

**Determinazione del piombo in sangue capillare mediante  
impiego di un microcampionatore automatico per forno  
di grafite**

CLAUDIO MINOIA, GIOVANNI CATENACCI, ADRIANA BARUFFINI  
e ALBERTO PRESTINONI

*II Cattedra di Medicina del Lavoro, Istituto di Medicina del Lavoro dell'Università di Pavia*

**Riassunto.** — Viene descritto un metodo per il dosaggio ematico del Pb in campioni capillari che utilizza la spettroscopia di assorbimento atomico versione « flameless » in connessione con un sistema di microcampionamento automatico.

Per le determinazioni sono sufficienti 50  $\mu$ l di sangue intero eparinizzato ottenuti mediante prelievo dal dito o dal lobo dell'orecchio.

La preparazione dei campioni alla analisi avviene in sede di prelievo e comporta la diluizione del campione raccolto nel rapporto 1:5 con soluzione acquosa di Silicone Antifoam allo 0,05 %.

Il confronto tra i valori di piombemia ottenuti per campioni capillari e venosi, prelevati negli stessi soggetti e nella medesima seduta di prelievo, ha fornito correlazioni altamente significative confermando le possibilità di impiego a livello routinario del metodo descritto.

**Summary** (*Lead automated microdetermination in capillary samples of blood by a flameless atomic absorption spectroscopy*). — A method for lead determination in capillary samples of blood based on flameless atomic absorption spectroscopy in connection with an automated microsampling system is described.

For such determinations 50  $\mu$ l of heparinized whole blood samples from the fingertip or from the ear lobe are sufficient.

Immediately after sampling blood is diluted in ratio 1:5 by an aqueous 0.05 % Silicon Antifoam solution.

Correlation between lead capillary from the same subjects and venous blood levels sampled from the same subjects and in the same sampling session is highly significant and well suited for routine clinical use.

## INTRODUZIONE

Il metodo di determinazione diretta del piombo nel sangue intero mediante spettroscopia di assorbimento atomico versione «flameless» è stato descritto da diversi AA. [1-3].

In alternativa, per minimizzare l'effetto matrice, si può procedere ad un pretrattamento del campione biologico operando una diluizione in rapporto 1:5 o 1:10 con soluzione acquosa di Triton X-100 [4-6]. A emolisi avvenuta, una microaliquota, in genere 25  $\mu$ l, viene iniettata in forno di grafite e sottoposta a specifico programma termico. Tra i parametri che influiscono in modo significativo sulla ripetibilità delle determinazioni risulta essere la posizione occupata, dopo ogni iniezione, dalla gocciolina di sangue all'interno della navicella di grafite. I risultati analitici che si possono ottenere, se l'operatore non è particolarmente addestrato, rischiano quindi di diventare estremamente soggettivi ed influenzabili da un elevato numero di variabili. Sulla base di queste considerazioni e ritenendo utile in determinate situazioni la possibilità di eseguire prelievi capillari, ci siamo proposti di sperimentare l'uso di un microcampionatore automatico per forno di grafite onde verificare la sua eventuale adattabilità alla analisi dei liquidi biologici e la sua influenza sulla ripetibilità delle determinazioni. A questo scopo è stato messo a punto un micro-metodo per la determinazione del piombo in campioni di sangue capillare, la esecuzione del quale richiede una quantità di sangue intero compresa tra 25 e 100  $\mu$ l. Prima della descrizione del metodo verranno riportati e discussi i criteri da noi adottati nella esecuzione del micro-prelievo (effettuabile al dito o al lobo dell'orecchio) con analisi dei vantaggi e delle limitazioni derivanti dall'uso di capillari tarati o di micropipette a puntale intercambiabile; particolare attenzione verrà rivolta alle modalità di prelievo e al controllo qualità del materiale utilizzato nel corso della intera procedura.

A conferma della validità del metodo verranno riportati i risultati del confronto tra i dati ottenuti con il prelievo venoso e quelli ottenuti con il prelievo capillare dal dito e dall'orecchio degli stessi soggetti, nella medesima seduta di prelievo.

La specificità delle determinazioni eseguite in assorbimento atomico su campioni di sangue venoso è stata verificata mediante impiego della voltammetria di strippaggio anodico.

## MATERIALI E METODI

*Apparecchiature utilizzate*

Le determinazioni in spettroscopia di assorbimento atomico sono state effettuate utilizzando un A.A. mod. 420 Perkin Elmer equipaggiato con cor-

rettore di fondo al deuterio, forno di grafite HGA-76 Perkin Elmer e relativo campionatore automatico modello AS-I.

Le registrazioni sono state effettuate utilizzando un Perkin Elmer Hitachi Recorder mod. 056. È stato anche impiegato un modello ESA 3010 A per le determinazioni in strippaggio anodico, con relativo kit per il dosaggio del Pb ematico.

### *Sistemi di microcampionamento.*

Per la esecuzione dei prelievi capillari sono state utilizzate lancette sterili Feather, micropipette Eppendorf da 25  $\mu$ l e 50  $\mu$ l con relativi puntali intercambiabili. Alternativamente è stato impiegato un kit ESA costituito da lancette sterili, garze, cartine imbevute di alcool isopropilico e capillari eparinizzati.

Tutto il materiale utilizzato nel campionamento capillare è stato precedentemente sottoposto a controllo di qualità onde accertare l'assenza di contaminazioni da Pb.

I micropuntali intercambiabili sono stati eparinizzati pochi istanti prima delle operazioni di prelievo mediante aspirazione ripetuta di soluzione di eparina Vister al 10 %. Per la raccolta dei campioni di sangue capillare, in quest'ultimo caso, sono stati utilizzati microcontenitori a fondo conico da 1200  $\mu$ l, in materiale plastico, muniti di tappo a vite e inseribili nella piastra rotante dell'AS I.

Antecedentemente al loro impiego i microcontenitori sono stati posti in bagno di  $\text{HNO}_3$  al 10 % per 24 ore. Dopo ripetuti lavaggi con  $\text{H}_2\text{O}$  distillata sono stati lasciati ad asciugare a temperatura ambiente.

In ciascuno di essi sono stati introdotti 200  $\mu$ l di soluzione acquosa di Silicone Antifoam allo 0,05 %.

I prelievi di sangue venoso sono stati raccolti in provette da 5 ml contenenti eparina come anticoagulante (LP italiana).

### *Esecuzione del microprelievo.*

Il prelievo è stato effettuato in alcuni soggetti dal dito, in altri dal lobo dell'orecchio, dopo pulizia e disinfezione accurata della parte interessata. I prelievi dal dito sono stati eseguiti secondo le seguenti modalità:

- lavaggio con acqua saponata calda e trattamento con soluzione di EDTA (25 g/l) servendosi di una spruzzetta;
- risciacquo con acqua bidistillata asciugando poi con garza;
- frizionamento con cartina imbevuta di alcool isopropilico o etere dietilico per facilitare l'afflusso di sangue.

È stata incisa la parte periferica del polpastrello del dito anziché la parte centrale più callosa allontanando la prima gocciolina di sangue e prelevando immediatamente dopo 50  $\mu$ l di sangue. In questa delicata fase di prelievo si è evitata la «spremitura del dito» che avrebbe potuto provocare diluizioni del sangue con i liquidi tissutali e quindi alterazione dei valori di piombemia.

Nei casi in cui il prelievo è stato effettuato dal lobo dell'orecchio le operazioni di lavaggio hanno potuto essere ridotte e si sono utilizzati indifferentemente etere dietilico o alcool isopropilico per le operazioni di frizionamento.

Complessivamente sono stati analizzati 107 campioni di sangue venoso e capillare (corrispondenti questi ultimi a 62 prelievi dal dito e a 45 prelievi dall'orecchio), prelevati in ogni soggetto nella stessa seduta.

#### *Reattivi.*

- Silicone Antifoam (BDH), soluzione allo 0.05 % in  $H_2O$ ;
- etere dietilico (BDH);
- EDTA, sale bisodico (Shilling): sciogliere 25 g di sale in 1000 ml di  $H_2O$ ;
- piombo nitrato (BDH).

#### *Condizione dell'analisi*

50  $\mu$ l di sangue intero eparinizzato, provenienti dal microcampionamento capillare sono stati introdotti nel microcontenitore contenente 200  $\mu$ l di soluzione acquosa. Dopo capovolgimento ripetuto per favorire l'emolisi delle emazie la soluzione è stata mescolata per 30 sec per completare la fase di omogeneizzazione.

I campioni così preparati sono stati collocati su apposito disco portacampioni. Il bianco dei reattivi è stato preparato ogni 5 campioni di sangue, dopo eparinizzazione del micropuntale, aspirando 50  $\mu$ l di  $H_2O$  bidistillata.

Il trasporto dei campioni al laboratorio è stato effettuato con apposita borsa frigorifera per evitare sbalzi termici che avrebbero potuto comprometterne la conservazione.

Una volta pervenuto al laboratorio il disco portacampioni è stato inserito sul campionatore automatico ed è stata iniziata la procedura analitica.

Per evitare fenomeni di decantazione e di eterogeneità è apparsa indispensabile l'agitazione dei campioni su Vortex per 5-10 sec immediatamente prima dell'inizio dell'analisi.

Sono di seguito riportati i parametri termici da noi utilizzati per le analisi in forno di grafite:

- evaporizzazione 0-120 °C per 15 sec; 120 °C per 20 sec;
- incenerimento: 525 °C per 35 sec;
- atomizzazione: 2350 °C per 8 sec.

### RISULTATI

La curva di taratura è risultata lineare nell'intervallo 0 - 180  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  di Pb. L'aggiunta di Pb in quantità note a campioni di sangue ha fornito, nell'intervallo di concentrazione 0 - 150  $\mu\text{g} / 100\text{ ml}$ , percentuali di recupero comprese fra il 97,8 % e il 101,2 %.

La specificità delle determinazioni in A.A. è stata verificata analizzando in doppio 96 campioni di sangue venoso, sia mediante analisi diretta in forno di grafite (secondo la procedura descritta), sia mediante impiego della voltammetria di strappaggio anodico. La correlazione fra i risultati ottenuti con le due tecniche è risultata altamente significativa ( $r = 0,931$ ).

Il grado di precisione analitica ottenibile con il campionatore automatico nei confronti della tecnica di iniezione convenzionale è stato valutato analizzando ripetutamente, per 2 volte consecutive e in doppio, 5 campioni di sangue a vari livelli di concentrazione.

I dati di confronto sono riportati in Tab. 1.

TABELLA 1

**Precisione del metodo: confronto  
tra campionamento automatico  
e manuale**

| N.<br>determi-<br>nazioni | Pb emia<br>$\mu\text{g}/100\text{ ml}$ | C.V.<br>Camp.<br>Automatico<br>% | C.V.<br>Tecn.<br>manuale<br>% |
|---------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| 11                        | 14                                     | 1,7                              | 3,3                           |
| 11                        | 27                                     | 1,1                              | 2,9                           |
| 11                        | 47                                     | 1,0                              | 1,8                           |
| 11                        | 54                                     | 1,2                              | 1,9                           |
| 11                        | 78                                     | 1,4                              | 2,4                           |

I valori di piombemia ottenuti mediante determinazione su sangue capillare sono stati confrontati con quelli ottenuti, negli stessi soggetti e nella medesima seduta di prelievo, su sangue venoso. A questo scopo si è ritenuto opportuno suddividere i soggetti esaminati in 2 classi, individuate in base alla concentrazione del piombo nel sangue venoso. La prima classe raggruppa i valori di piombemia  $\leq 39 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ; la seconda classe i valori di piombemia  $\geq 40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

Sui dati totali e sulle 2 classi, si è quindi proceduto all'analisi della correlazione e della regressione.

Per quanto riguarda i dati totali, si sono ottenuti i seguenti valori di concentrazione media del piombo:

—  $45,00 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ , con una deviazione standard di 27,23, sul prelievo venoso:

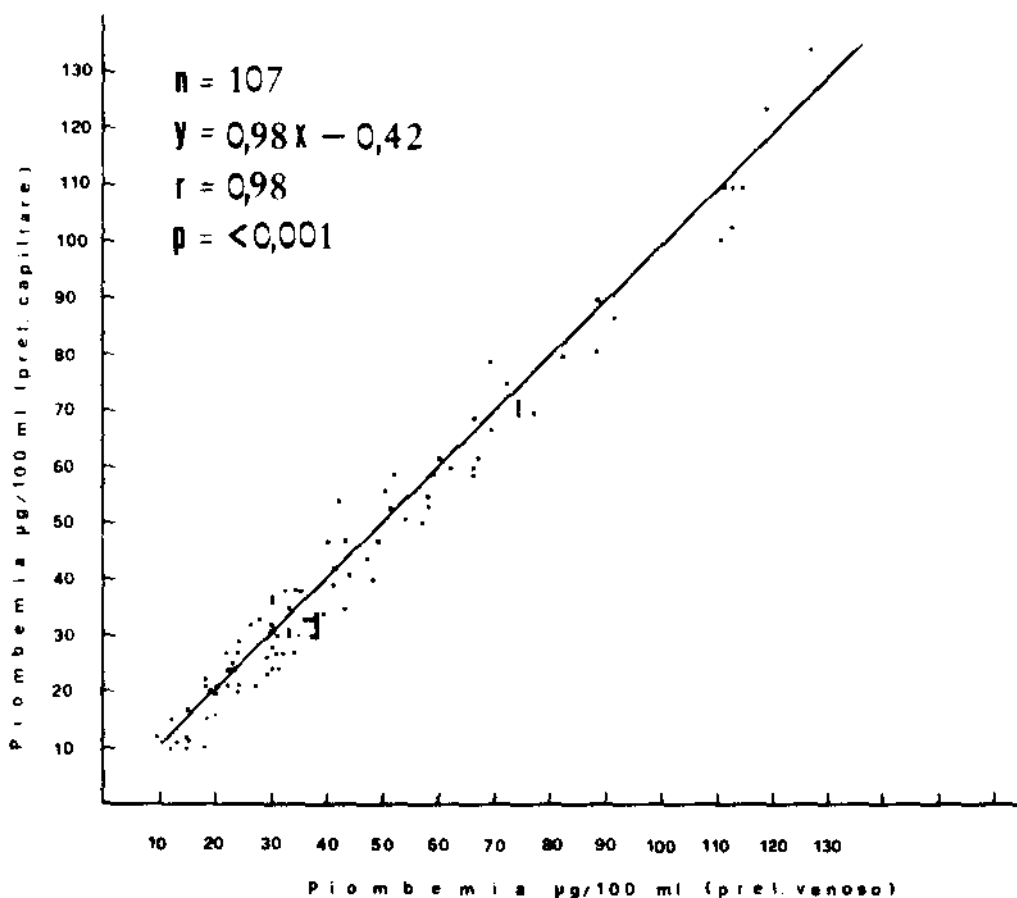


Fig. 1. — Regressione fra piombemia (prelievo venoso) e piombemia (prelievo capillare) nella totalità dei soggetti esaminati.

- 43,83  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ , con una deviazione standard di 27,18, sul prelievo capillare.

Il confronto statistico fra le medie (*t* di Student) ha dato i seguenti risultati:  $t = 2,61$ ;  $p < 0,01$ . La correlazione fra valori di concentrazione del piombo nel sangue venoso e nel sangue capillare è risultata statisticamente significativa ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ).

I risultati della correlazione e della regressione sono illustrati nel grafico di Fig. 1.

Per la classe a concentrazione di piombo nel sangue venoso  $\leq 39\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$ , si è ottenuta una piombemia media di  $26,83 \pm 8,17\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$  sul prelievo venoso, e di  $25,45 \pm 7,78\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$  sul prelievo capillare.

Il confronto fra le medie (*t* di Student) ha dato i seguenti risultati:  $t = 1,259$ ;  $p < 0,30$ . La correlazione fra le 2 serie di risultati è altamente significativa ( $r = 0,84$ ;  $p < 0,001$ ).

I risultati dell'analisi della correlazione e della regressione, relativi alla prima classe di valori, sono riportati in Fig. 2.

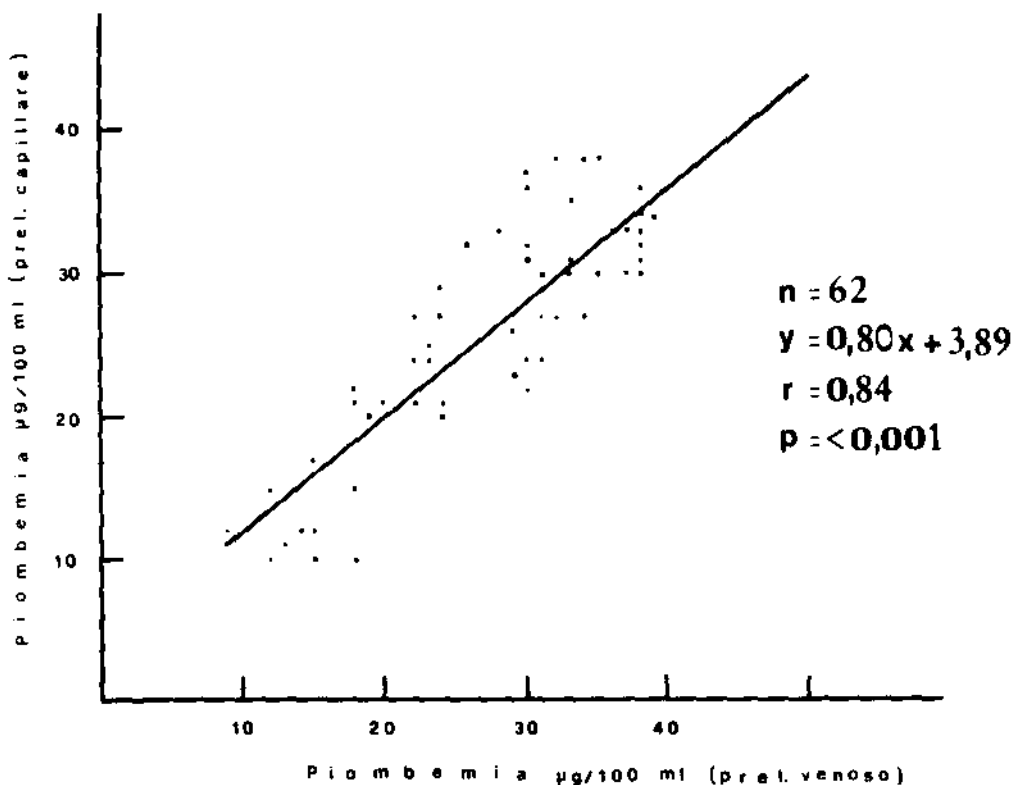


Fig. 2. — Regressione fra piombemia (prelievo venoso) e piombemia (prelievo capillare) nella classe di soggetti a concentrazione di piombo nel sangue venoso  $\leq 39\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$ .

Per quanto riguarda, infine, la classe a concentrazione di piombo nel sangue venoso  $\geq 40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ , i valori medi di piombemia ottenuti sul prelievo venoso e su quello capillare sono rispettivamente di  $70.02 \pm 24.27 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  e di  $68.93 \pm 24.12 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

Il confronto fra le medie ha dato i seguenti risultati:  $t = 1.34$ ;  $p < 0.20$ . La correlazione è risultata, anche in questo caso, altamente significativa ( $r = 0.97$ ;  $p < 0.001$ ).

I risultati della correlazione e della regressione, relativi alla seconda classe di valori, sono riportati in Fig. 3.

Confrontando i coefficienti di correlazione inerenti alle 2 classi di valori, si ottiene:  $t = 2.28$ ;  $p < 0.05$ .

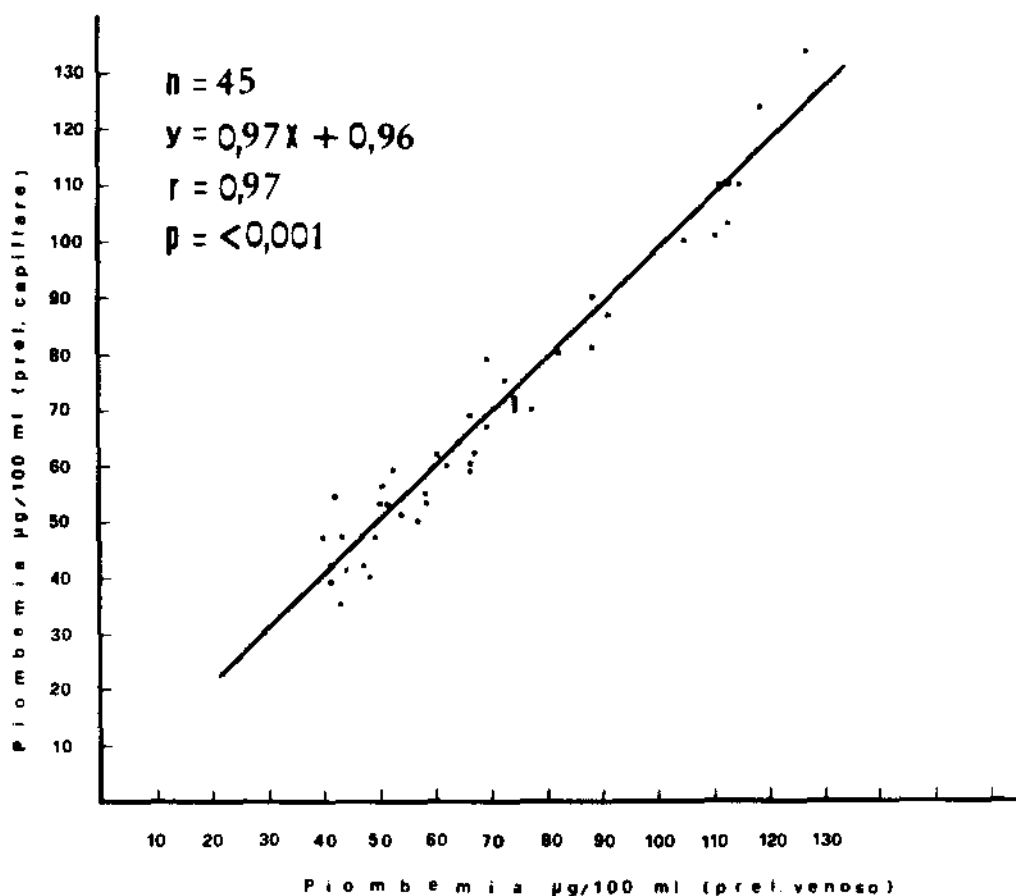


Fig. 3. — Regressione fra piombemia (prelievo venoso) e piombemia (prelievo capillare) nella classe di soggetti a concentrazione di piombo nel sangue venoso  $\geq 40 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

## DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano la significatività biologica del dosaggio del Pb su sangue capillare e nello stesso tempo permettono di verificare la totale assenza di contaminazioni durante l'esecuzione del microprelievo e durante la fase di preparazione all'analisi.

I dati di confronto tra il campionamento automatico e quello manuale evidenziano un sensibile miglioramento della ripetibilità analitica a favore del metodo automatizzato, con un coefficiente di variazione dell'1,1 % nell'ambito dei valori di concentrazione di Pb considerati normali per non esporli professionalmente.

Il sistema, durante il funzionamento, non richiede particolare attenzione da parte dell'operatore, fatta salva la sistematica sostituzione della navicella di grafite ogni 80 determinazioni.

Per quanto riguarda le operazioni di cattura della goccia di sangue durante l'esecuzione del microprelievo, esse possono venire effettuate con la tecnica dei capillari tarati o con micropipette tarate a puntale intercambiabile. Tra i due sistemi abbiamo optato per il secondo citato in quanto offre migliori garanzie di rapidità e permette inoltre una miglior prevenzione di eventuali fenomeni di inquinamento chimico.

Utilizzando la micropipetta tarata (a volume di 50  $\mu$ l) va tenuto presente che l'errore che più facilmente si può compiere è nella fase di aspirazione del sangue per la possibilità di aspirare dell'aria nel puntale sfuggendo così ad una quantità tarata.

Per evitare ciò, occorre operare con il micropuntale in posizione leggermente inclinata rispetto alla base della goccia di sangue, onde permettere una velocità di aspirazione regolare ed evitare nel contempo fenomeni di pressione che potrebbero ostacolarla.

Normalmente una goccia di sangue raggiunge un volume di 75-150  $\mu$ l. Prelevando un volume massimo di 50  $\mu$ l si riescono ad evitare gli inconvenienti sopra citati. La tecnica dei capillari tarati, se, da un lato, per i punti descritti offre migliori garanzie, dall'altro, può risultare meno agevole per quanto riguarda la dispersione dell'anticoagulante e la prevenzione di microcoaguli di sangue.

Utilizzando la tecnica dei puntali intercambiabili, infine risulta più pratico il trasferimento del campione al microcontenitore di raccolta.

I risultati dell'analisi statistica confermano la validità del metodo di determinazione del piombo su sangue capillare. Infatti:

- i valori medi ottenuti con dosaggio del piombo nel sangue capillare non differiscono in modo significativo da quelli ottenuti nel sangue venoso;
- la correlazione fra i risultati forniti dai 2 metodi è altamente significativa.

A questo proposito, è interessante notare come tale significatività è maggiore per i livelli di piombemia superiori a 40  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ , generalmente indicativi di un'esposizione professionale.

Riteniamo a questo punto di poter concludere che il metodo di dosaggio del piombo su sangue capillare si presta ottimamente, sia per il controllo di popolazioni professionalmente esposte, sia per l'effettuazione di indagini sulla popolazione generale, e, in particolare, date le modalità di prelievo, su popolazioni infantili.

Ricevuto il 24 maggio 1978.

Accettato il 16 agosto 1978.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ROSEN, J. F. 1972. The microdetermination of blood lead in children by flameless atomic absorption : the carbon rod atomizer. *J. Lab. Clin. Med.* **80**: 567 - 576.
2. KUBASIK, N. P. & VOLOSIN, M. T. 1974. Use of the carbon rod atomizer for direct analysis of lead in blood. *Clin. Chem.* **20/2**: 300 - 301.
3. EVENSON, M. A. & PENDERCAST, D. D. 1974. Rapid ultramicro direct determination of erythrocyte lead concentration by atomic absorption spectrophotometry with use of a graphite furnace. *Clin. Chem.* **20**: 163 - 171.
4. KUBASIK, N. P., VOLOSIN, M. T., MURRAY, M. N. 1972. Carbon rod atomizer applied to measurement of lead in whole blood by atomic absorption spectrometry. *Clin. Chem.* **18**: 410 - 412.
5. HWANG, J. Y., ULLUCCI, P. A., & MOKELER, C. J. 1973. Direct flameless atomic absorption determination of lead in blood. *Anal. Chem.*, **45**: 795 - 798.
6. FERNANDEZ, F. J. 1975. Micromethod for lead determination in whole blood by atomic absorption, with use of the graphite furnace. *Clin. Chem.*, **21**: 558 - 561.