

M. Bettinelli

Aspetti e problematiche analitiche nello studio dei valori di riferimento

ENEL P - Laboratorio di Piacenza, Via Nino Bixio 39, 29100 Piacenza

RIASSUNTO. La definizione dei Valori di Riferimento (V.R.) in fluidi biologici implica, per i laboratori chimici, uno sforzo analitico significativo per quanto riguarda: (1) la strumentazione, che deve avere limiti di rivelabilità adeguati ai livelli di concentrazione in gioco; (2) la scelta del metodo analitico, che deve ridurre il più possibile la manipolazione del campione per limitare le contaminazioni (3) il controllo dei fattori preanalitici, che deve essere tale da minimizzare i valori dei bianchi sia in termini di valore assoluto che di variabilità. Da questo punto di vista, la possibilità di analizzare il campione tal quale impiegando tecniche *hyphenated* con elevato potere di rivelabilità, costituisce un presupposto fondamentale per il raggiungimento di V.R. non artefatti. Per quanto riguarda la determinazione delle specie metalliche gli esempi riportati mostrano come l'ICP-MS, nelle sue diverse configurazioni, costituisce un riferimento di assoluta importanza nel panorama delle tecniche analitiche utilizzabili in questo campo di ricerca.

Parole chiave: valori di riferimento, fattori preanalitici, ICP-MS, tecniche *hyphenated*.

ABSTRACT. *www.gimle.fsm.it* - The determination of Reference Values (R.V.) in biological fluids is a hard task for analytical laboratories because: (1) the instrumentation must have detection limits adequate to low concentration levels; (2) the analytical method adopted should reduce the sample manipulation in order to avoid the cross-contamination; (3) the control of pre-analytical factors must assure low levels of blank in term of absolute value and variability. The possibility to analyze the samples without pretreatment by using *hyphenated* techniques with low detection limits it is the main tool to obtain reliable reference values. The large number of papers recently published and the reported examples show that the determination of metallic species in biological fluids can be successfully performed by ICP-MS in its different configuration and that mass spectrometry can be considered as reference technique in this specific application field.

Key words: reference values, pre-analytical factors, ICP-MS, *hyphenated* techniques.

Introduzione

Nell'analisi elementare dei materiali biologici devono essere considerati tre principali obiettivi: l'identificazione e la quantificazione di analiti vari, l'identificazione e la quantificazione di composti contenenti quegli analiti ed infine lo studio della loro biodisponibilità e/o tossicità. Generalmente, quando un materiale biologico viene analizzato se ne determina la composizione elementare e si giudica se la concentrazione di un dato analita o di un gruppo di essi è "normale" o no. Molto più problematico è riuscire ad avere informazioni sulla distribuzione spaziale e temporale di un elemento in un fluido, organo o tessuto in quanto la variazione della distribuzione elementare indotta da perturbazioni del sistema (es. dieta, ambiente, avvelenamenti ecc.) estende la semplice analisi fino allo studio di processi "in vivo". L'identificazione di specifici composti contenenti gli analiti di interesse, invece della determinazione della sola concentrazione totale, è auspicabile ma spesso limitata dalla sensibilità relativa o assoluta di un rivelatore specifico per quel dato elemento. La quantificazione dei composti contenenti il metallo passa perciò attraverso la loro separazione dalla matrice del campione, generalmente con tecniche cromatografiche o elettroforetiche, e la loro successiva identificazione mediante l'impiego di rivelatori spettroscopici specifici. Identificare la forma chimica del metallo nel composto è poi uno stadio estremamente complesso in quanto le fasi di trattamento del campione possono apportare significativi cambiamenti nella forma chimica del metallo. Tale caratteristica è di enorme importanza nello studio della biodisponibilità in particolare quando devono essere caratterizzati i meccanismi di metabolismo e di tossicità.

In ciascuno di questi aspetti dell'analisi di materiali biologici, l'ICP-MS può fornire, a nostro avviso, un contributo importante e in alcuni casi unico.

Dieci anni fa, nel primo Workshop SIVR del 1991 (1), scrivevamo "...se è indubbio che la spettrometria di assorbimento atomico con fornello di grafite (GFAAS) è oggi la tecnica elettiva del laboratorio chimico-tossicologico che opera nell'analisi in traccia e ultratraccia, non è azzardato prevedere che la spettrometria di massa accoppiata al plasma (ICP-MS) è destinata a diventare, entro la fine degli anni 90, una strumentazione a diffusione routinaria...

...sebbene allo stato attuale l'ICP-MS abbia trovato un impiego limitato per la determinazione di elementi in traccia in matrici biologiche, nei prossimi anni la sua utilizzazione sarà sempre più crescente, una volta approfondite le problematiche connesse al pretrattamento del campione biologico, talvolta indispensabile per la risoluzione del problema delle interferenze....

....si assisterà al passaggio dalla determinazione di un singolo analita alla caratterizzazione del profilo di un ampio numero di elementi....

... è già oggi possibile configurare, per alcuni analiti, la possibilità di avviare ricerche mirate alla speciazione delle varie forme metaboliche....

....è presumibile ipotizzare che la crescente semplificazione delle procedure di analisi ed il progressivo incremento del potere di rivelabilità dei metodi avranno un ruolo rilevante nel determinare una riduzione dei valori di riferimento (V.R.) determinati sperimentalmente dai diversi Autori..."

Da queste affermazioni ma ancor più dall'esperienza maturata in questi dieci anni, che si è concretizzata in una serie innumerevole di pubblicazioni scientifiche, emerge come il settore analitico degli elementi in traccia è quello che, più di altri, ha permesso di tradurre la considerevole evoluzione tecnica e strumentale in una semplificazione dei metodi, a ovvio vantaggio della velocità e dei costi di analisi e dell'accuratezza del risultato finale.

Alcuni dei più significativi sviluppi delle tecniche analitiche impiegate nell'analisi degli elementi in tracce in campioni clinici e biologici, riportati in review recentemente pubblicate (2-4), possono essere così riassunti:

- forno a microonde per la digestione dei campioni e impiego di sistemi alternativi alla mineralizzazione acida (es. tetra metil ammonio idrossido, TMAH);
- modificatori di matrice nella spettrometria di assorbimento atomico con fornello di grafite (GFAAS);
- materiali solidi per la preconcentrazione di analiti specifici o di nuovi agenti chelanti per migliorare l'estrazione liquido/liquido;
- sistemi di introduzione del campione quali l'iniezione in flusso (flow injection - FI);
- accoppiamento di tecniche cromatografiche (HPLC, GC, CI) con rivelatori specifici ad elevata sensibilità quali ICP-MS per le problematiche di speciazione;
- analisi in situ di campioni solidi con tecniche quali fluorescenza a raggi x (XRF), spettrometria di massa a sorgente laser (LMMA), spettrometria di massa a ioni secondari (SIMS).

La determinazione accurata di elementi in tracce, in fluidi biologici di rilevanza ambientale e occupazionale è un prerequisito importantissimo per la valutazione dell'esposizione interna di un individuo, per la prevenzione e il controllo dell'inquinamento nonché per la diagnosi e il trattamento di effetti nocivi sulla salute umana. Le concentrazioni "normali" di alcuni elementi non sono, in molti casi ancora note e ben definite, e questo rende ancor più urgente la necessità di sviluppare procedure analitiche idonee alla determinazione dei così detti valori di riferimento nei fluidi biologici umani.

I principali problemi analitici presenti nello studio dei valori di riferimento sono riconducibili fondamentalmente a tre punti:

- Necessità di dosare concentrazioni degli analiti molto basse (dell'ordine dei ng/L o pg/L)
- Possibili contaminazioni introdotte durante la fase di pretrattamento del campione (con conseguente necessità del controllo dei fattori analitici)
- Difficoltà di verificare l'accuratezza per mancanza di materiali di riferimento adeguati.

Le tecniche analitiche impiegate nel campo del biomonitoraggio umano possono essere arbitrariamente suddivise in *dirette* o *indirette* a seconda del fatto che possano analizzare il campione *tal quale* o dopo semplice diluizione dello stesso oppure necessitano di uno stadio di pretrattamento prima di poter effettuare la lettura strumentale vera e propria. La principale limitazione operativa, che rende non tutte le tecniche di uso corrente idonee per lo studio dei valori di riferimento, è legata al potere di rivelabilità che dovrebbe essere almeno un ordine di grandezza inferiore alla concentrazione che deve essere misurata. Poiché in letteratura esistono diverse definizioni del limite di rivelabilità è opportuno ricordare che per limite di rivelabilità strumentale (LRS) si intende quello relativo a letture replicate della stessa soluzione mentre il limite di rivelabilità del metodo (LRM) è quello relativo a letture di campioni replicati di *bianco* che hanno subito lo stesso trattamento dei campioni reali. In ogni caso, indipendentemente dalle procedure seguite per calcolare il LR, il valore del *bianco* e la sua deviazione standard dovrebbero essere ben caratterizzati ($n > 10$). A nostro giudizio l'impiego del LRM è più opportuno perché conservativo anche se ciò, ovviamente, pone delle limitazioni all'impiego di alcune tecniche analitiche che non risultano avere un potere di rivelabilità sufficiente per le concentrazioni in gioco. La seconda limitazione operativa che in qualche modo già si riflette nella stima del LRM è legata al fatto che la fase di pretrattamento del campione dovrebbe essere la più semplice possibile al fine di ridurre la contaminazione accidentale e di ottenere quindi valori dei bianchi (e della loro deviazione standard) più bassi possibile. Da ciò deriva la necessità di effettuare un attento controllo dei fattori preanalitici e di studiare attentamente le interferenze dovute alla matrice.

Spettrometria di massa a bassa ed elevata risoluzione

Se fino a qualche anno fa la spettrometria di assorbimento atomico con fornello di grafite (GFAAS) o con idrucci (HGAAS) era la tecnica più utilizzata nel biomonitoraggio dei metalli con rilevanza nei settori ambientale e occupazionale, oggi certamente, la spettrometria di massa accoppiata al plasma (ICP-MS) ha guadagnato popolarità per la possibilità di effettuare un'analisi multielementare, per l'elevata sensibilità e per l'ampio range dinamico. In particolare i LR ottenibili con ICP-MS possono essere anche tre ordini di grandezza migliori di quelli GFAAS ed è possibile la determinazione di metalli quali U, Th, Mo, Pt, Pd, Ag, Au, Ti, Si non analizzabili mediante GFAAS.

Solamente nel 1999 sono stati pubblicati più di 80 lavori riguardanti l'impiego di ICP-MS nel campo della tossicologia e dell'analisi dei fluidi biologici di cui circa 50 mediante LR-ICP-MS (Low Resolution ICP-MS) e 30 mediante HR-ICP-MS (High Resolution ICP-MS) (5-13).

Tuttavia, anche l'ICP-MS come ogni altra tecnica analitica soffre di interferenze spettrali e non-spettrali che in alcuni casi costituiscono la limitazione principale del metodo. Queste interferenze appaiono particolarmente serie e pesanti nell'analisi di matrici complesse come i fluidi biologici contenenti elevate quantità di componenti organiche ed inorganiche. La Tabella I riporta, a titolo di esempio, per alcuni metalli routinariamente determinati nei fluidi biologici alcune possibili interferenze spettrali dovute principalmente alla presenza di N, O, S, C, Ca e Cl nelle matrici considerate.

L'impiego di spettrometri a quadrupolo di tipo convenzionale (Q-ICP-MS) non consente perciò la determinazione accurata di alcuni elementi interferiti spettralmente senza un adeguato pretrattamento del campione che comprenda una fase di separazione / arricchimento dell'analita.

Alcune di queste interferenze spettrali possono oggi essere più o meno efficientemente risolte mediante strumenti che possono operare sia in bassa LRM (400 m/Δm) che media MRM (3000 m/Δm) che elevata risoluzione HRM (> 9000 m/Δm). I valori di media risoluzione sono, in pratica, sufficienti a separare il segnale dell'analita da molte delle più comuni interferenze spettrali dovute a specie poliatomiche o a doppie cariche riportate in Tabella I. La de-

terminazione di Al, Si, Sc, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga e Br può essere condotta in MRM, Ge, As e Se in HRM mentre tutti gli altri analiti possono essere determinati in LRM. Lavorando in LRM e assumendo un isotopo libero da interferenze, un background strumentale tipico di 0,2 counts/s, un bianco ideale e un fattore di diluizione 1/10 del campione si possono raggiungere limiti di rivelabilità strumentali teorici inferiori a 1 ng/l. Questo è, in pratica, vero solo per pochi elementi in quanto per gli analiti con massa compresa tra 27 e 81 amu per risolvere le interferenze spettrali è necessario lavorare in MRM (con un fattore di deterioramento dei LRS di circa 15-20 volte) o in HRM (con un fattore di 200-300 volte). Il background strumentale tipico per la maggior parte degli analiti in una matrice semplice come l'acqua distillata è sicuramente più elevato di 0,2 counts/s (vedi Fig. 1). Il sistema di introduzione del campione contribuisce significativamente al livello dei bianchi di alcuni elementi (Si, B, Ni e Cr) e gli effetti memoria dovuti all'analisi di campioni a diversa concentrazione sono tali da peggiorare, in alcuni casi drasticamente, i LRS prima riportati. Per tali motivi, come già accennato in precedenza, è più opportuno considerare il LRM e questo dipende fortemente dalla preparazione del bianco, dalla purezza dei reagenti impiegati, dalle impurità rilasciate dai contenitori utilizzati e dalla contaminazione accidentalmente introdotta in tutti gli stadi del metodo. In poche parole dai fattori analitici. Vari Autori (5, 6) riportano che, per alcuni analiti, il LRM è anche un ordine di grandezza più elevato del LRS; in Tabella II sono riportati, ad es., i risultati pubblicati da Rodushkin (5).

Tabella I. Potenziali interferenze spettrali per la determinazione di alcuni analiti mediante ICP-MS

Isotopo	Abundance (%)	Possibile interferences ^a
⁴⁵ Sc	100	²⁹ Si ¹⁶ O, ²⁸ Si ¹⁶ OH, ¹² C ¹⁶ O ₂ H, ¹³ C ¹⁶ O ₂ , ¹⁴ N ₂ ¹⁶ OH, ⁹⁰ Zr ²⁺
⁵¹ V	99.75	³⁵ Cl ¹⁶ O, ³⁷ Cl ¹⁴ N, ³⁶ Ar ¹⁵ N, ³⁶ Ar ¹⁴ NH, ³⁶ S ¹⁵ N, ³³ S ¹⁸ O, ³⁴ S ¹⁷ O, ³⁴ S ¹⁶ OH
⁵² Cr	83.79	³⁵ Cl ¹⁷ O, ³⁵ Cl ¹⁶ OH, ³⁶ Ar ¹⁶ O, ³⁸ Ar ¹⁴ N, ³⁶ Ar ¹⁵ NH, ⁴⁰ Ar ¹² C, ³⁷ Cl ¹⁵ N, ³⁴ S ¹⁸ O, ³⁶ S ¹⁶ O
⁵³ Cr	9.50	³⁷ Cl ¹⁶ O, ³⁵ Cl ¹⁸ O, ³⁸ Ar ¹⁵ N, ³⁸ Ar ¹⁴ NH, ⁴⁰ Ar ¹³ C, ³⁶ Ar ¹⁷ O, ³⁶ Ar ¹⁶ OH, ³⁶ S ¹⁷ O
⁵⁵ Mn	100	³⁷ Cl ¹⁸ O, ³⁷ Cl ¹⁷ OH, ⁴⁰ Ar ¹⁵ N, ⁴⁰ Ar ¹⁴ NH, ³⁸ Ar ¹⁷ O, ³⁶ Ar ¹⁶ OH, ³⁹ K ¹⁶ O, ²³ Na ³² S, ²³ Na ¹⁶ O ₂ , ²³ Na ³² S, ¹¹⁰ Cd ²⁺
⁵⁶ Fe	91.72	⁴⁰ Ar ¹⁶ O, ³⁶ Ar ¹⁸ O, ⁴⁰ Ca ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ¹⁵ NH, ³⁷ Cl ¹⁸ OH, ¹¹² Cd ²⁺
⁵⁷ Fe	2.2	⁴⁰ Ar ¹⁶ OH, ⁴⁰ Ar ¹⁷ O, ³⁸ Ar ¹⁸ OH, ⁴⁰ Ca ¹⁷ O, ⁴⁰ Ar ¹⁶ OH, ⁴¹ K ¹⁶ O, ¹¹⁴ Cd ²⁺
⁵⁹ Co	100	⁴⁰ Ar ¹⁸ OH, ⁴² Ca ¹⁶ OH, ⁴³ Ca ¹⁶ O, ⁴² Ca ¹⁷ O, ³⁶ Ar ²³ Na, ²⁴ Mg ³⁵ Cl, ¹¹⁸ Sn ²⁺
⁶⁰ Ni	26.1	⁴⁴ Ca ¹⁶ O, ²³ Na ³⁷ Cl, ¹²⁰ Sn ³⁺
⁶² Ni	3.59	³⁸ Ar ²⁴ Mg, ³⁶ Ar ²⁶ Mg, ²³ Na ₂ ¹⁶ O
⁶³ Cu	69.17	⁴⁰ Ar ²³ Na, ³¹ P ¹⁶ O ₂ , ²³ Na ₂ ¹⁶ OH, ²³ Na ₂ ¹⁷ O, ³⁵ Cl ¹⁴ N ₂ , ³⁷ Cl ¹² C ¹⁴ N, ³⁶ Ar ²⁷ Al, ⁴⁷ Ti ¹⁶ O, ⁴⁶ Ti ¹⁷ O, ⁴⁶ Ti ¹⁶ OH, ²³ Na ₂ ¹⁷ O, ²⁶ Mg ³⁷ Cl, ²⁵ Mg ³⁸ Ar, ²⁴ Mg ³³ Na ¹⁶ O
⁶⁵ Cu	30.83	³⁶ Ar ¹⁴ N ₂ H, ³² S ₂ H, ³³ S ¹⁶ O ₂ , ³² S ¹⁶ O ₂ , ³² S ¹⁶ O ₂ , ³² S ³³ S, ³² S ¹⁶ O ₂ H, ⁴⁸ Ca ¹⁷ O, ⁴⁸ Ca ¹⁶ OH, ³⁷ Cl ¹⁴ N ₂ , ³¹ P ¹⁶ O ¹⁸ O, ³¹ P ¹⁷ O ₂ , ⁴⁹ Ti ¹⁶ O, ⁴⁸ Ti ¹⁶ OH, ³⁸ Ar ²⁷ Al, ³⁶ Ar ²⁹ Si, ⁴⁰ Ar ²⁵ Mg
⁶⁶ Zn	27.9	³² S ¹⁶ O ¹⁸ O, ³² S ¹⁷ O ₂ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁷ O, ³³ S ¹⁶ O ₃ H, ³⁴ S ¹⁶ O ₂ , ³³ S ₂ , ³² S ³⁴ S, ⁴⁸ Ca ¹⁸ O, ⁴⁸ Ca ¹⁷ OH, ³⁸ Ar ²⁸ Si, ⁵⁰ Ti ¹⁶ O, ⁴⁹ Ti ¹⁶ OH, ⁵⁰ Cr ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ²⁶ Mg, ³⁵ Cl ¹⁴ N ¹⁶ OH, ³⁷ Cl ¹² C ¹⁶ OH, ³⁸ Ar ¹⁴ N ₂
⁶⁷ Zn	4.1	³³ S ¹⁷ O ₂ , ³³ S ¹⁶ O ¹⁸ O, ³² S ¹⁷ O ₂ H, ³² S ¹⁶ O ¹⁸ OH, ³⁴ S ¹⁶ O ₂ H, ³⁴ S ¹⁷ O ¹⁶ O, ³³ S ³⁴ S, ³⁶ Ar ¹⁴ N ¹⁶ OH, ³⁶ Ar ³¹ P, ³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ , ³⁷ Cl ¹⁴ N ¹⁶ O, ⁵¹ V ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ²⁷ Al, ⁵⁰ Ti ¹⁶ OH, ¹³⁴ Ba ²⁺
⁶⁸ Zn	18.8	³⁶ S ¹⁶ O ₂ , ³⁴ S ¹⁶ O ¹⁸ O, ³⁴ S ¹⁷ O ₂ , ³² S ¹⁸ O ₂ , ³³ S ¹⁷ O ¹⁸ O, ³² S ³⁶ S, ³⁴ S ₂ , ³⁶ Ar ³² S, ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹⁷ O, ³⁵ Cl ¹⁶ O ₂ H, ³⁷ Cl ¹⁴ N ¹⁶ OH, ³⁶ Ar ¹⁶ O ₂ , ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ₂ , ³⁸ Ar ¹⁴ N ¹⁶ O, ⁵² Cr ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ²⁸ Si, ⁵¹ V ¹⁷ O, ⁵¹ V ¹⁶ OH, ¹³⁶ Ba ²⁺
⁶⁹ Ga	60.1	⁵³ Cr ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ²⁹ Si, ³⁷ Cl ¹⁶ O ₂ , ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹⁸ O, ³⁵ Cl ¹⁷ O ₂ , ³⁶ Ar ¹⁶ O ₂ H, ³⁶ Ar ²⁶ O ¹⁷ O, ³³ S ¹⁸ O ₂ , ³⁴ S ¹⁷ O ¹⁸ O, ³⁶ S ¹⁶ O ¹⁷ O, ³⁶ S ¹⁶ O ₂ H, ³³ S ³⁶ S, ³⁶ Ar ³³ S, ¹³⁸ Ba ²⁺
⁷¹ Ga	39.9	⁵⁵ Mn ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ¹⁴ N ¹⁶ OH, ⁴⁰ Ar ¹⁵ N ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ³¹ P, ³⁶ Ar ³⁵ Cl, ³⁵ Cl ₂ H, ³⁵ Cl ¹⁸ O ₂ , ³⁷ Cl ¹⁶ O ¹⁸ O, ³⁷ Cl ¹⁷ O ₂ , ³⁸ Ar ³³ S, ³⁶ S ¹⁷ O ¹⁸ O, ¹⁴² Nd ²⁺ , ¹⁴² Ce ²⁺
⁸⁹ Y	100	⁴⁰ Ar ⁴⁹ Ti, ⁷³ Ge ¹⁶ O, ⁷² Ge ¹⁶ OH, ⁷² Ge ¹⁷ O, ⁷¹ Ga ¹⁸ O, ¹⁷⁸ Hf ²⁺
¹¹⁵ In	95.7	¹¹⁵ Sn (0.36%)

^aThis list is not exhaustive. References used in the compilation of this interference table include 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 14, 21 and 22.

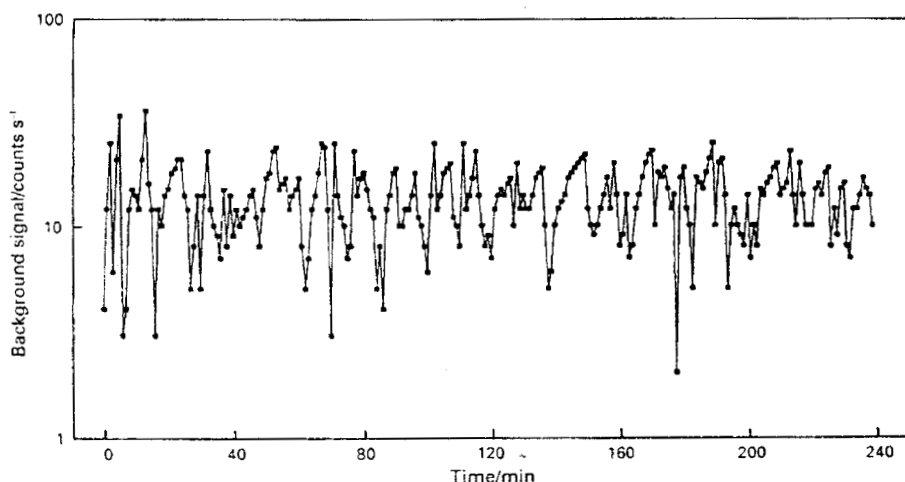


Figura 1. Background strumentale tipico per la maggior parte degli analiti in acqua distillata, misurato a massa 174

Tabella II. Limiti di rivelabilità strumentali (LRS) e del metodo (LRM) ($\mu\text{g/l}$) ottenuti mediante SF-ICP-MS per la matrice sangue intero (5)

Element	Instrumental DL (3s, n = 12)	Method DL (3s, n = 12)	Element	Instrumental DL (3s, n = 12)	Method DL (3s, n = 12)
Ag	0.004	0.004	Mo	0.007	0.03
Al	0.25	1.6	Nb	0.0007	0.0015
As	0.44	0.46	Nd	0.0008	0.0021
Au	0.0009	0.0026	Ni	0.05	0.31
B	0.8	1.2	Pb	0.015	0.024
Ba	0.026	0.028	Pr	0.0003	0.0007
Be	0.012	0.014	Pt	0.0003	0.0005
Bi	0.001	0.0017	Rb	0.006	0.005
Br	0.7	90	Re	0.00005	0.0001
Cd	0.004	0.008	Sb	0.004	0.004
Ce	0.0006	0.0052	Sc	0.005	0.006
Co	0.009	0.016	Se	1.6	1.8
Cr	0.025	0.24	Si	3	8
Cs	0.0002	0.0007	Sm	0.0004	0.001
Cu	0.06	0.19	Sn	0.045	0.06
Dy	0.0002	0.0007	Sr	0.04	0.065
Er	0.0002	0.0004	Ta	0.0004	0.0004
Eu	0.0005	0.0005	Tb	0.0001	0.0001
Ga	0.002	0.004	Tc	0.007	0.011
Gd	0.0004	0.0006	Th	0.0004	0.0006
Ge	0.07	0.10	Ti	0.05	0.16
Hf	0.0004	0.0016	Tl	0.0023	0.0028
Hg	0.03	0.03	Tm	0.0002	0.0002
Ho	0.0001	0.0002	U	0.0003	0.0004
I	0.05	4	W	0.0029	0.0085
Ir	0.0002	0.0002	V	0.007	0.013
La	0.0009	0.0027	Y	0.001	0.0046
Li	0.03	0.05	Yb	0.0006	0.0008
Lu	0.0002	0.0002	Zn	0.15	0.30
Mn	0.04	0.06	Zr	0.0022	0.015

Controllo dei fattori pre-analitici

Il controllo dei fattori pre-analitici appare tanto più importante quanto più sono basse le concentrazioni da determinare e tanto più complessa è la preparazione del campione.

A tale scopo devono essere attentamente controllati alcuni fattori quali: (a) la natura dei materiali impiegati durante la fase di prelievo; (b) la purezza dei reagenti utilizzati; (c) l'eventuale rilascio da parte dei contenitori e delle varie apparecchiature da laboratorio (es. recipienti del forno a microonde); (d) contaminazione derivante dall'ambiente del laboratorio (vedi Tab. III).

Poiché la fase di pretrattamento del campione assume un'importanza rilevante ai fini della qualità del risultato

finale (accuratezza, precisione e limiti di rivelabilità), vengono di seguito riassunte le principali tipologie di pretrattamento del campione (siero ed urina) riportati nella letteratura più recente.

Per la matrice **siero** sono previsti:

- diluizione (1/5 - 1/20) con acqua ultrapura;
- diluizione con NH_4OH (per la distruzione dei globuli rossi);
- diluizione con EDTA (per prevenire la perdita di elementi per precipitazione o assorbimento);
- diluizione con Triton X-100 (per ridurre i problemi di intasamento del sistema nebulizzatore/iniettore/torcia);
- fotolisi UV;
- dissoluzione con TBOH (tetrametilammonio idrossido);
- dissoluzione acida con MW in sistemi aperti o chiusi a bassa o elevata P

Tabella III. Concentrazione dei vari elementi (ng/l) presenti nello stesso campione di sangue intero raccolto in due differenti tipologie di contenitori

Element	Glass tube: Found (s ^a)	Plastic tube: Found (s ^a)	Element	Glass tube: Found (s ^a)	Plastic tube: Found (s ^a)
Ag	0.037 (0.001)	0.034 (0.005)	Mo	1.06 (0.02)	0.23 (0.03)
Al	24 (2)	2.6 (0.2)	Nb	0.020 (0.001)	0.017 (0.002)
As	0.88 (0.06)	0.78 (0.08)	Nd	1.16 (0.08)	0.054 (0.001)
Au	0.009 (0.001)	0.009 (0.002)	Ni	0.55 (0.14)	< 0.31
B	4.3 (6)	4.3 (0.5)	Pb	9.0 (0.2)	9.1 (0.8)
Ba	260 (20)	7.4 (0.3)	Pr	0.47 (0.03)	0.019 (0.002)
Bc	0.032 (0.002)	0.025 (0.005)	Pt	0.0011 (0.0002)	0.0010 (0.0001)
Bi	0.015 (0.007)	0.005 (0.001)	Rb	2190 (30)	2210 (20)
Br	14000 (1400)	14000 (700)	Re	0.0006 (0.0001)	0.0006 (0.0001)
Cd	0.109 (0.011)	0.105 (0.009)	Sb	0.040 (0.004)	0.044 (0.002)
Ce	34 (2)	0.100 (0.005)	Sc	0.011 (0.001)	0.004 (0.004)
Co	0.36 (0.03)	0.052 (0.007)	Se	108 (3)	117 (6)
Cr	0.99 (0.09)	0.47 (0.05)	Si	3800 (100)	270 (10)
Cs	3.17 (0.07)	3.20 (0.05)	Sm	0.087 (0.007)	0.013 (0.001)
Cu	1010 (30)	1000 (50)	Sn	0.39 (0.23)	< 0.06
Dy	0.008 (0.002)	0.005 (0.001)	Sr	26 (2)	14 (1)
Er	0.004 (0.001)	0.004 (0.001)	Ta	< 0.0004	< 0.0004
Eu	0.015 (0.001)	0.003 (0.001)	Tb	0.006 (0.001)	0.001 (0.001)
Ga	0.030 (0.008)	0.014 (0.006)	Tc	0.023 (0.004)	0.052 (0.002)
Gd	0.031 (0.002)	0.004 (0.001)	Th	0.066 (0.015)	0.0010 (0.0002)
Ge	< 0.1	< 0.1	Ti	2.2 (0.5)	0.34 (0.18)
Hf	0.003 (0.001)	0.002 (0.001)	Tl	0.018 (0.001)	0.005 (0.001)
Hg	0.62 (0.04)	0.68 (0.02)	Tm	0.0007 (0.0002)	0.0007 (0.0002)
Ho	0.0015 (0.0003)	0.0012 (0.0001)	U	0.012 (0.001)	0.002 (0.001)
I	73 (11)	77 (6)	W	0.016 (0.005)	0.006 (0.001)
Ir	0.0002 (0.0001)	< 0.0002	V	0.162 (0.052)	0.021 (0.008)
La	4.2 (0.2)	0.084 (0.013)	Y	0.059 (0.008)	0.024 (0.001)
Li	5.0 (0.1)	0.82 (0.07)	Yb	0.0041 (0.0008)	0.0024 (0.0005)
Lu	0.0008 (0.0001)	0.0005 (0.0001)	Zn	4890 (180)	4740 (120)
Mn	8.8 (0.8)	8.5 (0.4)	Zr	0.173 (0.015)	0.041 (0.003)

^aUncertainties expressed as standard deviation (n = 3).

Per la matrice **urina** sono previsti:

- diluizione (1/5 - 1/20) con acqua ultrapura;
- fotolisi UV;
- dissoluzione acida con MW in sistemi aperti o chiusi a bassa o elevata P.

Poiché l'ICP-MS soffre di una significativa diminuzione di sensibilità, e quindi di potere di rivelabilità, nell'analisi di campioni biologici contenenti elevate concentrazioni di composti organici e inorganici disciolti, ne deriva la necessità di lavorare su diluizioni sensibili del campione (da 1/5 fino a 1/20) oppure di ossidare la matrice organica del campione per trattamento in forno a microonde o mediante irraggiamento UV. I lavori pubblicati dai diversi autori, a seconda della scuola di pensiero e della esperienza specifica, evidenziano i vantaggi e gli svantaggi di un metodo rispetto all'altro. Vale qui la pena di sottolineare il fatto che, in ogni caso, il rischio di contaminazione appare tanto più elevato quanto più basse sono le concentrazioni in gioco e più complessa è la procedura di trattamento del campione. Per la definizione dei VR non appare perciò eccessivo pensare all'utilizzo di una *clean room* nella quale effettuare la preparazione del campione e di uno spettrometro di massa dedicato a questa precisa tipologia di analisi.

Tecniche Hyphenated

Nell'ottica di una semplificazione sempre più spinta dei metodi analitici impiegabili in questo campo di appli-

cazione specifico, suscita un grande interesse l'accoppiamento dell'atomizzazione elettrotermica alla spettrometria di massa (ETV-ICPMS) in quanto coniuga un ridotto trattamento del campione (che spesso per siero ed urina può essere analizzato tal quale) ad un elevato potere di rivelabilità del "detector spettrometro di massa".

I vantaggi dell'ETV come sistema di introduzione del campione sono ampiamente trattati in numerosi lavori specifici (14, 15) e saranno perciò qui solo brevemente ricordati:

- possibilità di effettuare un microcampionamento (dell'ordine di 10 - 40 µl);
- possibilità di trattare campioni con un elevato contenuto di solidi disciolti;
- elevata efficienza di trasporto;
- possibilità di analizzare solventi organici;
- riduzione delle interferenze spettrali dovute al solvente e conseguente miglioramento dei LRS;
- controllo delle interferenze di matrice mediante l'uso dei modificatori di matrice.

Nel nostro laboratorio sono stati analizzati 14 elementi nella matrice urina iniettando 10-20 µl di campione tal quale senza alcuna diluizione o trattamento preliminare. Per ragioni legate alla volatilizzazione dei diversi elementi e per una limitazione del numero di analiti quantificabili in una singola atomizzazione senza peggioramento della precisione analitica sono stati realizzati due gruppi di analiti chiamati rispettivamente "gruppo W" (atomizzazione dalle pareti) e "gruppo P" (atomizzazione dalla piattaforma). Le condizioni operative ed il programma termico re-

lativo all'analisi di Co, Cu, Mn, Ni e V sono riportate in Tabella IV mentre in Figura 2 sono mostrati, a titolo di esempio, i profili di picco relativi a 10 µg/l dei vari elementi nella matrice urina unitamente al segnale del bianco.

Per il "gruppo P" le condizioni operative sono sintetizzate in Tabella V mentre in Figura 3 sono mostrati i profili di picco relativi a 10 µg/l di As, Be, Cd, Pb, Te, Tl, Sb ed Se nella matrice urina, unitamente al segnale del bianco. Le curve di taratura ottenute per Ni, V e As, Sb, nel campo di lavoro 5 - 20 µg/l, sono mostrate rispettivamente nelle Figure 4 e 5.

Utilizzando l'ETV-ICP-MS e la tecnica della modificazione di matrice (aggiunta di Freon al gas interno del fornetto di grafite) è stato possibile analizzare direttamente il contenuto di terre rare (REE's) nella matrice urina senza mineralizzazione preliminare del campione e pre-

concentrazione degli analiti su resine chelanti. Ciò, oltre a permettere un notevole risparmio di tempo, assicura livelli dei bianchi molto contenuti con conseguenti LRM adeguati alle bassissime concentrazioni in gioco. I limiti di rivelabilità del metodo sono risultati, per tutte le REE's, comprese nel campo 1-10 ng/l con una precisione, alla concentrazione di 100 ng/l, inferiore al 15%. In Figura 6 sono mostrati i profili di picco relativi all'analisi di 50 ng/l di Dy, Er, Tm, Eu, Yb nella matrice urina mentre nella Figura 7 sono riportate le curve di taratura, comprese nel campo 50 - 200 ng/l di Tb e Pr ottenute iniettando 20 µl di campione.

Tabella IV. Parametri ETV per la determinazione di Co, Cu, Mn, Ni, V

Stadio n.	Temperatura (C°)	Tempo di Salita (s)	Tempo di Permanenza (s)	Flusso di Ar (mL min ⁻¹)
1	120	3	10	300
2	700	15	20	300
3	2650	0	6	0 *
4	2700	1	5	300
5	20	1	10	300

10 µl di campione;
10 µg/l⁻¹ di standard interno (Yb) aggiunto al campione;
tubo pirilizzato; atomizzazione dalle pareti.

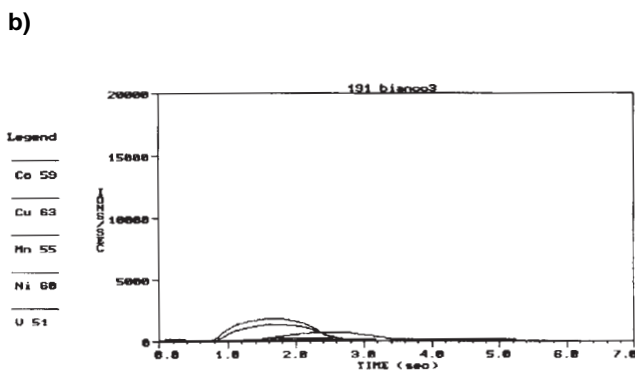
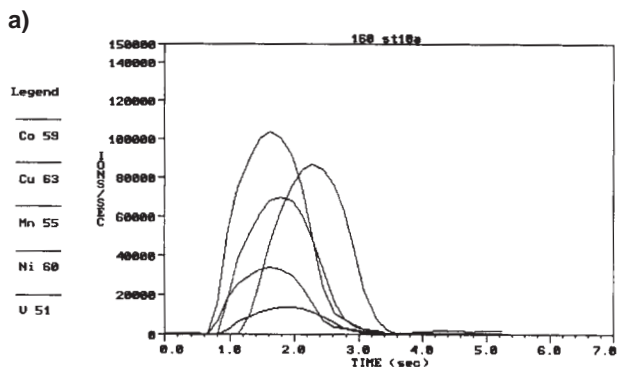


Figura 2. Profili di picco relativi all'analisi di 10 µg/l di Co, Cu, Mn, Ni e V (a) nella matrice urina e del relativo segnale del bianco (b)

Tabella V. Parametri ETV per la determinazione di As, Be, Cd, Pb, Se, Te e Tl

Stadio n.	Temperatura (C°)	Tempo di Salita (s)	Tempo di Permanenza (s)	Flusso di Ar (mL min ⁻¹)
1(*)	120	3	10	300
2	1000	10	20	300
3	20	1	10	300
4(**)	120	3	10	300
6	600	15	20	300
7	2500	0	6	0 *
8	2700	1	5	300
9	20	1	10	300

20 µl di modificatore di matrice Pd/Mg(NO₃)₂ aggiunto allo stadio 1(*);
10 µl di campione aggiunto allo stadio n. 4 (**);
10 µg/l⁻¹ di standard interno (Yb) aggiunto al campione;
tubo pirilizzato con piattaforma del L'vov; atomizzazione dalla piattaforma.

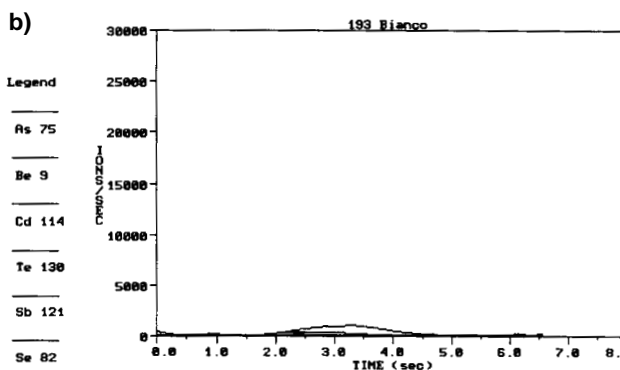
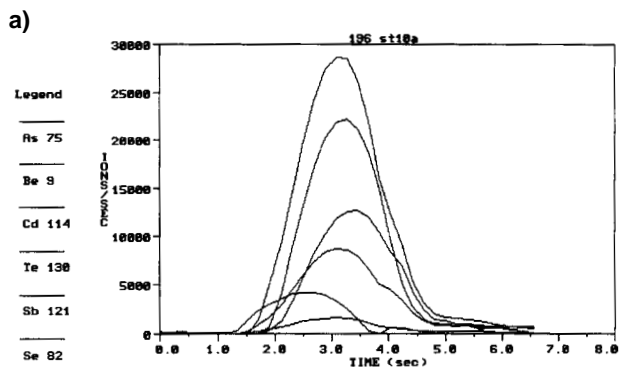


Figura 3. Profili di picco relativi all'analisi di 10 µg/l di As, Be, Cd, Te, Sb e Se (a) nella matrice urina e del relativo segnale del bianco (b)

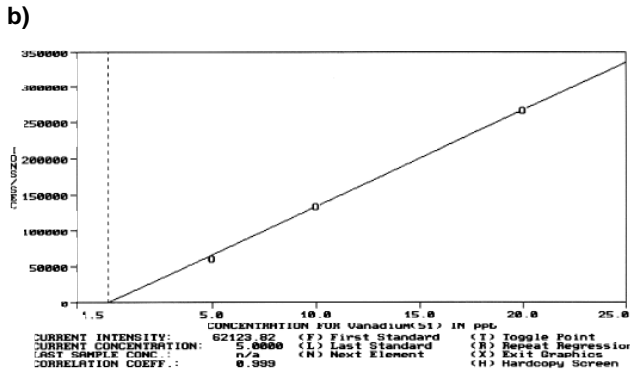
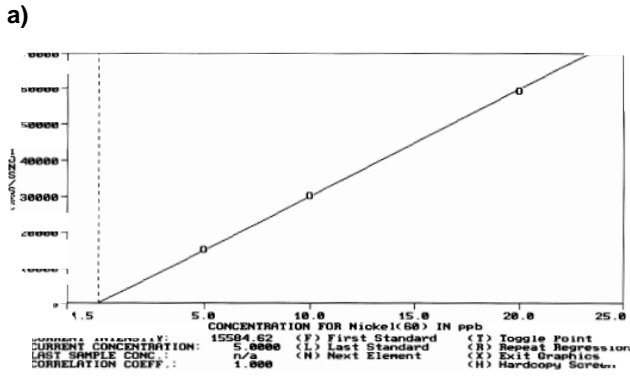


Figura 4. Curva di taratura (5 - 20 µg/l) per Ni (a) e per V (b) nella matrice urina; atomizzazione dalle pareti, volume del campione 10 µl

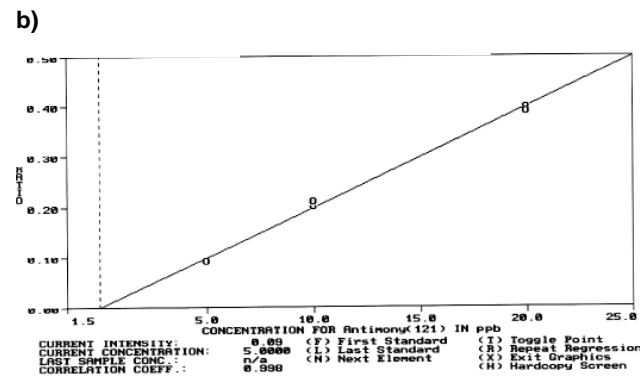
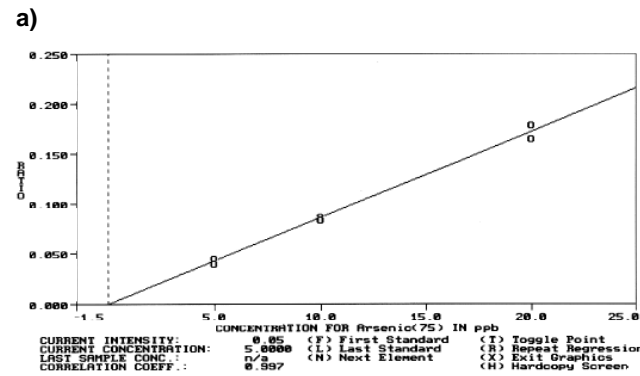


Figura 5. Curva di taratura (5 - 20 µg/l) per As (a) e per Sb (b) nella matrice urina; atomizzazione dalla piastrina, volume del campione 10 µl, 20 µl di modificatore di matrice Pd/Mg(NO₃)₂

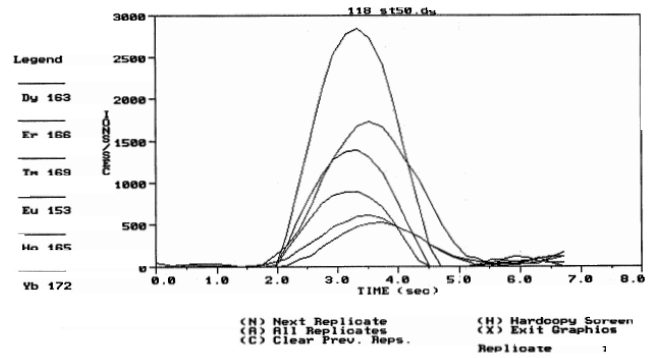


Figura 6. Profili di picco relativi all'analisi di 50 ng/l di Dy, Er, Tm, Eu, Ho, Yb nella matrice urina analizzati mediante ETV-ICP-MS

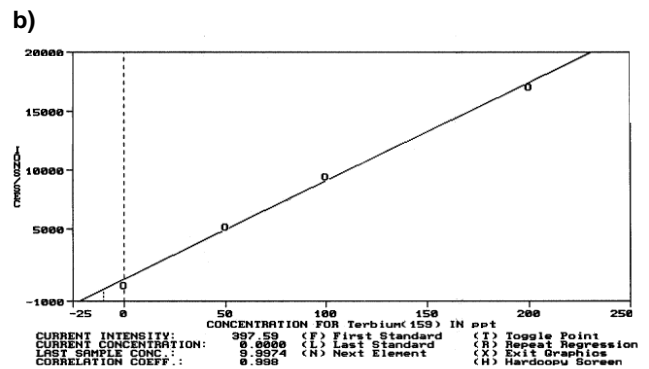
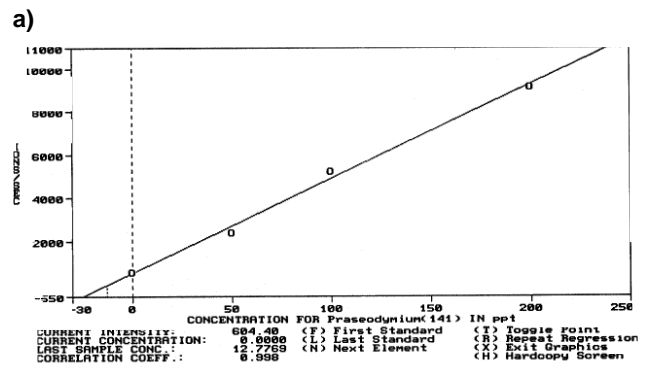


Figura 7. Curva di taratura (50 - 200 ng/l) per Pr (a) e per Tb (b) nella matrice urina; atomizzazione dalle pareti, volume del campione 20 µl, modificatore di matrice Freon

Le concentrazioni medie di REE's misurate in 58 campioni di urina raccolti da soggetti non-esposti sono risultate comprese nel campo 5-20 ng/l, con i valori più elevati sempre al di sotto di 70 ng/l.

Una descrizione statistica dei risultati relativi a questo studio è riportata nella Tabella VI mentre il lavoro completo è in fase di pubblicazione (16).

L'ICP-MS può essere accoppiata in altre tecniche di introduzione del campione che, come mostrato in Figura 8, permettono la risoluzione di specifici problemi analitici.

Il sistema di generazione ad idruri e l'iniezione in flusso (FI-HG) forniscono elevata sensibilità e specificità nella determinazione di As, Se e Hg mentre il nebulizzatore ad ultrasuoni (USN) permette, per matrici non troppo com-

Tabella VI. Concentrazione di REEs determinata mediante ETV-ICP-MS in 58 campioni di urina di soggetti non-esposti

Elemento	Numero atomico	Media \pm dev.s. ng/l	Mediana ng/l	Range ng/l	Numero di campioni < LRM
¹³⁹ La	57	16.0 \pm 9.8	12.2	> 6.0 – 49.7	2
¹⁴⁰ Ce	58	15.7 \pm 9.2	14.2	> 7.0 – 58.8	5
¹⁴¹ Pr	59	7.5 \pm 4.4	6.2	3.0 – 25.6	–
¹⁴³ Nd	60	19.6 \pm 6.3	18.2	5.0 – 37.7	–
¹⁴⁷ Sm	62	18.4 \pm 12.0	15.7	4.6 – 69.2	–
¹⁵³ Eu	63	4.3 \pm 3.0	3.6	> 1.5 – 17.8	5
¹⁵⁷ Gd	64	14.5 \pm 5.3	15.1	> 9.0 – 31.1	6
¹⁵⁹ Tb	65	4.7 \pm 3.3	3.9	> 2.0 – 18.1	5
¹⁶³ Dy	66	10.3 \pm 8.6	7.8	3.3 – 55.4	–
¹⁶⁵ Ho	67	3.7 \pm 3.5	2.4	> 1.5 – 19.8	5
¹⁶⁶ Er	68	7.5 \pm 5.8	5.6	> 3.0 – 35.0	3
¹⁶⁹ Tm	69	2.5 \pm 2.3	1.7	> 1.0 – 13.2	9
¹⁷² Yb	70	7.2 \pm 5.2	5.2	2.4 – 33.4	–
¹⁷⁵ Lu	71	2.8 \pm 2.0	2.3	> 1.5 – 11.8	9

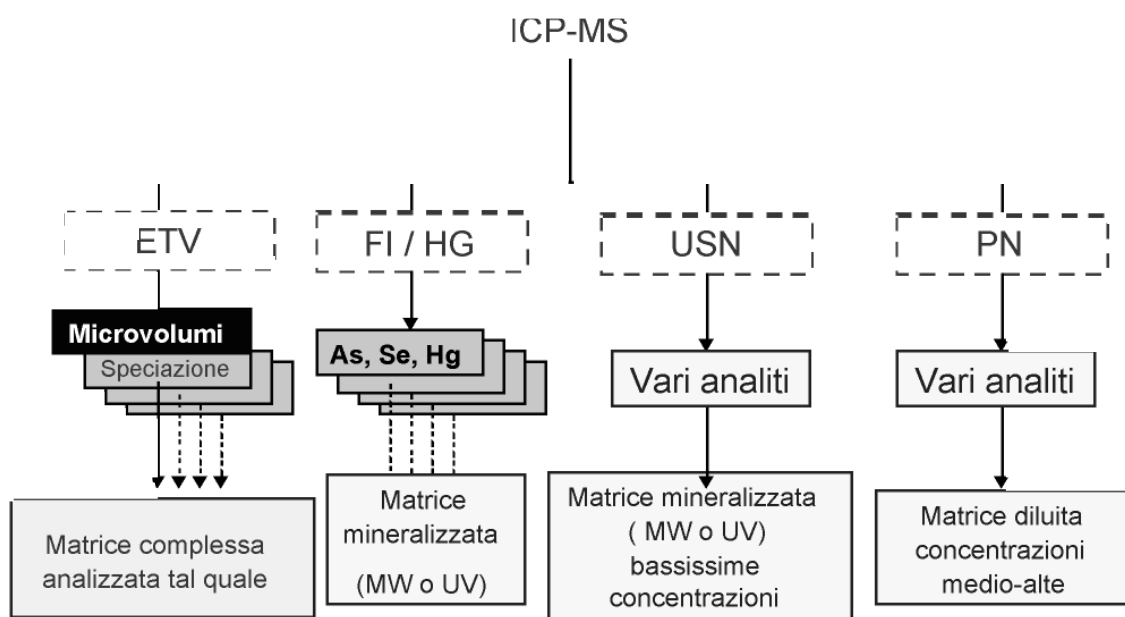


Figura 8. Possibili accoppiamenti di ICP-MS (quadrupolo a bassa risoluzione) con tecniche di introduzione del campione diverse per la risoluzione di specifici problemi analitici

plesse, di elevare la sensibilità per molti analiti di un fattore 30-50. Il sistema a microonde on-line (MW) consente infine un trattamento del campione in grado di assicurare il completo recupero degli analiti presenti in forme chimiche differenti.

Verifica dell'accuratezza

Un grosso problema nello studio dei valori di riferimento è la valutazione dell'accuratezza del metodo analitico impiegato per livelli di concentrazione di analita molto bassi in una specifica matrice. Nel caso in cui siano dispo-

nibili materiali certificati di riferimento (CRM), un criterio di accettabilità dei risultati, arbitrario ma comunque derivato dall'esperienza analitica, potrebbe essere il seguente:

- per concentrazioni > 1 μ g/l entro il \pm 20% del valore certificato o assegnato;
- per concentrazioni < 1 μ g/l entro il \pm 50% del valore certificato o assegnato.

Qualora non siano disponibili CRM, come nella maggior parte dei casi, si dovrebbe *validare* il metodo analitico applicato valutandone l'accuratezza per confronto con tecniche analitiche di *riferimento* come l'ICP-MS operanti nello stesso laboratorio o all'interno di Circuiti di Inter-calibrazione specifici.

Conclusioni

Lo studio dei valori di riferimento si configura come un'attività sperimentale di laboratorio che presenta peculiarità non comuni ad altri campi di ricerca. Le concentrazioni degli analiti da determinare, spesso prossime ai limiti di rivelabilità delle tecniche più comunemente impiegate, l'esasperato controllo dei fattori preanalitici derivante dalla necessità di controllare adeguatamente la contaminazione ambientale, la quasi totale mancanza di materiali certificati di riferimento con livelli di analiti confrontabili con quelli dei campioni reali rendono particolarmente problematica la produzione di dati analitici affidabili.

Nel campo dell'analisi dei metalli l'accoppiamento della spettrometria di massa ad alta / bassa risoluzione con tecniche di introduzione / preparazione del campione, diversificate in funzione dell'analita e della matrice considerata, consentono in molti casi, il raggiungimento di limiti di rivelabilità adeguati alla definizione dei VR non solo per la concentrazione totale, ma anche per le differenti forme chimiche dell'elemento eventualmente presenti.

Bibliografia

- 1) Workshop SIVR "Valori di riferimento di elementi in traccia in tessuti umani" in Quaderni di medicina del lavoro e medicina riabilitativa, S. Gaudenzio (Pavia) 1991.
- 2) Taylor A, Branch S, Fisher A, Halls D, White M. Atomic Spectrometry Update. Clinical and biological materials, foods and beverages. ASU Review, JAAS 2001; 16: 421-448.
- 3) Subramanian KS. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. Spectrochim Acta Part B 1996; 51: 291-319.
- 4) Lobinski R, Pereiro IR, Chassaigne H, Wasik A, Szpunar J. Elemental speciation and coupled techniques - towards faster and reliable analyses. JAAS 1998; 13: 859-867.
- 5) Rodushkin, Odman F, Olofsson R and Axelsson MD. Determination of 60 elements in whole blood by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. JMS 2000; 15: 937-944.
- 6) Townsend AT. The accurate determination of the first row transition metals in water, urine, plant, tissue and rock samples by sector field ICP-MS. JAAS 2000; 15: 307-314.
- 7) Begerow J, Turfeld M and Dunemann L. New horizons in human bio-monitoring of environmentally and occupationally relevant metals - sector-field ICP-MS versus electrothermal AAS. JAAS 2000; 15: 347-352.
- 8) Muniz CS, Marchante-Gayon JM, Alonso JIG and Sanz-Medel A. Multi-elemental trace analysis of human serum by double-focusing ICP-MS. JMS 1999; 14, 193-198.
- 9) Krachler M, Alimonti A, Petrucci F, Forastiere F and Caroli S. Influence of sample pre-treatment on the determination of trace elements in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. JAAS 1998; 13: 701-705.
- 10) Barnes R. Advances in inductively coupled plasma mass spectrometry: human nutrition and toxicology. Anal Chim Acta 1993; 283: 115-130.
- 11) Pozebon D, Dressler VL and Curtius AJ. Determination of trace elements in biological materials by ETV-ICP-MS after dissolution or slurry formation with tetramethylammonium hydroxide. JAAS 1998; 13: 1101-1105.
- 12) Lyon TDB, Fell GS, Hutton RC and Eaton AN. Evaluation of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for simultaneous multi-element trace analysis in clinical chemistry. JAAS 1988; 3: 265-271.
- 13) Sturup S. Application of HR-ICP-MS for the simultaneous measurement of zinc isotope ratios and total zinc content in human samples. JMS 2000; 15: 315-321.
- 14) Gregoire DC, Lamoureux M, Chakrabarti CL, Al-Maawali S, Byrne JP. Electrothermal Vaporization for inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic absorption spectrometry: Symbiotic Analytical techniques. JAAS 1992; 7: 579-585.
- 15) Sturgeon RE, Lam JW. The ETV as a thermochemical reactor for ICP-MS sample introduction. JAAS 1999; 14: 785-791.
- 16) Bettinelli M, Spezia S, Terni C, Ronchi A, Minoia C, Balducci C. Determination of REEs in urine by Electrothermal vaporization inductively coupled mass spectrometry, in publication on Rapid Communications in Mass Spectrometry.