



Bepaling van lood in volbloed

met behulp van atomaire absorptie spectrometrie in combinatie met de ACT-80, Atom Concentrator Tube

C.M.T. Wilbers, M.H. van der Steen,
M.C.J. Langen en A.C.G. Egberts
Laboratorium Ziekenhuisapotheek
Midden-Brabant,
TweeSteden ziekenhuis,
Postbus 90107,
5000 LA Tilburg
CWilbers@zamb.tsz.nl

Inleiding

Lood is een zwaar metaal dat normaliter niet in het lichaam aanwezig hoort te zijn. Via het milieu worden we toch blootgesteld aan lood zodat de meeste volwassenen een spiegel hebben tussen de 0,2-0,6 $\mu\text{mol/L}$. De belangrijkste opnameroute van lood is via de ademhalingswegen en in beperkte mate oraal (alleen loodzouten). Lood stapelt zich op in met name de botten en heeft een halfwaardetijd van 10-20 jaar. Acute loodvergiftigingen komen minder vaak voor dan chronische loodvergiftigingen. De belangrijkste verschijnselen bij een vergiftiging zijn van centrale aard: hoofdpijn, geïrriteerdheid en moeheid. Bij ernstigere vergiftigingen kunnen kolieken, nierbeschadiging en neuropathieën optreden. Vergiftigingsverschijnselen kunnen voorkomen bij spiegels vanaf ongeveer 1 $\mu\text{mol Pb/L}$.

Met name bij jonge kinderen moet men erg voorzichtig met blootstelling aan lood zijn. Het is bekend dat jonge kinderen die blootgesteld zijn aan lood, zelfs geringe hoeveelheden, een lager IQ bereiken [1-5].

Lood wordt over het algemeen bepaald in volbloed met atomaire absorptie spectrometrie in combinatie met een grafietoven. Het monster wordt na een voorbehandeling in de grafietoven gebracht. Storende componenten worden langzaam verast en met argon afgevoerd. Nadat de argon toevoer is gestopt wordt de temperatuur snel verhoogd waardoor loodatomen worden verkregen.

In dit artikel wordt de bepaling van lood beschreven waarbij loodatomen worden verkregen in een lucht/acetyleen vlam. Om de gevoeligheid van de analyse te verhogen wordt gebruik gemaakt van de ACT-80 van Varian [6]. ACT staat voor Atom Concentrator Tube. Dit is een kwartsbuis voorzien van twee evenwijdige sleuven, die op de branderkop geplaatst wordt (figuur 1). Hierdoor verblijven de atomen langer in de vlam waardoor de gevoeligheid aanzienlijk hoger wordt. De kwarts buis wordt zo gepositioneerd dat de langste sleuf tegenover de opening van de brander zit en de andere sleuf schuin naar achteren. Zo komt de vlam via de lange sleuf in de buis en verlaat de vlam via de kortere sleuf en zijanten de buis. Dit is te zien in figuur 2 op de volgende pagina.

Reagentia en standaarden

Reagentia

Loodnitraat, Triton X-100 en salpeterzuur (65%) zijn afkomstig van Merck, Darmstadt.
De Lyphochek® Whole Blood

Control kwaliteitscontrolemonsters zijn afkomstig van Bio-Rad Diagnostics Group, Veenendaal.

Standaarden

De stockoplossing bevat 5 mmol Pb/L en wordt gemaakt in 4% salpeterzuur.

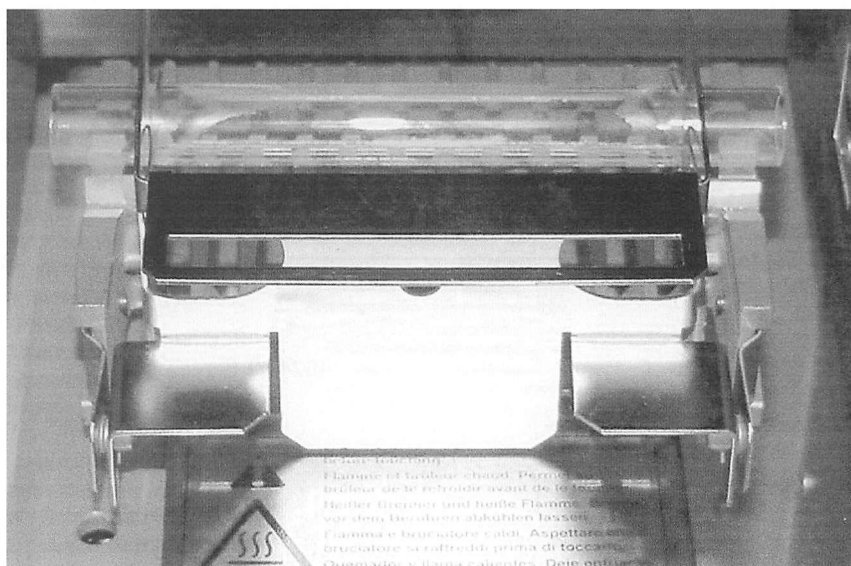
De standaarden voor de ijklijn hebben een concentratie van respectievelijk 0,5, 1,0, 2,0 en 4,0 $\mu\text{mol/L}$ en worden gemaakt in een mengsel van 4% salpeterzuur en 0,2% Triton X-100. De standaarden worden voor gebruik nog doorverdund met 4% salpeterzuur / 0,2% Triton-X in een verhouding 1:2.

Apparatuur en analysecondities

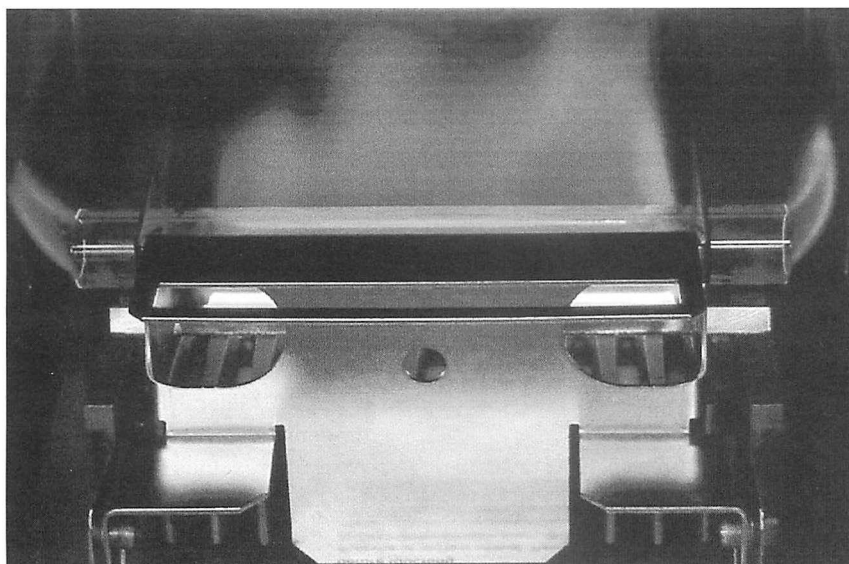
Apparatuur

Als AAS systeem wordt de SpectrAA-100 gebruikt in combinatie met een SPS5 autosampler.

De SpectrAA-100 is voorzien van een SpectrAA lamp voor lood. Op de branderkop wordt een ACT-80, Atom Concentrator Tube, geplaatst. Alle genoemde onderdelen zijn afkomstig van Varian/Chrompack Benelux, Bergen op Zoom.



Figuur 1: De ACT-80 op de branderkop.



Figuur 2: De ACT-80 met ontstoken licht/acetyleen vlam.

Analysecondities

De loodatomen worden vrijgemaakt uit het monster in een lucht/acetyleen vlam. Vervolgens wordt de absorptie van de loodatomen gemeten bij 217,0 nm.

Uitvoering

Ijklijn

Voor de gehaltebepaling wordt een ijklijn opgesteld met vier standaarden en een blanco. Om de juistheid van de ijklijn te controleren worden bij iedere meetserie drie kwaliteitscontrolemonsters meegenomen.

Monstervoorbewerking

In een plastic reageerbuis worden 1,00 mL volbloed en 2,00 mL 4% salpeterzuur / 0,2% Triton X-100 samengevoegd. Na vortexen en centrifugeren wordt de heldere

bovenlaag overgebracht in een schone plastic reageerbuis.

Validatie

De validatie is uitgevoerd volgens de richtlijnen voor analytische validatie [7]. Voor dit onderzoek zijn juistheid, precisie herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid, lineariteit en bepalingsgrens bepaald.

Voor het bepalen van de juistheid zijn spikemonsters in 4% salpeterzuur en 0,2% Triton X-100 bereid. Voor het bepalen van de reproduceerbaarheid zijn tevens commercieel verkrijgbare kwaliteitscontrolemonsters geanalyseerd. De lineariteit is bepaald door analyse van vier standaarden, elk in duplo. Van de gemeten waarden is een regressielijn met correlatiecoëfficiënt en 'lack of fit' bepaald. De 'lack of fit' is een maat voor de acceptatie van de

lineariteit van de bepaling over het desbetreffende concentratiebereik. Voor acceptatie van de lineariteit dient de 'lack of fit' beneden een bepaalde kritische waarde te liggen, welke afhankelijk is van het aantal vrijheidsgraden van de regressielijn [8]. De bepalingsgrens is vastgesteld als de concentratie behorende bij tien maal de ruis (blanco).

Resultaten

De validatieparameters voor de juistheid, precisie herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid zijn gegeven in tabel 1. Voor de bepaling van de lineariteit zijn vier standaarden in duplo geanalyseerd. De standaarden hebben een concentratie van respectievelijk 0,5, 1,0, 2,0 en 4,0 $\mu\text{mol Pb/L}$. De gegevens van de regressielijn zijn terug te vinden in tabel 2 op de volgende pagina.

De bepalingsgrens is vastgesteld op 0,4 $\mu\text{mol Pb/L}$. Dit is de X-waarde behorende bij tien maal de ruis (= waarde gemeten voor de blanco). In tabel 3 (op de volgende pagina) zijn de resultaten van externe kwaliteitscontrolemonsters gegeven.

Discussie en conclusie

De gevoeligheid van de beschreven methode is gering vergeleken bij de methode waarbij gebruik wordt gemaakt van de grafietoven voor het vrijmaken van loodatomen. Echter het gebruik van de ACT-80 verhoogt de gevoeligheid van de bepaling met een factor 4 (analyseresultaten niet gegeven).

Uit de validatie gegevens blijkt dat de vlam AES methode met ACT-80

Lood [$\mu\text{mol/L}$]	Juistheid [$\mu\text{mol/L}$] (%) n=6	Herhaalbaarheid (VC %) n=6	Reproduceerbaarheid (VC %) n=6
0,20	0,16 80	13,1	13,4
0,50	0,53 105	3,7	8,5
1,00	1,01 101	1,3	3,8
2,00	1,99 100	1,1	3,1
Bio-Rad level 1		7,4	25,0
Bio-Rad level 2		4,9	9,2
Bio-Rad level 3		5,5	4,7

Tabel 1: Validatieparameters.

Extract

A	B	R	'lack of fit'
0,00034	0,0086	0,998	0,13*

* de kritische waarde voor deze regressielijn is 5,409

Tabel 2: Gegevens van de regressielijn ($Y = A + BX$) voor de bepaling van de lineariteit van de bepaling van lood met AAS met behulp van de ACT-80 ($n=2$).

met name te kort schiet in het lage concentratiegebied. Dit is het directe gevolg van de geringe gevoeligheid van de methode. De bepaling is opgezet met als doel te kunnen aantonen of er sprake is van een lood-intoxicatie of niet. Het is in dat kader niet klinisch relevant dat zeer lage loodconcentraties gemeten kunnen worden. Met een onderste bepalingsgrens van $0,4 \mu\text{mol Pb/L}$ is de bepaling geschikt voor de bepaling van lood in volbloed in het kader van toxicologie. Gebruik van de ACT-80 maakt een dure investering in een grafiet oven voor de analyse van matige loodintoxicaties overbodig. De methode is ongeschikt voor de bepaling van lage lood concentraties.

Literatuur

- [1] Ned Tijdschr Geneesk 1992;136: 1093-6
- [2] Ziekenhuisfarmacie 1996;12:16-19
- [3] Medical Toxicology 1986;1:387-410

- [4] Pharmaceutisch Weekblad 1988; 123:1069
- [5] N Engl J Med 1992;327:1279-84
- [6] Moffett J. Sensitivity enhancement for flame atomic absorption spectrometry using an atom concentrator tube, the ACT-80. AA Instruments At Work/Varian: 1989; AA-91.
- [7] Van de Vaart FJ. Richtlijnen voor analytische validatie. Pharm. Weekbl 1992; 127:1229-35.
- [8] Miller JC, Miller JN. Statistics for analytical chemistry. 3e ed. West Sussex: Ellis Horwood, 1993:223.

SKZL Test	Lood ($\mu\text{mol/L}$)	
	ZAMB	Gemiddelde alle laboratoria
145	0,50	0,53 (n=15)
146	0,34	0,39 (n=12)
147	0,67	0,68 (n=15)
148	0,80	0,83 (n=16)
149	0,94	1,03 (n=17)
150	0,27	0,24 (n=14)

Tabel 3: Analyse resultaten externe kwaliteitscontrolemonsters.