

# Determinazione di alluminio nel siero mediante GFAAS con modificante di matrice

Nervi G., Camogliano L., Della Volpe M.\*, Ginestri M. e Massacane R.

Laboratorio Analisi ASL 22 Novi Ligure Regione Piemonte; \*Emodialisi ASL 22 Novi Ligure Regione Piemonte

## RIASSUNTO

La determinazione del contenuto di alluminio nel siero (Al-S) di soggetti sottoposti a emodialisi periodica è una delle applicazioni della spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornello di grafite (GFAAS) maggiormente studiata in questi ultimi anni. La crescente importanza assunta dal dosaggio di Al-S va messa in relazione con i quadri patologici osservati nei soggetti uremici sottoposti a trattamento dialitico periodico evidenziati per la prima volta da Alfrey nel 1976.

Sono stati valutati ed esaminati criticamente molti metodi descritti in letteratura alcuni dei quali sono applicati, a volte con lievi modifiche, in diversi Centri operativi in Italia.

Il confronto di diverse procedure proposte da alcuni autori, la loro parziale modifica per una strumentazione con correzione al deuterio e numerose prove di laboratorio ci hanno permesso di individuare un protocollo analitico relativamente semplice e rapido che consente di ottenere una elevata precisione anche senza l'utilizzo di un più costoso spettrometro con correzione Zeeman.

## SUMMARY

Determination of Aluminum in serum (Al-S) by graphite furnace atomic absorption spectroscopy (GFAAS) in patients undergoing regular hemodialysis is one of the more studied application of this method in the last years. The increasing importance of Al-S dosage is related to pathological features observed in subjects with uremia receiving dialysis and was emphasized for the first time by Alfrey in 1976.

Several methods described in Literature frequently applied, sometimes lightly modified, in different Italian Laboratories were carefully examined and evaluated.

The comparison between the different methods proposed, their partial modification for instruments using a deuterium arc background corrector and several tests performed in our laboratory consented us to characterize a simple and rapid analytical protocol to obtain an elevated precision in dosage without the employment of a more expensive systems with Zeeman background correction.

## INTRODUZIONE

L'alluminio è il terzo metallo più diffuso sulla terra e costituisce circa l'8% dei metalli della crosta terrestre. Nonostante il suo impiego sia praticamente ubiquitario (da quello terapeutico all'utilizzo per la costruzione di infissi o macchine) la sua relativa non disponibilità biologica ne limita l'apporto nell'uomo a 1-10 mg/die. La concentrazione del metallo risulta essere più elevata negli eritrociti che nel plasma dove l'alluminio è prevalentemente legato a proteine (fino al 90%), principalmente alla transferrina, ma anche all'albumina. La concentrazione tissutale è di circa 2mg/Kg ed è più elevata nell'osso, nel fegato e nel polmone. Il bilancio corporeo è mantenuto dalla sua eliminazione attraverso le feci e le urine (dai 3 agli 8 mg/die) e questo spiega la maggior probabilità di accumulo in caso di insufficienza renale cronica.

Anche se il livello di esposizione all'alluminio nella popolazione è in aumento a causa del suo ampio utilizzo in contenitori per cibo o bevande, additivi e farmaci non ci sono prove conclusive che questo possa determinare un incremento della sua concentrazione nei tessuti di un soggetto sano. Anche in occasione di esposizioni massive, come nel caso dell'incidente di Camelford del 1988 nel Regno Unito, furono riportati sintomi di nausea, vomito, diarrea, ulcere alla mucosa buccale e sulla pelle, rash cutanei ma gli effetti sulla popolazione furono transitori e non poterono essere correlati in maniera univoca ad una sovraesposizione all'alluminio dell'acqua potabile.

Tuttavia la tolleranza al metallo può diminuire quando contemporaneamente si verificano variazioni nel pH dell'acqua o una concomitante esposizione ad agenti chelanti. L'uso di alluminio in molti antitranspiranti cutanei può inoltre essere causa di sensibilizzazione al metallo provocando rush cutanei ed altre reazioni allergiche.

La determinazione del rischio di esposizione ad una qualsiasi sostanza chimica deve comprendere processi di identificazione del rischio, curve di relazione dose-risposta, dimostrazione dell'esposizione e la caratterizzazione del rischio (1). L'IPCS (International Programme on Chemical Safety), per stabilire il rischio proveniente da agenti chimici, raccomanda l'impiego di curve dose-effetto e dose-risposta per studi di tipo epidemiologico condotti preferibilmente su popolazioni umane piuttosto che in animali da esperimento (2).

Da molti autori è stata dimostrata la neurotossicità dell'alluminio a seguito dell'iniezione di sali del metallo in animali da esperimento (3), ma assai più scarsi sono i lavori nell'uomo per definire il rischio causato dalla somministrazione parenterale o inalatoria di composti dell'alluminio. L'esposizione per via inalatoria negli animali ha messo in evidenza effetti nocivi sull'apparato respiratorio senza comparsa di altri sintomi sistemici e sono stati anche riportati in Letteratura effetti respiratori su lavoratori esposti a polveri d'alluminio (4).

Più arduo risulta attribuire un rischio all'assunzione di alluminio per via orale in quanto la quantità di alluminio ingerita varia, in rapporto alla quantità contenuta nell'acqua potabile e alle abitudini alimentari, da 0.07 mg/Kg a 0.2 mg/Kg a seconda delle regioni geografiche e delle popolazioni (5). La dose effettivamente assorbita dall'organismo dell'intero apporto giornaliero è stata stimata fra lo 0.1 e l'1% (6) con una ritenzione nei tessuti inferiore al 5% di questa quantità. La quantità di alluminio ingerita con l'acqua potabile è circa cinque volte maggiore di quella proveniente da altre fonti (7), anche se l'alluminio è presente in molte altre sostanze come farmaci (aspirine tamponate, antiacidi, vaccini, irrigazioni vescicali), presidi igienico-sanitari (latte per neonati a base di soia, paste dentifricie, polvere di guanti, preservativi, materiali per impianti dentali), cosmetici (deodoranti, prodotti antisudorazione), cibi cotti in pentole o fogli di alluminio, bevande conservate in lattine, additivi alimentari, caffè passato attraverso percolatori, pesticidi. Inoltre fosfati, citrati, fluoro presenti nella dieta possono aumentare la biodisponibilità dell'alluminio e facilitarne l'assorbimento. In linea generale le prove che l'alluminio sia un reale fattore di rischio per la popolazione generale sono deboli, tuttavia particolari categorie come neonati o soggetti con riduzione della funzione renale potrebbero più facilmente sviluppare patologie legate all'accumulo del metallo.

Un discorso a parte meritano i rapporti tra alluminio e Morbo di Alzheimer (AD). Per questa malattia è

stata ipotizzata una eziologia genetica legata ai geni codificanti l'amiloide b, tuttavia studi condotti in gemelli monozigoti dimostrano che lo sviluppo della malattia è fortemente influenzato da fattori ambientali e non può essere facilmente spiegato solo con cause genetiche.

Francoforte sul Meno in Germania fu la prima città ad introdurre l'uso dei sali d'alluminio in macchine per la filtrazione dell'acqua nel 1880. Nel 1907 il Dr. Alois Alzheimer riportò, appunto in Francoforte, il primo caso di AD in una donna di 51 anni, descrivendolo come una sindrome demenziale dalle peculiari manifestazioni che la caratterizzavano come una malattia fino ad allora sconosciuta (8). La malattia continuò comunque ad essere relativamente rara per diversi anni (solo 33 casi confermati nel 1925 di cui diversi nella città di Francoforte) per poi diventare decisamente più comune negli anni ottanta parallelamente all'aumento della potenziale biodisponibilità di alluminio (9,10,11). Negli USA l'incidenza di AD è aumentata da 1.2 milioni di casi nel 1984 a 4 milioni di casi nel 1994 seguendo l'espansione della presenza di alluminio in cibi e bevande (12). Questa associazione potrebbe essere una pura coincidenza, ma potrebbe anche non esserlo. Inoltre la presenza di alluminio è stata trovata nelle placche e nelle neurofibrille intracellulari caratteristiche della malattia (13) ed esistono numerose prove sperimentali che l'alluminio, quando reso biodisponibile in grandi quantità per il tessuto nervoso, possa indurre alterazioni del tutto simili a quelle del morbo di Alzheimer (14). È stato anche dimostrato che pazienti con AD assorbono più alluminio di soggetti di pari età non affetti (15) ed il metallo è in grado di concentrarsi maggiormente in zone del cervello come corteccia cerebrale, ippocampo, amigdala e cellule piramidali che sono fortemente interessate dalla malattia (16). In conclusione l'ipotesi alluminio come concausa ambientale del morbo di Alzheimer mostra evidenze pesanti e sarebbe senz'altro auspicabile abbassare la soglia accettabile di alluminio solubile nell'acqua potabile a 0.010 mg/L oltre a limitarne l'uso in contenitori per cibi e negli additivi alimentari.

Il problema dell'intossicazione da alluminio nell'insufficienza renale cronica è stato probabilmente a lungo misconosciuto almeno fino agli anni '70, quando sono stati descritti i primi casi clinici di sofferenza neurologica in pazienti sottoposti a dialisi cronica (17). Le ragioni di tale intossicazione risiedevano prevalentemente nell'elevata concentrazione di alluminio nel dialisato sia per l'inadeguatezza dei sistemi di trattamento delle acque per emodialisi allora in uso, sia per l'impiego di sali di alluminio come flocculante per ridurre la torbidità dell'acqua di rete. Altro importante fattore di rischio è rappresentato dall'uso di chelanti intestinali del fosforo a base di alluminio, oggi per fortuna in gran parte sostituiti da farmaci alternativi a base di calcio (carbonato di calcio e calcio acetato) e dal sevelamer.

L'introduzione di tecniche più moderne come l'osmosi inversa nella purificazione dell'acqua per il dializzato ha enormemente ridotto l'entità del problema, anche se questa procedura può non essere disponibile in tutti i paesi o non risultare sufficientemente efficace nel caso di elevate concentrazioni di Al nell'acqua di rete. La possibilità di accumulo di alluminio nei dializzati va comunque sempre tenuta presente per diversi motivi: elevata sopravvivenza dei dializzati con conseguente maggiore esposizione, necessità di utilizzare ancora in alcuni pazienti chelanti a base di alluminio (anche se per periodi limitati), predisposizione all'accumulo di alluminio in alcuni tipi di pazienti come paratiroidectomizzati (18), bambini (19) e diabetici (20).

L'alluminio circolante nel sangue è legato per circa il 90% (21) a proteine seriche e nella popolazione normale i livelli plasmatici sono normalmente inferiori a 10 µg/L mentre nei dializzati vengono comunemente riscontrate concentrazioni comprese tra i 10 µg/L e i 40 µg/L. L'elevata affinità per il metallo delle proteine plasmatiche di trasporto facilita enormemente il passaggio di quest'ultimo nel sangue anche per livelli apparentemente bassi di contaminazione del dializzato.

La sindrome neurologica da intossicazione da alluminio viene definita col termine di encefalopatia o demenza dialitica (22, 23) e si manifesta con disturbi dello stato di coscienza, disartria, mioclonie e convulsioni che possono anche essere letali. L'utilizzo di una terapia chelante con Desferrioxamina (DFO) può provocare un transitorio aumento dei livelli plasmatici con insorgenza di sintomi neurologici. L'intossicazione può anche determinare l'insorgenza di una anemia secondaria, spesso microcitica o normocitica, che regredisce dopo il trattamento con DFO specie se si opera una opportuna integrazione di ferro.

L'accumulo di alluminio è inoltre causa nei pazienti in dialisi cronica di una patologia muscolo scheletrica che è prevalente rispetto a quella neurologica nei casi di accumulo graduale nell'arco di periodi prolungati. Le manifestazioni cliniche comprendono dolore osseo spesso molto intenso e miopatia prossimale che peggiorano rapidamente e possono portare ad una perdita completa della capacità di deambulare. Inoltre l'ipercalcemia è un segno biochimico di accompagnamento molto caratteristico dell'osteopatia da alluminio per la ridotta capacità dello scheletro di incorporare calcio nell'osso, anche se ovviamente nel paziente dializzato occorre escludere la presenza di altre cause di ipercalcemia. In ciò può essere di aiuto la determinazione del PTH che è frequentemente normale o solo modestamente elevato nell'osteomalacia da accumulo di alluminio.

## MATERIALI E METODI

I metodi descritti in letteratura (24, 25) prevedono solitamente una diluizione del campione biologico con un ugual volume di soluzione acquosa con modificante di matrice. Questo accorgimento riduce eventuali problemi di campionamento delle matrici biologiche più viscosi e favorisce la completa ossidazione e la distruzione termica delle sostanze organiche. Un volume di 10 µl depositato sulla piattaforma di L'Vov è di solito considerato sufficiente a garantire una sensibilità analitica adeguata ed un buon livello di precisione.

La temperatura di incenerimento varia a seconda degli autori, così come l'impiego dell'ossigeno come gas alternativo in una fase di preincenerimento a 500 - 600 °C al fine di aumentare l'ossidazione delle sostanze organiche (26); a tale proposito Gardiner e collaboratori criticano l'impiego dell'ossigeno in quanto questo allunga notevolmente il tempo di analisi e riduce la vita media del fornetto di grafite (27).

Per ciò che concerne la lunghezza d'onda della radiazione utilizzata per la lettura quella a 309,3 n.m. ha il vantaggio di una maggiore sensibilità mentre altri impiegano quella a 396,2 prediligendo una maggiore linearità con una leggera perdita di sensibilità (25%).

La quantità del metallo viene determinata per integrazione dell'area del picco del segnale analitico; ciò permette di ridurre gli errori dovuti alla variazione della forma del picco causata dal progressivo deterioramento del fornetto. Va altresì sottolineato che tale modo di operare rende l'analisi meno sensibile all'effetto della composizione della matrice. Nel caso in cui la determinazione quantitativa avvenga per integrazione del segnale e non per misurazione della sola altezza alcuni autori suggeriscono anche la possibilità di effettuare una calibrazione diretta con standard acquosi di Al contenenti 1% di HNO<sub>3</sub>. Altri autori al contrario non confermano una buona correlazione tra la pendenza della retta di calibrazione in soluzione acquosa e quella ottenuta con il metodo delle aggiunte, suggerendo l'impiego di standard serici (28).

Procediamo descrivendo più nel dettaglio il metodo utilizzato in questo studio per la determinazione dell'alluminio.

Strumentazione utilizzata:

- Spettrofotometro Perkin Elmer AA-100 con correzione del fondo al deuterio.
- Lampada a catodo cavo Al Lumina Lamp (Perkin Elmer)
- Fornetto in grafite Perkin Elmer Con piattaforma di L'Vov .
- Campionatore per fornetto di grafite Perkin Elmer AS-60.

Reagenti:

- Soluzioni standard di siero liofilizzato con concentrazione nota di Al Seronorm Trace Elements (SERO).
- Modificante di matrice  $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  10000 mg/L soluzione certificata (Perkin Elmer).
- Fosfato di ammonio  $NH_4H_2PO_4$  10% soluzione certificata (Perkin Elmer).
- $HNO_3$  (Suprapur Merk).
- $H_2O$  Superpura con sistema MilliQ (Millipore).

Sono ampiamente documentate in letteratura le difficoltà tecnico sperimentali che si incontrano nella determinazione dell'alluminio in campioni biologici a causa del rischio di contaminazione ambientale (29,30). La contaminazione può provenire sia dagli strumenti utilizzati per il campionamento dei fluidi biologici, aghi e siringhe, sia dai contenitori impiegati nella successiva conservazione e preparazione del campione.

A tale scopo sono state condotte prove per verificare la presenza eventuali inquinamenti da parte delle pareti interne delle provette utilizzate per il campionamento.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la quantità di Al rilasciate dalle pareti delle provette di prelievo in polipropilene o policarbonato e dei puntali in polietilene sono trascurabili rispetto alla concentrazione di Al-S e tali da non rendere indispensabile una decontaminazione di questi materiali.

Si evidenzia invece un possibile rilascio del metallo nel campione durante la fase di prelievo quando questo è effettuato con aghi metallici, a causa della elevata affinità per l'alluminio contenuto nell'ago da parte di alcune proteine seriche. E' pertanto raccomandabile l'uso di aghi di prelievo speciali a basso rilascio che possono essere forniti da tutte le principali aziende produttrici di sistemi di prelievo sottovuoto.

Si sottolinea inoltre l'importanza dell'utilizzo di reattivi certificati ultrapuri privi di metalli, in modo da ridurre al minimo l'eventuale inquinamento procurato dall'utilizzo del modificante di matrice, accorgimento di fondamentale importanza viste le basse concentrazioni medie dell'alluminio nei fluidi biologici.

Il contenuto in alluminio del siero viene determinato con una procedura modificata basata sul metodo riportato da Bettinelli et al. (31). I campioni pervenuti vengono immediatamente preparati per l'analisi operando dapprima una separazione del siero dalla parte figurata per centrifugazione a 2500 g per 10 min. Quindi si opera una diluizione del siero (500  $\mu$ l) con un ugual volume di una soluzione acquosa di nitrato di magnesio (2 g/l) e fosfato di ammonio (5 g/l) omogeneizzando per 30 secondi con agitatore vortex.

Un'aliquota di 20  $\mu$ l di soluzione viene introdotta mediante l'autocampionatore AS 60 all'interno del fornetto di grafite ove viene sottoposta al seguente ciclo termico per la successiva analisi, come riportato nella

seguinte tabella.

Temperatura (°C)	Rampa (sec)	Permanenza (sec)	Processo
120	1	2	Essiccamento
200	20	5	
1400	10	30	Incenerimento
2600	0	4	
2700	1	5	Pulizia

Tabella 1.

Sono quindi state condotte prove di ripetibilità del metodo su soluzioni standard a concentrazioni note sia intraserie che interserie, come riportato nelle seguenti tabelle.

LIVELLO	MEDIA $\mu$ g/l	N	SD	CV%
Normale	12,4	21	0,64	5,2
Alto	24,8	21	0,94	3,8

Tabella 2. Ripetibilità intraserie.

LIVELLO	MEDIA $\mu$ g/l	N	SD	CV%
Normale	12,4	21	0,88	7,1
Alto	24,8	21	1,44	5,8

Tabella 3. Ripetibilità interserie

Sono state eseguite, utilizzando dieci soluzioni a concentrazione crescente e nota, prove atte a determinare la sensibilità del metodo (0,87  $\mu$ g/L) definita come la concentrazione di Al-S che produce un segnale di 0,0044 A\*s.

Il limite di rilevabilità (LDR), definito come 3 DS della prova in bianco ( $3s_b$ ) e calcolato su una media di 10 determinazioni, è risultato pari a 0,5  $\mu$ g/L di Al-S. Il corrispondente limite decisionale (LDQ), definito dalla American Society Committee on Environmental Impovement come  $10 s_b$ , risulta pari a 1,70  $\mu$ g/L di Al.

Si sono quindi eseguite determinazioni dell'Al-S in quaranta soggetti sani non esposti al metallo e su quaranta soggetti sottoposti ad emodialisi cronica. I risultati ottenuti in queste due popolazioni sono riportati nella seguente tabella.

Soggetti	Media	Deviazione Standard
Sani	5.35	2.35
Dializzati	19.41	11.23

Tabella 4. Confronto dei valori medi di Al-S fra popolazione normale e dializzata.

## CONCLUSIONI

Il dosaggio di Al-S in soggetti emodializzati è oggi effettuato routinariamente mediante GFAAS utilizzando la piattaforma di L'Vov ed un modificante di matrice a base di nitrato di magnesio.

Il metodo da noi proposto per la determinazione dell'alluminio nel siero in assorbimento atomico con correzione al deuterio risulta sensibilmente più rapido rispetto a quello proposto da Bettinelli (31) poiché non utilizzando il gas alternativo ha un programma termico di durata ridotta.

Lo scopo che ci siamo prefissi è stato quello di ottenere la migliore sensibilità e ripetibilità utilizzando i tempi di analisi più brevi possibili. Si è osservato durante le prove di ottimizzazione del metodo che variazioni notevoli sulla ripetibilità sono determinate dalla temperatura e dal tempo di essiccazione. Viceversa variazioni sulla temperatura e sul tempo di incenerimento influenzano notevolmente la sensibilità del metodo. Siamo riusciti a ridurre i tempi di essiccazione a pochi secondi evitando fenomeni di disomogeneizzazione del campione senza che in questa fase la scelta della temperatura risultasse particolarmente critica. Al contrario nella fase di incenerimento l'ottimizzazione della temperatura a 1400° C ci ha consentito di ridurre il tempo di incenerimento a 30" limite oltre il quale era inficiata la sensibilità.

Gli assorbimenti aspecifici dovuti al segnale del fondo sono relativamente bassi (0,030 - 0,060 A-s al 95%) e per tale ragione la correzione del fondo al deuterio appare appropriata per le concentrazioni di alluminio da noi studiate. Come evidenziato nella descrizione del metodo il livello di precisione espresso come CV% è risultato inferiore al 10% sia nelle prove intraserie che interserie. La sensibilità del metodo ed i valori di LDR e LDQ rispettivamente di 0,87 µg/l, 0,50 µg/l e 1,70 µg/l risultano quindi più che sufficienti per i livelli serici medi sia della popolazione non esposta che sottoposta ad emodialisi cronica.

Il contenuto di Al-S dei soggetti sottoposti ad emodialisi è risultato variare in un ampio intervallo di valori tra i 5 ed i 80 µg/l, significativamente superiori alla concentrazione media di alluminio presente nel siero di soggetti non esposti a cicli dialitici. Al contrario nella popolazione normale si sono riscontrati valori medi del metallo notevolmente più bassi con un intervallo di variazione decisamente inferiore (5,35 mg/L ± 2,35 DS).

## BIBLIOGRAFIA

- 1) IPCS: Preamble to IPCS Environmental Health Criteria. WHO, Geneva 1995.
- 2) IPCS: Environmental Health Criteria for Aluminum. WHO, Geneva 1995.
- 3) Klatzo I., Wisniewski H.M., Streucher E.: Experimental production of neurofibrillary degeneration. Light microscopic observations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1965, 24: 187-199.
- 4) Monson R.R. : Occupational epidemiology. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. 1980, 93-103.
- 5) UK/MAFF: Aluminum in food. The 39<sup>th</sup> report of the steering group on chemical aspects of food Surveillance. UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). HMSO, London, (1993), 1-52.
- 6) Priest N.D., Talbot R.J., Austin G.C.: The bioavailability in young adults of aluminum ingested in drinking water. UKAEA: AEA Technology, Harwell Laboratory, Oxfordshire, UK. 1995, Report n° AEA-TPD-269.
- 7) Nieboer E., Gibson B.L.: Health effects of aluminum: a critical review with emphasis on aluminum in drinking water. Report to Public Health Branch, Ontario Ministry of Health, Toronto, Canada. 1993, 1-122.
- 8) Alzheimer A. Ueber eine eengenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Zentralblatt fur Nervenheilkunde und Psychiatrie.* 1907, 30: 177-179.
- 9) Martin C.N., Osmond C. et al.: Geographic relation between Alzheimer's disease and aluminum drinking water. *Lancet* 1989, 1: 59-62.
- 10) Michel P., Commenges D. et al.: Study of the relationship between of aluminum concentration in drinking water and the risk of Alzheimer's disease. In: Alzheimer's disease basic mechanism, diagnosis and therapeutic strategies. Chichester: J.Wiley and Sons. 1991, 387-389.
- 11) National Center for Health Statistics: TRANSAX: The NCHS system for producing multiple-cause-of-death statistics. NCHS, Hyattsville MD, 1986.
- 12) Seruga M., Grgic J., Mandic M.: Aluminum content of soft drinks from aluminum cans. *Z Lebesm Unters Forsh.* 1994, 198: 313-316.
- 13) Perl DP., Pendlebury WW: Aluminum (Al) accumulation in neurofibrillary tangle (NFT) bearing neurons of senile dementia Alzheimer's type (SDAT) - Detection by intraneuronal X-ray spectrometry studies of unstained tissue sections. *Pro. Am. Assoc. Neuropath.* 1992, 349.
- 14) Meiri H, Banin E., Roll M., Rousseau A.: Toxic effects of aluminum on nerve cells and synaptic transmission. *Neurobiol.* 1993, 40: 89-121.
- 15) Taylor G.A., Ferrier I.N. et al.: Gastrointestinal absorption of aluminum in Alzheimer's disease: response to aluminum citrate. *Age and Ageing.* 1992, 21: 81-90.
- 16) Edwardson J.A., Ferrier I.N. et al.: Alzheimer's disease and the aluminum hypothesis. *Aluminum in Chemistry Biology and Medicine.* NY Raven Press. 1992, 85-96.

- 17) Alfrey A.C., Le Genere G.R. et al.: The dialysis encephalopathy syndrome: possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* 1976, 294: 184-188.
- 18) Andress D.L., Ott S.M. et al.: Effect of parathyroidectomy on bone aluminum accumulation in chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.* 1985, 312: 468-473.
- 19) Andreoli S.P., Bergstein G.M., Sherrard D.J.: Aluminum intoxication from aluminum containing phosphate binders in children with azotemia not undergoing dialysis. *N. Engl. J. Med.* 1984, 310: 1079-1084.
- 20) Andress D.L., Knopp J.B. et al.: Early deposition of bone aluminum in diabetic patients with chronic renal failure. *N. Engl. J. Med.* 1987, 316: 292-296.
- 21) Trapp G.A.: Interaction of aluminum with cofactors, enzymes et other proteins. *Kidney Int.* 1986, 29(Suppl. 18): S12-16.
- 22) Alfrey A.C., Le Gendre G.R., Kaehny W.D.: The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *N. Engl. J. Med.* 1976, 294: 184-188.
- 23) Parkinson I.S., Ward W.K., Kerr D.N.S.: Dialysis encephalopathy, bone disease and anemia: the aluminum intoxication syndrome during regular hemodialysis. *J. Clin. Path.* 1981, 34: 1285-1294.
- 24) Slavin W.: An overview of recent developments in the determination of aluminum in serum by furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 1986, 1: 281-285.
- 25) Fagioli F., Scanavini L. et al.: Determination of aluminum in dialysis fluids by graphite furnace atomic absorption spectroscopy using the L'Vov platform. *Anal. Lett.* 1984, 17(A13): 1473-1486.
- 26) Casetta B., Nardini R. et al.: I possibili problemi nella determinazione dell'alluminio nel siero ematico. Soluzione ottimale con l'uso della STPF e del gas alternativo. In: *Alluminio: Problematiche analitiche e tossicologiche in nefrologia e medicina del lavoro.* (Edri) La goliardica pavese. Pavia 1984, 176-201.
- 27) Gardiner P.E., Ottaway J., Fontana F. et al.: Determination of aluminum in blood plasma or serum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta.* 1981, 128: 57-66.
- 28) Leung F.Y., Henderson. A.R.: Improved determination of aluminum in serum and urine with use of a stabilized platform furnace. *Clin. Chem.* 1982, 28: 2139-2143.
- 29) Minoia C., Miccoli G. et al.: Influenza di fattori extraanalitici nel dosaggio dell'alluminio sierico. In: *Alluminio: Problematiche analitiche e tossicologiche in nefrologia e medicina del lavoro.* (Edri) La goliardica pavese. Pavia 1984, 104-131.
- 30) Manning D.C., Slavin W. et al.: Investigation of aluminum interference using the stabilized temperature platform furnace. *Spectrochim. Acta Part B.* 1982, 37: 331-341.
- 31) Bettinelli M., Baroni U., Fontana F., et al.: Evaluation of the L'Vov platform and matrix modification for the determination of aluminum in serum. *Analyst.* 1985, 110: 19-22.

*Corrispondenza a:*  
 Nervi G.  
 Laboratorio Analisi  
 ASL22 Novi Ligure  
 Regione Piemonte  
 15067 Novi Ligure (AL)