



COMITATO NAZIONALE PER LA RICERCA E PER LO SVILUPPO
DELL'ENERGIA NUCLEARE E DELLE ENERGIE ALTERNATIVE

**ATTI DEL XXII SEMINARIO
SPETTROCHIMICO AIM, DELLA
VII RIUNIONE ITALO-FRANCESE DI
SPETTROMETRIA ATOMICA E DEL
II INCONTRO DI SPETTROSCOPIA
ANALITICA SCI**

S. MARGHERITA LIGURE, 5-7 OTTOBRE 1988

ORGANIZZAZIONE
AIM, CENTRO RICERCHE SPETTROCHIMICHE
GAMS, DIVISION SPETTROMETRIE ATOMIQUE
SCI, GRUPPO DI SPETTROSCOPIA ANALITICA

EDIZIONE
NAZZARENO BASILI
MARIA ANTONIETTA BIANCFIORI
CORRADO BORDONALI
GIOVANNA ZAPPA

SERIE SIMPOSI

STUDIO DI FATIBILITA' PER L'ACCERTAMENTO DEI VALORI DI RIFERIMENTO DI
ELEMENTI NEI CAPELLI

O. Senofonte, N. Violante, E. Beccaloni, L. Fornarelli, A. Power, S. Carolfi
Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena 299, 00161 - Roma

INTRODUZIONE

L'analisi elementare di capelli umani sta acquistando sempre maggiore importanza sia a fini nutrizionali che tossicologici, così come per la diagnosi di specifiche patologie (1). I vantaggi intrinseci a questo tipo di analisi nei confronti di quelle cliniche tradizionali, basate sul prelievo di sangue ed urine, sono numerose. Il campione può essere prelevato in modo semplice ed indolore anche da persone non specializzate e non richiede attrezzature particolari. Altri pregi derivano dall'accumulo degli elementi nei capelli e la non deteriorabilità della matrice stessa, fattori che certamente facilitano materialmente l'analisi. Serie difficili si manifestano tuttavia nell'interpretazione dei dati analitici in quanto la contaminazione esogena, se non adeguatamente minimizzata, può portare a valutazioni del tutto errate. E' d'altro canto indispensabile che vengano accertati i valori normali di riferimento per gruppi di età e per sesso, in soggetti sani (2-5). E' solo sulla base di tali valori che diviene ragionevole determinare le eventuali alterazioni delle concentrazioni di specifici elementi in soggetti affetti da patologie a seguito di esposizione ambientale od occupazionale. Tale obiettivo è la motivazione principale di questo studio che ha richiesto un'estesa campagna di campionamento nell'area urbana di Roma. E' stato seguito un protocollo preciso e rigoroso per il prelievo, secondo il quale vengono riportati per ogni soggetto sia i dati anagrafici che informazioni come peso, altezza, sesso, stato di salute generale ed abitudini alimentari. L'indagine è stata limitata finora a soggetti in età scolare fino ai 14 anni.

E' stato comunque preso in considerazione un numero notevole di elementi, sia a livello di tracce che in concentrazioni maggiori, nell'intento di approfondire gli aspetti fisiologici e tossicologici connessi. Gli elementi inclusi nell'indagine sono: Al, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Se, Ti, V e Zn. Tecniche analitiche quali l'assorbimento atomico con formate di grafite (ETA-AAS), la fluorescenza a raggi X (XRF) e l'attivazione neutronica (NAA) sono state e sono tuttora largamente impiegate per questo tipo di determinazioni (6-8). Negli ultimi anni si è peraltro sempre più diffusa la spettrometria atomica a plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES). Ciò è soprattutto dovuto al carattere multielementare di questa tecnica, alla sua relativa insensibilità al tipo di matrice ed al suo ampio intervallo dinamico di concentrazione (4, 5). E' noto che in termini di potere di rivelabilità, ICP-AES e ETA-AAS sono due tecniche complementari, poiché con l'una o con l'altra è possibile determinare quantità dell'ordine dei $ng\ g^{-1}$ per la maggior parte degli elementi. Tuttavia esistono numerosi prerequisiti a favore dell'ICP-AES che la fanno ritenere particolarmente idonea all'analisi elementare dei capelli. Una precisa valutazione di tale potenzialità rientra nelle finalità di questo lavoro.

PARTE SPERIMENTALE

Circa 1 g di capelli sono stati prelevati per ogni soggetto dalla regione occipitale. Il taglio è stato effettuato a circa 2 cm dalla cute. I campioni così raccolti sono stati immediatamente posti in bustine di polietilene, catalogati e messi in un essiccatore. Prima della mineralizzazione acida i campioni sono stati lavati per rimuovere il materiale esogeno. In letteratura vengono riportate numerose procedure idonee a tale scopo (1-3). Col presente studio è stata sviluppata una procedura di lavaggio che in maniera soddisfacente minimizza il fenomeno dell'estrazione di analiti dall'interno del capello. Nella Tabella 1 sono riportate le principali fasi del lavaggio proposto.

Per la mineralizzazione del campione si fatto è ricorso ad un forno a microonde (CEM, USA) (9). Questo forno è costituito da una cavità risonante alla frequenza di 2450 MHz nella quale è inserito un piatto portacampioni ruotante. Il recipiente di digestione è costituito da un cilindro di PTFE speciale chiuso da un coperchio filettato con valvola capace di resistere fino ad una pressione di circa 6 atm. L'utilizzazione di tale forno ha permesso di ottenere sia una mineralizzazione più rapida (qualche ora nel caso peggiore) che di minimizzare al massimo il contributo della contaminazione esterna tipico dei metodi convenzionali di digestione. La procedura è riportata nella Tabella 2. La soluzione viene infine diluita a 20 cm^3 in provette Falcon ed analizzata. Nella Tabella 3 sono riportati i parametri strumentali.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Entrambe le tecniche analitiche ICP-AES e ETA-AAS sono state confrontate attraverso l'utilizzazione di un materiale di riferimento giapponese (NIES) (10). La Tabella 4 riporta i risultati ottenuti per alcuni elementi con entrambe le metodiche. Si può notare il buon accordo dei risultati con i valori certificati. La Tabella 5 e la Fig. 1 riportano invece le correlazioni lineari per alcuni elementi di campioni di capelli di soggetti normali, analizzati sia per ICP-AES che ETA-AAS. Anche in questo secondo caso l'accordo tra le due serie di misure è soddisfacente nonostante il fatto che i campioni non siano stati trattati esattamente nello stesso modo prima dell'analisi. Nella Tabella 6 vengono riportati i dati, ottenuti per ICP-AES, riguardanti la precisione ed il limite di rivelabilità per gli elementi determinati sia a livello di tracce che in concentrazione maggiore. Infine nella Tabella 7 e nella Fig. 2, si riportano rispettivamente i valori delle medie e delle mediane delle concentrazioni per i vari elementi, il rapporto con alcuni intervalli citati in letteratura e le distribuzioni di un certo numero di elementi sia di interesse fisiologico che tossicologico.

In conclusione, questa prima indagine conferma l'applicabilità dell'ICP-AES alla determinazione degli elementi contenuti nei capelli per quanto concerne accuratezza, precisione, sensibilità, intervallo dinamico di concentrazione e multielementarità delle analisi. Il numero ristretto dei campioni e la tipologia dei soggetti (tra i 10 e i 15 anni) consente solo valutazioni preliminari circa i valori da assumere come rappresentativi per questo gruppo. Vale comunque la pena di segnalare la buona sovrapposizione con i valori riportati in letteratura relativamente ad altre popolazioni (4).

Bibliografia

- 1 - S. A. Katz, Int. Lab., 1979, May/June, p. 181-9.
- 2 - R. E. Jervis, B. Tiefenbach, A. Chattopadhyay, J. Radioanal. Chem., 37 (1977), p. 751-60.
- 3 - G. S. Assarian, D. Oberleas, Clin. Chem., 23 (1977) p. 1771-2.
- 4 - M. Kamamura, Jap. J. Hyg., 38 (1983), p. 823-38.
- 5 - F. Garry, M. D. Gordon, Sci. Total Environ., 42 (1985) p. 133-47.
- 6 - A. J. J. Bos, C. C. A. H. Van der Stap, V. Valkovic, R. D. Vis, H. Verheul, Sci. Total Environ., 42 (1985), p. 157-69.
- 7 - W. W. Harrison, J. P. Yurachek, Clin. Chim. Acta, 23 (1969), 83-91.
- 8 - A. Imahori, I. Fukushima, S. Shiobara, Y. Yanagida, K. Tomura, J. Radioanal. Chem., 52 (1979), p. 167-80.
- 9 - H. M. Kingston, L. B. Jassie, Anal. Chem., 58 (1986), p. 2534-41.
- 10 - K. Okamoto, M. Morita, H. Quan, T. Uehiro, K. Fuwa, Clin. Chem., 31 (1985), p. 1592-7.

Tabella 1

Procedura di lavaggio

- a) doppio lavaggio, sotto agitazione, per 10 minuti con una miscela di etere etilico acetone (v/v, 3 + 1)
- b) asciugatura a 85 °C per 1 ora;
- c) trattamento con una soluzione acquosa di EDTA al 5 % per 1 ora;
- d) ripetuti risciacqui con acqua bidistillata;
- e) asciugatura a 105 °C per 24 ore per la determinazione del peso secco.

Tabella 2.

Procedura di mineralizzazione.

- a) il campione di capelli preventivamente pesato viene posto nel bicchiere di teflon con 5 ml di acido nitrico concentrato e fatto digerire per una notte;
- b) primo ciclo di mineralizzazione in forno per 1 ora al 30 % di potenza della potenza massima di microonde;
- c) dopo raffreddamento si aggiunge 1 ml di H₂O₂ e si inizia un'altro ciclo di mineralizzazione per 1 ora al 50 % di potenza;

Tabella 3

Condizioni strumentali ICP-AES

Spettrometro	Jobin-Yvon 32-38 PI VHR (ISA Instruments, Francia)
Generatore RF	DURR-JY 3248, frequenza 56 MHz, potenza massima 2.2 kW
Spirale di induzione	6 spire, 32 mm d.i., altezza 30 mm
Torcia	INSA, smontabile
Nebulizzatore	Meinhard di tipo C con camera di nebulizzazione Scott
Monocromatore	HR 1000 M, focale di 1 m, montaggio Czerny-Turner, dotato di un reticolo olografico piano con 3600 righe/mm e fenditure di entrata e di uscita di 40 μ m
Pollicromatore	HR 1000 M, focale di 0.5 m, montaggio Paschen-Runge, dotato di un reticolo olografico concavo con 3600 righe/mm e fenditura di entrata e di uscita di 50 μ m
Lunghezze d'onda (nm)	Al 349.2, As 193.7, Ca 317.9, Cd 226.5, Co 283.6, Cr 267.7, Cu 324.7, Fe 259.9, Mg 279.5, Mn 257.6, Mo 292.0, Na 589.0, Ni 231.6, P 214.9, Pb 220.3, Se 196.0, V 292.4, Zn 213.8
Elaboratore	Apple II, Versione Pascal 2-5

Tabella 4

Determinazione degli elementi nel materiale di riferimento NIES, N05, "Human Hair"

Elementi	Concentrazioni (μ g g ⁻¹)		
	Analisi con ETAS-AAS	Analisi con ICP-AES	Valori certificati
As	0.2	0.4	---
Ca	712	719	728 \pm 30
Cd	0.21	0.22	0.2 \pm 0.03
Cu	16	17.0	16.3 \pm 1.2
Fe	226	227	226 \pm 9
Mg	212	202	208 \pm 10
Mn	5.3	5.0	5.2 \pm 0.3
Pb	6.0	6.0	6.0 *
Sb	0.5	0.03	0.07*
Se	1.4	1.5	1.4 *
Zn	163	165	169 \pm 10

* valori qualificati

Tabella 5

Parametri di correlazione tra ICP - AES e ETA - AAS

Elementi	r	r ²	pendenza *
Ca	0.95	0.91	1.38
Cd	0.87	0.78	1.38
Fe	0.86	0.74	0.86
Mg	0.90	0.81	0.91
Mn	0.98	0.97	0.82
Pb	0.99	0.98	1.00

* ICP - AES come variabile indipendente.

Tabella 6

Precisione e limite di rivelabilità per gli elementi in tracce contenuti nei capelli.

El.	Limite di rivelabilità ($\mu\text{g l}^{-1}$) (criterio 3 sigma)	Precisione % (RSD)
As	0.2*	2.8
Ca	0.5	1.6
Cd	2.7	1.3
Co	17	1.1
Cr	7.1	1.94
Cu	7.7	1.1
Fe	6.2	1.7
Mg	0.1	1.5
Mn	1.4	1.4
Ni	23	1.8
Pb	42	2.2
Se	0.4*	2.7
Zn	1.8	1.1

* sviluppo di idruro volatile

Pb (ICP/AAS)

$R^2 = 0.84, r = 0.05$

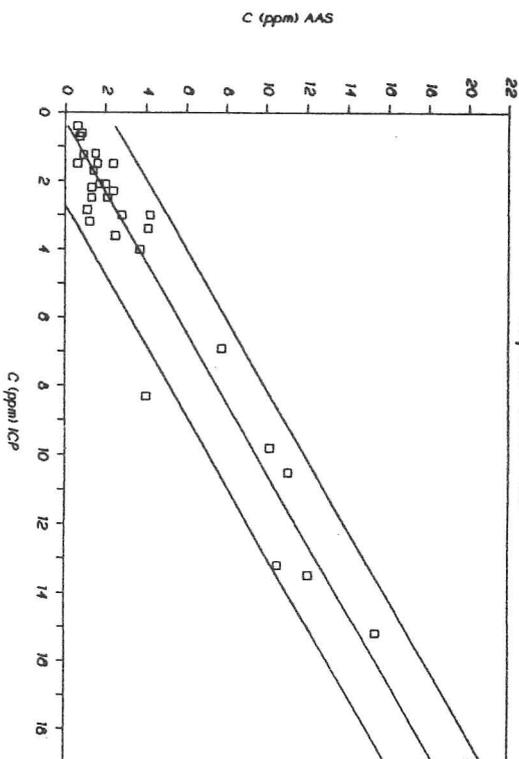


Fig. 1 Correlazione lineare tra ICP-AES e ETA-AAS nel caso di Pb.

Tabella 7

Concentrazioni medie ($\mu\text{g g}^{-1}$) e mediane per gli elementi contenuti nei capelli e raffronto con intervalli di riferimento.

El.	Media	Mediana	Valori di riferimento	
			UK	Giappone
Al	9.74	9.35	0.6-14	0.6-36
As	0.19	0.15	1	1-2.7
Ca	390	350	1-2220	190-3700
Cd	0.18	0.15	0.1-0.43	0.04-300
Co	0.14	0.06	---	---
Cr	0.27	0.27	0.2-0.41	0.1-4.6
Cu	30.2	10.2	6.5-18	6.0-69.1
Fe	14.7	15.0	4.0-15	6.1-87.4
Mg	24.5	23.01	0.06-160	14-567
Mn	0.28	0.27	0.06-0.36	0.06-4.5
Mo	0.19	0.17	n.r.	0.2-0.59
Na	172	154	0.6-86	27-1500
Ni	0.47	0.35	0.4-1.3	0.17-3.0
P	116	112	110-190	110-250
Pb	7.3	7.4	2.0-4.0	1.4-13
Se	1.12	0.38	1.0-1.4	1.0-4.9
V	0.06	0.05	0	0.16-0.88
Zn	124	127	120-220	72-327

Pb (distribution)

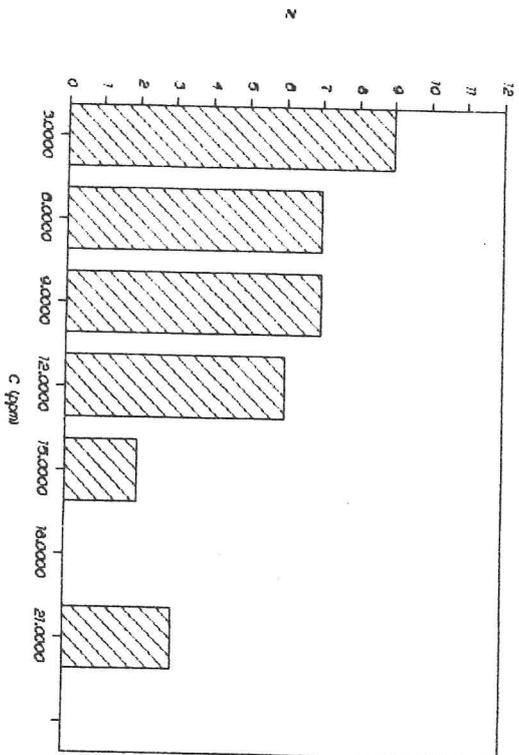


Fig. 2 Distribuzione di Pb nei soggetti esaminati.