

U M W E L T P R O B E N B A N K D E S B U N D E S

Richtlinie zur Analytik

Spuren- und Bulk-Elemente in Humanproben
K o p f - / S c h a m h a a r e

H.P. Bertram und Cornelia Müller

Umweltprobenbank für Human-Organproben/Datenbank

Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Domagkstr. 11
D-48129 Münster

Fassung vom August 1993

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Ziel und Anwendungsbreite der Methode	3
3. Prinzip der Methode	3
4. Materialien	4
5. Geräte	4
6. Methodendurchführung	5
6.1 Aufschluß	5
6.2 Probenansatz	5
6.3 Atomabsorptionsspektroskopie	6
6.3.1 Elektrothermales Verfahren	6
6.3.2 Kaltdampf-Verfahren für Quecksilber	8
6.4 Plasma-Atomemissionsspektroskopie	8
6.5 Validierung	9

1. Einleitung

Die atmosphärischen Interferenzfaktoren für Metalle weisen in der Mehrzahl aus, daß der anthropogene Eintrag in die Biosphäre deutlich größer ist als der natürliche. Dies gilt besonders für die Elemente, für die bis heute keine Essentialität für den Menschen nachgewiesen werden konnte: z.B. Quecksilber, Blei, Cadmium, Arsen. Im Humanorganismus haben einige organspezifisch extrem lange Halbwertszeiten. Diese deep compartments reichern die Metalle z.T. lebenslang an.

Interferenzen der akzidentellen Schwermetalle mit essentiellen Spurenelementen im Sinne einer Störung der Homöostase lassen es geraten erscheinen, auch diese in Human-Matrizes mitzubestimmen. Das Ergebnis eines Element-Rasters enthält entsprechend der biologischen Struktur der Matrix unterschiedliche Mikroelemente.

2. Ziel und Anwendungsbreite der Methode

Die Methode ermöglicht die Erfassung und Bestimmung der akzidentellen Spurenelemente Blei, Cadmium, Arsen, Quecksilber, Barium und Strontium, der essentiellen Spurenelemente Kupfer, Zink, Eisen, Mangan, Chrom und Nickel sowie der Bulkelemente Natrium, Calcium, Magnesium und Schwefel in Human-Haar.

3. Prinzip der Methode

Aliquote Haar-Proben werden nach oxidativem Säure-Aufschluß mit hochreiner konz. Salpetersäure für die Analyse vorbereitet.

Dabei kommen die Plasma-Emissionsspektroskopie (für Kupfer, Zink, Eisen, Strontium, Barium, Mangan, Natrium, Calcium, Magnesium und Schwefel) sowie zwei Varianten der flammenlosen Atomabsorptionsspektroskopie zum Einsatz: Elektrothermale AAS (für Blei, Cadmium, Chrom, Nickel, Arsen und Selen) und Kaltdampf-AAS (für Quecksilber).

4. **Materialien**

- Bidest. Wasser
- 65%ige Salpetersäure, hochrein
- Argon 99.998 %
- Stickstoff 99.998 %
- Maßlösungen für die genannten Elemente
- 5%ige Lösung von Zinn(II)-chlorid-dihydrat, analysenrein, in 10%iger Salzsäure, analysenrein
- Silicon-Entschäumer
- 1.5%ige Salzsäure, analysenrein
- Palladiumchlorid-Lösung in 10%iger Salzsäure mit ca. 1.00 g Pd
- Seesand, säuregewaschen
- Referenzhaar (oder ähnliche Matrix) mit zertifizierten Gehalten der zu bestimmenden Elemente

5. **Geräte**

- Atomabsorptionsspektrometer mit Möglichkeit zur Zeeman-Untergrundkompensation
- Atomabsorption-Zusatzgerät zur Quecksilber-Generation
- Amalgamzusatz für Quecksilberbestimmung
- Graphitrohrküvette, vorzugsweise mit automatischer Probeneingabe
- Plasma-Emissionsspektrometer
- Datenverarbeitungssystem mit Kompensationsschreiber bzw. Drucker
- Reinraum-Arbeitsplatz Klasse 100 mit Möglichkeit germizider Bestrahlung
- Mikrowaage, Genauigkeit 0.1 mg
- Keramik-Pinzette
- Sandbad oder Heizblock für 13.5-ml-Reagenzröhren
- Mikrowellensender zur Anregung von Entladungslampen
- Elektrodenlose Entladungslampen für Blei / Cadmium / Quecksilber / Arsen / Selen
- Hohlkathodenlampen für Chrom und Nickel
- Graphitrohre, Pyrokohlenstoff-beschichtet
- Endvolumen-Meßgerät, geeicht
- Mikroliter-Pipetten variabel zwischen 10 und 100 µl bzw. 100 und 1000 µl
- Pipettenspitzen für Mikroliter-Pipetten
- 13.5-ml-Polypropylenröhren mit Schraubverschluß
- 3.5-ml-Polypropylenröhren mit Schraubverschluß
- Einmalreaktions- oder Autosamplergefäße
- Meßkolben aus Polypropylen 100, 250 und 500 ml

Alle Kunststoffgefäße und Pipettenspitzen werden vor Gebrauch mindestens einmal mit bidest. Wasser gespült. Die Polypropylenröhren für den Säure-Aufschluß müssen säure- und bidest.-Wassergespült sein (s. Vorschrift Probenahme-Richtlinien).

6. Methodendurchführung

6.1 Aufschluß

Die Haare werden auf einer ausreichend genauen Waage in 13.5-ml-Polypropylenröhren eingewogen (Kopfhaare in 2.5-cm-Longitudinal-Abschnitten, Schamhaare ohne Längsteilung). Die Menge sollte dabei nicht wesentlich unter 100 mg liegen. Optimal sind ca. 500 mg. Unter dem Abzug werden die Proben portionsweise mit insgesamt ca. 5 ml 65%iger Salpetersäure, hochrein, versetzt. Dabei wird jeweils das Abklingen der heftigen oxidativen Reaktion abgewartet. Nach ca. 12 Stunden werden die Proben im Sandbad oder Wärmeblock bei 80 - 100°C noch ca. 12 Stdn. aufgeschlossen, bis die Lösung sich gelb verfärbt hat. Nach Beendigung des Aufschlusses wird das Endvolumen der Aufschlußlösung bestimmt. Die Röhren werden bis zum Probenansatz verschlossen.

6.2 Probenansatz

Für die Bestimmung von Cadmium, Blei, Chrom, Nickel, Arsen und Selen wird die Aufschlußlösung am Reinraum-Arbeitsplatz direkt 1:2 (für Blei, Chrom, Nickel, Arsen und Selen) bzw. 1:5 (für Cadmium) in die Autosampler-Gefäße des AAS-Autosampler-Gerätes mit bidest. Wasser verdünnt, dies für jedes Element separat. Für die mit ET-AAS zu analysierenden Elemente erfolgt ein zweiter Ansatz mit gleicher Verdünnung, der mit den zu bestimmenden Elementen gespikt ist:

zugesezte Endkonzentration:

für Cadmium	0.005	µg/ml
für Blei	0.10	µg/ml
für Chrom	0.025	µg/ml
für Nickel	0.10	µg/ml
für Arsen	0.25	µg/ml
für Selen	0.25	µg/ml

Für die Bestimmung mit ICP-AES wird die Aufschlußlösung unmittelbar vor der Messung 1:3 (für Mangan) bzw. 1:5 (für Kupfer, Zink, Eisen, Strontium, Barium, Natrium, Calcium, Magnesium und Schwefel) in 13.5- bzw. 3.5-ml-Polypropylenröhren mit bidest. Wasser verdünnt.

Für die Bestimmung von Quecksilber werden ml-Aliquote der Aufschlußlösung verwendet.

6.3 Atomabsorptionsspektroskopie

6.3.1 Elektrothermales Verfahren

Blei, Cadmium, Chrom, Nickel, Arsen und Selen werden unter Verwendung Pyrokohlenstoffbeschichteter Graphitrohre und der elementspezifischen elektrodenlosen Entladungslampen (für Blei, Cadmium, Arsen und Selen) bzw. der Hohlkathodenlampen (für Chrom und Nickel) am AAS-Meßplatz mit Zeeman-Untergrundkompensation mit folgenden Programmen analysiert:

Blei

Wellenlänge 283.3 nm

Spaltbreite 0.7 nm

1. Messung: 15 µl Proben-Aliquot
2. Messung: 15 µl gespikte Proben-Lösung

Schritt	Temperaturprogramm [°C]	Ramp [sec]	Hold [sec]	Gas flow [ml/min]	Read
Schritt 1	110	2	10	300	
Schritt 2	140	2	15	300	
Schritt 3	550	5	20	300	
Schritt 4	2600	1	3	10	X
Schritt 5	2700	1	1	300	

Cadmium

Wellenlänge 228.8 nm / Spaltbreite 0.7 nm

1. Messung: 10 µl Proben-Aliquot
2. Messung: 10 µl gespikte Proben-Lösung

Schritt	Temperaturprogramm [°C]	Ramp [sec]	Hold [sec]	Gas flow [ml/min]	Read
Schritt 1	110	2	10	300	
Schritt 2	140	2	10	300	
Schritt 3	250	5	15	300	
Schritt 4	2100	1	3	10	X
Schritt 5	2700	1	1	300	

Chrom

Wellenlänge 357.9 nm / Spaltbreite 0.7 nm

1. Messung: 10 µl Proben-Aliquot

2. Messung: 10 µl gespikte Proben-Lösung

Schritt	Temperaturprogramm [°C]	Ramp [sec]	Hold [sec]	Gas flow [ml/min]	Read
Schritt 1	110	2	10	300	
Schritt 2	140	2	10	300	
Schritt 3	1000	10	10	300	
Schritt 4	2500	0	3	10	X
Schritt 5	2800	1	1	300	

Nickel

Wellenlänge 232.0 nm / Spaltbreite 0.2 nm

1. Messung: 20 µl Proben-Aliquot

2. Messung: 20 µl gespikte Proben-Lösung

Schritt	Temperaturprogramm [°C]	Ramp [sec]	Hold [sec]	Gas flow [ml/min]	Read
Schritt 1	110	2	10	300	
Schritt 2	140	2	10	300	
Schritt 3	1000	10	10	300	
Schritt 4	2500	0	3	0	X
Schritt 5	2800	1	1	300	

Arsen

Wellenlänge 193.6 nm / Spaltbreite 0.7 nm

1. Messung: 25 µl Proben-Aliquot + 5 µl Palladium-Lösung als Matrix-Modifier

2. Messung: 25 µl gespikte Proben-Lösung + 5 µl Palladium-Lösung

Schritt	Temperaturprogramm [°C]	Ramp [sec]	Hold [sec]	Gas flow [ml/min]	Read
Schritt 1	110	2	15	300	
Schritt 2	140	2	15	300	
Schritt 3	1100	10	12	300	
Schritt 4	2500	0	3	0	X
Schritt 5	2700	1	1	300	

Selen

Wellenlänge 196.0 nm / Spaltbreite 2.0 nm

1. Messung: 25 µl Proben-Aliquot + 5 µl Palladium-Lösung als Matrix-Modifizier
2. Messung: 25 µl gespikete Proben-Lösung + 5 µl Palladium-Lösung

Schritt	Temperaturprogramm [°C]	Ramp [sec]	Hold [sec]	Gas flow [ml/min]	Read
Schritt 1	110	2	15	300	
Schritt 2	140	2	15	300	
Schritt 3	1100	10	12	300	
Schritt 4	2500	0	3	0	X
Schritt 5	2700	1	1	300	

6.3.2 Kaltdampf-Verfahren für Quecksilber

Die Bestimmung von Quecksilber in der Haar-Aufschlußlösung wird mit dem Reduktions-Zusatz-Gerät mit integriertem Amalgam-Zusatz in Kombination mit dem Atomabsorptionsspektrometer durchgeführt. Je nach Hg-Gehalt der Probe werden 0.5 - 2.0 ml der Aufschlußlösung in das Reaktionsgefäß überführt und mit 1.5%iger Salzsäure auf 10 ml aufgefüllt. Der ersten Probe während einer Analysenserie werden 1 - 2 Tropfen Silicon-Entschäumer zugefügt. Die entschäumende Wirkung während der (heftigen) Reduktionsreaktion hält durch Ablagerung geringer Siliconmengen an den mit der Probe in Berührung kommenden Geräteteilen einige Stunden an. Vor jeder Probenserie wird eine externe Kalibrierung mit 5, 7.5 und 10 µl einer Lösung mit 1.0 µg Hg/ml durchgeführt.

Wellenlänge: 253.6 nm / Spaltbreite 0.7 nm

Temperatur der Meßzelle 200°C

1. Spülung 40 sec / Reaktion 10 sec / 2. Spülung 30 sec

Reduktionslösung: 5%ige Zinn(II)-chlorid-Lösung

6.4 Plasma-Atomemissionsspektroskopie

Die Messung der verdünnten Haar-Aufschlußlösung im ICP-Plasma-Emissionsspektrometer erfolgt unmittelbar nach dem Probenansatz, da nach längerem Stehen unlösliche Reaktionsprodukte ausfallen können. Die vorherige externe Kalibrierung erfolgt in mehreren Schritten mit vorgemischten Eichlösungen folgender Element-Gehalte:

Lösung 1: 20.0 mg Kupfer/L, 20.0 mg Zn/L, 15.0 mg Fe/L,
1.0 mg Sr/L, 5.0 mg Ba/L, 5.0 mg Mn/L

Lösung 2: 100 mg Ca/L, 20.0 mg Mg/L

Lösung 3: 100 mg Na/L

Lösung 4: 100 mg S/L

Geräte-Bedingungen:

Hochfrequenzgenerator 1200 W / Argonfluß für Plasmafackel 15 l/min / Argonfluß
Hilfsgasstrom 0.5 l/min / Sprühgasfluß 0.85 l/min / Rollpumpe 1.2 ml/min

Spülung der Optik mit Stickstoff ca. 1 - 2 l/min

Wellenlängen und Spaltbreiten:

Kupfer	324.754 nm / 0.009 nm
Zink	213.856 nm / 0.009 nm
Eisen	238.204 nm / 0.009 nm
Strontium	407.771 nm / 0.018 nm
Barium	455.403 nm / 0.018 nm
Natrium	589.592 nm / 0.018 nm
Calcium	317.933 nm / 0.009 nm
Magnesium	279.553 nm / 0.009 nm
Schwefel	182.625 nm / 0.009 nm
Mangan	257.610 nm / 0.009 nm

6.5 Validierung

- Methodenkontrolle

- (a) Mitführen von Reagenzien-Blindwerten (mindestens im Verhältnis 1:5 zu den Analysenlösungen) bei allen Aufarbeitungsschritten
- (b) Mitführen eines zertifizierten Referenz-Haares (oder ersatzweise einer ähnlichen Matrix) während einer Analysenserie
- (c) Täglich frische Herstellung der Eichlösungen für ET-AAS aus Stammlösungen mit 0.100 g/L. Die o.g. Bedingungen für die Kalibrierung müssen gerätespezifisch evtl. variiert werden.

- Nachweisgrenze

Die AAS- und ICP-AES-Nachweisgrenzen sind von vielen Parametern abhängig, z.B. der Emissionsquelle des monochromatischen Lichts, insbesondere vom Gerätetyp, von der Wellenlänge u.a.

Für die genannten Verfahren und die selektierten Wellenlängen können für die Matrix Kopf-/Schamhaare etwa folgende realistische Nachweisgrenzen genannt werden (bei einer Einwaage von **0.5 g**):

Blei	ca.	0.025	µg/g
Cadmium	ca.	0.0005	µg/g
Mangan	ca.	0.010	µg/g
Quecksilber	ca.	0.0005	µg/g
Arsen	ca.	0.025	µg/g
Selen	ca.	0.025	µg/g
Chrom	ca.	0.005	µg/g
Nickel	ca.	0.005	µg/g
Kupfer	ca.	0.05	µg/g
Zink	ca.	0.05	µg/g
Eisen	ca.	0.05	µg/g
Strontium	ca.	0.05	µg/g
Barium	ca.	0.05	µg/g
Natrium	ca.	0.75	µg/g
Calcium	ca.	0.1	µg/g
Magnesium	ca.	0.01	µg/g
Schwefel	ca.	5.0	µg/g