan katım deneylerinde ise 10-160 $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ kan için % 93-102 arasında değişmektedir. % değişme katsayısı 1.8-4.9 olan bu yöntem gerek normal bireylerin ($<40\ \mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ kan), gerekse çeşitli nedenlerle kurşuna maruz kalmış kimselerin ($> 40\ \mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ kan) kan kurşunu seviyelerinin ölçülmesinde kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Zielhuis, R.L. : Second International Workshop Permissible Levels for Occupational Exposure to Inorganic Lead, *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, 39, 59-72, (1977).
2. *Recommended Health-Based Limits in Occupational Exposure to Heavy Metals*, Technical Report Series 647, WHO, Geneva 1980.
3. Herber, R.F.M. : Estimation of blood lead values from blood porphyrin and urinary 5-aminolevulinic acid levels in workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, 45, 169-179 (1980).
4. *İşçi Sağlığı ve İş Güvenliği Tüzüğü*, Resmi Gazete, 14765, 1974.
5. *Sosyal Sigortalar Sağlık İşlemleri Tüzüğü'nün değiştirilmesine ilişkin tüzük*, Resmi Gazete, 16587, 1979.
6. Pfeilsticker, K. : Eine spektrochemische Mikrobestimmung des Bleis in biologischem Material. *Mikrochim. Acta (Wien)*, 1956, 319 - 333.
7. Steiner, R.L., Anderson, D.H. : Spectrographic determination of lead in blood, *Appl. Spectrosc.*, 26, 41-43, (1972).
8. Teisinger, J. : Eine rasche mikropolarographische Methode zur quantitativen Bestimmung des Bleis im Blut. *Z. ges. exper. Med.*, 98, 520-538, (1936).
9. Searle, B., Chan, W., Davidow, B. : Determination of lead in blood and urine by anodic stripping voltammetry. *Clin. Chem.*, 19, 76-80. (1973).
10. Shendrikar, A.B., West, P.W. : Microdetermination of lead with dithizone and the ring oven technique, *Anal. Chim. Acta*, 61, 43-48, (1972).
11. Amos, M.D., Bennet, P.A., Brodie, K.G., Lung, P.W.Y., Matousek, J.P. : Carbon rod atomiser in atomic absorption and fluorescence spectrometry and its application. *Anal. Chem.*, 43, 211-215, (1971).

12. Iwantscheff, G. : *Das Dithizon und seine Anwendung in der Mikro- und Spurenanalyse*. Verlag Chemie, 2. Baskı, Weinheim 1972.
13. Van Dijk, C. P. : *Ned. Ti. Geneesk.*, 86, 3141, 1942. Ref., Müller, R.K. : *Die toxiologisch-chemische Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim 1976, s. 174 «Photometrische Bleibestimmung mit Dithizon nach van Dijk».
14. Deutsche Forschungsgemeinschaft : *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe*, Band 2, Analysen in biologischem Material, 2. Lieferung (1978), Blei Meth.-Nr. 2.
15. Kamm, G. : Bestimmung von Blei in biologischem Material durch zweifache direkte extraktive Titration mit Dithizon. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 6, 182-185, (1958).
16. Sprague, S., Slavin, W. : A simple method for the determination of lead. *At. Absorpt. Newsl.*, 5, 9-10, (1966).
17. Einarsson, O., Linstedt, G. : Nonextraction atomic absorption method for the determination of lead in blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 23, 367-371, (1969).
18. Hessel, D.W. : A simple and rapid quantitative determination of lead in blood. *At. Absorpt. Newsl.*, 7, 55-56, (1968).
19. Zinterhofer, L.J. M., Jatlow, P.L., Fappiano, A. : Atomic absorption determination of lead in blood and urine in the presence of EDTA. *J. Lab. Clin. Med.*, 73, 654-674 (1971).
20. Mitchell, D.G., Ryan, F.J., Aldous, K.M. : Precise determination of lead in whole blood by solvent extraction-atomic absorption spectrometry. *At. Absorpt. Newsl.*, 11, 120-121, (1972).
21. Amore, F. : Determination of cadmium, lead, thallium and nickel in blood by atomic absorption spectrometry : *Anal. Chem.*, 46, 1597-1599, (1974).
22. Hoffmann, F., Büchner, M. : Die Bestimmung von Blei in Vollblut und Harn mit der Flammenatomabsorptionsspektrophotometrie. *Z. Med. Labor.Diagn.*, 18, 51-52, (1977).
23. Berman, E. : The determination of lead in blood and urine by atomic absorption spectrophotometry. *At. Absorpt. Newsl.*, 3, 111-114, (1964).
24. Lehnert, G., Schaller, K.H. : Quantitative Bleibestimmung in Blut und Harn durch Atomabsorptionsspektrophotometrie. *Med. Welt*, 1967, 1131-1133.
25. Selander, S., Cramer, K. : Determination of lead in blood by atomic absorption spectrophotometry. *Br. J. Ind. Med.*, 25, 209-213, (1968).
26. Delves, H.T. : A microsampling method for the rapid determination of lead in blood by atomic-absorption spectrophotometry. *Analyst (London)*, 95, 431-438, (1970).
27. Cernik, A.A., Sayers, M.H.P. : Determination of lead in capillary blood using a paper punched disc atomic absorption technique. *Br. J. Ind. Med.*, 28, 392-398, (1971).
28. Barthel, W.F., Smrek, A.L., Angel, G.P., Liddle, J.A., Landrigan, P.J., Gehlbach, S.H., Chisolm, J.J. : Modified Delves Cup atomic absorption determination of lead in blood *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 56, 1252-1256, (1973).

29. Rose, G.A., Willden, E.G. : Improved method for the determination of whole blood lead by an atomic-absorption technique. *Analyst (London)*, 98, 243-245, (1973).
30. Hicks, J. M., Gutierrez, A.N., Worthy, B.E. : Evaluation of the Delves micro system for blood lead analysis. *Clin. Chem.*, 19, 322-325, (1973).
31. Heinemann, G. : Atomabsorptionsspektrometrische Bestimmung von Blei in Blut und Harn mit dem Delves-Sampling-System. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 11, 197-201, (1973).
32. Joselow, M.M., Bogden, J.D. : Multielement microanalysis by Delves Cup-Atomic Absorption Spectrophotometry on chelate-solvent extracts. *At Absorpt. Newsl.*, 11, 127-123, (1972).
33. Hein, H. : Bleibestimmung in Blut mit der Graphitrohrküvette HGA-72. *Analysetechn. Berichte*, 29, (1973).
34. Stoeppler, M., Brandt, K., Rains, T.L. : Rapid method for the automated determination of lead in whole blood by electrothermal atomic-absorption spectrophotometry. *Analyst (London)*, 103, 714-722, (1978).
35. Alt, F. : Eine einfache, schnelle und zuverlässige Bleibestimmung in Blut mittels Atomabsorptionsspektrometrie. *Z. Anal. Chem.*, 290, 108-109, (1978).
36. Nise, G., Vesterberg, O. : Blood lead determination by flameless atomic absorption spectroscopy. *Clin. Chim. Acta*, 84, 129-136, (1978).
37. Baily, P., Kilroe-Smith, T.A. : Effect of sample preparation on blood lead values. *Anal. Chim. Acta*, 77, 29-36, (1975).
38. Cavalleri, A., Minoia, C., Pozzoli, I., Baruffini, A. : Determination of plasma lead levels in normal subjects and in lead-exposed workers. *Er. J. Ind. Med.*, 35, 21-23, (1973).
39. Allain, P., Mauras, Y. : Microdetermination of lead and cadmium in blood and urine by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry. *Clin. Chim. Acta*, 91, 41-46 (1979).
40. Carelli, G., Rimatori, V., Sperduto, B. : Determination of lead in blood by wet ashing solvent extraction and flameless atomic absorption spectrophotometry. *Med. Lav.*, 70, 313-317, (1979).
41. Deutsche Forschungsgemeinschaft : *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheits-schädlicher Arbeitsstoffe*. Band 2. Analysen in biologischem Material, 1. Lieferung (1976), 2. Lieferung (1978), Blei Meth.-Nr 1.
42. *Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry*. Perkin-Elmer Co., Norwalk 1976.
43. Schmidt, K., kişisel görüşme.

