

Slutrapport för projektet

Snabbmetod för kadmium bestämning i samband med falltalsmätning.

Projektledare: Fredrik Winquist , S-SENCE, Linköpings Universitet.

Bakgrund till projektet

Det finns ett allmänt stort intresse för att mäta kadmium halter i cerealia produkter, och som har ökat markant under de senaste åren, då hälsoriskerna uppmärksammats i en serie rapporter (Eriksson, 2009) och i nyhetsmedia.

Orsaken till att just kadmium anses speciellt hälsofarlig anses vara att höga halter kan ge benskörhet och störa njurfunktionen. Kadmium anses kunna utgöra en hälsorisk även vid de låga koncentrationer som den förekommer i svensk mat då kadmium ackumuleras i kroppens inre organ samt har en mycket lång halveringstid, c:a 30 år. Detta innebär att även ett mycket ringa dagligt intag på sikt leder till en stor ackumulering av kadmium. Många åkrar i Sverige har höga halter av tungmetaller. Speciellt bly och kadmium har visat sig förekomma på stora åkerarealer, och mätningar i spannmål från dessa jordar har visat så höga kadmiumhalter att de ligger två till tre gånger högre än det hygieniska gränsvärdet. Mediankoncentrationen av kadmium i svenskt jordbruk är emellertid 0.23 mg/kg (Swedish National Environmental Agency Report), vilket anses vara en moderat nivå. Detta värde kan emellertid variera mycket mellan olika fält och även inom ett fält.

Kadmiumproblemet har uppmärksammats i Sverige sedan flera decennier och åtgärder har vidtagits för att minska tillförsel via konstgödning, vilket har varit framsynt, då hälsoeffekterna idag snarare framstår som allvarligare än tidigare ansetts.

Uppskattningsvis 80% av kadmiumintaget kommer från vegetabilier, framför allt från cerealiaprodukter, där vete har en speciell position då det innehåller något högre koncentrationer kadmium jämfört med andra cerealier, samt är en viktig basföda och utgångsprodukt till många livsmedel. Mediumhalten av kadmium i vete varierar mellan 0.04 – 0.05 mg/kg, med stora individuella variationer mellan 0.010 – 0.1 mg/kg. Gränsvärdet ligger på 0.2 mg/kg, men kommer troligtvis att skärpas i framtiden.

Uppenbarligen bör det vara en mycket stor fördel att kunna mäta kadmium direkt vid leverans av cerealia, dels för att utesluta leveranser med för höga kadmiumhalter, men även för att kunna få en geografisk fördelning av kadmiumhalter i cerealia.

Ett antal olika metoder för bestämning av kadmium och bly har utvecklats, som induktiv plasma-mass spektroskopi, atom adsorption spektroskopi (Eriksson 1999, Emons 2000). Dessa metoder är dock dyrbara, i storleksordningen 400 – 500 kr/analys. Det finns alltså ett stort behov av billigare och snabbare analyser av kadmium (och andra tungmetaller) på analyslaboratorier. Elektrokemiska metoder erbjuder ett mycket intressant alternativ, då de är enkla, kan göras mycket känsliga och snabba. Metoden baserar sig på anodisk stripping voltmetri, där metaller i lösning reduceras och elektropläteras på en elektrod och därefter strippas tillbaka till lösningen. Då detta innebär ett koncentrerings steg, kunde metoden göras mycket känslig.

Tidigare mätningar

Projektansvarig har tidigare erhållit medel från VL samt SLF för ett projekt som syftade till att utveckla och utvärdera en snabbmetod för kadmiumanalys i jordextrakt, jord samt mjöl. Metoden baserade sig på anodisk stripping voltammetri. Vid analyser av dessa komplexa prover erhöles komplicerade och överlagrade strömspektra, vilka dock med stor framgång kunde analyseras med multivariat data analys. Två mätförfarande utvecklades, ett baserat på en probe för direktmätning i vätska, samt ett baserat på ett genomflödessystem som möjliggjorde automatiska mätningar på upp till 8 olika prover. Dessa system kunde mäta kadmiumhalter i jordextrakt (ammonium-laktat respektive salptersyra) ner till en koncentration av 0.1 uM. Detta arbete har även publicerats i Precision Agriculture (Winquist et al, 2009).

Jämfört med konventionella elektrokemiska metoder skiljer sig denna på två punkter, dels används en guldelektrod, som har visat sig ha unika egenskaper för kadmium mätningar (metallen amalgamiserar i ett tunt ytskikt på guldytan och kan därför väsentligt koncentreras), dels att utvärderingen sker med multivariat data analys. Ytterligare en fördel med systemet att en konventionell referens elektrod (som kräver en hel del underhåll) ej är nödvändig.

Kadmium analys på mjöl och stärkelselösning (från falltals mätning) utfördes även, men visade dålig precision. Detta beror på att kadmium i dessa prover delvis är komplexbundet till olika proteiner i provet, och därför delvis oåtkomligt vid den anodiska stripping analysen.

Projekt mål

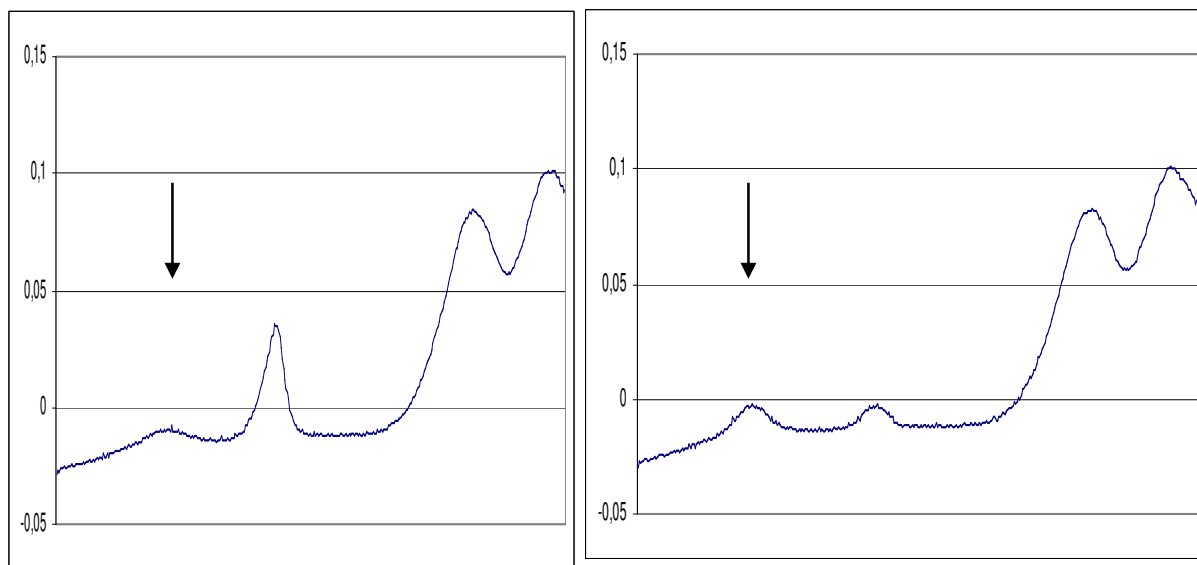
I detta projekt skall den tidigare utvecklade metoden för kadmiumanalys av jord vidare utvecklas där slutmålet är ett färdigt instrument, som skall kunna användas för bestämning av kadmium i mjöl eller i samband med falltalsbestämning. Metoden skall medge en känslighet under gränsvärdet för kadmium och kunna utföras under fem minuter.

Projektarbete och resultat

Projektet delades in i tre delar: ett provbearbetningsteg, där extraktionsdelen utvecklas, ett analyssteg, där den elektrokemiska analysen utvecklas och ett slutligt implementeringsteg, då ett användbart system skall utvecklas.

Projektarbetet inleddes med att vidareutveckla och optimera den elektrokemiska analysen. Det har vid tidigare mätningar visat sig att många parametrar inverkar, provets pH, befintliga joner i provet, provets jonledningsförmåga etc, vidare potentialer samt tid för elektroplätning. Lämpliga försöksbetingelser för standardlösning av kadmium bestämdes, dessa betingelser användes sedan för mätningar på mjöl och stärkelselösning. Det konfirmerades även att slipning av elektrodytan mellan mätningar var essentiell. För analys av voltammogram kan man använda ett enkelt skan eller differentiell puls voltammetri, det senare förfarandet ger ofta bättre resultat, men då det är mer komplicerat används enkelt skan vid optimeringarna.

Vid tidigare mätningar har komplexbildaren EDTA används för att frisätta kadmium, men med tveksamma resultat. Det beslöts att ändå försöka ytterligare utveckla metoden genom att kombinera med chelaterande ämnen för att försöka hitta en balans, där EDTA var tillräckligt aktiv för att frisätta kadmium, men inte band kadmium så hårt att elektrokemisk analys var omöjlig. Efter ett antal försök visade det sig att citronsyra, oxalsyra samt EDTA i lämpliga proportioner gav bra resultat. I figur nedan visas effekt av komplexbindaren EDTA. Toppen där kadmium strippas ut är markerad med pilar.



Stärkelselösning spikad med 5 µM Cd

Stärkelselösning spikad med 5 µM Cd, EDTA samt citronsyra och oxalsyra

Intressant är att en topp blir mindre men framför allt att kadmium toppen blir större. Detta beror (troligtvis) på att EDTA dels frisätter kadmium, dels maskas en metalljon (troligtvis järn) även av citron och oxalsyra.

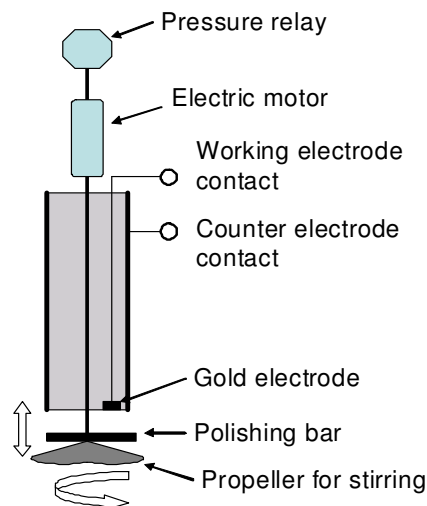
För applikationen att mäta kadmiumhalt i mjöl är normalt mätområde 0.02 – 0.5 mg Cd/kg mjöl, vilket i stärkelselösning motsvaras av 0.1µM – 2.5µM Cd. Ur graferna ovan kan uppskattas en känslighet som bör vara tillfredställande för applikationen. Det är även viktigt att notera att vid dessa optimeringsexperiment är de experimentella betingelserna inte optimerade, vilket innebär att känsligheten bör kunna ytterligare ökas.

Proben

I nästa skede av projektet utvecklades en speciell för ändamålet anpassad probe, utrustad med en guldelektrod och ett polersystem., se figur nedan. Genom proben går en axel (kopplad till en elektrisk motor), som dels sköter omrörning av mätmediet, dels polerar genom att axeln kan förskjutas i höjdlid genom ett dragrelä. Proben är ansluten till en potentiostat samt en dator.

Mätstrategi

Det är svårt att genomföra direkta mätningar av kadmium i spannmålsprover, vilket beror på att metallen binder hårt till olika typer av proteiner samt föreningar som inositol trifosfat. Ett mildt och enkelt sätt att frisätta metallen är att tillsätta komplexbildare som EDTA vid optimalt pH (för kadmium omkring 7.0), därigenom rycks metallen ur greppet.



Mätproben

Även chelaterande föreningar som citronsyra, oxalsyra och vinsyra kan användas på samma sätt. Antal olika metaller mellan proverna varierar åtskilligt, detta chelaterande steg är därför viktigt för att maska bort dessa. Vinsyra är speciellt intressant då det binder starkt till järn som normalt finns i höga koncentrationer. Vid den efterföljande elektrokemiska analysen sänks pH, vilket innebär att både komplexerande och chelaterande effekter minskas och möjliggör att kadmium blir åtkomlig för mätning.

Optimering av tillsatta mängder chelaterande och komplexerande föreningar utfördes, och bästa analytiska förhållanden uppstod när EDTA tillsattes provlösningen vid pH 7.0, inkuberades under en minut, därefter tillsattes EDTA, citron-, oxal- samt vinsyra, samt salpetersyra till ett pH 2.7. Elektrokemiska mätningar med mätproben startade sedan direkt i denna lösning.

Mätförfarandet börjar med att applicera en potential på arbetselektroden, då metall elektropläteras, därefter strippas metallen ut genom att gradvis öka potentialen i positiv riktning. Lämpliga försöksbetingelser var att använda en guldelektrod, plätera under 3 min vid en potential på -1.3V, därefter utstripping från -1.3 – 0.7V under 1.9 sek. Provlösningen innehöll även en stödelektrolyt, 0.1M KNO₃.

För att minimera ospecifika signaler, börjar en analys med att bara under en kort tid (10 sek) applicera elektropläteringspotentialen innan strippningen, detta medför att inga större mängder metall elektropläteras, detta medför ett resultat utan metallsignal. Därefter upprepas proceduren, men nu med normal tid för elektropläteringen. Detta resultat subtraheras sedan från det första resultatet, skillnaden är då bara orsakad av elektropläterad metall.

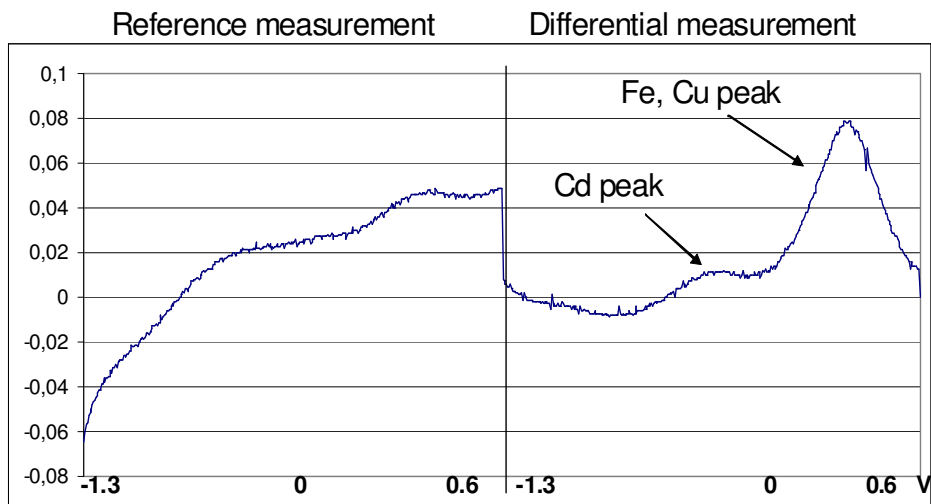
Då signalerna är komplexa erhålls komplicerade och ofta överlagrade strömspektra, vilka dock kan analyseras med multivariat data analys, som projektion till latent struktur, PLS. Man kan då göra en matematisk kalibreringsmodell från ett set träningsdata, som sedan kan användas för

prediktion av nya data. Prediktionsfelet ges av RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction). Ett användbart sätt att kunna utvärdera modellens validitet är att beräkna modellens RPD (Relative Predicted Deviation) värde, som är definierat som standardavvikelsen för hela data mängden dividerad med standardavvikelsen för prediktionen. För en användbar modell, bör detta värde vara större än 2.

Ett stort antal mätningar utfördes både på rena mjölprover samt falltalslösning, tyvärr noterades en dålig precision på de senare proverna, vilket troligtvis beror på att förfarande är mer omständligt, förorenat med enzym samt utförs i glaskärl, varvid metall förmodligen absorberas. Vidare kan noteras att mätning på rent mjöl är en mycket enkel metod. Detta medförde att mätningarna i fortsättningen enbart utfördes på rent mjöl.

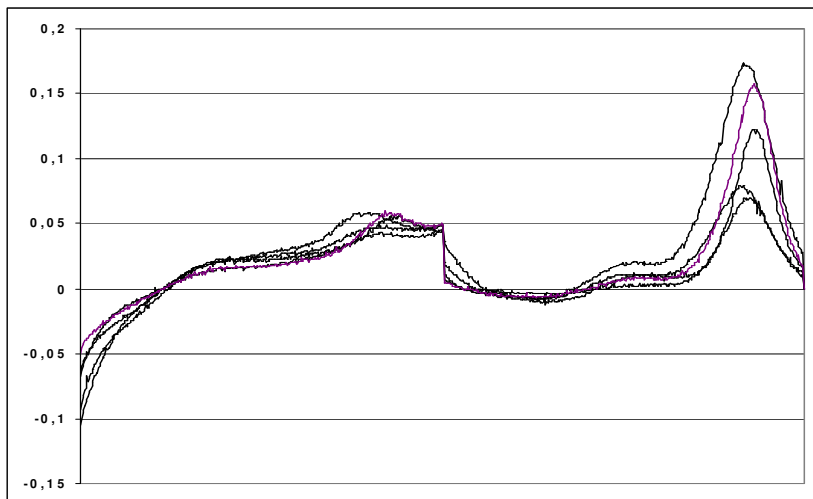
Resultat

Prover av vetemjöl erhöles generöst från SW Seed, tillsammans 11 st. Dessa var analyserade på en rad metaller, framför allt de viktigaste, kadmium, aluminium, koppar samt järn. Kadmiumhalten varierade från 0.011 – 0.172 mg/kg. Av dessa spikades 7 st genom extra tillsats av kadmium, så tillsammans analyserades 18 prover. Ett typiskt voltammogram för ett prov med 0.09 mg Cd/kg visas i nästkommande figur. Den vänstra delen visar referensmätningen, dvs utan metallsignal, den högra den subtraherade signalen, som bara visar metallsignaler (utan bakgrund). Kadmium, koppar och järntopparna syns tydligt.



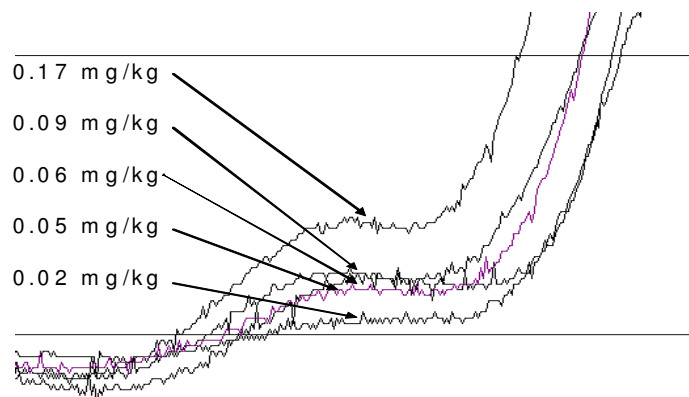
Ett voltammogram från ett mjölprov

Resultat från fem olika prover visas i nästa figur nedan.



Sammanlagt fem olika överlagrade voltammogram

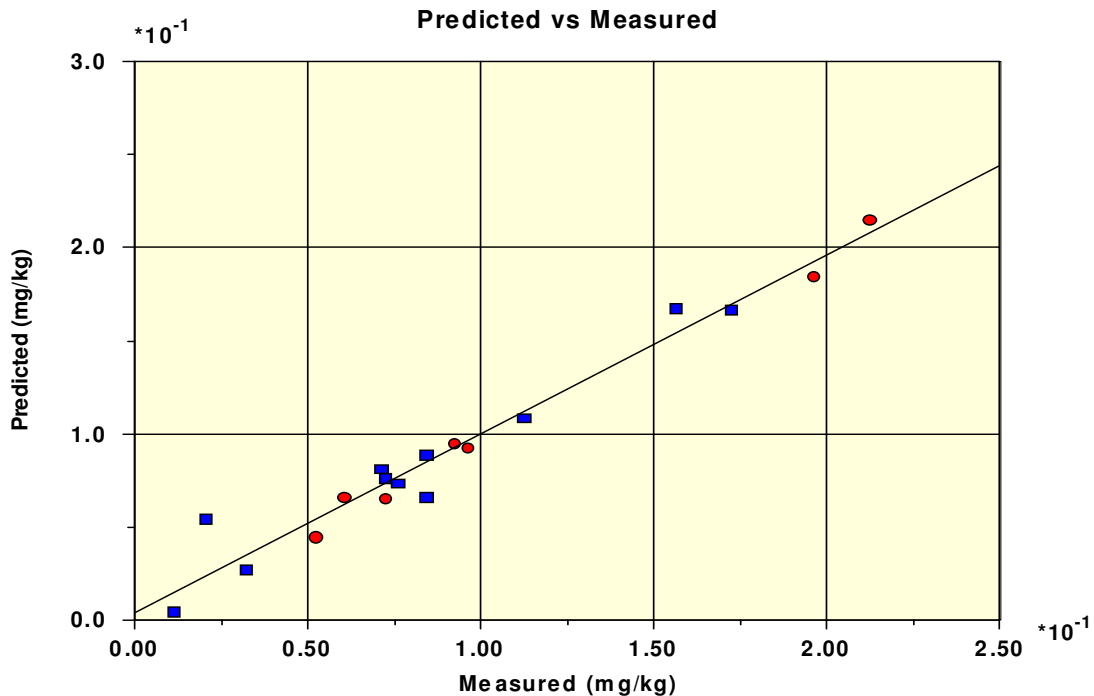
Kadmiumkoncentrationerna varierade från 0.02 till 0.17 mg/kg, och motsvarande toppar kan tydligt ses. En förstoring av detta toppområde visas nedan.



En uppförstoring av kadmiumtopparna från den tidigare figuren

Från figuren ses tydligt att topphöjderna är väl korrelerade med motsvarande kadmiumkoncentrationer.

Resultat från alla 18 prov behandlades även med PLS modellering. I dessa prov befanns även de spikade proverna. Korsvaliderade data från denna mätserie visas i figur nedan för predikterade värden mot sanna värden. Spikade prover är representerade med röda cirklar. RMSEP är 0.019 mg/kg och RPD är 3.56, vilket visar att modellen kan prediktera kadmium väl i detta koncentrationsområde.



I tabell nedan visas de spikade proverna med motsvarande predikterade värden, alla i mg/kg, samt felprocent.

Cd i prov	Tillsatt Cd	Cd i spikat prov	Predikterad Cd	Fel %
0.076	0.020	0.096	0.100	104
0.172	0.040	0.212	0.210	99
0.020	0.040	0.060	0.054	90
0.072	0.020	0.092	0.089	97
0.156	0.040	0.196	0.208	106
0.032	0.020	0.052	0.059	113
0.032	0.040	0.072	0.080	111

Som kan ses ur tabellen, kan kadmium predikteras väl.

Att prediktionerna blir så bra antas bero på att en mycket stor informationspotential ligger i att en relativt specifik kadmiumtopp genereras. Den efterföljande data analysen får då ett stort inslag av univariata data, varvid den multivariata data analysen får en mer justerande funktion.

Slutsatser, framtida mätningar

Som visats har detta projekt lett fram till en användbar metod för bestämning av kadmiumkoncentrationer i mjöl. I projektansökan avsågs att mätning skulle ske på falltalslösning, så har dock inte skett, då dålig precision erhöles.

Den försöksuppställning som togs fram var visserligen en laboratorieuppställning, men mycket enkel med speciellt framtagen probe och elektronik. Det bör dock framhållas att trots allt har bara 18 prover analyserats, för att bli en etablerad metod bör ett mycket större antal prover undersökas.

Projektledaren har i dagarna fått en ny uppsättning prover från SW Seed. Dessa kommer, när tid så medges, att analyseras med avseende på kadmium.

Dessa resultat har även resulterat i en artikel "A fast and simple electrochemical method for determination of cadmium in wheat flour" som kommer att skickas in för publikation inom kort.

Referenser

Barregård et al, 1999. Environment Health Perspective 107; 867-871.

Eriksson, J. and Ledin, S. 1999. Changes in phytoavailability and concentration of cadmium in soil, Water, Air and Soil Pollution, 114, 171 – 184.

Eriksson J. 2009. Strategi för att minska kadmiumbelastningen i kedjan mark-livsmedel-människa, SLU rapport MAT21 nr1.

Emons, H., Baade, A. and Schöning, M.J. 2000. Voltammetric Determination of Heavy Metals in Microvolumes of Rain Water. Electroanalysis, 15, 1171-1176.

Winquist F., Krantz-Rülcker C., Olsson T. and Jonsson A. 2009 Measurement of cadmium in soil extracts using multivariate data analysis and electrochemical sensors. *Precision Agric* 10, 231-246.

Sammanfattning av slutrapport

Det finns ett allmänt stort intresse för att mäta kadmium halter i cerealia produkter, vilket har ökat markant under de senaste åren, då hälsoriskerna i en serie rapporter uppmärksammats. I ett tidigare projekt har en snabbmetod för kadmium analys i jordextrakt utvecklats. Metoden baserade sig på anodisk stripping voltammetri, kombinerad med multivariat data analys, och kadmiumhalter ner till en koncentration av 0.1 uM kunde detekteras. I nuvarande projekt har denna metod utvecklas vidare för bestämning av kadmium i rent mjöl. En speciell probe, utrustad med en guldelektrod och ett polersystem utvecklades, och mätförfarandet börjar med att applicera en potential på arbetelektroden, varvid metall elektropläteras, därefter strippas metallen ut genom att gradvis öka potentialen i positiv riktning. Genom att mäta ström, får man ett topp där metallen

oxideras. För att frisätta bundet kadmium tillsattes en komplexbindare (EDTA) samt chelaterande syror (citron-, oxal- samt vinsyra). pH sänktes därefter till 2.7 före analys. Sammanlagt 18 prover analyserades, där kadmiumhalten varierade från 0.011 – 0.172 mg/kg. Samtliga prover kunde predikteras väl med PLS-modellering, med RMSEP 0.019 mg/kg och RPD 3.56. Mätning på falltalslösning gav dålig precision.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Det finns ett allmänt stort intresse för att mäta kadmium halter i cerealia produkter, vilket har ökat markant under de senaste åren, då hälsoriskerna i en serie rapporter uppmärksammats. Uppskattningsvis 80% av kadmiumintaget kommer från vegetabilier, framför allt från cerealiaprodukter, där vete har en speciell position då det innehåller något högre koncentrationer kadmium jämfört med andra cerealier, samt är en viktig basföda och utgångsprodukt till många livsmedel. Mediumhalten av kadmium i vete varierar mellan 0.04 – 0.05 mg/kg, med stora individuella variationer mellan 0.01 – 0.10 mg/kg. Gränsvärdet ligger på 0.2 mg/kg, men kommer troligtvis att skärpas i framtiden.

Uppenbarligen bör det vara en mycket stor fördel att kunna mäta kadmium direkt vid leverans av cerealia, dels för att utesluta leveranser med för höga kadmiumhalter, men även för att kunna få en geografisk fördelning av kadmiumhalter i cerealia. I ett tidigare projekt har en elektrokemisk snabbmetod för kadmium analys i jordextrakt utvecklats. Elektrokemiska metoder erbjuder många fördelar, då de är enkla, kan göras mycket känsliga och snabba. Metoden baserade sig på anodisk stripping voltammetri, där metaller i lösning reduceras och elektropläteras på en elektrod och därefter strippas tillbaka till lösningen. Då detta innebär ett koncentrerings steg, kunde metoden göras mycket känslig, och kadmiumhalter ner till en koncentration av 0.1 μM kunde detekteras.

I detta nya projekt har denna metod utvecklats vidare för bestämning av kadmium i rent mjöl. En speciell probe, utrustad med en guldelektrod och ett polersystem utvecklades, och mätförfarandet börjar med att applicera en negativ potential på arbetselektroden, varvid i provet lösta metaller reduceras ut och elektropläteras på elektrodytan. Därefter strippas metallen ut genom att gradvis öka potentialen i positiv riktning. Genom att mäta ström mot spänning får man ett antal toppar i diagrammet där metaller oxideras.

För att optimera metoden utfördes initialt ett stort antal mätningar utfördes både på rena mjölprover samt falltalslösning. Kadmium är bundet till proteiner i provet och därför svåråtkomligt vid analys. För att frisätta metallen tillsattes en komplexbindare (EDTA) samt chelaterande syror (citron-, oxal- samt vinsyra), varefter pH sänktes till 2.7. För mätning på falltalsvätska erhöles dålig precision, vilket troligtvis beror på att detta förfarande är mer omständigt, förorenat med enzym samt utförs i glaskärl varvid metall förmodligen absorberas. Vidare kan noteras att mätning på rent mjöl är en mycket enkel metod. Detta medförde att mätningarna i fortsättningen enbart utfördes på rent mjöl.

För att minimera ospecifika signaler, börjar en analys med att bara under en kort tid applicera den negativa potentialen innan strippningen, då fås ett slutresultat utan metallsignal. Därefter upprepas proceduren, men nu med normal tid för elektroplätningen. Detta resultat subtraheras sedan från det första resultatet, skillnaden är då bara orsakad av mängd elektropläterad metall.

Då proverna är komplexa erhålls även komplicerade och ofta överlagrade strömspektra, utvärderingarna av dessa utfördes därför med en multivariat data analys metod, projektion till latent struktur, PLS.

Sammanlagt 18 prover av vetemjöl analyserades, med kadmiumhalter varierade från 0.011 – 0.172 mg/kg. De var även analyserade på en rad metaller, framför allt de viktigaste, kadmium, aluminium, koppar och järn. Samtliga prover kunde predikteras väl med PLS-modellering, och RMSEP var 0.019 mg/kg samt RPD var 3.56.

Det här projektet har visat på en användbar metod för bestämning av kadmiumkoncentrationer i mjöl. Den försöksuppställning som togs fram var visserligen en laboratorieuppställning, men med mycket enkel mätprobe och elektronik. Det bör dock även framhållas att trots allt har bara 18 prover analyserats, för att bli en etablerad metod bör ett mycket större antal prover undersökas.