

Verfahren zur Probenvorbereitung biologischen Materials zur Bestimmung von Spurenelementen = Procedures for the sample preparation of biological materials for the determination of trace elements

Autor(en): **Hohl, Ch. / Seiler, Marianne / Seiler, H.G.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und
Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **80 (1989)**

Heft 1

PDF erstellt am: **22.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-983598>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Verfahren zur Probenvorbereitung biologischen Materials zur Bestimmung von Spurenelementen

Procedures for the Sample Preparation of Biological Materials
for the Determination of Trace Elements

Ch. Hohl, Marianne Seiler und H. G. Seiler

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel, Basel

Einleitung

Viele Bestimmungsmethoden für Spurenelemente in biologischen Materialien erfordern eine mehr oder weniger vollständige Zerstörung der biologischen Matrix. Diese Mineralisierungsverfahren, besonders aber die sehr häufig angewendete sog. «nasse Mineralisierung», benötigen den Einsatz relativ grosser Mengen an Reagenzien, wodurch erhebliche Kontaminationen des Analysenguts mit zu bestimmenden Elementen erfolgen können (1, 2). Diese Kontaminationen üben, auch unter Berücksichtigung der entsprechenden Blindwerte, einen entscheidenden Einfluss auf die Bestimmungsgrenze der interessierenden Elemente aus. Mineralisierungsverfahren sind meist relativ zeitaufwendig, benötigen spezielle Geräte bzw. Apparaturen und lassen sich häufig nur in kleinen Serien durchführen. Ein weiterer Nachteil besteht darin, dass vielfach nur kleine Probenmengen eingesetzt werden können, was sich bei biologischen Materialien nachteilig auf die Richtigkeit der Analysenresultate auswirkt, da in diesen die zu bestimmenden Elemente meist inhomogen verteilt sind (3).

Grundlage des im folgenden beschriebenen Verfahrens ist, dass die meisten routinemässig zu bestimmenden kationischen essentiellen und toxischen Mengen- und Spurenelemente durch genügend grosse Protonenaktivitäten oder starke Komplexbildner aus der Matrix freigesetzt und von dieser abgetrennt werden können. Mitabgetrennte, die nachfolgende Bestimmung störende Matrixbestandteile werden anschliessend durch Filtration über ein makroretikulares Harz weitgehend entfernt.

Die «Saure Extraktion» (4)

Sowohl praktische Erfahrungen wie thermodynamische Berechnungen zeigen, dass ionisch- und komplexgebundene Metallionen bei ausreichender Proto-

nenaktivität aus ihren Bindungen in der Matrix freigesetzt werden (5, 6). Die Geschwindigkeit und Vollständigkeit der Extraktion bei gegebener Protonenaktivität hängt sowohl von der Zusammensetzung und Textur der biologischen Matrix, der Art der Bindung der Metallionen und der angewendeten Temperatur ab.

Voraussetzung für jede saure Extraktion von Metallionen aus festem biologischem Material ist eine vorgängige, möglichst feine Zerkleinerung und Homogenisierung, eventuell unter Zusatz von Reinstwasser. Sie ist sowohl für die Vollständigkeit als auch für die Geschwindigkeit der Extraktion entscheidend. Hierbei ist besondere Sorgfalt bezüglich möglicher Kontaminationen oder Verluste durch die Art der Homogenisierung und der hierzu verwendeten Geräte unerlässlich. Bei der Entnahme eines Probenaliquots ist darauf zu achten, dass das Verhältnis Festkörper/Flüssigkeit der ursprünglichen Zusammensetzung des Homogenats entspricht.

Die saure Extraktion sollte immer unter den mildesten Bedingungen erfolgen, bei welchen die Metallionen möglichst vollständig aus ihren Bindungen freigesetzt, die biologische Matrix jedoch so wenig als möglich verändert wird. Die Menge, Konzentration und Art der Säure sowie die anzuwendende Temperatur und die Extraktionszeit hängen von der Zusammensetzung und Textur der Matrix ab. Ist das Analysengut gut benetzbar und erlaubt die Textur eine rasche Permeation mit der Säure, so stellt sich das Gleichgewicht zwischen Lösung und verbleibendem Festkörper schnell ein, d. h. die Extraktion ist auch bei niedriger Temperatur rasch beendet. Hat die zu untersuchende Matrix eine dichte Textur oder ist hydrophob – z. B. Stoffe mit hohem Fettgehalt, dichtes Muskelgewebe wie auch Nadeln von Koniferen –, so erfordert eine vollständige Extraktion mehr Zeit und erhöhte Temperatur.

Auch die Art der Bindung der Metallionen in der Matrix beeinflusst das Extraktionsverhalten. Sind die Metalle als Kationen an Eiweiss, Carboxylat- oder Phosphatgruppen gebunden, so werden sie relativ rasch schon bei niedriger Temperatur gegen Protonen ausgetauscht, während Metallionen aus kinetisch stabilen Komplexen langsam und erst bei höherer Temperatur freigesetzt werden. Die Menge der zugesetzten Säure muss so bemessen sein, dass im gesamten Extraktionsgemisch ein pH von 0,2 bis 0,5 gewährleistet ist. Höhere Säurekonzentrationen sollten vermieden werden, da diese zu unerwünschten Spaltungen von Matrixbausteinen führen können. Auch aus Gründen möglicher Kontaminationen durch die Säure ist die kleinste notwendige Säurezugabe anzustreben. Im genannten pH-Bereich werden Metallionen auch aus sehr stabilen Komplexverbindungen freigesetzt. Besteht die Möglichkeit, dass sich während der Lagerung des Analysenguts durch Zersetzung der Matrix schwerlösliche Sulfide gebildet haben, so muss zur Extraktion von Metallionen mit einem Löslichkeitsprodukt der Sulfide $< 10^{-33}$ der Säure ein Oxidationsmittel – vorzugsweise H_2O_2 – zugesetzt werden.

Die zur Extraktion verwendete Mineralsäure sollte folgende Eigenschaften aufweisen: im angewendeten Konzentrationsbereich die organischen Bestandteile der Matrix nicht oxidieren, mit der Matrix bzw. deren Bruchstücke keine hydrophilen Substitutionsprodukte bilden, mit matrixinherenten Mengen- und Spurenelementen unter Extraktionsbedingungen keine schwerlöslichen oder we-

nig dissoziierten Verbindungen oder anionischen Komplexe ausbilden. Letztere könnten an kationischen Gruppen der Matrix als Gegenionen gebunden werden und so zu Verlusten führen. Ausserdem darf die Säure das nachfolgende Bestimmungsverfahren nicht stören.

Vergleichende Untersuchungen mit HCl , H_2SO_4 , HNO_3 und HClO_4 zeigten, dass HClO_4 diese Anforderungen am besten erfüllt. Die meisten Metallperchlorate sind leichtlöslich. Eventuelle Ausfällungen von KClO_4 oder NH_4ClO_4 lassen sich bereits durch geringe Verdünnung wieder in Lösung bringen. Im anzuwendenden Konzentrationsbereich wirkt Perchlorsäure nicht oxidierend. Es werden keine anionischen Komplexe gebildet. Eine Gefährdung durch Explosionen ist ausgeschlossen. Besondere Vorteile bietet Perchlorsäure bei der Extraktion eiweisshaltiger Materialien, da sie auf Eiweiss stark koagulierend wirkt und so die anschliessende Abtrennung und Reinigung der Extraktionslösung erleichtert. Voltammetrische Untersuchungen von Extraktionslösungen verschiedenartiger biologischer Materialien zeigten, dass bei Verwendung von Perchlorsäure die geringsten Störungen erhalten werden. Ein weiterer die Qualität der Extraktion beeinflussender Faktor ist das Verhältnis von Probengrösse zum Volumen der Extraktionslösung. Untersuchungen unterschiedlichster biologischer Matrizen zeigten, dass das Volumen der nach der Zentrifugation überstehenden Lösung ca. das 5fache des Bodenkörpers betragen sollte. Wird ein kleineres Verhältnis Lösungsüberstand/Bodenkörper gewählt, so besteht bei Proben mit hohen Gehalten an Mineralstoffen bzw. ionischen Verbindungen die Gefahr der Ausbildung von Ionenpaaren, welche bei der anschliessenden adsorptiven Reinigung ebenfalls adsorbiert werden und so zu Verlusten an zu bestimmenden Elementen führen könnten. Bei der Ermittlung des Volumens und der Konzentration der zu verwendenden Säure muss neben der eingesetzten Masse und dem Gesamtbasengehalt der zu untersuchenden Probe auch deren Wassergehalt berücksichtigt werden.

Die adsorptive Reinigung der Extraktionslösung (4)

Bei der sauren Extraktion biologischen Materials gehen aus der Matrix nicht nur Mineralstoffe und Spurenelemente in Lösung, sondern, wie schon erwähnt, auch verschiedene lösliche organische Bestandteile, besonders wenn die Extraktion unter eher drastischen Bedingungen (hohe Temperatur, oxidierendes Milieu, lange Extraktionszeit) erfolgen musste. Diese gelösten Stoffe können das nachfolgende Bestimmungsverfahren stören. Solche Störungen sind besonders bei voltammetrischen Messungen zu beobachten. Werden derartige Stoffe an der Arbeitselektrode im angewendeten Potentialbereich oxidiert oder reduziert, so ergeben sich zusätzliche Stromsignale, wodurch die Auswertung der interessierenden Signale erschwert oder sogar verunmöglicht werden kann. Können diese Stoffe an der Arbeitselektrode adsorbiert werden, so bewirken sie einen Verlust an Empfindlichkeit oder im Extremfall den Abfall des Quecksilbertropfens.

Untersuchungen zeigten, dass viele derartige Stoffe in saurem, wässrigem Milieu an unpolare makroretikuläre Harze gebunden werden, während Metallionen unter diesen Bedingungen in Lösung bleiben. Untersucht wurden folgende Harze unterschiedlicher Zusammensetzung, in verschiedenen Vernetzungsgraden: Polystyrole, Polyamide und Polyacryle.

Polyacryle ergaben meist unbefriedigende Resultate. Polyamide binden bevorzugt grenzflächenaktive Substanzen. Polystyrole mittleren Vernetzungsgrades (4% Dvbz) zeigten gute Adsorptionseigenschaften für die meisten aus biologischen Matrizen extrahierten, die voltammetrische Bestimmung störenden Substanzen. Die besten Reinigungseffekte wurden mit einer Mischung aus Polyamid (MN-Polyamid-DC 6) und Polystyrol (Amberlite XAD 4 [7]) (2 : 3 g/g) mit einer Korngrösse von 0,05–0,1 mm erhalten.

Diese Adsorbentien können vom Herstellungsprozess und von der meist notwendigen Zerkleinerung mit verschiedenen Metallen erheblich kontaminiert sein und müssen daher vorgängig sorgfältig gereinigt werden. Dies erfolgt am besten mit der gleichen Säure – jedoch höherer Konzentration –, wie sie für die «saure Extraktion» verwendet wird. Die Adsorbentien werden hierzu während längerer Zeit (1–2 Tage) mit der Säure (z. B. 3 m HClO_4) bei Raumtemperatur ausgelaugt, wobei auf vollständige Benetzung zu achten ist. Die Adsorbentien besitzen gemäss ihrer Struktur eine sehr grosse innere Oberfläche, welche in trockenem Zustand mit Luft besetzt und daher nur schwer benetzbar ist. Für eine wirksame Reinigung werden sie in der Säure aufgeschlämmt, und durch mehrmaliges Evakuieren (Wasserstrahlvakuum) und Dilatieren wird für eine möglichst vollständige Benetzung der inneren Oberfläche gesorgt (erkennbar am Absinken der Adsorbentien in der Flüssigkeit). Die Säure wird über eine Nutsche abgesaugt und die Adsorbentien zuerst zur Entfernung niedermolekularer organischer Verunreinigungen mit reinstem Methanol (ca. doppeltes Volumen der Adsorbentien), anschliessend mit Reinstwasser neutral gewaschen. Sie werden in feuchtem Zustand aufbewahrt.

Die Reinigung der «sauren Extraktionslösungen» erfolgt mit Vorteil durch Filtration über kleine Säulen des Adsorbentengemischs. Die Grösse der Adsorptionssäule muss der Art und Masse der zu untersuchenden Matrix angepasst werden und ist so zu wählen, dass die zu entfernenden, gelösten organischen Bestandteile nie bis ins untere Drittel der Säule gelangen können, was sich meist anhand einer schwachen Verfärbung des Säulenmaterials erkennen lässt. Das Verhältnis Säulenlänge/Durchmesser muss immer > 4 sein. Die Masse des Adsorbens sollte nicht grösser als notwendig gewählt werden, um das zur vollständigen Elution der interessierenden Metallionen benötigte Elutionsvolumen wie auch den Zeitbedarf klein zu halten. In erster Näherung kann die Masse Adsorbens aus dem Gehalt des zu filtrierenden Probenaliquots an löslichen organischen Verbindungen abgeschätzt werden; sie sollte mindestens das 20fache betragen.

Solche Säulen lassen sich einfach aus käuflichen Einwegspitzen sog. Pipettoren (5–10 ml Fassungsvermögen) aus Polyethylen bzw. Polypropylen herstellen, indem man in deren spitzen Auslauf Teflonwolle als Filter einpresst, danach eine gut durchmischte Aufschlämmung des Adsorbens in 1 m HClO_4 (Reagenzienmi-

scher) einfüllt und anschliessend die Flüssigkeit mit schwachem Gasdruck (gereinigte Luft oder Stickstoff) möglichst vollständig ausbläst. Einwegspitzen und Teflonwolle müssen durch längeres Einlegen in 2 m HNO₃ (mehrere Tage) und gründliches Nachspülen mit Reinstwasser gereinigt werden. Die Säulen sollten jeweils erst kurz vor Gebrauch hergestellt werden, um ein Austrocknen des Adsorbens zu vermeiden (siehe oben). In den meisten Fällen ist eine Mischung aus 0,3 g XAD-4 und 0,2 g MN-Polyamid-DC 6 ausreichend.

Extraktionsgemische ohne bzw. mit wenig Feststoffanteil (< 5%) werden direkt auf die Säule gegeben. Enthält das Extraktionsgemisch grössere Mengen Feststoffe, so werden diese mit Vorteil durch Zentrifugieren (ca. 3000 UPM) sedimentiert und ein Aliquot des Überstands über die Säule filtriert. Die Filtration erfolgt unter schwachem Gasdruck, wobei die Filtrationsgeschwindigkeit < 2 ml/min sein sollte. Die Lösung wird danach möglichst vollständig aus der Säule geblasen. Zur vollständigen Elution der Metallionen wird die Säule mehrmals mit 0,1 m HClO₄ höchster Reinheit nachgewaschen. Untersuchungen zeigten, dass in den meisten Fällen 3maliges Nachwaschen ausreicht, wenn das jeweilige Volumen der Waschlösung ca. gleich gross wie das Volumen des Adsorbens gewählt und jede Waschung ausgeblasen wird. Nachdem die gereinigten Lösungen auf ein definiertes Volumen gebracht wurden, sind sie für die Messung bereit. Erfolgte die Filtration in ein trockenes, tariertes Gefäss, kann das Volumen des Filtrats durch einfache Wägung bestimmt werden ($d \approx 1$), wodurch eine weitere Verdünnung vermieden wird.

Für voltammetrische Messungen wird direkt ins Polarographiergefäss filtriert. Da die Kalibrierung normalerweise via Standardadditionsverfahren erfolgt, muss für die Berechnung nur das Volumen des filtrierten Aliquots der Extraktionslösung bekannt sein.

Zur Berechnung des Analysenresultats muss in Gegenwart von Feststoffen der ursprüngliche Wassergehalt der untersuchten Probe berücksichtigt werden. Bei voltammetrischen Bestimmungen, für welche meist ein oder mehrere Milliliter der Extraktionslösung eingesetzt werden, kann diese Korrektur anhand des bestimmten oder aus Tabellen ermittelten Trockengewichts des spezifischen biologischen Materials nach folgender Gleichung vorgenommen werden.

$$\text{ppb} = \frac{\text{ng}_A \left[\text{ml}_{HX} + \frac{100 - \%TS}{100} E \right]}{\text{ml}_A \cdot E}$$

- ng_A = ng gefunden im Probenaliquot
- ml_{H_2} = Volumen der zugesetzten Säure
- $\%TS$ = % Trockengewicht des Analysenguts
- ml_A = Volumen des Probenaliquots
- E = Einwaage des Analysenguts in g

Bei Materialien mit hohem Gehalt an leichtlöslichen aber unter Trocknungsbedingungen schwerflüchtigen Verbindungen, z. B. Mineralstoffe oder Zucker,

würden bei dieser Berechnungsart zu niedrige Werte erhalten werden. In diesen Fällen muss das Trockengewicht entweder mit Hilfe von Kenntnissen dieser Matrixbestandteile korrigiert oder aber die effektive Trockenmasse des Zentrifugats bestimmt werden. Da sich das beschriebene Verfahren besonders für Bestimmungen grösserer Serien eignet, ist dieser Nachteil nicht gravierend. Dieser aus dem Gehalt an Trockensubstanz resultierende Fehler nimmt mit zunehmendem Verhältnis Extraktionsvolumen/Bodenkörper ab.

Adsorptive Voranreicherung mit Hilfe von Komplexbildnern

Sind Metallionen in sehr niedrigem Konzentrationsbereich (unterer ppb-Bereich) in homogenen Lösungen bzw. Suspensionen mit wenig fein verteilten Feststoffen zu bestimmen, bei welchen unter Anwendung des vorher beschriebenen Verfahrens die Erfassungsgrenze der Bestimmungsmethode, bedingt durch die Verdünnung, unterschritten würde, oder enthalten die Lösungen die Bestimmung störende Stoffe, welche durch die vorher beschriebene adsorptive Reinigung nicht entfernt werden, so kann durch Verwendung geeigneter, an makroretikularen Harzen stark adsorbierender Komplexbildner eine Anreicherung von Metallionen bzw. bessere Entfernung störender Substanzen erzielt werden.

Das Verfahren beruht darauf, dass die durch «saure Hydrolyse» aus ihren ursprünglichen Bindungen in der Matrix freigesetzten Metallionen zunächst an einen in grossem Überschuss zugesetzten Komplexbildner bei geeignetem pH gebunden werden. Dann wird die Lösung inkl. des eventuell gebildeten Niederschlages über eine Adsorptionssäule (s. vorher) filtriert und sorgfältig nachgewaschen. Filtrat und Waschlösung werden verworfen. Die komplexierten Metallionen befinden sich nun auf der Adsorptionssäule und können mit kleinen Volumina Säure geeigneter Konzentration aus den Komplexen freigesetzt und aus der Säule eluiert werden, wobei der Ligand auf dieser adsorbiert bleiben sollte.

Der Komplexbildner sollte mit möglichst vielen zu bestimmenden Metallionen ausreichend stabile, schwerlösliche oder sehr hydrophobe Komplexe bilden und der freie Ligand am Harz stark adsorbiert werden. Ausserdem muss er in hoher Reinheit erhältlich oder leicht zu reinigen sein. Bei der Freisetzung der Metallionen aus dem Komplex durch Säure dürfen keine nichtadsorbierbaren, die Bestimmung störenden Produkte entstehen.

5,7-Dibrom-8-Hydroxychinolin (Dibromoxin) (8) erfüllt diese Anforderungen weitgehend, da es mit einer grossen Zahl von Metallionen sowohl sehr stabile als auch schwerlösliche Komplexe bildet, selbst aber an Polystyrol stark adsorbiert wird.

Das Verfahren ist einfach. In einem verschliessbaren Zentrifugengefäss geeigneter Grösse (PE) wird die zu analysierende saure, wässrige Lösung mit einem Überschuss einer warm (30 °C) gesättigten Lösung von Dibromoxin in Aceton versetzt und mit einem geeigneten Puffer (z. B. $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$) auf pH ca. 9 eingestellt. Der benötigte Überschuss an Dibromoxin lässt sich näherungsweise aus

den zu erwartenden Gehalten an Zink und Eisen abschätzen, da von den stabile Komplexe bildenden Elementen diese in den meisten biologischen Materialien die höchsten Konzentrationen aufweisen. Der Überschuss sollte ca. 100% der für Zink und Eisen benötigten Menge betragen. Es bildet sich sofort ein deutlicher Niederschlag, bestehend aus in Wasser schwerlöslichem Dibromoxin, verschiedenen Metalloxinaten wie auch – je nach Zusammensetzung der Matrix – Erdalkaliphosphaten. Zur vollständigen Ausbildung der Komplexe wird die Lösung auf ca. 60 °C erwärmt. Die hohe Stabilität vieler Komplexe des Dibromoxins sowie der grosse Überschuss an Ligand gewährleisten eine praktisch vollständige Ausbildung der Komplexe. Die Komplexe der in biologischen Materialien häufig in relativ hohen Konzentrationen vorliegenden Erdalkaliionen sind wesentlich instabiler als die der anderen Metallionen, so dass ihre Konkurrenzreaktion vernachlässigbar ist. Die kompetitive Wirkung eventuell in der Lösung anwesender anderer Liganden wird durch den Überschuss an Dibromoxin und der grossen Stabilität der Bromoxinate weitgehend ausgeschaltet.

Ein sich bildender Niederschlag z. B. von Erdalkaliphosphaten ist insofern von Vorteil, als mit diesem die Chelate der vergleichsweise nur in geringen Konzentrationen vorliegenden anderen Metallionen copräzipitiert werden, was die Filtration über die Adsorptionssäule erleichtert. Vor der Filtration wird der Niederschlag mit Vorteil zentrifugiert (ca. 3000 UPM), die überstehende Lösung über eine Adsorptionssäule aus XAD-4/Polyamid mit schwachem Gasdruck filtriert und das Filtrat verworfen. Der Niederschlag im Zentrifugengefäss wird mehrmals mit kleinen Volumenteilen Ethanol, 0,1 m NH_3 und evtl. mit Reinstwasser gewaschen, die Waschlösungen ebenfalls über die Säule filtriert und die Filtrate verworfen. In basischem Milieu werden verschiedene lösliche organische Bestandteile der Matrix nicht adsorbiert und somit eliminiert, z. B. Fettsäuren.

Danach wird der Niederschlag im Zentrifugengefäss mit wenig 1 m HClO_4 versetzt und auf ca. 60 °C erwärmt, wodurch die Metallionen aus den Komplexen freigesetzt werden (Ausnahme Fe^{3+} und VO^{2+}), während der freie Ligand in schwerlöslicher Form verbleibt. Eventuell vorhandene Erdalkaliphosphate werden ebenfalls gelöst, so dass Verluste durch Okklusionen ausgeschlossen werden können. Die warme Lösung wird über die Adsorptionssäule (siehe oben) filtriert, sodann das Zentrifugiergefäss mehrmals mit 0,1 m HClO_4 (ca. Volumen der Adsorptionssäule) gespült und die Spüllösungen jeweils über die Säule filtriert, wobei nach jeder Filtration die Flüssigkeit möglichst vollständig ausgeblasen wird.

Die so erhaltenen mineralsauren Lösungen sind weitgehend von störenden organischen Begleitsubstanzen befreit und gestatten störungsfreie voltammetrische Bestimmungen bei hoher Messempfindlichkeit. Je nach Analysengut lassen sich Anreicherungen um Faktoren 5 bis 50 erzielen.

Diese Art der Probenvorbereitung ist mit Vorteil auch dann anzuwenden, wenn die Lösung der «sauren Extraktion» Störsubstanzen enthält, welche an makroretikularen Harzen nicht adsorbieren.

Beurteilung der beiden Aufbereitungsverfahren

In beiden Verfahren ist der Reagensverbrauch, vielfach determinierend für die Bestimmungsgrenze, verglichen mit einer vollständigen nassen Mineralisierung der biologischen Matrix um einen Faktor 5 bis 10 vermindert. Die benötigten Reagenzien sind in hoher Reinheit erhältlich oder können einfach gereinigt werden. Es werden keine speziellen Apparaturen benötigt. Der Arbeits- und Zeitaufwand ist gering. Diese Art der Probenvorbereitung ist für grössere Messserien und für Routineuntersuchungen besonders geeignet. Infolge des geringen Platzbedarfs für die benötigten Geräte und der niedrigen anzuwendenden Temperaturen eignet sich dieses Verfahren auch für die Durchführung der Probenvorbereitung in sog. «Laminar-Flow Workstations», wodurch die Gefahr möglicher Kontaminationen aus der Luft vermindert wird.

Vergleichende Untersuchungen verschiedener biologischer Matrizen wie Harn, Milch, Kopfsalat und Fleisch ergaben für die besonders häufig zu bestimmenden Metallionen Zn, Cd und Pb eine gute Übereinstimmung mit Werten aus «nassen Mineralisierungen». Die Standardabweichungen innerhalb einer Messserie der gleichen Matrix sind im allgemeinen kleiner als bei nassen Mineralisierungen. Die Wiederfindungen bei «gespikten» Proben war immer besser als 95%. Bei Bestimmungen von Cd wurden nach diesen Verfahren durchwegs etwas höhere Werte als nach nasser Mineralisierung erhalten, was auf geringe Verluste bei der Mineralisierung zurückzuführen ist.

Die «saure Extraktion» mit anschliessender «adsorptiver Reinigung» ist für voltammetrische Verfahren mit adsorptiver Voranreicherung der zu bestimmenden Spezies an der Elektrode (z. B. Ni, Al, Fe, Mo) nicht geeignet, da hier bereits kleinste Spuren grenzflächenaktiver Substanzen stark stören. Erfolgt die Reinigung der Extraktionslösung jedoch durch «adsorptive Voranreicherung mit Komplexbildnern», so können diese Störungen durch geeignetes Waschen des Adsorbats beseitigt werden.

Experimentelles

Bestimmung von Cd und Pb in Kopfsalat

Unter fliessendem Leitungswasser gereinigter Kopfsalat wird kurz in deionisiertem Wasser geschwenkt und das anhaftende Wasser durch Schleudern entfernt. Der gereinigte Kopfsalat wird in einem Mixer solange homogenisiert, bis keine Textur mehr erkennbar ist. Ca. 2 g des Homogenats werden in eine verschliessbare PE-Zentrifugentube eingewogen (darauf achten, dass das Verhältnis Flüssigkeit/Feststoff nicht verändert wird), mit 8 ml 0,6 m HClO_4 versetzt, gut durchmischt (Reagenzienmischer) und während 2 h auf 40 °C unter zwischenzeitlichem Durchmischen (alle 15 min) erwärmt. Danach wird zentrifugiert und der Überstand direkt über eine Adsorptionssäule ins Polarographiergefäss filtriert.

Der Rückstand wird 2mal mit 2 ml und 1mal mit 1 ml 0,6 m HClO_4 gut gemischt, zentrifugiert und die Lösungen jeweils ebenfalls über die Säule ins Polarographiegefäß filtriert. Nach Zusatz von 2 ml 2 m Acetatpuffer ($\text{HOAc}/\text{NH}_4\text{OAc}$ pH = 4,76) und Einstellung des pH-Wertes auf pH 3–4 mit 12,5% NH_3 werden Cd und Pb inversvoltammetrisch bestimmt.

Die Richtigkeit dieser Probenvorbereitung wurde durch Vergleich mit Resultaten aus nasser Mineralisierung überprüft.

Extraktion und Filtration	Mineralisierung
($n = 6$)	($n = 5$)
53,0 $\pm$ 2,3 ng Cd/g FG	53,0 $\pm$ 4,0 ng Cd/g FG
30,0 $\pm$ 2,0 ng Pb/g FG	29,0 $\pm$ 3,0 ng Pb/g FG

Bestimmung von Cd, Cu, Pb und Zn in Klärschlamm
(zertifiziertes, homogenisiertes Material, BCR Nr. 146)

100 mg getrockneter Klärschlamm werden in eine verschliessbare 20-ml-PE-Zentrifugentube eingewogen, mit 2 ml H_2O reinst aufgeschlämmt, 150 μl HClO_4 konz. Suprapur und 500 μl H_2O_2 p. A. (30%) zugefügt und während 2 h im Wasserbad auf 85 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Aufschlammung über eine Adsorptionssäule in einen 25-ml-Messkolben filtriert und zunächst 5mal mit 2 ml 1 m HClO_4 , dann 5mal mit 2 ml 0,1 m HClO_4 nachgewaschen und mit Reinstwasser zur Marke aufgefüllt. 4 ml der so erhaltenen Lösung werden für die inversvoltammetrische Bestimmung verwendet.

Sollwerte Referenzmaterial	gefundene Werte	% d. Sollwerts
Cd ($n = 9$) 77,7 $\pm$ 2,6 $\mu\text{g/g}$	72,9 $\pm$ 1,94 $\mu\text{g/g}$	93,8
Pb ($n = 9$) 1270,0 $\pm$ 28 $\mu\text{g/g}$	1223,0 $\pm$ 64,7 $\mu\text{g/g}$	96,3
Cu ($n = 6$) 934,0 $\pm$ 24 $\mu\text{g/g}$	886,6 $\pm$ 27,5 $\mu\text{g/g}$	94,9
Zn ($n = 8$) 4059,0 $\pm$ 90 $\mu\text{g/g}$	4149,2 $\pm$ 248 $\mu\text{g/g}$	102,2

Bestimmung von Cd und Pb in Tomatensaft

5 ml Tomatensaft werden in einer verschliessbaren 20-ml-PE-Zentrifugentube mit 3 ml 1 m HClO_4 gut vermischt (Reagenzienmischer) und während 15 min auf 70 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird zentrifugiert (3 min ca. 3000 UPM) und 4 ml des Überstands über eine mit 1 ml 1 m HClO_4 gespülte Adsorptionssäule direkt in das Polarographiegefäß filtriert und ausgeblasen. Die Säule wird 3mal mit 1 ml 0,1 m HClO_4 nachgewaschen (jeweils ausblasen). Nach Zusatz von 2 ml 2 m Acetatpuffer ($\text{HOAc}/\text{NH}_4\text{OAc}$ pH = 4,76) werden Cd und Pb inversvoltammetrisch bestimmt.

Resultate

Tomatensaft: ($n = 7$)	$6,9 \pm 1,3$ ng Cd/ml	$43,0 \pm 2,8$ ng Pb/ml
Tomatensaft: + 22,5 ng Cd/ml + 41,4 ng Pb/ml ($n = 7$)	$30,9 \pm 2,2$ ng Cd/ml	$85,6 \pm 1,8$ ng Pb/ml
Wiederfindung:	24,0 ng Cd = 106,7%	42,6 ng Pb = 102,9%

Bestimmung von Cd und Pb in Milch

2,5 ml Vollmilch werden in eine verschliessbare 20-ml-PE-Zentrifugentube einpipettiert, mit 2,5 ml Reinstwasser verdünnt und mit 250 μ l HClO₄ (60%) Suprapur versetzt. Nach gutem Durchmischen (Reagenzienmischer) wird während 20 min auf 80 °C erwärmt, wobei nach 7 und 14 min nochmals gut durchmischt wird. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wird zentrifugiert (3 min ca. 3000 UPM) und der Überstand über eine mit 1 ml 1 m HClO₄ gewaschene Adsorptionssäule direkt in das Polarographiergefäss filtriert und ausgeblasen. Der Rückstand wird 3mal mit 1 ml 0,1 m HClO₄ gut aufgeschüttelt, zentrifugiert und die Lösung über die Säule ebenfalls in das Polarographiergefäss filtriert und ausgeblasen. Nach Zusatz von 2 ml 2 m Acetatpuffer (HOAc/NH₄OAc pH = 4,76) werden Cd und Pb inversvoltammetrisch bestimmt.

Resultate

Vollmilch ($n = 4$):	$1,0 \pm 0,3$ ng Cd/ml	$17,5 \pm 2,4$ ng Pb/ml
Vollmilch ($n = 6$): + 45,0 ng Cd/ml + 82,9 ng Pb/ml	$46,1 \pm 2,9$ ng Cd/ml	$101,6 \pm 8,0$ ng Pb/ml
Wiederfindung:	45,1 ng Cd = 100,3%	84,1 ng Pb = 101,4%

Bestimmung von Cd und Pb in Harn

Zur Lagerung war der Harn mit 1 ml 100% Essigsäure/100 ml Harn versetzt. 5 ml Harn werden in einer verschliessbaren PE-Zentrifugentube mit 200 μ l 12,5% NH₃ und 1 ml einer bei 30 °C gesättigten Lösung von 5,7-Dibrom-8-Hydroxychinolin in Aceton versetzt, gut durchgemischt (Reagenzienmischer) und während 20 min auf 65 °C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der gebildete Niederschlag zentrifugiert (3 min ca. 3000 UPM) und der Überstand über eine vorgängig mit 2 m NH₃ gespülte Adsorptionssäule filtriert. Der Bodenkörper wird unter jeweiligem kräftigem Durchmischen und Zentrifugieren 2mal mit 1 ml 0,1 m NH₃ in Alkohol und 2mal mit 1 ml 0,1 m NH₃ in H₂O gewaschen und die Waschlösungen ebenfalls über die Adsorptionssäule filtriert. Die Filtrate der Fällungs- und Waschlösungen werden verworfen. Der Bodenkörper in der PE-Zentri-

fugentube wird 2mal mit 1 ml 1 m HClO_4 und 2mal mit 1 ml 0,1 m HClO_4 versetzt (jeweils während 5 min auf 65 °C erwärmen), gut durchmischt und die Lösungen über die Adsorptionssäule direkt in das Polarographiergefäß filtriert. Nach Zusatz von 2 ml 2 m Acetatpuffer ($\text{HOAc}/\text{NH}_4\text{OAc}$ pH = 4,76) werden Pb und Cd inversvoltammetrisch bestimmt.

Resultate

Harn ($n = 7$):	0,9 $\pm$ 0,2 ng Cd/ml	9,7 $\pm$ 0,6 ng Pb/ml
Harn ($n = 7$):	13,0 $\pm$ 0,9 ng Cd/ml	51,0 $\pm$ 3,7 ng Pb/ml
+ 11,2 ng Cd/ml		
+ 41,7 ng Pb/ml		
Wiederfindung:	12,1 ng Cd = 108,0%	41,3 ng Pb = 99,8%

Bestimmung von Pb und Cd in Geflügelleber

2 g fein homogenisierte Leber werden in eine PE-Zentrifugentube mit Schraubdeckel eingewogen, mit 3 ml 2 m HClO_4 und 200 μl H_2O_2 30% versetzt und während 30 min bei Raumtemperatur reagieren gelassen. Danach werden 2,8 ml Reinstwasser zugesetzt, mit Hilfe eines Reagenzienmischers kräftig durchgemischt und anschliessend zentrifugiert (3 min 3000 UPM). 2 ml der überstehenden Lösung werden mit 300 μl 12,5% NH_3 versetzt und während ca. 30 min auf 60 °C erhitzt, bis keine Gasentwicklung mehr zu beobachten ist. Danach wird 1 ml einer bei 30 °C gesättigten Lösung von 5,7-Dibromoxin in Aceton zugefügt, kräftig durchmischt (Reagenzienmischer) und während 30 min auf 60 °C erwärmt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird der entstandene Niederschlag abzentrifugiert und der Lösungsüberstand über eine mit 1 ml 2 m NH_3 gespülte Adsorptionssäule filtriert. Das Zentrifugat wird darauf 2mal mit 1,5 ml reinstem Ethanol und 2mal mit 1 ml 0,1 m NH_3 unter gutem Durchmischen und jeweiligem Zentrifugieren gewaschen und die Waschlösungen ebenfalls über die Säule filtriert. Die Filtrate der Fällungs- und Waschlösungen werden verworfen. Der Rückstand wird 2mal mit 1 ml 1 m und 2mal mit 1 ml 0,1 m HClO_4 versetzt, auf 60 °C erwärmt und die Lösungen jeweils über die Säule direkt in das Polarographiergefäß filtriert. Nach Zusatz von 2 ml 2 m Acetatpuffer ($\text{HOAc}/\text{NH}_4\text{OAc}$ pH = 4,76) werden Cd und Pb inversvoltammetrisch bestimmt.

Resultate

Geflügelleber:	20,3 $\pm$ 2,2 ng Cd/g	26,4 $\pm$ 5,0 ng Pb/g
($n = 10$)		
Geflügelleber:	80,4 $\pm$ 5,2 ng Cd/g	133,0 $\pm$ 9,9 ng Pb/g
+ 56,2 ng Cd/g		
+ 103,6 ng Pb/g		
($n = 8$)		
Wiederfindung:	60,1 ng Cd/g = 106,9%	106,6 ng Pb/g = 102,9%

Zusammenfassung

Es werden zwei einfache, kostengünstige und wenig zeitaufwendige Verfahren zur Probenaufbereitung von biologischem Material für die Bestimmung von kationischen Mengen- und Spurenelementen beschrieben. Zunächst werden die Metallionen mit Säure aus ihren Bindungen in der biologischen Matrix herausgelöst. Die so erhaltenen Extrakte werden entweder durch direkte Filtration über makroretikuläre Harze oder nach Komplexierung der Metallionen mit einem geeigneten Liganden von den die Bestimmung störenden Substanzen gereinigt. Die Verfahren wurden auf unterschiedliche biologische Matrizen wie Harn, Milch, Salat, Fleisch besonders zur Bestimmung von Cd und Pb angewendet. Die Reproduzierbarkeit und die Wiederfindungsraten bei «gespikten» Proben wurden eingehend untersucht. Vergleichende Untersuchungen mit Probenaufbereitungen durch «nasse Mineralisierungen» zeigten deutliche Vorteile der neuen Verfahren.

Résumé

Deux méthodes simples, économiques et permettant de gagner du temps pour la préparation des échantillons de matériaux biologiques en vue de la détermination des cations, des éléments traces et des oligo-éléments sont décrites. D'abord, les ions métalliques sont extraits par un acide de leurs liaisons dans la matrice biologique. Ces extraits sont purifiés des substances qui gênent les déterminations, soit par filtration directe sur des résines macroréticulaires, soit après une complexation des ions métalliques avec une substance adéquate. Les méthodes ont été appliquées à différentes matrices biologiques, comme l'urine, le lait, la salade et la viande, spécialement pour la détermination du Cd et du Pb. La reproductibilité et la quote retrouvée dans des échantillons avec des ajouts ont été contrôlées. Des analyses comparatives avec des échantillons minéralisés par «voie humide» ont mis en évidence les avantages des méthodes décrites.

Summary

Two simple, inexpensive, and little time consuming methods for the sample preparation of biological materials for the determination of cationic abundant and trace elements are described. First, the metal ions are extracted by acid from their binding sites within the biological material. The obtained extracts are purified from substances possibly disturbing the determination either by direct filtration over macroreticular resins or after complexation of the metal ions with a suitable ligand. The methods have been applied to different biological materials like urine, milk, salad and meat, above all for the determination of Cd and Pb. The reproducibility and the quote of recovery in spiked samples have been thoroughly examined. Comparative investigations with samples prepared by «wet mineralisation» made evident the advantages of the described methods.

Literatur

1. Seiler, H.: Probenvorbereitung und Mineralisation. In: Symposium Anorganische Stoffe in der Toxikologie und Kriminalistik der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie, S. 39–45. Verlag Dr. D. Helm, Heppenheim 1983.

2. *Seiler, H. and Schaller, K. H.*: Digestion procedures for the determination of metals in biological material. In: J. Angerer and K. H. Schaller (eds.), *Analyses of hazardous substances in biological materials*, Vol. 2, pp. 1–30. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim 1988.
3. *Tölg, G.*: Bedeutung, Zuverlässigkeit und Wirtschaftlichkeit der Spurenanalytik der Elemente. In: *Symposium Anorganische Stoffe in der Toxikologie und Kriminalistik der Gesellschaft für toxikologische und forensische Chemie*, S. 109–141. Verlag Dr. D. Helm, Heppenheim 1983.
4. *Hohl, Ch.*: Verwendung von makroretikularen Harzen zur Probenvorbereitung biologischen Materials in der Spurenelementanalytik. Dissertation Basel 1986.
5. *Watson, C.*: Sample preparation for the analysis of heavy metals in food. *Trends in Anal. Chem.* 3, 25–28 (1984).
6. *Hinners, T. A.*: Atomic absorption analysis of liver without ashing. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 277, 377–378 (1975).
7. *Blasius, E.*: Chromatographische Methoden in der analytischen und präparativen anorganischen Chemie. In: G. Jander (Hrg.), *Die chemische Analyse*, Bd. 46, S. 63–70. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1958.
8. *Berg, R.*: Die analytische Verwendung von o-Oxychinolin und seiner Derivate. In: W. Böttger (Hrg.), *Die chemische Analyse*, Bd. 34, S. 105–109. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1938.

Dr. Ch. Hohl
 Marianne Seiler
 PD Dr. H. G. Seiler
 Institut für Anorganische Chemie
 Universität Basel
 Spitalstrasse 51
 CH-4056 Basel