

Arbeidsforskningsinstituttene,
Yrkeshygienisk Institutt,
Gydas vei 8, Oslo 3.

HURTIG MINERALISERING AV URINPRØVER TIL BLYBESTEMMELSER.

PRELIMINÆR MEDDELELSE

K. Wülfert

Ved den såkalte "Screen-test" etter J. Cholac-Silson (1,2,3,) felles tilstedeværende bly sammen med kalsium som fosfat (Koprecipitation). Man tilsetter (den sure) urinprøven en kjent mengde sur kalsiumfosfatoppløsning, prøven gjøres ammoniakalsk. Det utfelte fosfat avsentrifugeres, vaskes med tykt ammoniakkvann, sentrifugeres igjen og presipitatet løses i et par dråper saltsyre. Denne saltsure oppløsning tilsettes en "buffer"-oppløsning som inneholder amoniumsitræt, ammoniakk, cyankalium og ditizon. Blandingen utrustes med kloroform og man bestemmer ekstinksjonsverdien med filter S51 = 510 mm (s.k. mixed color metode), hvor blyditizonat har maksimal ekstinksjon samtidig med at selve ditizon-ekstinksjonen er lav.

Metoden har ofte blitt benyttet til rutineanalyser. 2 laboranter kan i fellesskap utføre opptil 60 analyser pr. arbeidsdag. Metoden har en rekke alvorlige feil som det ikke har lyktes å eliminere til tross for det omfattende arbeide vårt analytiske laboratorium har nedlagt gjennom mange år.

Utfellingen i form av ko-presipitasjon med kalsiumfosfat, er i og for seg ikke helt ubetenkelig, spesielt med henblikk på den senere utvasking og dekanteringen som kan medføre substans-tap. Forsøk med vann tilsatt kjente mengder blysalter viser dog at ko-presipitasjonsmetoden vanligvis gir fullt tilfredsstillende resultater. Dette kan ikke sies å være tilfelle

ved analysering av urinprøver tilsatt kjente mengder blysalter. Resultatene vil kunne variere fra noenlunde tilfredsstillende til nærmest ubrukelige, uten at det har lyktes å finne årsaken. Det må også nevnes at disse uregelmessigheter synes å stå i forbindelse med angjeldende uriners sammensetning, idet fersk latte uriner fra forskjellige personer kan gi sterkt varierende verdier.

Ko-presipiteringen forutsetter prinsipielt at hele blyet foreligger i ionogen form i urin. Dette er ikke tilfelle hos personer som har blitt eksponert for bly i større utstrekning (se: Wassermanns publikasjon fra Romania). Man kan heller ikke utelukke at også "normalpersoner" kan utskille bly i "chelatert form". Man kan endog tenke seg at all metallutskillelse kan skje i form av metallkomplekser med organiske emner av hittil ukjent struktur og med skiftende bindingsfasthet mellom angjeldende metall og "transportøren".

Eldre uriner gir ofte "slimete utfellinger", og det kan ikke utelukkes at disse "slim-stoffer" (som ikke kan fjernes kvantitativt ved ammoniakkvask) påvirker ditizonet, f.eks. ved å ødelegge det under dannelsen av fargete kloroform-løselige stoffer.

Den originale buffer-oppløsningen (etter Cholac-Silson), er lite stabil, og selv vedroppbevaring i kjøleskap, kan man få uforklarlige spontandestruksjoner av ditizonet som ikke kan elimineres ved tilsetning av reduserende stoffer.

Omkring årskifte ble laboratoriet plutselig konfrontert med et meget forbausende fenomen - som vi tidligere aldri har konstatert: Under den sedvanlige "metodekontroll med ferske uriner", var det ikke mulig å gjenfinne de tilsatte mengder bly, kvantitativt. Det ble tilsynelatende bundet ("chelatert" ?) en viss mengde av det tilsatte bly av stoffer i urinen på en slik måte at dette bly ikke kunne ekstraheres igjen med ditizon.

Mengden av det "tapte" bly, varierte noe fra urin til urin (både mann- og kvinneurin) og lå på omlag 0,5 γ - 1 γ bly absolutt. (Dette betyr at det f.eks. ble gjenfunnet 1 γ av 2 γ , 2 γ av 3 γ , 3 γ av 4 γ Pb o.s.v.). Vi har selvsagt kontrollert samtlige reagenser og alt utstyr, og vi fant regelmessig alt bly igjen såsnart vi gjennomførte kontrollen med 40 ml. vann

tilsatt skiftende mengder bly istedenfor med 40 ml av angjeldende uriner.

Ved disse undersøkelser ble det alltid nødvendigvis gjennomført parallell-serier, hvor urinene ikke var blitt tilsatt bly (som blysaltoppløsninger) for å bestemme den s.k. blindverdi.

Det ble påvist omlag 30 γ Pb/l urin, en verdi som i mange år er blitt funnet hos ikke eksponerte personer både ved bruk av "Screen-test" og ved totalmineralisering med svovelsyre-salt-syre. Det må da betegnes som eiendommelig at man ved kopresipitasjon kunne påvise disse 30 γ Pb/l, mens bly som ble tilsatt samme urinen, delvis undro seg den senere bestemmelse.

Dette forhold taler imot tanken om en "chelatering" - idet en chelaterende substans også burde ha bundet nevnte "genuine" 30 γ Pb/l urin.

Vi anså det for ulønnsomt å ofre kostbar tid på den videre oppklaring av det nye usikkerhetsmoment hos en metode som ofte har gitt anledning til ubehag, ergelse og tidstap, - og som bare hadde blitt tolerert fordi den innen visse grenser kunne nyttes til orienterende rutinekontroll, og da med forbehold. Sykehuspasienters urin. ble alltid oppsluttet. Dette hadde vist seg å være en ganske tidkrevende prosess som syntes å utelukke "mineralisering" som rutinemetode.

Med utgangspunkt i vår Selen-bestemmelse respektive oppslutning av urin etter Eberius-Wülfert (1967), ble det satt igang 1 undersøkelse vedr. anvendbarheten av denne metode for blybestemmelser. Ved Se-analysene må man ta hensyn til Se-flyktighet ved temp. over + 200°C. Dette er ikke nødvendig for blyets vedkommende. Det ble dessuten fastslått at molybdation i alkalisk miljø, er uten innflytelse på ditizon under utrusting med kloroform.

Resultatet av våre forsøksserier er følgende:

Ved hjelp av en blanding av $H_2SO_4-HNO_3-HCl$ $\frac{1}{4}$ - Ammoniummolybdat, kan urinprøver våt-foraskes i Kjeldahlkolber av passende størrelse innen ca. 12 min. Denne oppslutningstid varierer noe

med angjeldende urin's eventuelle tendens til å skumme i begynnelsen.

Fremgangsmåte:

eller 300 ml

Hele den innkomne urinprøve overføres i en 250 ml Kjeldahlkolbe (Pyrex, England), tilsettes noe iseddik p.a. og oppvarmes inntil prøven er klar. Den varme urin helles tilbake til flasken som korkes og rystes godt for å løse eventuelle utfellinger langs flaskeveggen. 20 ml urin overføres med pipette til en 100 ml **3** Kjeldahlkolbe (Pyrex). Det tilsettes kokesten (knuste kvarstbiter), 4 ml av blandingen $H_2SO_4 - HNO_3$ (A) samt ~~2,5~~ ml av blanding $HClO_4$ - ammonmolybdat (B). Kolben oppvarmes forsiktig inntil innholdet har sluttet å skumme. Kolbene står direkte på triangler av lere ("Ton-Dreiecke") slik at flammen slår rett mot kolben. Ved tendens til skumming vil slukking av flammen momentant stanse enhver overkoking. Siden kjøres med full flamme, etter at vannet har kokt bort, begynner oksydasjonen av urinen som meget snart er "klar brent" (helt fargløs). Salpetersyren og perklorsyren ryker av, siden følger svovelsyren. Det kokes inntil det renner svovelsyre - "Schlieren" på innsiden av kolben. Denne og kolbehalsen skal være fri for svovelsyretåken som bare står over kolbeåpningen. Flammen slukkes, etter avkjølingen tilsettes 5 ml 30 % "Perhydrol" (Merck) og kolben opphetes: innholdet bruser sterkt (store gassblærer), massen blir gul (permolybdat), deretter igjen fargløs, samtidig utvikles en større mengde små-blæret skum, kokingen fortsettes inntil kolben og kolbehalsen er klar og det renner "Schlieren" på veggen. Avkjøles. Tilsetting av H_2O_2 har blitt brukt for å destruere all "nitrose" (fra nitrosyl-svovelsyren) som ellers med vann vil danne HNO_2 respektive NH_4NO_2 , som senere kan bli adsorbent til fosfatutfelling og derved følger med til ditizonekstraksjonen. Ennvidere vil man gjennom permolybdat få en sluttoksydasjon for eventuelt ikke destruert org. materiale. I tilfelle av at det ved senere forsøk skulle lykkes å utryste bly direkte uten forutgående utfelling med fosfat, er det selvfølgelig nødvendig å få fjernet all HNO_2 , hvis sterke oksydasjonseffekt ødelegger ditizone øyeblikkelig.

Kolbeinnholdet overføres med ca. 30 ml H_2O (ionebyttervann) til sentrifugeglasset, tilsettes 2 ml feldningsvæske og 10 ml NH_3 , kons. Røres ut med glasstav (Pyrex), sentrifugeres hardt (3000 o/m) i 10 min., dekanteres. Bunnfeldingen løses med 0,8 ml 20 % HCl (20 % HCl kan oppvarmes uten tap av HCl: Med varme syre påskyndes oppløsningen ytterligere), tilsettes 40 ml H_2O , overføres til røresylinder og 30 ml "buffer". Denne "Buffer" består bare av ammoniumsitratt + KCN. Fra byrette tilsettes 12 ml ditizonoppløsning, vibreres i $\frac{1}{2}$ min med Vibromischer. Skilles i skilletrakt. Kloroformlaget tappes av gjennom en liten dott rensed bomull. De første dråper kastes. Hvis bomulldotten skifter farge, fra grønt til rødaktig, må dotten skiftes øyeblikkelig og en ny settes inn (forurensning av vatt-dotten med bly eller sink!). Avleses i 20 mm kyvette i Elko II med filter S 51, d.v.s. ved 510 μ m.

1 γ Pb viser i 20 mm kyvette, ved bruk av 12 ml ditizonoppløsning en ekstinksjon av 0,050 (dette svarer ved 10 mm kyvette og 10 ml ditizonoppløsning til en ekstinksjon av: 0,030).

Vi har med denne metode gjennomført flere hundre analyser (som dobbeltanalyser). Disse viser innbyrdes en ekstinksjonsspredning på maksimalt $\pm 0,010$, hvilket svarer til $\pm 10 \gamma$ Pb/l urin. Spredningen ligger i alminnelighet betydelig lavere. Ved spredning $> \pm 0,010$ gjentas analysen.

Ved å bestemme bly som er tilsatt urinprøver i skiftende mengde finnes samme ekstinksjon, for 1 γ Pb/absolutt/ som når samme serie gjennomføres med 20 ml vann, uten oppslutning, nemlig 0,050.

Metoden tillater 20 analyser pr.dag, 2 laboranter som arbeider i fellesskap. Metoden har i de senere måneder blitt brukt for våre rutinekontroller. Vi anser ikke det metodiske arbeide for avsluttet. Målet er å finne frem til en metode uten kopresipitasjon, altså med direkte ekstraksjon av blyet ved hjelp av ditizon/kloroform i ammoniakalsk-sitratt-cyanid miljø.

Dette har hittil støtt på visse vanskeligheter som fortrinnsvis synes å ligge i problemet å holde den rette Ph-verdi i den vandige fase. Nu er Ph i "den vandige fase" som består av den

sure fosfatfelning (0,8 ml) + H₂O (40 ml) + "buffer" (30ml) konstant 10,80 -10,85. Dette er lett å få til, takket være det forhold at 40 ml buffer + 30 ml H₂O gir en Ph-verdi på 10,95 - 11,00. Denne verdi påvirkes meget lite av den sure fosfatoppløsning og forskyvningen til 10,8 - 10,85 er konstant.

Helt annerledes er forholdet i de ferdige sterkt svovelsyreholdige oppslutninger hvis Ph-verdier vil variere med den tilstedeværende svovelsyre med de tilsatte ammoniakkmengder samt de dannede mengder ammoniumsulfat. En 100%-ekstraksjon av blyditizonat, kan bare påregnes i et begrenset Ph-område / 9,5 - 11 / (4) ^{1/2} og er dessuten også avhengig av konsentrasjonen av sitrater o.l.

I tilfelle av at det lykkes å overvinne disse vanskeligheter, vil antall analyser som kan gjennomføres under ellers like forhold, antagelig kunne fordobles. Det er sentrifugeringen og oppløsningen av det utfelte fosfat, som for øyeblikket utelukker en enda hurtigere gjennomføring av disse analyser.

Avsluttende skal jeg få lov til å påpeke at Yrkeshygienisk Institutt akter å tilsette alle sine prøveflasker en bestemt mengde Komplexon (Di-Na-salt av Etylendiamintetraeddiksyre)¹⁾ for å hindre dannelsen av fosfatutfellinger under transporten. Disse utfellinger representerer analytisk et alvorlig problem og våre orienterende undersøkelser har vist at en slik "Komplexon"-tilsetting hindrer fosfatutfelling totalt i mange uker, selv ved oppbevaring i varme rom. Utfellingen av ureater kan ikke forhindres av Komplexon, men uriner med Komplexon-tilsetting og ureat-bunnfellinger blir helt klare ved kortvarig oppvarming. Tilsetting av Komplexon krever totalmineralisering. Det har ikke lyktes oss å påvise bly i "komplexon" / 5 g substans til analysen / - alminnelige prøveflasker på 250 ml vil bare inneholde 0,5 g Komplexon. Selvsagt vil man ikke kunne bestemme spes.vekt i uriner med slik Komplexon-tilsetting. De fleste uriner som kommer inn til vårt laboratorium, er fulle av fosfatfelling og rikelige ureatfelling, delvis også bakterielt

siden forandret til Tetra-Na-saltet.

dekomponert, slimete og ammoniakkluktende. Bestemmelsen av spes. vekt i slike uriner savner berettigelse og er unødige tidsspill. Bestemmelsen av spes.vekt kan bare forsvares hos helt ferske uriner.

KJEMIKALIER.

H₂O - destillert og behandlet i ionebytter.

NH₃, kons. d: 0,88-0,90, fremstilt i laboratoriet fra NH₃-gass ved innledning i ionebyttervann, kjølt med isvann.

HCl - 20% fremstilt fra HCl -37% (1.19) Merck (317) ved destillasjon i Pyrex-apparatur.

HClO₄ - 60 % d = 1,54 Merck (518)

HNO₃, kons. d= 1,40 fremstilt fra kons. HNO₃ p.a. Merck (456) ved destillasjon i Pyrex-apparatur.

H₂SO₄ kons. 95-97 % p.a. d: 1.84. "Merck" (731)

H₂O₂ = "Perhydrol" Merck (7209))

Sitronsyre p.a. Merck (244) - C₆H₈O₇ H₂O

Ammoniummolybdat = (NH₄)Mo₇O₂₄ · 4H₂O Merck (1182)/"Heptamolybdat"/ KCN Merck (4967)

Kloroform p.a. Merck (2445)

Ditizon Merck (3092)

CaCO₃, Merck (2066)

di - Ammonium-hydrogenphosphat, Merck (1207)-(NH)₂ HPO₄

REAGENSOPPLØSNINGER.

"Fellingsvæske": 12,5 g CaCO_3 Merck (2066) løses i omlag 34 ml HCl kons. Merck 10 g diammoniumfosfat p.a. $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ løses i ionebytter- vann og settes porsjo svis til den saltsure kalsiumholdige oppløsning. Fylles opp med vann til 500 ml. I tilfelle av at det kommer til en varig utfelling tilsettes et par dråper kons. saltsyre. Tilsett et par dråper metylrødt som indikator.

"Buffer".

250 g sitronsyre Merck - tilsettes 175 ml ionebyttervann. Under omrøring tilsettes kons. NH_3 -oppløsning inntil indikatoren skifter farve. Bruk fenolrødt som indikator. Avkjøl væske, tilsett 12,5 g KCN Merck (4967) som løses under omrøring. Fyll opp til 625 ml med ionebyttervann. Befris for bly i skilletrakt ved å ryste med en ditizon - CHCl_3 -oppløsning (30 mg ditizon / 1 CHCl_3). Tapp av ditizonlaget. Ryst 1 à 2 ganger med kloroform, tapp av kloroformen og filtrer den vandige oppløsning gjennom en bomullsdott ned i en 2 liter flaske. Tilsettes 2 x 625 ml kons. NH_3 . Oppbevares koldt. Best er det å ha bufferten stående ved -18°C til -20°C utenfor arbeidstiden. I arbeidstiden settes flasken i kjøleskapet. De til analysen nødvendige 30 ml dispenseres fra en "kipp-automat", som er plasert i en "kjøle-bag" fylt med de sedvanlige kjøleposer i en slik bag. "Kippautomaten" resp. buffertvæsken holder da omlag $+8^\circ\text{C}$ under hele arbeidstiden. Uten slik nedkjøling vil det kunne komme til betydelige ammoniakktap fra væsken i "kippautomaten", som medfører Ph-forskyvninger. Disse vil påvirke blyekstraksjonen og ditizonekstraksjonen i uheldig retning.

Ditizonoppløsning: 48 mg ditizon Merck (3092) (pakninger à 5 g) løses i 1 liter CHCl_3 Merck (2445). Oppbevares i kjøleskap. Oppløsningen holder seg uforandret i omlag 4 døgn. Ved fremstillingen av denne ditizonoppløsning bør mengden avpasses etter det aktuelle behov, slik at man slipper å få restbeholdninger som er flere dager gamle.

Syreblanding A: 200 ml kons. H_2SO_4 Merck 95-98 %
150 ml HNO_3 $d=1.40$, destillert.

Syreblanding B: 20 g Ammoniummolybdat, Merck
250 ml ionebyttervann
~~350~~ 300 ml HCl_4 - 60%, Merck.

Glassvarer: Samtlige glassvarer er enten Pyrex (of England) eller "Duran 50" (Schott & Genossen). De må renses i en blanding av like deler vann og kons. salpetersyre.

Ved bruk av Kjeldahkolben på 250 ml - 350 ml til oppslutning, anbefales å korte av "halsen" med omlag 50 %. Oppslutningstiden avkortes vesentlig hos slike "korthalsede" kolber (på 250 - 300 ml), men vil dog være lengre enn ved bruk av 100 ml - Kjeldahlskolber.

Som kokesten nyttes kvartsbiter (feks. fra knuste kvartsskåler o.l.) som renses i salpetersyre, ettervaskes med ionebyttervann og tørkes. Står så med ditizonoppløsning i 48 timer, skylles etter med $CHCl_3$ og oppbevares i ren polyetylenflaske

ooo000ooo

Litteratur:

- 1) John Silson "A rapid screening test for urinary lead ", New York State Department of Labor, Monthly Review, vol 27, July 1948, No.7.
- 2) Cholac, Jacob e.a. "The determination of lead in freshly voided urine" (Method received from Associated Ethyl Co.Ltd. 9.3.1949).
From the Kettering Laboratory of Applied Physiology, College of Medicine, University of Cincinnati, Ohio.
- 3) Cholac, J. Hubbard, D.M. and Burkey, R.E. "The determination of lead in freshly voided urine". J.Industr.Hyg. and Toxicol. Vol.30, No.1. Jan.48.
- 4). Iwantscheff: "Das Dithizon und seine Anwendung" in der Mikro-und Spurenanalyse. Verlag Chemie G.m.b.H. /1958.
- 5) O.B. Mathre and E.B. Sandell, Talanta, 1964, 11(2), 295-314.