

KOMMISSION DER
EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN

COMMISSION DES
COMMUNAUTÉS EUROPÉENNES

UNITED STATES ENVIRONMENTAL
PROTECTION AGENCY

INTERNATIONAL SYMPOSIUM

Environmental health aspects of lead

Die gesundheitlichen Aspekte
der Umweltverschmutzung durch Blei

Les problèmes sanitaires posés par le plomb
présent dans l'environnement

DETERMINATION DU PLOMB DANS LE SANG
PAR ANALYSE SPECTROPHOTOMETRIQUE A
ABSORPTION ATOMIQUE

ANDREOLETTI F., GRIFFINI A., COLOMBO G., ZURLO N.

Clinique du Travail "L. Devoto"
de l'Université de Milan
MILAN, ITALIE

Amsterdam, October 2 - 5, 1972

R E S U M E

Il est décrit une méthode de détermination du plomb dans le sang par spectrophotométrie à absorption atomique qui comporte une déprotéinisation en deux temps, après hémolyse par saponine dans le but d'obtenir une hémolyse complète et le passage total du plomb dans le liquide déprotéinisé.

L'adjonction, à chaque échantillon, d'une solution de cadmium comme traçant, permet d'évaluer le facteur de dilution du plomb hématisé.

La sensibilité de la méthode permet d'évaluer les concentrations de plomb dans le sang égales à 0,1 p.p.m.

Les résultats analytiques présentent un fort degré de reproductibilité et une excellente concordance avec ceux obtenus par la méthode titrimétrique au dithione.

Les méthodes de dosage du plomb dans le sang, par spectrophotométrie à absorption atomique, exigent généralement l'extraction du métal du sang par des solvants, après une déprotéinisation ou une minéralisation préalable de l'échantillon (1-2-3-4-5-6-7); dernièrement il a été proposé d'effectuer l'extraction directe du plomb du sang tel quel (8).

Les techniques d'extraction permettent un enrichissement du métal dans le solvant et permettent l'analyse même sur des volumes extrêmement réduits de sang complet (9); cependant elles exigent encore un procédé analytique long et laborieux.

Pour simplifier l'analyse, certains proposent des techniques par lesquelles le métal est directement dosé sur le résidu minéralisé (10, 11) ou sur le liquide déprotéinisé (12); d'autres savants (13) ont préparé une méthode directe en utilisant le "Sampling Boat" qui ne veut que la dilution du sang par une solution physiologique; pour ce procédé, qui actuellement est encore en phase expérimentale, il faut un instrument possédant une sensibilité très élevée (aux environs de 0,01-0,02 ppm). La précision est sensiblement inférieure à celle des autres méthodes et, de plus, les résultats ne sont pas valables si les échantillons contiennent EDTA.

Objectif du travail.

Parmi les méthodes mentionnées, la plus simple et la plus valable nous semble celle basée sur la détermination du plomb dans le liquide déprotéinisé; cette méthode présente cependant deux inconvénients:

a) la déprotéinisation, effectuée surtout avec de l'acide perchlorique concentré (10-11-4) ou avec de l'acide trichloracétique à 10% (3-12), ne fournit pas toujours des résultats satisfaisants: en effet, le liquide surnageant se révèle souvent trouble et, de plus, la libération du plomb érythrocytique et le passage du métal dans le liquide déprotéinisé, ne sont pas toujours complets (10-11) à cause de l'hémolyse incomplète due à la dénaturation et la précipitation trop rapide des substances protéiques.

b) le volume du liquide déprotéinisé n'est pas constant; il varie d'un échantillon à l'autre par rapport à l'hématocrite et, de ce fait, par rapport au volume en pour-cent de l'eau plasmatisée. Il faut donc obligatoirement évaluer, pour chaque échantillon, l'entité de volume du liquide déprotéinisé.

Nous avons donc jugé opportun de conduire une recherche pour éliminer ces deux inconvénients dans le but de pouvoir obtenir une méthode de détermination du plombémiatique simple, rapide et à même de fournir des résultats parfaitement valables sur le plan clinique.

1) Recherches préliminaires

a) déprotéinisation du sang

Après une série d'expériences, nous avons constaté que pour obtenir les conditions optimales pour une hémolyse complète et pour le passage quantitatif du plomb érythrocytique dans le liquide déprotéinisé, il suffit d'hémolyser le sang avec de la saponine pour le trichloracétique à 2,5% (0,8 ml/ml de sang entier) qui provoque la précipitation d'une fraction des protéines et réduit le pH de ce qui suffit à libérer le plomb des liens organiques, puis ensuite acide trichloracétique à 50% (0,2 ml/ml de sang entier) qui achève la précipitation des protéines de cet échantillon ; par cette technique le liquide surnageant est parfaitement limpide.

b) évaluation du volume de liquide déprotéinisé

Pour évaluer le volume de liquide déprotéinisé correspondant à l'espace de diffusion du plomb contenu dans les érythrocytes, il a été ajouté à l'échantillon en examen, une substance traçante dont, à chaque fois, on a évalué le volume de dilution : dans ce but on a utilisé du cadmium ajouté à la solution d'acide trichloracétique à 2,5%, utilisée pour la première déprotéinisation. Une fois que l'on est parvenu à l'isolement du liquide déprotéinisé, il faut donc procéder à une double lecture spectrophotométrique ; en plus de la détermination du plomb, on détermine la concentration du cadmium par le rapport entre la concentration de ce métal ajouté à l'échantillon et celle qui se détermine par voie analytique, on calcule le facteur de dilution. En multipliant la valeur obtenue par le facteur de dilution, on obtient la concentration du plomb dans le sang entier. Quand on pense que le sang à analyser puisse contenir une quantité appréciable de Cd, fait exceptionnel, on peut utiliser comme traçant un autre métal, facilement dosable par le spectrophotomètre, qui soit en général présent dans le sang en concentrations négligeables.

2) Expérimentation

a) éouiment

Pour l'expérience on a utilisé le spectrophotomètre à absorption atomique Unicam SP 90, dans les conditions opératives suivantes :

longueur d'onde 2171 Å pour le Pb

2288 Å pour le Cd

fissure ; - 0,4 mm

hauteur brûleur 1,4 cm

Propane flux 250 ml/min

Air flux 4,5 l/min

Vitesse aspiration échantillon 15-30 sec.

Expansion échelle 2 x (pour le Pb)

1 x (pour le Cd)

b) Réactifs

a) solution standard de plomb : de 0,25 à 4,00 p.p.m.

b) solution de 1 p.p.m. de cadmium en solution acide trichloracétique 2,5 sans plomb

c) solutions d'acide trichloracétique à 50% exemptes de plomb

d) saponine

Il est nécessaire d'utiliser du verre exempt de plomb, lavé soigneusement avec de l'acide chlorhydrique (1:4) puis ensuite longuement avec de l'eau bi-distillée et périodiquement contrôlé par diluzone

c) Méthode

- prélever au moins 6 ml de sang hépariné et en placer à la pipette avec soin, 5 ml dans l'éprouvette de centrifuge
- ajouter une pointe de spatule de saponine et mélanger
- ajouter 4 ml de la solution de Cd en acide trichloracétique à 2,5% (solution b)
- mélanger avec soin pendant 1' avec une baguette en verre en laissant reposer dix autres minutes encore.
- ajouter 1 ml d'acide trichloracétique 50% (solution c) et tri-turer le précipité avec une baguette en verre pendant 5' pour obtenir une suspension homogène.
- après au moins 30' de repos, dans la centrifuge à 3000 r.p.m. pendant environ 10'
- décanté et si nécessaire, recentrifuger
- préparer un blanc avec 4 ml de solution b et 1 ml de solution c (concentration de Cd dans le blanc = 0,8 ppm)
- évaluer instrumentalement la concentration de plomb à 2170 Å ; à cette longueur d'ondes, en plus de l'absorption de plomb on a une absorption due à l'interférence des sels dissous dans l'échantillon en examen ; de ce fait en effectuant une seconde lecture

à 2200 Å où la réponse du plomb est nulle, on peut déterminer l'absorption provoquée par les sels, la quantifier en équivalents de Pb puis soustraire cette valeur de celle déterminée à 2170 Å.

évaluer la concentration du cadmium à 2288 Å, soit dans l'échantillon que dans le blanc ; le rapport entre les deux concentrations donne le facteur de dilution du Pb hématique. Pour obtenir la concentration effective du Pb il faudra donc multiplier par ce facteur la valeur de concentration du Pb déterminée instrumentalement.

Exemple :

Notons que l'analyse spectrophotométrique d'un liquide atténué ait donné les résultats suivants :

A = concentration du plomb évaluée par la lampe à plomb à 2170 Å

B = concentrations des sels interférents évaluée par la lampe à plomb à 2200 Å et exprimée en équivalents en plomb

C = concentration de cadmium évaluée par la lampe à plomb à 2288 Å

D = concentration de cadmium évaluée par la lampe à cadmium à 2288 Å dans le blanc

La concentration effective du plomb dans le sang entier est donnée par la formule suivante :

$$\frac{(A - B) - \frac{D}{C}}{C} = (50 - 5) - \frac{80}{50} = 88 \text{ mcg/100 ml}$$

3) Données expérimentales

Comparaison avec la méthode au ditizone

Pour évaluer la validité du procédé analytique, on a examiné 21 échantillons de sang, dont 6 prélevés sur des individus normaux et 15 sur des sujets hospitalisés pour recherche de saturnisme et 5 sur des saturniens pendant le traitement avec EDTA. Les 21 échantillons ont été analysés en parallèle par la méthode au ditizone et les résultats sont abrégés dans le tableau n° 1.

Tableau n° 1 - Moyenne et déviation standard relatives aux valeurs de plombémie (mcg/100 ml) obtenues dans 21 échantillons analysés en parallèle par la méthode au ditizone et par la méthode spectrophotométrique à Absorption Atomique.

Type de méthode	moyenne	Déviat. standard
Ditizone	56,24	18,16
Absorption Atomique	59,14	18,24

Les données statistiques démontrent l'absence de grandes différences entre les deux procédés analytiques ; les valeurs de moyennes et du degré de dispersion présentent en effet une bonne concordance.

Reproductibilité

Pour étudier la reproductibilité des valeurs, on a analysé 4 échantillons de sang sur chacun desquels ont été effectuées 3 déterminations du plomb ; les valeurs obtenues sont reportées dans le tableau n° 2.

Tableau n° 2

Valeurs de la concentration de Pb (mcg/100ml) trouvées dans 4 échantillons de sang, sans aucun desquels on a procédé à 3 déterminations ; Il est indiqué également la différence % des valeurs par rapport à la moyenne.

Echantillon Valeurs obtenues Différence % par rapport à la moyenne

1	45,0 43,5 45,0 <u>44,83</u>	+ 0,37 - 2,90 + 2,61
---	--------------------------------------	----------------------------

2	32,5 34,0 31,5 <u>32,66</u>	- 0,48 + 4,10 - 3,55
---	--------------------------------------	----------------------------

3	57,0 58,0 60,0 <u>58,30</u>	- 2,20 + 0,51 + 2,91
---	--------------------------------------	----------------------------

4	38,50	+ 3,65
	36,0	- 1,80
	36,5	- 0,43
	37	

Il a également été évaluée l'entité de la récupération du plomb ajouté à deux autres échantillons de sang ; les résultats sont reportés sur le tableau n° 3

Tableau n° 3 Valeurs de la concentration de Pb (mcg/100ml)

Trouvées avant et après asjonction de Pb à concentration connue dans deux échantillons de sang ; pour chaque échantillon ont été effectuées trois déterminations ; il est également indiqué la récupération pour cent du Pb ajouté.

Echantillon	Plombémie basale	mcgPb/100 ml	Concentr. prévue	Concentr. trouvée	Récupération
1	45	30	75	72 73 78	90% 93,8% 110,0 %
2	32	50	81	80 79 83	96,0% 94,0% 102,0%

CONSIDERATIONS DE CONCLUSION

Le procédé décrit pour la détermination du plomb dans le sang par spectrophotométrie à absorption atomique, est sensiblement le plus rapide des méthodes d'extraction : en effet il est possible en 5 heures environ, d'effectuer l'analyse de 24 échantillons. L'analyse peut également être effectuée sur des échantillons de sang prélevés chez des sujets en cours de traitement par chélateur. Etant donné qu'expérimentalement on s'est rendu compte qu'une rapide déprotéinisation peut parfois comporter une partielle co-précipitation du plomb, on a adopté, après des expériences appropriées, une technique de déprotéinisation graduelle qui s'effectue en ajoutant à l'échantillon, hémolysé à la saponine au préalable, une solution d'acide trichloracétique à 2,5 % puis à 50 % . par

cette technique on assure une hémolyse totale et le passage complet du plomb érythrocyte dans le liquide déprotéinisé . On a ajouté à la solution d'acide trichloracétique diluée, du cadmium, comme substance traçante, en concentration égale à 1ppm; l'adjonction de ce métal à l'échantillon à analyser permet d'évaluer par une seconde lecture instrumentale, le volume du liquide déprotéinisé qui peut amplement varier d'un échantillon à l'autre en fonction de l'hématocrite et permet de ce fait de calculer le facteur de dilution du plomb hémétique . La sensibilité de la méthode est satisfaisante car on peut mettre en évidence 10-15 mcg de plomb/100 ml de sang, avec une erreur égale à +/- 4% . Les essais instrumentaux ont été effectués en parallèle avec la méthode titrimétrique au dithizone; les résultats fournis par les deux méthodes présentent une excellente concordance . De plus le procédé décrit ci-dessus, a une bonne reproductibilité et la récupération du plomb ajouté aux échantillons de sang est presque totale .