

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 528476 001

Bepaling van cadmium in levers en nieren
van humane herkomst met behulp van atomaire-
absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

K.L. Wubs en G. de Groot

augustus 1988

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de Geneeskundige Hoofdinspectie van de Volksgezondheid in het kader van projecten 528474 (voorheen 842135) en 528476 (voorheen 842137); opdrachtbrieven 137017 d.d. 12 oktober 1984 en 138575 d.d. 16 november 1984.

Verzendlijst

1-5	Geneeskundige Hoofdinspectie
6	Secretaris-Generaal van het Ministerie van WVC
7	Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
8	Plv. Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, tevens Hoofddirecteur Financiering en Planning
9	Hoofddirecteur van de Gezondheidsbescherming
10	Hoofddirecteur van de Gezondheidszorg
11	Directie RIVM
12	Drs.C.A. van der Heijden, Prof.Dr.B. Sangster
13	Dr.R.W. Stephany
14	Prof.Dr.F. de Waard
15	Prof.Dr.Ir.D Kromhout
16	Dr.H.A. van 't Klooster
17	Drs.E.I. Krajnc
18	Drs.I.A. Kreis
19	Dr.T.J.F. Savelkoul
20-21	Auteurs
22	Dr.G. Ellen, Ir.H.P. van Egmond, Dr.L.A. van Ginkel, Dr.R.C. Schothorst
23-24	Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
25-36	Reserve

INHOUDSOPGAVE

Summary and Conclusions	iii
Samenvatting en Conclusies	iv
1. Inleiding	1
2. Materialen en Methoden	2
3. Resultaten	3
4. Discussie	6
5. Referenties	10
Bijlage I	12

National Institute of Public Health and Environmental Protection

RIVM report: 528476 001

August 1988

Determination of cadmium in human livers and kidneys with atomic absorption spectroscopy and flame atomization.

Wubs, K.L. and Groot, G. de

Summary and Conclusions

In this report a method is described for the determination of cadmium in human livers and kidneys with atomic absorption spectroscopy and flame atomization. The tissue samples are digested by an enzymic digestion procedure under physiological conditions, followed by destruction at elevated temperature with subsequently hydrogen peroxide and nitric acid.

The upper limit of the linear working range corresponds for liver with 13 mg Cd/kg and for kidney with 46 mg Cd/kg using 0.5 g of tissue. The limit of detection (at 3 x the noise) is for liver 0.3 mg Cd/kg and for kidney 1.2 mg Cd/kg. The linear working range is for liver 0.3 - 13 mg Cd/kg and for kidney 1.2 - 46 mg Cd/kg.

The average relative standard errors (\pm standard deviation) calculated from 10 calibration curves are for livers $(2.1 \pm 1.5)\%$ at a concentration of 0.8 mg Cd/kg and for kidneys $(0.96 \pm 0.50)\%$ at a concentration of 2.5 mg Cd/kg. The average values of the coefficients of variation of duplicate analyses are for livers $(7.6 \pm 7.0)\%$, for kidney cortex $(9.2 \pm 8.7)\%$ and for kidney medulla $(34 \pm 28) \%$.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne

RIVM-rapport: 528476 001

augustus 1988

Bepaling van cadmium in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

Wubs, K.L. en Groot, G. de

Samenvatting en Conclusies

In dit rapport wordt een methode beschreven voor de bepaling van cadmium in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie en vlamatomisatie. De weefselmonsters worden ontleed met een enzymatische methode onder fysiologische condities, gevolgd door destructie met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur bij verhoogde temperatuur.

De bovengrens van het lineaire werkgebied komt voor lever overeen met 13 mg Cd/kg en voor nier met 46 mg Cd/kg, uitgaande van 0,5 g lever of nier. De detectielimiet (overeenkomend met 3 x de ruis) is voor lever 0,3 mg Cd/kg en voor nier 1,2 mg Cd/kg. Het lineaire werkgebied is dus voor lever 0,3 - 13 mg Cd/kg en voor nier 1,2 - 46 mg Cd/kg.

De gemiddelde relatieve standaardfouten (\pm standaarddeviatie) berekend uit 10 calibratielijnen bedragen voor levers bij een concentratie van 0,8 mg Cd/kg ($2,1 \pm 1,5$)% en voor nieren bij een concentratie van 2,5 mg Cd/kg ($0,96 \pm 0,50$)%. De gemiddelden van de variatiecoëfficiënten van tweevoudige analyses bedragen voor levers ($7,6 \pm 7,0$)%, voor nierschors ($9,2 \pm 8,7$)% en voor niermerg (34 ± 28) %.

1. Inleiding

Als gevolg van een jarenlange uitstoot van cadmium door metallurgische industriën is in een groot gebied dat de nederlandse en belgische Kempen omvat, de bodem verontreinigd met een aantal metalen waaronder zink, cadmium, lood en kwik. Naar de effecten van deze verontreiniging op de nierfunctie is een epidemiologisch onderzoek verricht in een langdurig aan cadmium blootgestelde populatie in de Kempen en in een controlepopulatie.

Parallel aan dit epidemiologisch onderzoek is in het kader van project 528476 onderzoek verricht naar de cadmiumbelasting van overleden personen die langdurig in het verontreinigde gebied in de Kempen hadden gewoond. De resultaten bij deze populatie zijn vergeleken met de resultaten verkregen bij een controlepopulatie van overledenen uit gebieden (Twente en Friesland) waar, voorzover bekend, geen verontreiniging van de bodem met cadmium of andere metalen aanwezig is. Verwant aan dit project is project 528474 waarbinnen ten behoeve van het bewakingsprogramma Mens en Voeding de belasting van de mens aan een aantal metalen wordt vastgesteld en in de tijd gevolgd door middel van de bepaling van de concentratie van deze metalen in menselijk weefsel verkregen bij obductie van overleden personen uit niet met de metalen verontreinigde gebieden. De onderzochte parameters zijn cadmium in nieren (nierschors en niermerg), cadmium in levers, kwik in nieren en lood in wervels.

Ten behoeve van bovengenoemde projecten zijn methoden ontwikkeld voor de kwantitatieve bepaling van de genoemde metalen in de betreffende weefsels. Reeds beschreven zijn:

- De bepaling van lood in wervels van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie (Wubs et al., 1988).
- De bepaling van kwik in nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met koude-damp atomisatie (Wubs en de Groot, 1988).

Dit rapport beschrijft de bepaling van cadmium in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

2. Materialen en Methoden

Cadmium wordt bepaald in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie. De nieren en levers worden gelyseerd met een enzymatische methode gevolgd door een destructie met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur. De destruatens worden vervolgens verdund met een Triton X-100 oplossing in 5 procent (g/v) salpeterzuur en de cadmiumconcentratie wordt na centrifugatie in het destruaat bepaald. De methode is in detail beschreven in Standard Operating Procedure nr. ARO/028 (bijlage I).

3. Resultaten

Met de hier beschreven enzymatische ontledingmethode wordt een lysaat verkregen waarin nog slechts zeer kleine weefselfragmenten voorkomen. Een antibiotica-oplossing wordt voorafgaande aan de incubatie toegevoegd om te voorkomen dat er tijdens de ontleding bacteriegroei optreedt. De ontwikkeling van deze enzymatische ontledingmethode is elders beschreven (De Groot en Wubs, 1987).

Om de toepasbaarheid van de enzymatische ontledingmethode bij de bepaling van cadmium in weefsels te onderzoeken werd de cadmiumconcentratie bepaald in een aantal rattenieren en vergeleken met de waarden verkregen na een klassieke natte destructie. Een drietal nieren (ca. 0,6 g) werd elk in twee helften gesneden, waarna de ene helft met behulp van bovengenoemde enzymatische methode (zie bijlage I) werd ontleed en de andere helft werd gedestruueerd met behulp van 2 ml geconcentreerd zwavelzuur, 12 ml geconcentreerd salpeterzuur en 5 ml 30% waterstofperoxide tot een volledig helder en kleurloos destruaat. In zowel het enzymatische lysaat als in het zure destruaat werd vervolgens, na het maken van een geschikte verdunning met 0,025 % Triton X-100 in water, de cadmiumconcentratie bepaald met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie (AAS) met vlamatomisatie. De cadmiumconcentratie in de nieren ontleed met de zure destructie was gemiddeld (\pm standaarddeviatie) $(13 \pm 8)\%$ hoger dan de enzymatische ontleding. Aangezien bij beide ontledingstechnieken voor de reagensblanco was gecorrigeerd, was dit verschil niet terug te voeren tot contaminatie vanuit de gebruikte materialen en/of reagentia.

Om de verdere ontsluiting van cadmium in de enzymatische lysaten te onderzoeken werd een mengmonster gemaakt van een aantal enzymatische lysaten. Aan 0,5 ml van dit mengmonster werd 0,3 ml van respectievelijk gedestilleerd water, 30% waterstofperoxide of geconcentreerd salpeterzuur toegevoegd. Deze oplossingen werden gedurende 6 uur in een waterbad van 60 °C geplaatst. Visueel gaf waterstofperoxide de beste resultaten bij de onderzochte rattenieren, de oplossing werd helder zonder precipitatie. Bij destructie van nieren van humane herkomst werd echter ook met waterstofperoxide een troebele oplossing verkregen. Weliswaar kon deze troebeling door centrifugatie worden geprecipiteerd. Echter in de gecentrifugeerde oplossing werd een lagere cadmiumconcentratie gedetecteerd

dan in niet gecentrifugeerde oplossingen. Door aansluitend op de waterstofperoxidebehandeling een korte destructie met 1 ml 35% salpeterzuur uit te voeren werd een helder neerslagvrij destruaat verkregen. Centrifugatie van de meetmonsters bleek hierna geen invloed meer te hebben op de gevonden cadmiumconcentratie in de meetoplossingen.

Vervolgens werd de destructie van het enzymatisch lysaat geoptimaliseerd door respectievelijk 0; 0,05; 0,5 en 1 ml 35% salpeterzuur voor, tijdens en na de waterstofperoxidebehandeling toe te voegen aan 0,5 ml van het lysaat c.q. destruaat van de niermonsters waarna het uiteindelijke volume op 3,5 ml werd gebracht met gedestilleerd water. In de resulterende oplossing werd cadmium bepaald. Om aantasting van de meetapparatuur door een hoge salpeterzuurconcentratie in de meetoplossing te voorkomen, is gestreefd naar een minimale salpeterzuurconcentratie in de meetoplossing, waarbij de destructie van de enzymatische lysaten toch volledig is. De beste resultaten werden verkregen indien het salpeterzuur na de waterstofperoxidebehandeling werd toegevoegd. Als 0,5 ml 35% salpeterzuur werd toegevoegd aan de oplossing, dan bleek een reactietijd van 1 uur bij 60 °C voldoende om een helder, neerslagvrij destruaat van een humaan niermonster te bewerkstelligen.

De bovengrens van het lineaire werkgebied van de detectiemethode werd vastgesteld door de piekhoogte te meten van oplossingen met stapsgewijs toenemende cadmiumconcentratie. De meetoplossingen werden bereid door verschillende hoeveelheden cadmium toe te voegen aan een mengsel van 2,5 ml gedestilleerd water, 2,0 ml 30% waterstofperoxide en 0,5 ml 50% salpeterzuuroplossing. Deze waterige standaarden benaderden de matrix van de gedestrueerde weefselmonsters. Na een drievoudige verdunning van deze standaardoplossingen met 0,025% Triton X-100 in water bleek tot 0,32 AU (schaalexpansie 1) een lineair verband te bestaan tussen de cadmiumconcentratie in de meetoplossing en de gemeten atomaire absorptie. Dit komt overeen met een maximale cadmiumconcentratie in de meetoplossing van 416 µg Cd/l. Op basis van de in bijlage I beschreven procedures komt de bovengrens van het lineaire werkgebied derhalve voor lever overeen met 13 mg Cd/kg en voor nier met 46 mg Cd/kg, uitgaande van 0,5 g lever of nier (nat gewicht).

De detectielimiet van de beschreven methode (overeenkomend met 3 x de ruis) is voor lever 0,3 mg Cd/kg en voor nier 1,2 Cd/kg. Het lineaire

werkgebied is dus voor lever 0,3 - 13 mg Cd/kg en voor nier 1,2 - 46 mg Cd/kg. Indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing van de destruat en hoger is dan de bovengrens van de calibratielij n dient het destruaat voorafgaand aan de meetmonsterbereiding verdu nd te worden.

In onderstaande tabel zijn de lineaire werkgebieden, de regressie-coëfficiënten en de intercepten weergegeven van 10 calibratielijnen evenals de relatieve standaardfouten als maat voor de precisie van de bepalingsmethoden. Voor elk van beide organen zijn 10 calibratielijnen opgenomen in een periode van 3 weken.

tabel 1 Kengetallen van de calibratielijnen voor de bepaling van cadmium in lever en nier van humane herkomst (voor elk orgaan berekend uit 10 calibratielijnen).

	bereik (mg/kg)	regressie coëfficiënt gem ± sd	intercept gem ± sd	relatieve standaardfout (%) gem ± sd
lever	0,3 - 4,5	0,026 ± 0,002	-0,37 ± 0,12	2,1 ± 1,5 *
nier	1,2 - 46	0,048 ± 0,006	-3,3 ± 1,0	0,96 ± 0,50 **

* bij een gemiddelde concentratie van 2,4 mg Cd/kg

** bij een gemiddelde concentratie van 26,7 mg Cd/kg

De reproduceerbaarheid van de analyseresultaten werd bepaald door een aantal weefsels in tweevoud te bepalen en het gemiddelde en de variatiecoëfficiënt van de analyseresultaten te berekenen. De gemiddelde variatiecoëfficiënt (\pm standaarddeviatie) was voor lever (7,6 \pm 7,0)% (n = 97) in een concentratiegebied van 0,3 - 8,2 mg Cd/kg, voor nierschors (9,2 \pm 8,7)% (n = 97) in een concentratiegebied van 2,1 - 78 mg Cd/kg en voor niermerg (34 \pm 28)% (n = 97) in een concentratiegebied van 1,4 - 53 mg Cd/kg.

4. Discussie

Het doel van het onderzoek was het ontwikkelen van een kwantitatieve bepalingmethode voor cadmium in levers en nieren van humane herkomst. De te ontwikkelen methode zou toepasbaar moeten zijn in de seriematige analyse van grote aantallen weefselmonsters. De detectiemethode zou een hoge specificiteit voor cadmium moeten vertonen. Voor dit doel is atomaire absorptiespectrofotometrie geschikt omdat deze methode een hoge specificiteit combineert met een hoge gevoeligheid.

Vaessen et al. (1982) hebben in de periode van 1975-1981 in zes series de cadmiumconcentratie in lever en nier van humane herkomst gemeten. Aan de hand van hun meetresultaten kon een schatting van het te verwachten meetgebied worden gemaakt. De cadmiumconcentratie in lever in het genoemde onderzoek was 0,3 - 10 mg/kg met een gemiddelde concentratie van 2,1 mg/kg (n = 174) en in nier 2,3 - 47 mg/kg met een gemiddelde concentratie van 16 mg/kg (n = 174). Het door ons gevonden lineaire werkgebied komt voor beide organen met deze concentratiegebieden overeen. Om deze cadmiumconcentraties te kunnen meten volgens de monstervoorbereiding zoals beschreven in bijlage I is vlamatomisatie geschikt, mits het uiteindelijke monstervolume, uitgaande van 0,5 g lever of nier, minder is dan 5,5 ml.

Bij de analyse van het relatief vluchtige cadmium treden een aantal praktische problemen tijdens de ontsluiting van het cadmium uit het substraat op. Enerzijds moet om vervluchtiging van cadmium te vermijden de temperatuur tijdens de ontsluiting zo laag mogelijk worden gehouden, anderzijds is voor een volledige mineralisatie van het biologische monstermateriaal een hoge temperatuur tijdens de ontsluiting gewenst. Voor dit doel is een natte destructie het meest geschikt omdat hierbij de destructietemperatuur beperkt blijft. Voorts is de kans op contaminatie tijdens de monstername en de analytische verwerking van het substraat aanwezig, waardoor kunstmatig verhoogde analyseresultaten verkregen kunnen worden. Om de kans op contaminatie tijdens de analytische verwerking minimaal te houden, dienen de gebruikte chemicalien van zuivere kwaliteit te zijn en moeten zowel de gebruikte reagenshoeveelheden, als het aantal manipulaties tijdens de monsterverwerking zo gering mogelijk worden gehouden.

Voor de bepaling van cadmium in organen stonden een aantal beschreven methodes ter beschikking (Blanusa et al., 1985; Pickston et al., 1983; Salmela et al., 1983; Vaessen et al., 1982; Elinder et al., 1981; Casey en Robinson, 1978; Hirst et al., 1973). Blanusa et al. (1985), Salmela et al. (1983), Casey en Robinson (1978) en Hirst et al. (1973) verassen de organen in een oven bij 450 °C, waarna de asrest wordt opgenomen in verdund zoutzuur of verdund salpeterzuur. Blanusa et al. (1985) vergelijken deze droge verassing met een natte destructie met geconcentreerd salpeterzuur en kunnen hierin geen significante verschillen constateren. Elinder et al. (1981) destrueren 0,4 g gelyophiliseerde nier met 25 ml geconcentreerd salpeterzuur en perchloorzuur (2:1). Het destruaat wordt drooggedampt, waarna de asrest wordt opgenomen in 5 ml gedestilleerd water. Het cadmium wordt gecomplexeerd met ammoniumpyrrolidinedithiocarbamaat (APDC) en geextraheerd met methylisobutylketon (MIBK). De auteurs wijzen hierbij op het feit dat de extractiemethode niet toepasbaar is voor cadmiumconcentraties hoger dan 22 mg/kg. Pickston et al. (1983) destrueren 15 g lever met 2 ml salpeterzuur bij 450 °C. Vaessen et al. (1982) passen een drukvatdestructie toe om organen te mineraliseren. Alle genoemde onderzoekers gebruiken atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie ter bepaling van de cadmiumconcentratie in de organen.

Het oplossen van weefsels met behulp van de beschreven enzymatische ontledingmethode is vanwege de geringe monstermanipulatie en de milde condities bijzonder geschikt voor bovenstaand doel. De ontwikkeling van deze enzymatische ontledingmethode is elders beschreven (De Groot en Wubs, 1987). Hij heeft in de afgelopen jaren zijn waarde en kwaliteiten bewezen als monstervoorbewerkingstechniek bij verschillende analytische methoden, zoals bij de bepaling van platina in weefsels met behulp van atomaire absorptie spectrofotometrie met de electrothermische atomisatie (De Groot en Wubs, 1986) en tevens bij de HPLC-analyse van adriamycine in weefsels met fluorescentie detectie (De Groot et al., 1988). Ten behoeve van deze bepalingen zijn inmiddels enkele duizenden weefselmonsters (hart, spier, long, milt, lever en tumor) met de beschreven enzymatische ontledingmethode zonder problemen gelyseerd. Een voordeel van de enzymatische ontleding is dat het monster na de opvolgende destructie in een klein uiteindelijk volume van ca 5 ml wordt opgenomen. Dit in tegenstelling tot een natte destructie waarbij het uiteindelijke volume 20

ml of meer bedraagt. Deze grote verdunning is nodig om het zuurgehalte in de meetoplossing te verlagen omdat de atomaire absorptiespectrofotometer door hoge zuurconcentraties wordt aangetast.

Aangezien tijdens de ontwikkeling van de bepalingsmethode is gebleken dat enzymatische ontleding alleen niet voldoende is om een volledige ontsluiting van het cadmium te bewerkstelligen, wordt aansluitend een destructie uitgevoerd met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur bij verhoogde temperatuur. De toegepaste temperaturen zijn echter niet dusdanig hoog, dat hierbij verlies van cadmium door vervluchtiging optreedt. Hierdoor wordt een heldere oplossing zonder precipitatie verkregen. Het aantal manipulaties tijdens deze monstervoorbewerking (zie bijlage I) is gering, mede doordat de ontleding en de destructie in dezelfde buis worden uitgevoerd.

De enzymatische ontledingsprodukten van de weefsels blijken na de beschreven destructie met waterstofperoxide en salpeterzuur uitstekend geschikt voor de analyse van cadmium met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie. Kleine verschillen in viscositeit tussen meetmonsters onderling en tussen meetmonsters en standaarden worden geminimaliseerd door de monsters en standaarden te verdunnen met een Triton X-100 oplossing in 5 procent (g/v) salpeterzuur.

Uit de kleine standaarddeviaties van de regressiecoëfficiënten van de calibratielijnen (tabel 1) blijkt de geringe dag-tot-dag variatie van de gevoeligheid van de atomaire absorptiespectrofotometer onder de beschreven omstandigheden. Binnen de meetseries wordt de invloed van deze geringe variaties op het analyseresultaat verder beperkt door kleine meetseries van 6 standaarden en maximaal 14 monsters samen te stellen en door de monsters en standaarden gezamenlijk in aselechte volgorde te meten.

Uit de kleine relatieve standaardfouten van de calibratielijnen (tabel 1) blijkt de hoge nauwkeurigheid van de methode. Deze nauwkeurigheid is aanzienlijk beter dan de spreiding bij tweevoudige bepalingen van monsters lever, nierschors of niermerg. Deze laatste spreiding wordt naast de analytische spreiding bepaald door de inhomogeniteit van monstername, vooral bij monsters niermerg (De Groot et al., 1988).

Concluderend kan gesteld worden dat met de beschreven procedure een methode beschikbaar is gekomen voor de bepaling van cadmium in humane levers in een concentratiegebied van 0,3 - 13 mg/kg en voor humane nieren

in een concentratiegebied van 1,2 - 46 mg/kg. De beschreven methode heeft als voordeel boven bestaande methoden dat hij weinig arbeidsintensief is, waardoor grote series monsters een beperkte tijd kunnen worden bepaald. Per etmaal kunnen door een ervaren analist circa 14 monsters worden gedestruueerd en geanalyseerd.

De hier beschreven methode voor het bepalen van cadmium in levers en nieren is toegepast bij de projecten 528474 (Monstername van weefsel van menselijke herkomst en analyse op contaminanten ten behoeve van het bewakingsprogramma mens en voeding) en 528476 (studie naar cadmium-gehalte in nierweefsel van mensen uit gebieden met verhoogd cadmium-gehalte in groente). Hierbij heeft de methode zijn waarde bewezen bij de analyse van 97 monsters lever, 97 monsters nierschors en 97 monsters niermerg.

5. Referenties

Blanusa M, Kralj Z, Bunarević.

Interaction of cadmium, zinc and copper in relation to smoking habit, age and histopathological findings in human kidney cortex.

Arch Toxicol 1985;58:115-117.

Casey CE, Robinson MF.

Copper, manganese, zinc, nickel, cadmium and lead in human foetal tissues.

Br J Nutr 1978;39:639-645.

Elinder CG, Lind B, Piscator M, Sundstedt K, Åkerberg S.

An extraction procedure may not be feasible for cadmium analysis of tissues, such as horse kidney cortex, having a very high cadmium content.

Bull Environ Contam Toxicol 1981;27:810-815.

Groot G de, Mulder W, Wubs KL, Kreis IA.

Cadmium in lever, nierschors en niermerg, kwik in nieren en lood in wervels afkomstig van overledenen uit de Kempen, Twente en Friesland.

RIVM-rapport in voorbereiding.

Groot G de, Wubs KL.

A simple enzymic digestion procedure of intact tissue samples in pharmacokinetic drug analysis.

J Anal Toxicol 1987;11:175-178.

Groot G de, Tepas BCA, Storm G (1988).

High-performance liquid chromatographic determination of doxorubicin in tissues after solid-phase extraction.

J Pharm Biom Anal in druk.

Hirst RN, Perry HM, Cruz MG, Pierce JA.

Elevated cadmium concentration in emphysematous lungs.

Am Rev Respir Dis 1973;108:30-39.

Pickston L, Lewin JF, Drysdale JM, Smith JM, Bruce J.

Determination of potentially toxic metals in human livers in New Zealand.

J Anal Toxicol 1983;7:2-6.

Salmela SS, Vuori E, Huunan-Seppälä A, Kilpiö JO.

Body burden of cadmium in man at low level of exposure.

Sci Total Environ 1983;27:89-95.

Vaessen HAMG, Schuller PL, Ooik A van, Smit CAW, Tolsma K, Zuidendorp J.

Kwik, lood, cadmium en seleen in enkele menselijke weefsels; een tussentijdse balans.

RIVM-rapport 647819 001 (1982).

Wubs KL, Mulder W, Groot G de.

Bepaling van lood in wervels van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

RIVM-rapport 528476 002 (1988).

Wubs KL, Groot G de.

Bepaling van kwik in nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met koude-damp atomisatie.

RIVM-rapport 528476 003 (1988).

Bijlage I

Standard Operating Procedure nr. ARO/028.

Bepaling van cadmium in humane nieren en levers
met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie
en vlamatomisatie.

K.L. Wubs en G. de Groot.

maart 1988

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE

Lab./Unit/Dienst: Laboratorium voor Analytisch Residu Onderzoek

standard operating procedure

Titel: Bepaling van cadmium in humane nieren en levers met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie en vlamatomisatie.

S.O.P.nr.ARO / 028

Uitgifte dat. 880310

Uitgave nr. 1

Aant. pag. 10

Naam:	Handtekening:	Datum:
Opgesteld door K.L. Wubs/dr. G. de Groot		3-3-1988
Goedgekeurd door dr. R.W. Stephany		pl0309
Goedgekeurd door		
Hoofd BKG dr. J.J.T.W.A. Strik		880310

VERZENDLIJST		
Naam:	Afdeling/Functie:	Opmerkingen:
1 K.L. Wubs	ARO	
2 dr. G. de Groot	ARO	
3		
4		
5		
6		
7		
8		

Overzicht van wijzigingen aangebracht in deze S.O.P.							
	Datum:	Pagina nr.:	Punten nr.:		Datum:	Pagina nr.:	Punten nr.:
1				6			
2				7			
3				8			
4				9			
5				10			

Opmerkingen:

OFFICIELE UITGAVE

BKG 1

INHOUDSOPGAVE

1. Principe van de methode	1
2. Apparatuur	2
3. Chemicaliën	3
4. Referentie-oplossingen en reagentia	4
5. Monstervoorbewerking	6
5.1. Enzymatische ontleding en destructie	6
5.2. Lever	6
5.3. Nier	7
6. Atomaire absorptiespectrofotometrie	8
7. Calibratie	9
8. Referentie	10

R I N V M

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 1 van 10

880310

Bepaling van cadmium in humane nieren en levers met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie en vlamatomisatie

1. Principe van de methode

In dit voorschrift wordt een methode beschreven voor de kwantitatieve bepaling van cadmium in nieren en levers van humane herkomst met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie. De weefselmonsters worden ontleed met een enzymatische methode onder fysiologische condities gevolgd door destructie met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur.

2. Apparatuur

- 2.1 Atomaire absorptiespectrofotometer (AA-5, Varian Techtron, Melbourne, Australie) voorzien van vlam, simultane waterstof achtergrondcorrector (BC-6, Varian Techtron) en digitale uitleeseenheid (DI-30, Varian Techtron). De spectrofotometer is uitgerust met een Cd-holle-kathode lamp (Visimax, Instrumentation Laboratory Inc., Wilmington, Ma., V.S.) en een waterstof continue lichtbron (Varian Techtron).
- 2.2 Recorder (BD-8 multirange, Kipp en Zonen, Delft).
- 2.3 Waterbad (Thermomix 1441 BKU, B. Braun, Melsungen, West-Duitsland).
- 2.4 Laboratoriumcentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus Christ, Osterode am Harz, West-Duitsland).
- 2.5 Vortex mixer (Scientific Industries Inc., Queens Village, V.S.).
- 2.6 Variabele pipet 1,5 ml (Pipetman P 5000, Gilson France S.A., Villiers-le-Bel, Frankrijk) voorzien van polypropyleen wegwerptips (C 6000, Gilson).
- 2.7 Variabele pipet 0,1-1 ml (Pipetman P 1000, Gilson) voorzien van polypropyleen wegwerptips (C 200, Gilson).
- 2.8 Variabele pipet 0,05-0,2 ml (Pipetman P 200, Gilson) voorzien van polypropyleen wegwerptips (C 20, Gilson).
- 2.9 Polystyreen buizen (26 ml) met polyethyleen stoppen (Greiner B.V., Alphen a/d Rijn).
- 2.10 Polystyreen buizen (12 ml) met polyethyleen stoppen (Greiner).
- 2.11 Polystyreen buizen (6 ml) met polyethyleen stoppen (Greiner).
- 2.12 Polyethyleen potten (250 ml) met idem schroefdeksels (Emergo B.V., Landsmeer).

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 3 van 10

880310

3. Chemicaliën

- 3.1 Antibiotica-oplossing (5.000.000 E penicilline (Mycofarm), 5 g streptomycine (Mycofarm) en 13 mg fungizone (Gibco) per 750 ml water; nr W.1150, RIVM).
 - 3.2 Cd-standaard (1.000 g; Titrisol, E.Merck, Darmstadt, West-Duitsland).
 - 3.3 Collagenase Type I (Clostridiopeptidase A; nr. C 0130, Sigma Chem. Co., St. Louis, Ma., V.S.).
 - 3.4 Protease Type VIII (Subtilopeptidase A, Subtilisin Carlsberg, nr. P 5380 Sigma).
 - 3.5 Salpeterzuur Spectrosol d = 1,42; 71,63 % (g/v) (BDH Chemicals, Poole, Engeland).
 - 3.6 Triton X-100 fuer die Gas-Chromatographie (E. Merck).
 - 3.7 Water, gedestilleerd in glas vanuit alkalische permanganaatoplossing.
 - 3.8 Waterstofperoxide Perhydrol (30 %) (E. Merck).
- N.B. Enzymen en antibiotica-oplossing dienen bij -20 °C bewaard te worden.

4. Referentie-oplossingen en reagentia

Oplossingen van Cd-zouten in water dienen bereid en bewaard te worden bij een pH lager dan 2 ter voorkoming van adsorptie aan glaswanden (Stoepler en Brandt 1980). Bij het pipetteren en overbrengen van deze standaarden dienen uitsluitend pipetten met wegwerp polypropyleen pipettips gebruikt te worden.

4.1 Een Cd-voorraadoplossing van 5000 mg Cd/l wordt bereid door 1000 mg Cd (3.2) in een maatkolf van 200 ml over te brengen, 2 ml salpeterzuur (3.5) toe te voegen en met water (3.7) aan te vullen.

Deze oplossing is vrijwel onbeperkt stabiel bij +4 °C.

4.2 Een tussenverdunningsoplossing van 100,0 mg Cd/l wordt hieruit bereid door 2 ml van de voorraadoplossing (4.1) over te brengen in een maatkolf van 100 ml, 1 ml salpeterzuur (3.5) toe te voegen en met water (3.7) aan te vullen.

Deze oplossing is vrijwel onbeperkt stabiel bij +4 °C.

4.3 Een werkoplossing A van 6,00 mg Cd/l wordt hieruit bereid door 600 µl van de tussenverdunningsoplossing (4.2) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10), 100 µl salpeterzuur (3.5) toe te voegen en aan te vullen met 9,3 ml water (3.7).

Deze oplossing is een week stabiel bij +4 °C.

4.4 Een werkoplossing B van 10,00 mg Cd /L wordt bereid door 1,00 ml van de tussenverdunningsoplossing (4.2) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10), 100 µl salpeterzuur (3.5) toe te voegen en aan te vullen met 8,9 ml water (3.7).

Deze oplossing is een week stabiel bij +4 °C.

4.5 Een serie calibratiestandaarden voor de bepaling van cadmium in lever wordt dagelijks vers bereid door volumes van de werkoplossing A (4.3) van respectievelijk 50 (59,4 µg Cd/l), 100 (117,6 µg Cd/l), 150 (174,8 µg Cd/l), 200 (230,0 µg Cd/l), 300 (339,6 µg Cd/l) en 400 µl (444,4 µg Cd/l) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10) en aan te vullen met 2,5 ml water (3.7), 2,0 ml waterstofperoxide (3.8) en 0,5 ml salpeterzuuroplossing (4.7).

- 4.6 Een serie calibratiestandaarden voor de bepaling van cadmium in nieren wordt dagelijks vers bereid door volumes van de werkoplossing B (4.4) van respectievelijk 200 (0,741 mg Cd/l), 500 (1,667 mg Cd/l), 800 (2,424 mg Cd/l), 1000 (2,857 mg Cd/l), 1500 (3,750 mg Cd/l) en 2000 μ l (4,444 mg Cd/l) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10) en aan te vullen met 1,25 ml water (3.7), 1,0 ml waterstofperoxide (3.8) en 0,25 ml salpeterzuuroplossing (4.7)
- 4.7 Een 50 procent (g/v) salpeterzuuroplossing wordt bereid door 100 ml salpeterzuur (3.5) toe te voegen aan 40 ml water (3.7).
- 4.8 Een 0,025 procent (g/v) Triton X-100-oplossing in 5 procent (g/v) salpeterzuur wordt dagelijks vers bereid in een polyethyleen pot (2.12) door 50 μ l Triton X-100 (3.6) met water (3.7) te verdunnen tot 180 ml en 20 ml salpeterzuuroplossing (4.7) toe te voegen.
- 4.9 Een benodigd volume enzymoplossing wordt dagelijks vers bereid door collagenase (4 mg/ml) (3.3) en protease (3 mg/ml) (3.4) in water (3.7) te suspenderen.

5. Monstervoorbewerking

5.1. Enzymatische ontleding en destructie

In een tevoren nauwkeurig gewogen (op 4 decimalen = gew.A) polystyreen buis (12 ml, 2.10) met polyethyleen stop wordt ongeveer 0,5 g lever of nier (natgewicht) ingebracht. De buis met inhoud wordt nauwkeurig op vier decimalen gewogen (= gew.B).

Aan het monster wordt 2 ml enzymoplossing (4.9) en 40 µl antibiotica-oplossing (3.1) toegevoegd. De buis wordt afgesloten en gedurende 16 uur (overnacht) in een waterbad bij 37 °C geplaatst totdat het monster volledig is ontleed en een dunvloeibare suspensie van weefselysaat is verkregen. Indien na krachtig schudden het weefsel nog onvoldoende is gelyseerd, wordt het monster nog gedurende 1 uur in een waterbad van 45 °C geplaatst. Na afkoelen worden met een injectienaald gaten in de polyethyleen stoppen geprikt, om drukopbouw tijdens de verdere destructie te vermijden. Vervolgens wordt aan het weefselysaat 2 ml waterstofperoxide (3.8) toegevoegd en wordt het mengsel gedurende 6 uur in waterbad van 60 °C geplaatst. Aan het destruaat wordt vervolgens 0,5 ml salpeterzuur (4.7) toegevoegd en het monster wordt gedurende 1 uur in een waterbad van 60 °C geplaatst totdat een volledig heldere oplossing is verkregen. Het destruaat wordt gewogen (op vier decimalen = gew.C) en het volume hiervan wordt numeriek gelijkgesteld aan het gewicht (gew.C - gew.A) van de oplossing.

5.2. Lever

In een polystyreenbuis (6 ml, 2.11) worden achtereenvolgens 1,0 ml leverdestruaat en 2,0 ml Triton X-100-oplossing (4.8) gebracht. Het mengsel wordt gedurende 1 min krachtig gevortext (2500 tpm) en vervolgens gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 4000 tpm (max 2500 g).

Calibratiestandaarden worden op analoge wijze in bewerking genomen door, in plaats van 1,0 ml destruaat, 1,0 ml van de respectievelijke calibratiestandaard (4.5) te nemen.

Indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing te hoog is voor de calibratielijn, wordt het destruaat voorafgaand verdund.

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 7 van 10

880310

5.3. Nier

In een polystyreenbuis (6 ml, 2.11) worden achtereenvolgens 0,3 ml nierdestruaat en 3,0 ml Triton X-100-oplossing (4.8) gebracht. Het mengsel wordt gedurende 1 min krachtig gevortext (2500 tpm) en vervolgens gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 4000 tpm (max 2500 g).

Calibratiestandaarden worden op analoge wijze in bewerking genomen door, in plaats van 0,3 ml destruaat, 0,3 ml van de respectievelijke calibratiestandaard (4.6) te nemen.

Indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing te hoog is voor de calibratielij, wordt het destruaat voorafgaand verdund.

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 8 van 10

880310

6. Atomaire absorptiespectrofotometrie

Er wordt een meetserie samengesteld bestaande uit 6 calibratiestandaarden en 14 monsters. De standaarden en monsters worden van opeenvolgende buisnummers voorzien. De buizen worden geanalyseerd in een aselechte volgorde die met behulp van een daartoe ontwikkeld computerprogramma wordt bepaald.

De verstuiving (5 ml/min) van de supernatant van het monster vindt plaats in een oxiderende acetyleen/perslucht vlam. De absorptie wordt gemeten bij 228,8 nm bij een spectrale bandbreedte van 0,33 nm (dit komt overeen met een spleetbreedte van 100 μm). Na elk monster wordt gedurende telkens 10 sec een Triton X-100 oplossing (4-8) verstoven. De absorptie wordt continu geregistreerd op een recorder (lever: 1,0 mV-stand; nier: 5 mV-stand).

De absorptie van de nierdestruaten en bijbehorende calibratiestandaarden wordt afgelezen op de digitale uitleeseenheid. De absorptie van de leverdestruaten en bijbehorende calibratiestandaarden wordt gerelateerd aan de recorderuitslag.

7. Calibratie

Het verband tussen de cadmiumconcentratie in de calibratiestandaard (onafhankelijke variabele) en de respons uitgedrukt in piekhoogte (afhankelijke variabele) wordt berekend met behulp van lineaire regressieanalyse. De verkregen regressielijn wordt gebruikt voor de berekening van de cadmiumconcentratie in onbekende monsters. De precisie van de methode wordt aangegeven door de standaardfout van de calibratielijn uitgedrukt als percentage van de gemiddelde respons (relatieve standaardfout). De gemiddelde respons komt overeen met de waarde van de afhankelijke variabele in het zwaartepunt van de calibratielijn, waar de onafhankelijke variabele gelijk is aan de gemiddelde concentratie. In dit punt vertoont de absolute standaardfout een minimum.

De concentratie Cd in lever of nier wordt bepaald met behulp van de volgende formule:

$$\text{gehalte Cd (mg/kg)} = \frac{\text{concentratie Cd} \times \text{destruaatvolume} \times \text{verduunningsfaktor}}{\text{weefselgewicht} \times 1000}$$

waarin: concentratie Cd : cadmiumconcentratie ($\mu\text{g/l}$) in de meetoplossing,
destruaatvolume : gew.C (g) - gew.A (g),
weefselgewicht : gew.B (g) - gew.A (g) en
verduunningsfaktor : verduunningsfaktor van het destruaat indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing te hoog is voor de calibratielijn (zie 5.2 en 5.3)

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 10 van 10

880310

8. Referentie

Stoeppler M, Brand K. Contributions to automated trace analysis. Part V. Determination of cadmium in whole blood en urine by electrothermal atomic-absorption spectrophotometry. Fresenius Z Anal Chem (1980); 300:372 - 380.

Rapport-Toelichtingskaart A

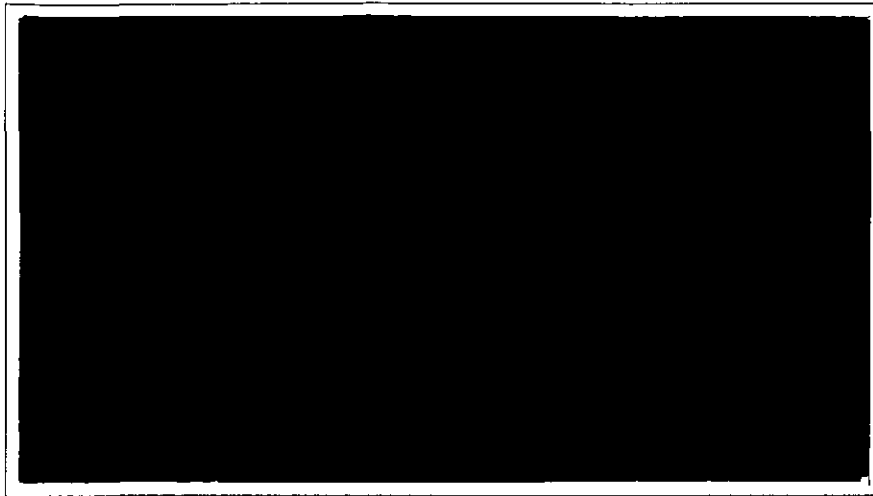
gebeld, overleg	oud rapport nummer	nieuw rapport nummer	retour kleine correc- ties	retour kleine correc- ties	door naar Dir: r.i.f. ontv.	datum ontv. rapp.
		toz 001	} KK. 14/9 door. numm. pag. + Kleinigheid.		KK 19/88	
		toz 002			id	
		toz 003			id	
" de groot 29/6 89		toz 004			ARO 14/8 89	
" de groot 29/6 89		toz 005			RvdM- 14/8 89	
" i om Kreis gegeven. in 89 tot 90		f 006				
"		007				
"		008				

Met de administratie (Hr.Ursem): datum:

Andere interpretatie:.....

- gecontroleerd
- nog te controleren
- geen controle nodig
-

Opmerkingen:
~~met de a. voor 14/9 KK. neem 19/9~~
 000 zws Lan hte 14/8 89



RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 528476 001

Bepaling van cadmium in levers en nieren
van humane herkomst met behulp van atomaire-
absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

K.L. Wubs en G. de Groot

augustus 1988

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de Geneeskundige Hoofdinspectie van de Volksgezondheid in het kader van projecten 528474 (voorheen 842135) en 528476 (voorheen 842137); opdrachtbrieven 137017 d.d. 12 oktober 1984 en 138575 d.d. 16 november 1984.

Verzendlijst

- 1-5 Geneeskundige Hoofdinspectie
6 Secretaris-Generaal van het Ministerie van WVC
7 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
8 Plv. Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, tevens
Hoofddirecteur Financiering en Planning .
9 Hoofddirecteur van de Gezondheidsbescherming
10 Hoofddirecteur van de Gezondheidszorg
11 Directie RIVM
12 Drs.C.A. van der Heijden, Prof.Dr.B. Sangster
13 Dr.R.W. Stephany
14 Prof.Dr.F. de Waard
15 Prof.Dr.Ir.D Kromhout
16 Dr.H.A. van 't Klooster
17 Drs.E.I. Krajnc
18 Drs.I.A. Kreis
19 Dr.T.J.F. Savelkoul
20-21 Auteurs
22 Dr.G. Ellen, Ir.H.P. van Egmond, Dr.L.A. van Ginkel, Dr.R.C.
Schothorst
23-24 Bureau Projecten- en Rapportenregistratie
25-36 Reserve

INHOUDSOPGAVE

Summary and Conclusions	iii
Samenvatting en Conclusies	iv
1. Inleiding	1
2. Materialen en Methoden	2
3. Resultaten	3
4. Discussie	6
5. Referenties	10
Bijlage I	12

National Institute of Public Health and Environmental Protection

RIVM report: 528476 001

August 1988

Determination of cadmium in human livers and kidneys with atomic absorption spectroscopy and flame atomization.

Wubs, K.L. and Groot, G. de

Summary and Conclusions

In this report a method is described for the determination of cadmium in human livers and kidneys with atomic absorption spectroscopy and flame atomization. The tissue samples are digested by an enzymic digestion procedure under physiological conditions, followed by destruction at elevated temperature with subsequently hydrogen peroxide and nitric acid.

The upper limit of the linear working range corresponds for liver with 13 mg Cd/kg and for kidney with 46 mg Cd/kg using 0.5 g of tissue. The limit of detection (at 3 x the noise) is for liver 0.3 mg Cd/kg and for kidney 1.2 mg Cd/kg. The linear working range is for liver 0.3 - 13 mg Cd/kg and for kidney 1.2 - 46 mg Cd/kg.

The average relative standard errors (\pm standard deviation) calculated from 10 calibration curves are for livers $(2.1 \pm 1.5)\%$ at a concentration of 0.8 mg Cd/kg and for kidneys $(0.96 \pm 0.50)\%$ at a concentration of 2.5 mg Cd/kg. The average values of the coefficients of variation of duplicate analyses are for livers $(7.6 \pm 7.0)\%$, for kidney cortex $(9.2 \pm 8.7)\%$ and for kidney medulla $(34 \pm 28)\%$.

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiëne

RIVM-rapport: 528476 001

augustus 1988

Bepaling van cadmium in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

Wubs, K.L. en Groot, G. de

Samenvatting en Conclusies

In dit rapport wordt een methode beschreven voor de bepaling van cadmium in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie en vlamatomisatie. De weefselmonsters worden ontleed met een enzymatische methode onder fysiologische condities, gevolgd door destructie met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur bij verhoogde temperatuur.

De bovengrens van het lineaire werkgebied komt voor lever overeen met 13 mg Cd/kg en voor nier met 46 mg Cd/kg, uitgaande van 0,5 g lever of nier. De detectielimiet (overeenkomend met 3 x de ruis) is voor lever 0,3 mg Cd/kg en voor nier 1,2 mg Cd/kg. Het lineaire werkgebied is dus voor lever 0,3 - 13 mg Cd/kg en voor nier 1,2 - 46 mg Cd/kg.

De gemiddelde relatieve standaardfouten (\pm standaarddeviatie) berekend uit 10 calibratielijnen bedragen voor levers bij een concentratie van 0,8 mg Cd/kg ($2,1 \pm 1,5$)% en voor nieren bij een concentratie van 2,5 mg Cd/kg ($0,96 \pm 0,50$)%. De gemiddelden van de variatiecoëfficiënten van tweevoudige analyses bedragen voor levers ($7,6 \pm 7,0$)%, voor nierschors ($9,2 \pm 8,7$)% en voor niermerg (34 ± 28) %.

1. Inleiding

Als gevolg van een jarenlange uitstoot van cadmium door metallurgische industriën is in een groot gebied dat de nederlandse en belgische Kempen omvat, de bodem verontreinigd met een aantal metalen waaronder zink, cadmium, lood en kwik. Naar de effecten van deze verontreiniging op de nierfunctie is een epidemiologisch onderzoek verricht in een langdurig aan cadmium blootgestelde populatie in de Kempen en in een controlepopulatie.

Parallel aan dit epidemiologisch onderzoek is in het kader van project 528476 onderzoek verricht naar de cadmiumbelasting van overleden personen die langdurig in het verontreinigde gebied in de Kempen hadden gewoond. De resultaten bij deze populatie zijn vergeleken met de resultaten verkregen bij een controlepopulatie van overledenen uit gebieden (Twente en Friesland) waar, voorzover bekend, geen verontreiniging van de bodem met cadmium of andere metalen aanwezig is. Verwant aan dit project is project 528474 waarbinnen ten behoeve van het bewakingsprogramma Mens en Voeding de belasting van de mens aan een aantal metalen wordt vastgesteld en in de tijd gevolgd door middel van de bepaling van de concentratie van deze metalen in menselijk weefsel verkregen bij obductie van overleden personen uit niet met de metalen verontreinigde gebieden. De onderzochte parameters zijn cadmium in nieren (nierschors en niermerg), cadmium in levers, kwik in nieren en lood in wervels.

Ten behoeve van bovengenoemde projecten zijn methoden ontwikkeld voor de kwantitatieve bepaling van de genoemde metalen in de betreffende weefsels. Reeds beschreven zijn:

- De bepaling van lood in wervels van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie (Wubs et al., 1988).
- De bepaling van kwik in nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met koude-damp atomisatie (Wubs en de Groot, 1988).

Dit rapport beschrijft de bepaling van cadmium in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.

2. Materialen en Methoden

Cadmium wordt bepaald in levers en nieren van humane herkomst met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie. De nieren en levers worden gelyseerd met een enzymatische methode gevolgd door een destructie met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur. De destruatens worden vervolgens verdund met een Triton X-100 oplossing in 5 procent (g/v) salpeterzuur en de cadmiumconcentratie wordt na centrifugatie in het destruaat bepaald. De methode is in detail beschreven in Standard Operating Procedure nr. ARO/028 (bijlage I).

3. Resultaten

Met de hier beschreven enzymatische ontledingmethode wordt een lysaat verkregen waarin nog slechts zeer kleine weefselfragmenten voorkomen. Een antibiotica-oplossing wordt voorafgaande aan de incubatie toegevoegd om te voorkomen dat er tijdens de ontleding bacteriegroei optreedt. De ontwikkeling van deze enzymatische ontledingmethode is elders beschreven (De Groot en Wubs, 1987).

Om de toepasbaarheid van de enzymatische ontledingmethode bij de bepaling van cadmium in weefsels te onderzoeken werd de cadmiumconcentratie bepaald in een aantal rattenieren en vergeleken met de waarden verkregen na een klassieke natte destructie. Een drietal nieren (ca. 0,6 g) werd elk in twee helften gesneden, waarna de ene helft met behulp van bovengenoemde enzymatische methode (zie bijlage I) werd ontleed en de andere helft werd gedestruëerd met behulp van 2 ml geconcentreerd zwavelzuur, 12 ml geconcentreerd salpeterzuur en 5 ml 30% waterstofperoxide tot een volledig helder en kleurloos destruaat. In zowel het enzymatische lysaat als in het zure destruaat werd vervolgens, na het maken van een geschikte verdunning met 0,025 % Triton X-100 in water, de cadmiumconcentratie bepaald met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie (AAS) met vlamatomisatie. De cadmiumconcentratie in de nieren ontleed met de zure destructie was gemiddeld (\pm standaarddeviatie) $(13 \pm 8)\%$ hoger dan de enzymatische ontleding. Aangezien bij beide ontledingstechnieken voor de reagensblanco was gecorrigeerd, was dit verschil niet terug te voeren tot contaminatie vanuit de gebruikte materialen en/of reagentia.

Om de verdere ontsluiting van cadmium in de enzymatische lysaten te onderzoeken werd een mengmonster gemaakt van een aantal enzymatische lysaten. Aan 0,5 ml van dit mengmonster werd 0,3 ml van respectievelijk gedestilleerd water, 30% waterstofperoxide of geconcentreerd salpeterzuur toegevoegd. Deze oplossingen werden gedurende 6 uur in een waterbad van 60 °C geplaatst. Visueel gaf waterstofperoxide de beste resultaten bij de onderzochte rattenieren, de oplossing werd helder zonder precipitatie. Bij destructie van nieren van humane herkomst werd echter ook met waterstofperoxide een troebele oplossing verkregen. Weliswaar kon deze troebeling door centrifugatie worden geprecipiteerd. Echter in de gecentrifugeerde oplossing werd een lagere cadmiumconcentratie gedetecteerd

dan in niet gecentrifugeerde oplossingen. Door aansluitend op de waterstofperoxidebehandeling een korte destructie met 1 ml 35% salpeterzuur uit te voeren werd een helder neerslagvrij destruaat verkregen. Centrifugatie van de meetmonsters bleek hierna geen invloed meer te hebben op de gevonden cadmiumconcentratie in de meetoplossingen.

Vervolgens werd de destructie van het enzymatisch lysaat geoptimaliseerd door respectievelijk 0; 0,05; 0,5 en 1 ml 35% salpeterzuur voor, tijdens en na de waterstofperoxidebehandeling toe te voegen aan 0,5 ml van het lysaat c.q. destruaat van de niermonsters waarna het uiteindelijke volume op 3,5 ml werd gebracht met gedestilleerd water. In de resulterende oplossing werd cadmium bepaald. Om aantasting van de meetapparatuur door een hoge salpeterzuurconcentratie in de meetoplossing te voorkomen, is gestreefd naar een minimale salpeterzuurconcentratie in de meetoplossing, waarbij de destructie van de enzymatische lysaten toch volledig is. De beste resultaten werden verkregen indien het salpeterzuur na de waterstofperoxidebehandeling werd toegevoegd. Als 0,5 ml 35% salpeterzuur werd toegevoegd aan de oplossing, dan bleek een reactietijd van 1 uur bij 60 °C voldoende om een helder, neerslagvrij destruaat van een humaan niermonster te bewerkstelligen.

De bovengrens van het lineaire werkgebied van de detectiemethode werd vastgesteld door de piekhoogte te meten van oplossingen met stapsgewijs toenemende cadmiumconcentratie. De meetoplossingen werden bereid door verschillende hoeveelheden cadmium toe te voegen aan een mengsel van 2,5 ml gedestilleerd water, 2,0 ml 30% waterstofperoxide en 0,5 ml 50% salpeterzuuroplossing. Deze waterige standaarden benaderden de matrix van de gedestrueerde weefselmonsters. Na een drievoudige verdunning van deze standaardoplossingen met 0,025% Triton X-100 in water bleek tot 0,32 AU (schaalexpanisie 1) een lineair verband te bestaan tussen de cadmiumconcentratie in de meetoplossing en de gemeten atomaire absorptie. Dit komt overeen met een maximale cadmiumconcentratie in de meetoplossing van 416 µg Cd/l. Op basis van de in bijlage I beschreven procedures komt de bovengrens van het lineaire werkgebied derhalve voor lever overeen met 13 mg Cd/kg en voor nier met 46 mg Cd/kg, uitgaande van 0,5 g lever of nier (nat gewicht).

De detectielimiet van de beschreven methode (overeenkomend met 3 x de ruis) is voor lever 0,3 mg Cd/kg en voor nier 1,2 Cd/kg. Het lineaire

werkgebied is dus voor lever 0,3 - 13 mg Cd/kg en voor nier 1,2 - 46 mg Cd/kg. Indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing van de destruat en hoger is dan de bovengrens van de calibratielij n dient het destruaat voorafgaand aan de meetmonsterbereiding verdu nd te worden.

In onderstaande tabel zijn de lineaire werkgebieden, de regressie-coëfficiënten en de intercepten weergegeven van 10 calibratielijnen evenals de relatieve standaardfouten als maat voor de precisie van de bepalingmethoden. Voor elk van beide organen zijn 10 calibratielijnen opgenomen in een periode van 3 weken.

tabel 1 Kengetallen van de calibratielijnen voor de bepaling van cadmium in lever en nier van humane herkomst (voor elk orgaan berekend uit 10 calibratielijnen).

	bereik (mg/kg)	regressie coëfficiënt gem ± sd	intercept gem ± sd	relatieve standaardfout (%) gem ± sd
lever	0,3 - 4,5	0,026 ± 0,002	-0,37 ± 0,12	2,1 ± 1,5 *
nier	1,2 - 46	0,048 ± 0,006	-3,3 ± 1,0	0,96 ± 0,50 **

* bij een gemiddelde concentratie van 2,4 mg Cd/kg

** bij een gemiddelde concentratie van 26,7 mg Cd/kg

De reproduceerbaarheid van de analyseresultaten werd bepaald door een aantal weefsels in tweevoud te bepalen en het gemiddelde en de variatiecoëfficiënt van de analyseresultaten te berekenen. De gemiddelde variatiecoëfficiënt (+ standaarddeviatie) was voor lever (7,6 ± 7,0)% (n = 97) in een concentratiegebied van 0,3 - 8,2 mg Cd/kg, voor nierschors (9,2 ± 8,7)% (n = 97) in een concentratiegebied van 2,1 - 78 mg Cd/kg en voor niermerg (34 ± 28)% (n = 97) in een concentratiegebied van 1,4 - 53 mg Cd/kg.

4. Discussie

Het doel van het onderzoek was het ontwikkelen van een kwantitatieve bepalingmethode voor cadmium in levers en nieren van humane herkomst. De te ontwikkelen methode zou toepasbaar moeten zijn in de seriematige analyse van grote aantallen weefselmonsters. De detectiemethode zou een hoge specificiteit voor cadmium moeten vertonen. Voor dit doel is atomaire absorptiespectrofotometrie geschikt omdat deze methode een hoge specificiteit combineert met een hoge gevoeligheid.

Vaessen et al. (1982) hebben in de periode van 1975-1981 in zes series de cadmiumconcentratie in lever en nier van humane herkomst gemeten. Aan de hand van hun meetresultaten kon een schatting van het te verwachten meetgebied worden gemaakt. De cadmiumconcentratie in lever in het genoemde onderzoek was 0,3 - 10 mg/kg met een gemiddelde concentratie van 2,1 mg/kg (n = 174) en in nier 2,3 - 47 mg/kg met een gemiddelde concentratie van 16 mg/kg (n = 174). Het door ons gevonden lineaire werkgebied komt voor beide organen met deze concentratiegebieden overeen. Om deze cadmiumconcentraties te kunnen meten volgens de monstervoorbereiding zoals beschreven in bijlage I is vlamatomisatie geschikt, mits het uiteindelijke monstervolume, uitgaande van 0,5 g lever of nier, minder is dan 5,5 ml.

Bij de analyse van het relatief vluchtige cadmium treden een aantal praktische problemen tijdens de ontsluiting van het cadmium uit het substraat op. Enerzijds moet om vervluchtiging van cadmium te vermijden de temperatuur tijdens de ontsluiting zo laag mogelijk worden gehouden, anderzijds is voor een volledige mineralisatie van het biologische monstermateriaal een hoge temperatuur tijdens de ontsluiting gewenst. Voor dit doel is een natte destructie het meest geschikt omdat hierbij de destructietemperatuur beperkt blijft. Voorts is de kans op contaminatie tijdens de monstername en de analytische verwerking van het substraat aanwezig, waardoor kunstmatig verhoogde analyseresultaten verkregen kunnen worden. Om de kans op contaminatie tijdens de analytische verwerking minimaal te houden, dienen de gebruikte chemicalien van zuivere kwaliteit te zijn en moeten zowel de gebruikte reagenshoeveelheden, als het aantal manipulaties tijdens de monsterverwerking zo gering mogelijk worden gehouden.

Voor de bepaling van cadmium in organen stonden een aantal beschreven methodes ter beschikking (Blanusa et al., 1985; Pickston et al., 1983; Salmela et al., 1983; Vaessen et al., 1982; Elinder et al., 1981; Casey en Robinson, 1978; Hirst et al., 1973). Blanusa et al. (1985), Salmela et al. (1983), Casey en Robinson (1978) en Hirst et al. (1973) verassen de organen in een oven bij 450 °C, waarna de asrest wordt opgenomen in verdund zoutzuur of verdund salpeterzuur. Blanusa et al. (1985) vergelijken deze droge verassing met een natte destructie met geconcentreerd salpeterzuur en kunnen hierin geen significante verschillen constateren. Elinder et al. (1981) destrueren 0,4 g gelyophiliseerde nier met 25 ml geconcentreerd salpeterzuur en perchloorzuur (2:1). Het destruaat wordt drooggedampt, waarna de asrest wordt opgenomen in 5 ml gedestilleerd water. Het cadmium wordt gecomplexeerd met ammoniumpyrrolidinedithiocarbamaat (APDC) en geextraheerd met methylisobutylketon (MIBK). De auteurs wijzen hierbij op het feit dat de extractiemethode niet toepasbaar is voor cadmiumconcentraties hoger dan 22 mg/kg. Pickston et al. (1983) destrueren 15 g lever met 2 ml salpeterzuur bij 450 °C. Vaessen et al. (1982) passen een drukvatdestructie toe om organen te mineraliseren. Alle genoemde onderzoekers gebruiken atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie ter bepaling van de cadmiumconcentratie in de organen.

Het oplossen van weefsels met behulp van de beschreven enzymatische ontledingmethode is vanwege de geringe monstermanipulatie en de milde condities bijzonder geschikt voor bovenstaand doel. De ontwikkeling van deze enzymatische ontledingmethode is elders beschreven (De Groot en Wubs, 1987). Hij heeft in de afgelopen jaren zijn waarde en kwaliteiten bewezen als monstervoorbewerkingstechniek bij verschillende analytische methoden, zoals bij de bepaling van platina in weefsels met behulp van atomaire absorptie spectrofotometrie met de electrothermische atomisatie (De Groot en Wubs, 1986) en tevens bij de HPLC-analyse van adriamycine in weefsels met fluorescentie detectie (De Groot et al., 1988). Ten behoeve van deze bepalingen zijn inmiddels enkele duizenden weefselmonsters (hart, spier, long, milt, lever en tumor) met de beschreven enzymatische ontledingmethode zonder problemen gelyseerd. Een voordeel van de enzymatische ontleding is dat het monster na de opvolgende destructie in een klein uiteindelijk volume van ca 5 ml wordt opgenomen. Dit in tegenstelling tot een natte destructie waarbij het uiteindelijke volume 20

ml of meer bedraagt. Deze grote verdunning is nodig om het zuurgehalte in de meetoplossing te verlagen omdat de atomaire absorptiespectrofotometer door hoge zuurconcentraties wordt aangetast.

Aangezien tijdens de ontwikkeling van de bepalingsmethode is gebleken dat enzymatische ontleding alleen niet voldoende is om een volledige ontsluiting van het cadmium te bewerkstelligen, wordt aansluitend een destructie uitgevoerd met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur bij verhoogde temperatuur. De toegepaste temperaturen zijn echter niet dusdanig hoog, dat hierbij verlies van cadmium door vervluchtiging optreedt. Hierdoor wordt een heldere oplossing zonder precipitatie verkregen. Het aantal manipulaties tijdens deze monstervoorbewerking (zie bijlage I) is gering, mede doordat de ontleding en de destructie in dezelfde buis worden uitgevoerd.

De enzymatische ontledingsprodukten van de weefsels blijken na de beschreven destructie met waterstofperoxide en salpeterzuur uitstekend geschikt voor de analyse van cadmium met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie. Kleine verschillen in viscositeit tussen meetmonsters onderling en tussen meetmonsters en standaarden worden geminimaliseerd door de monsters en standaarden te verdunnen met een Triton X-100 oplossing in 5 procent (g/v) salpeterzuur.

Uit de kleine standaarddeviaties van de regressiecoëfficiënten van de calibratielijnen (tabel 1) blijkt de geringe dag-tot-dag variatie van de gevoeligheid van de atomaire absorptiespectrofotometer onder de beschreven omstandigheden. Binnen de meetseries wordt de invloed van deze geringe variaties op het analyseresultaat verder beperkt door kleine meetseries van 6 standaarden en maximaal 14 monsters samen te stellen en door de monsters en standaarden gezamenlijk in aselechte volgorde te meten.

Uit de kleine relatieve standaardfouten van de calibratielijnen (tabel 1) blijkt de hoge nauwkeurigheid van de methode. Deze nauwkeurigheid is aanzienlijk beter dan de spreiding bij tweevoudige bepalingen van monsters lever, nierschors of niermerg. Deze laatste spreiding wordt naast de analytische spreiding bepaald door de inhomogeniteit van monsternamen, vooral bij monsters niermerg (De Groot et al., 1988).

Concluderend kan gesteld worden dat met de beschreven procedure een methode beschikbaar is gekomen voor de bepaling van cadmium in humane levers in een concentratiegebied van 0,3 - 13 mg/kg en voor humane nieren

in een concentratiegebied van 1,2 - 46 mg/kg. De beschreven methode heeft als voordeel boven bestaande methoden dat hij weinig arbeidsintensief is, waardoor grote series monsters een beperkte tijd kunnen worden bepaald. Per etmaal kunnen door een ervaren analist circa 14 monsters worden gedeutereerd en geanalyseerd.

De hier beschreven methode voor het bepalen van cadmium in levers en nieren is toegepast bij de projecten 528474 (Monsternamen van weefsel van menselijke herkomst en analyse op contaminanten ten behoeve van het bewakingsprogramma mens en voeding) en 528476 (studie naar cadmium-gehalte in nierweefsel van mensen uit gebieden met verhoogd cadmium-gehalte in groente). Hierbij heeft de methode zijn waarde bewezen bij de analyse van 97 monsters lever, 97 monsters nierschors en 97 monsters niermerg.

5. Referenties

Blanusa M, Kralj Z, Bunarević.

Interaction of cadmium, zinc and copper in relation to smoking habit, age and histopathological findings in human kidney cortex.

Arch Toxicol 1985;58:115-117.

Casey CE, Robinson MF.

Copper, manganese, zinc, nickel, cadmium and lead in human foetal tissues.

Br J Nutr 1978;39:639-645.

Elinder CG, Lind B, Piscator M, Sundstedt K, Åkerberg S.

An extraction procedure may not be feasible for cadmium analysis of tissues, such as horse kidney cortex, having a very high cadmium content.

Bull Environ Contam Toxicol 1981;27:810-815.

Groot G de, Mulder W, Wubs KL, Kreis IA.

Cadmium in lever, nierschors en niermerg, kwik in nieren en lood in wervels afkomstig van overledenen uit de Kempen, Twente en Friesland.

RIVM-rapport in voorbereiding.

Groot G de, Wubs KL.

A simple enzymic digestion procedure of intact tissue samples in pharmacokinetic drug analysis.

J Anal Toxicol 1987;11:175-178.

Groot G de, Tepas BCA, Storm G (1988).

High-performance liquid chromatographic determination of doxorubicin in tissues after solid-phase extraction.

J Pharm Biom Anal in druk.

Hirst RN, Perry HM, Cruz MG, Pierce JA.

Elevated cadmium concentration in emphysematous lungs.

Am Rev Respir Dis 1973;108:30-39.

Pickston L, Lewin JF, Drysdale JM, Smith JM, Bruce J.

Determination of potentially toxic metals in human livers in New Zealand.

J Anal Toxicol 1983;7:2-6.

Salmela SS, Vuori E, Huunan-Seppälä A, Kilpiö JO.
Body burden of cadmium in man at low level of exposure.
Sci Total Environ 1983;27:89-95.

Vaessen HAMG, Schuller PL, Ooik A van, Smit CAW, Tolsma K, Zuidendorp J.
Kwik, lood, cadmium en seleen in enkele menselijke weefsels; een
tussentijdse balans.
RIVM-rapport 647819 001 (1982).

Wubs KL, Mulder W, Groot G de.
Bepaling van lood in wervels van humane herkomst met behulp van atomaire-
absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie.
RIVM-rapport 528476 002 (1988).

Wubs KL, Groot G de.
Bepaling van kwik in nieren van humane herkomst met behulp van atomaire-
absorptiespectrofotometrie met koude-damp atomisatie.
RIVM-rapport 528476 003 (1988).

Bijlage I

Standard Operating Procedure nr. ARO/028.

Bepaling van cadmium in humane nieren en levers
met behulp van atomaire-absorptiespectrofotometrie
en vlamatomisatie.

K.L. Wubs en G. de Groot.

maart 1988

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE

Lab./Unit/Dienst: Laboratorium voor Analytisch Residu Onderzoek

standard operating procedure

Titel: Bepaling van cadmium in humane nieren en levers met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie en vlamatomisatie.

S.O.P.nr.ARO / 028
 Uitgifte dat. 880310
 Uitgave nr. 1
 Aant. pag. 10

Naam:		Handtekening:	Datum:
Opgesteld door	K.L. Wubs/dr. G. de Groot		3-3-1988
Goedgekeurd door	dr. R.W. Stephany		080309
Goedgekeurd door			
Hoofd BKG	dr. J.J.T.W.A. Strik		880310

VERZENDLIJST			
	Naam:	Afdeling/Functie:	Opmerkingen:
1	K.L. Wubs	ARO	
2	dr. G. de Groot	ARO	
3			
4			
5			
6			
7			
8			

Overzicht van wijzigingen aangebracht in deze S.O.P.							
	Datum:	Pagina nr.:	Punten nr.:		Datum:	Pagina nr.:	Punten nr.:
1				6			
2				7			
3				8			
4				9			
5				10			

Opmerkingen:

OFFICIELE UITGAVE

BKG 1

INHOUDSOPGAVE

1. Principe van de methode	1
2. Apparatuur	2
3. Chemicaliën	3
4. Referentie-oplossingen en reagentia	4
5. Monstervoorbewerking	6
5.1. Enzymatische ontleding en destructie	6
5.2. Lever	6
5.3. Nier	7
6. Atomaire absorptiespectrofotometrie	8
7. Calibratie	9
8. Referentie	10

RAINMA

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 1 van 10

880310

Bepaling van cadmium in humane nieren en levers met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie en vlamatomisatie

1. Principe van de methode

In dit voorschrift wordt een methode beschreven voor de kwantitatieve bepaling van cadmium in nieren en levers van humane herkomst met behulp van atomaire absorptiespectrofotometrie met vlamatomisatie. De weefselmonsters worden ontleed met een enzymatische methode onder fysiologische condities gevolgd door destructie met achtereenvolgens waterstofperoxide en salpeterzuur.

2. Apparatuur

- 2.1 Atomaire absorptiespectrofotometer (AA-5, Varian Techtron, Melbourne, Australie) voorzien van vlam, simultane waterstof achtergrondcorrector (BC-6, Varian Techtron) en digitale uitleeseenheid (DI-30, Varian Techtron). De spectrofotometer is uitgerust met een Cd-holle-kathode lamp (Visimax, Instrumentation Laboratory Inc., Wilmington, Ma., V.S.) en een waterstof continue lichtbron (Varian Techtron).
- 2.2 Recorder (BD-8 multirange, Kipp en Zonen, Delft).
- 2.3 Waterbad (Thermomix 1441 BKU, B. Braun, Melsungen, West-Duitsland).
- 2.4 Laboratoriumcentrifuge (Labofuge 6000, Heraeus Christ, Osterode am Harz, West-Duitsland).
- 2.5 Vortex mixer (Scientific Industries Inc., Queens Village, V.S.).
- 2.6 Variabele pipet 1,5 ml (Pipetman P 5000, Gilson France S.A., Villiers-le-Bel, Frankrijk) voorzien van polypropyleen wegwerptips (C 6000, Gilson).
- 2.7 Variabele pipet 0,1-1 ml (Pipetman P 1000, Gilson) voorzien van polypropyleen wegwerptips (C 200, Gilson).
- 2.8 Variabele pipet 0,05-0,2 ml (Pipetman P 200, Gilson) voorzien van polypropyleen wegwerptips (C 20, Gilson).
- 2.9 Polystyreen buizen (26 ml) met polyethyleen stoppen (Greiner B.V., Alphen a/d Rijn).
- 2.10 Polystyreen buizen (12 ml) met polyethyleen stoppen (Greiner).
- 2.11 Polystyreen buizen (6 ml) met polyethyleen stoppen (Greiner).
- 2.12 Polyethyleen potten (250 ml) met idem schroefdeksels (Emergo B.V., Landsmeer).

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 3 van 10

880310

3. Chemicaliën

- 3.1 Antibiotica-oplossing (5.000.000 E penicilline (Mycofarm), 5 g streptomycine (Mycofarm) en 13 mg fungizone (Gibco) per 750 ml water; nr W.1150, RIVM).
 - 3.2 Cd-standaard (1.000 g; Titrisol, E.Merck, Darmstadt, West-Duitsland).
 - 3.3 Collagenase Type I (Clostridiopeptidase A; nr. C 0130, Sigma Chem. Co., St. Louis, Ma., V.S.).
 - 3.4 Protease Type VIII (Subtilopeptidase A, Subtilisin Carlsberg, nr. P 5380 Sigma).
 - 3.5 Salpeterzuur Spectrosol d - 1,42; 71,63 % (g/v) (BDH Chemicals, Poole, Engeland).
 - 3.6 Triton X-100 fuer die Gas-Chromatographie (E. Merck).
 - 3.7 Water, gedestilleerd in glas vanuit alkalische permanganaatoplossing.
 - 3.8 Waterstofperoxide Perhydrol (30 %) (E. Merck).
- N.B. Enzymen en antibiotica-oplossing dienen bij -20 °C bewaard te worden.

4. Referentie-oplossingen en reagentia

Oplossingen van Cd-zouten in water dienen bereid en bewaard te worden bij een pH lager dan 2 ter voorkoming van adsorptie aan glaswanden (Stoepler en Brandt 1980). Bij het pipetteren en overbrengen van deze standaarden dienen uitsluitend pipetten met wegwerp polypropyleen pipettips gebruikt te worden.

4.1 Een Cd-voorraadoplossing van 5000 mg Cd/l wordt bereid door 1000 mg Cd (3.2) in een maatkolf van 200 ml over te brengen, 2 ml salpeterzuur (3.5) toe te voegen en met water (3.7) aan te vullen.

Deze oplossing is vrijwel onbeperkt stabiel bij +4 °C.

4.2 Een tussenverdunningsoplossing van 100,0 mg Cd/l wordt hieruit bereid door 2 ml van de voorraadoplossing (4.1) over te brengen in een maatkolf van 100 ml, 1 ml salpeterzuur (3.5) toe te voegen en met water (3.7) aan te vullen.

Deze oplossing is vrijwel onbeperkt stabiel bij +4 °C.

4.3 Een werkoplossing A van 6.00 mg Cd/l wordt hieruit bereid door 600 µl van de tussenverdunningsoplossing (4.2) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10), 100 µl salpeterzuur (3.5) toe te voegen en aan te vullen met 9,3 ml water (3.7).

Deze oplossing is een week stabiel bij +4 °C.

4.4 Een werkoplossing B van 10.00 mg Cd /L wordt bereid door 1,00 ml van de tussenverdunningsoplossing (4.2) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10), 100 µl salpeterzuur (3.5) toe te voegen en aan te vullen met 8,9 ml water (3.7).

Deze oplossing is een week stabiel bij +4 °C.

4.5 Een serie calibratiestandaarden voor de bepaling van cadmium in lever wordt dagelijks vers bereid door volumes van de werkoplossing A (4.3) van respectievelijk 50 (59,4 µg Cd/l), 100 (117,6 µg Cd/l), 150 (174,8 µg Cd/l), 200 (230,0 µg Cd/l), 300 (339,6 µg Cd/l) en 400 µl (444,4 µg Cd/l) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10) en aan te vullen met 2,5 ml water (3.7), 2,0 ml waterstofperoxide (3.8) en 0,5 ml salpeterzuuroplossing (4.7).

- 4.6 Een serie calibratiestandaarden voor de bepaling van cadmium in nieren wordt dagelijks vers bereid door volumes van de werkoplossing B (4.4) van respectievelijk 200 (0,741 mg Cd/l), 500 (1,667 mg Cd/l), 800 (2,424 mg Cd/l), 1000 (2,857 mg Cd/l), 1500 (3,750 mg Cd/l) en 2000 μ l (4,444 mg Cd/l) over te brengen in een 12 ml polystyreen buis (2.10) en aan te vullen met 1,25 ml water (3.7), 1,0 ml waterstofperoxide (3.8) en 0,25 ml salpeterzuuroplossing (4.7)
- 4.7 Een 50 procent (g/v) salpeterzuuroplossing wordt bereid door 100 ml salpeterzuur (3.5) toe te voegen aan 40 ml water (3.7).
- 4.8 Een 0,025 procent (g/v) Triton X-100-oplossing in 5 procent (g/v) salpeterzuur wordt dagelijks vers bereid in een polyethyleen pot (2.12) door 50 μ l Triton X-100 (3.6) met water (3.7) te verdunnen tot 180 ml en 20 ml salpeterzuuroplossing (4.7) toe te voegen.
- 4.9 Een benodigd volume enzymoplossing wordt dagelijks vers bereid door collagenase (4 mg/ml) (3.3) en protease (3 mg/ml) (3.4) in water (3.7) te suspenderen.

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 6 van 10

880310

5. Monstervoorbewerking

5.1. Enzymatische ontleding en destructie

In een tevoren nauwkeurig gewogen (op 4 decimalen = gew.A) polystyreen buis (12 ml, 2.10) met polyethyleen stop wordt ongeveer 0,5 g lever of nier (natgewicht) ingebracht. De buis met inhoud wordt nauwkeurig op vier decimalen gewogen (= gew.B).

Aan het monster wordt 2 ml enzymoplossing (4.9) en 40 μ l antibiotica-oplossing (3.1) toegevoegd. De buis wordt afgesloten en gedurende 16 uur (overnacht) in een waterbad bij 37 °C geplaatst totdat het monster volledig is ontleed en een dunvloeibare suspensie van weefsellysaat is verkregen. Indien na krachtig schudden het weefsel nog onvoldoende is gelyseerd, wordt het monster nog gedurende 1 uur in een waterbad van 45 °C geplaatst. Na afkoelen worden met een injectienaald gaten in de polyethyleen stoppen geprikt, om drukopbouw tijdens de verdere destructie te vermijden. Vervolgens wordt aan het weefsellysaat 2 ml waterstofperoxide (3.8) toegevoegd en wordt het mengsel gedurende 6 uur in waterbad van 60 °C geplaatst. Aan het destruaat wordt vervolgens 0,5 ml salpeterzuur (4.7) toegevoegd en het monster wordt gedurende 1 uur in een waterbad van 60 °C geplaatst totdat een volledig heldere oplossing is verkregen. Het destruaat wordt gewogen (op vier decimalen = gew.C) en het volume hiervan wordt numeriek gelijkgesteld aan het gewicht (gew.C - gew.A) van de oplossing.

5.2. Lever

In een polystyreenbuis (6 ml, 2.11) worden achtereenvolgens 1,0 ml leverdestruaat en 2,0 ml Triton X-100-oplossing (4.8) gebracht. Het mengsel wordt gedurende 1 min krachtig gevortext (2500 tpm) en vervolgens gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 4000 tpm (max 2500 g).

Calibratiestandaarden worden op analoge wijze in bewerking genomen door, in plaats van 1,0 ml destruaat, 1,0 ml van de respectievelijke calibratiestandaard (4.5) te nemen.

Indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing te hoog is voor de calibratielijn, wordt het destruaat voorafgaand verdund.

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 7 van 10

880310

5.3. Nier

In een polystyreenbuis (6 ml, 2.11) worden achtereenvolgens 0,3 ml nierdestruaat en 3,0 ml Triton X-100-oplossing (4.8) gebracht. Het mengsel wordt gedurende 1 min krachtig gevortext (2500 tpm) en vervolgens gedurende 10 min gecentrifugeerd bij 4000 tpm (max 2500 g).

Calibratiestandaarden worden op analoge wijze in bewerking genomen door, in plaats van 0,3 ml destruaat, 0,3 ml van de respectievelijke calibratiestandaard ~~te~~ te nemen.

Indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing te hoog is voor de calibratielijn, wordt het destruaat voorafgaand verdund.

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 8 van 10

880310

6. Atomaire absorptiespectrofotometrie

Er wordt een meetserie samengesteld bestaande uit 6 calibratiestandaarden en 14 monsters. De standaarden en monsters worden van opeenvolgende buisnummers voorzien. De buizen worden geanalyseerd in een aselechte volgorde die met behulp van een daartoe ontwikkeld computerprogramma wordt bepaald.

De verstuiving (5 ml/min) van de supernatant van het monster vindt plaats in een oxiderende acetyleen/perslucht vlam. De absorptie wordt gemeten bij 228,8 nm bij een spectrale bandbreedte van 0,33 nm (dit komt overeen met een spleetbreedte van 100 μm). Na elk monster wordt gedurende telkens 10 sec een Triton X-100 oplossing (4-8) verstoven. De absorptie wordt continu geregistreerd op een recorder (lever: 1,0 mV-stand; nier: 5 mV-stand).

De absorptie van de nierdestruaten en bijbehorende calibratiestandaarden wordt afgelezen op de digitale uitleeseenheid. De absorptie van de leverdestruaten en bijbehorende calibratiestandaarden wordt gerelateerd aan de recorderuitslag.

7. Calibratie

Het verband tussen de cadmiumconcentratie in de calibratiestandaard (onafhankelijke variabele) en de respons uitgedrukt in piekhoogte (afhankelijke variabele) wordt berekend met behulp van lineaire regressieanalyse. De verkregen regressielijn wordt gebruikt voor de berekening van de cadmiumconcentratie in onbekende monsters. De precisie van de methode wordt aangegeven door de standaardfout van de calibratielijn uitgedrukt als percentage van de gemiddelde respons (relatieve standaardfout). De gemiddelde respons komt overeen met de waarde van de afhankelijke variabele in het zwaartepunt van de calibratielijn, waar de onafhankelijke variabele gelijk is aan de gemiddelde concentratie. In dit punt vertoont de absolute standaardfout een minimum.

De concentratie Cd in lever of nier wordt bepaald met behulp van de volgende formule:

$$\text{gehalte Cd (mg/kg)} = \frac{\text{concentratie Cd} \times \text{destruaatvolume} \times \text{verdunningsfaktor}}{\text{weefselgewicht} \times 1000}$$

waarin: concentratie Cd : cadmiumconcentratie ($\mu\text{g/l}$) in de meetoplossing,
 destruaatvolume : gew.C (g) - gew.A (g),
 weefselgewicht : gew.B (g) - gew.A (g) en
 verdunningsfaktor : verdunningsfaktor van het destruaat indien de cadmiumconcentratie in de meetoplossing te hoog is voor de calibratielijn (zie 5.2 en 5.3)

cadmium in nieren en levers

SOP nr. ARO/028

Pag. 10 van 10

880310

8. Referentie

Stoeppler M, Brand K. Contributions to automated trace analysis. Part V. Determination of cadmium in whole blood en urine by electrothermal atomic-absorption spectrophotometry. Fresenius Z Anal Chem (1980); 300:372 - 380.