

## Materiali di riferimento e analisi di elementi in traccia

Mario GALLORINI (a) e Herbert MUNTAU (b)

(a) Centro di Radiochimica e Analisi per Attivazione, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pavia  
(b) Divisione di Chimica, Istituto dell' Ambiente, Joint Research Center, Ispra, Varese

**Riassunto.** - L'uso di adeguati materiali di riferimento permette di valutare l'accuratezza delle determinazioni analitiche. L'attuale disponibilità di materiali certificati di riferimento non sempre riesce a soddisfare pienamente le esigenze della ricerca di elementi in traccia ed ultratraccia, in particolare nell'analisi di matrici complesse quali quelle biologiche e ambientali. A questo proposito vengono discusse le molteplici definizioni di materiale di riferimento. La progettazione e la produzione di materiali di riferimento certificati di nuova concezione non possono non tener conto della esigenza di ottenere sempre maggiori informazioni sull'analita soprattutto per quanto concerne la specie chimica sotto cui esso si presenta.

**Parole chiave:** materiali di riferimento, elementi in traccia, calibrazione, effetti matrice, specie chimiche.

**Summary (Reference materials and trace elements analysis).** - The use of appropriate reference materials allows the accuracy of analytical determinations to be assessed. The present availability of certified reference materials not always can adequately meet the needs of research in the field of trace and ultratrace element analysis, in particular as regards complex matrices, such as biological and environmental materials. In this context the various definitions of a reference material are discussed. Planning and certification of novel certified reference materials cannot disregard the exigency of obtaining more qualified information on the analytes, especially in so far as their different chemical species are concerned.

**Key words:** reference materials, trace elements, calibration, matrix effects, chemical species.

### Premessa

La valutazione quantitativa di una misura analitica di una specie chimica viene sempre effettuata in riferimento ad una quantità nota della stessa specie analizzata con la stessa procedura. Tale quantità nota rappresenta lo standard analitico, di fondamentale importanza per l'effettuazione di misure corrette, precise ed accurate. Ovviamente, uno standard di titolo impreciso, contaminato, non omogeneo e che non sia sottoposto alle stesse "vicissitudini analitiche" del campione in esame, rende inutile la misura analitica, anche se questa viene effettuata correttamente.

In questi ultimi anni, da parte di alcune agenzie di ricerca a livello internazionale, si è cercato di affrontare questo problema in maniera sistematica, progettando e producendo materiali standard di riferimento con caratteristiche ottimali ed idonee al controllo della misura analitica [1-3]. In questo contributo si vuole presentare ed illustrare la situazione attualmente raggiunta in questo settore.

### Materiali di riferimento

E' necessario, come primo punto, chiarire cosa si intenda per materiale di riferimento poiché esistono diverse definizioni che possono creare confusione.

*Materiali di riferimento (reference materials, RMs)*

Con questo termine si intende un materiale o una sostanza, di cui una o più caratteristiche siano sufficientemente conosciute e stabilite per essere utilizzate nella calibrazione di strumentazione, per la definizione di un metodo di misura e per la convalida di uno o più valori misurati in altri materiali.

*Materiali di riferimento certificati  
(certified reference materials, CRMs)*

Si tratta di materiali di riferimento (vedi sopra) di cui una o più caratteristiche sono certificate con procedure universalmente riconosciute essere le più valide per

precisione ed accuratezza e che vengono accompagnate da, o almeno sono riconducibili a, un certificato rilasciato da un'agenzia avente la massima competenza nel campo di produzione e distribuzione di RMs.

*Materiali di riferimento standard  
(standard reference materials, SRMs)*

Con questo termine sono diffusi e distribuiti materiali di riferimento certificati (vedi sopra) dal National Institute of Standards and Technology (NIST) statunitense, già NBS.

*Standard*

Vanno sotto questo nome sostanze o materiali con proprietà, nei limiti specificati, che si credono sufficientemente conosciute per permetterne l'uso nella valutazione delle stesse proprietà in altri materiali. Quando tali sostanze vengono impiegate nella esecuzione di metodi analitici, è opportuno definirle come "standard di calibrazione".

*Standard primari (primary standards)*

Tale termine si riferisce a sostanze o materiali le cui proprietà, nei limiti specificati, possono essere accertate in maniera incontrovertibile, per stabilire le stesse caratteristiche in altri materiali.

*Standard secondari (secondary standards)*

Rappresentano standard i cui valori sono basati sul confronto con quelli corrispondenti di standard primari. Questi standard possono anche diventare standard primari.

**Materiali di riferimento ottimali (top level)**

Esistono quindi diversi materiali di riferimento utilizzabili sia per il controllo dei metodi analitici che per la valutazione dei dati ottenuti. Attualmente, i materiali standard di riferimento migliori sono quelli distribuiti a cura delle due agenzie NIST e Standards, Measurements and Testing (SMT, in precedenza BCR). La prima agenzia è statunitense, con sede a Washington, la seconda è un ente appartenente alla Comunità Europea, con sede a Bruxelles. In questi materiali una o più caratteristiche sono certificate con un intervallo di affidabilità stabilito da più tecniche analitiche (almeno due completamente differenti e basate su principi fisici diversi, per esempio attivazione neutronica e assorbimento atomico) e con dati provenienti da più laboratori e più operatori per ogni tecnica. Inoltre, vengono forniti i dati relativi a misure quantitative dell'omogeneità del materiale standard, riferita, oltre che al singolo flacone, anche a tutta la serie

di flaconi (intra-bottle e inter-bottles homogeneity). Per questi materiali di riferimento dovrebbe essere fornita anche la composizione, a livello di macrocostituenti, della matrice in modo tale da permettere una scelta precisa da parte dell'operatore.

I materiali certificati devono, tra l'altro, mantenere nel tempo le loro caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche. La stabilità deve quindi essere documentata o deve essere indicata la data di scadenza dei materiali stessi. In special modo, per quanto riguarda i materiali biologici che sono suscettibili di attacco batterico e microbiologico è necessaria una sterilizzazione che blocchi detti processi. In questo caso viene usato normalmente un irraggiamento gamma che tuttavia non deve danneggiare il materiale (legami chimici, formazione di prodotti di radiolisi, ecc.).

Nel caso di materiali formati da più di una fase solida si possono verificare gradienti di concentrazione e separazione di alcuni costituenti all'interno del flacone (tendenza dei costituenti più leggeri a "galleggiare" sopra la fase più pesante) in conseguenza di caratteristiche geometriche differenti delle particelle. Il produttore deve in questo caso segnalare quindi la possibilità che si verifichino questi effetti e fornire suggerimenti o accorgimenti da seguire prima del prelievo (per esempio, sfere di teflon all'interno della bottiglia per consentire la migliore agitazione) e indicazioni dettagliate per il ripristino della perfetta omogeneità.

**Uso dei materiali di riferimento**

Lo scopo principale dei materiali di riferimento è quello di trasferire la qualità della misura analitica ottenuta dalle agenzie produttrici e distributrici agli utilizzatori dei materiali stessi. Più precisamente, si possono identificare i seguenti campi di applicazione:

*Sviluppo, valutazione e verifica di metodi analitici*

In questo caso gli standard di riferimento possono essere utilizzati per valutare un nuovo metodo analitico e per verificarne sia l'accuratezza che la precisione. Forniscono inoltre informazioni fondamentali per la validazione del metodo stesso e per studiarne la variabilità in serie di misure replicate.

*Sviluppo di "nuovi" materiali di riferimento*

I materiali certificati sono indispensabili per l'identificazione e la caratterizzazione di "nuovi" possibili materiali da impiegare nei settori non ancora coperti da quelli certificati. Misure parallele condotte su materiali certificati con caratteristiche di matrice simili a quelli dei materiali candidati forniscono le informazioni necessarie affinché le agenzie di riferimento possano valutare la

possibilità di preparare e distribuire i "nuovi" standard. A titolo di esempio, un nuovo standard per gli elementi in traccia in carne di maiale, può essere validamente controllato utilizzando il già esistente BCR CRM Bovine Muscle [6-9].

#### Verifica di procedure analitiche

**Taratura e calibrazione.** - In casi particolari che prevedono la misura analitica diretta su campioni solidi senza la dissoluzione del campione stesso (spettrometria di fluorescenza a raggi X, spettrometria di assorbimento atomico con effetto Zeeman previo campionamento solido), i materiali di riferimento certificati possono essere utilizzati per la calibrazione di metodi e strumenti. In questo caso si dovranno seguire scrupolosamente le indicazioni fornite dai certificati. Infatti, le procedure di certificazione definiscono la quantità minima di materiale di riferimento che, secondo le agenzie produttrici, garantisce i dati certificati. Campioni di materiali prelevati al di sotto di tali quantità possono avere composizione diversa da quelle utilizzate nella formulazione del certificato.

**Effetti matrice.** - Uno dei vantaggi di avere a disposizione materiali certificati di riferimento di composizione quanto più simile ai campioni in esame consiste nel fatto che entrambi i materiali (campione incognito e standard di riferimento) incontrino le stesse "difficoltà analitiche". Si può dire che ogni matrice ha una sua "storia analitica" che va dall'ingresso in laboratorio alla misura finale (pesata, dissoluzione, trattamenti chimici pre-misura, ecc.) e che varia in

dipendenza non solo delle tecniche analitiche stesse, ma anche dal tipo di elemento da determinare con la stessa tecnica. L'analita, in special modo nei campioni biologici, è quasi sempre presente in diverse forme chimiche associate a diversi composti del materiale in esame. Specie chimiche diverse dello stesso elemento esibiscono comportamenti molto diversi, a volte opposti, al momento dell'analisi. E' il caso, ad esempio, di metalli legati a gruppi proteici o di composti metallo-organici caratterizzati da volatilità, solubilità, stato di ossidazione o comportamento chimico molto diversi. Questi fenomeni possono introdurre errori sistematici di notevole entità all'atto del trattamento analitico del campione. Le possibilità pertanto di verificare la "storia analitica" su campioni certificati può senz'altro fornire utili informazioni.

Allo stato attuale non esistono materiali di riferimento con valori certificati riguardanti specie chimiche di elementi. E' questo, infatti, uno dei futuri obiettivi che sono allo studio da parte delle agenzie di certificazione [10, 11].

#### Materiali standard di riferimento nell'analisi di bioelementi

Nelle Tab. 1-3 vengono elencati i principali materiali di riferimento utilizzabili nell'analisi di elementi in traccia in campioni biologici. I materiali standard sono stati raggruppati a seconda dei possibili campi di applicazione; in molti casi però possono trovare applicazioni incrociate in relazione a composizioni di matrice simili.

**Tabella 1.** - Materiali di riferimento certificati per l'analisi di elementi in traccia in campioni bioambientali

Agenzia	Codice	Materiale	Elementi certificati	Elementi con valore indicativo
BCR	060	Aquatic plant	Cd, Cu, Hg, Pb	Cl, S
BCR	279	Sea lettuce	As, Cd, Cu, Pb, Se	Br, C, Ca, Cr, Fe, Hg, I, K, P
BCR	186	Pig kidney	As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Se, Zn	Ca, Cl, Co, I, K, Mg, Na, Ni, Pb, S
BCR	278	Mussel tissue	As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se, Zn	
NIST	1566	Oyster tissue	Ag, As, Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, U, V, Zn	Br, Cl, Co, F, I, Mo, P, S, Ti, Th
NIST	1575	Pine needles	Ag, Al, As, Ca, Cl, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Pb, Rb, S, Se, Sr, U, Zn	Br, Cd, N, Sb, Ti

BCR: Bureau Communautaire de Référence

NIST: National Institute of Standards and Technology

**Tabella 2.** - Materiali di riferimento per l'analisi di elementi in traccia in campioni di interesse eco-agricolo-nutrizionale

<b>Agenzia</b>	<b>Codice</b>	<b>Materiale</b>	<b>Elementi certificati</b>	<b>Elementi con valore indicativo</b>
BCR	062	Olive leaves	Cd, Cu, Hg, Pb	Cl, Fe, S
BCR	063	Skim milk powder	Ca, Cd, Cl, Cu, Fe, Hg, K, Mg, N, Na, P, Pb	Mn, Ni, Se, Ti, Zn
BCR	189	Whole meal flour	Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Se, Zn	As, Ca, Cl, Cr, Hg, K, Mg, Na, Ni
BCR	273	Single cell protein	Ca, Fe, K, N, P, Pb, Se, Zn	Mg, Na
BCR	191	Brown bread	Cd, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn	As, Ca, Cl, Cr, Hg, K, Mg, Na, Ni, P, Se
BCR	184	Bovine muscle	Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Pb, Se, Zn	As, Ca, Cl, Cr, I, K, Mg, Na, Ni, P
BCR	281	Rye grass	As, B, Cd, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Zn	
NIST	1567	Wheat flour	Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, K, Mn, Na, Pb, Se, Zn	As, Br, Mo, Ni, Rb, Te
NIST	1568	Rice flour	As, Ca, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mn, Na, Pb, Se, Zn	Br, Mo, Ni, Rb, Te
NIST	1573	Tomato leaves	As, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mn, P, Pb, Rb, Ru, Sn, U, Zn	Al, Bi, Br, Cd, Ce, Co, Eu, La, Hg, Mg, N, Sc, Ti
NIST	1577a	Bovine liver	Ag, As, Ca, Cd, Cl, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Rb, S, Se, Sr, U, Zn	Al, Br, N, Sb, Ti

BCR: Bureau Communautaire de Référence

NIST: National Institute of Standards and Technology

**Tabella 3.** - Materiali di riferimento certificati per analisi nel settore clinico-chimico

<b>Agenzia</b>	<b>Codice</b>	<b>Materiale</b>	<b>Elementi certificati</b>	<b>Elementi con valore indicativo</b>
BCR	194	Lyophilized bovine blood	Cd, Pb	-
BCR	303	Lyophilized human serum	Ca	-
NIST	2670	Freeze-dried urine	As, Ca, Cd, Cl, Cu, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Se, Zn	-
NIST	2671a	Freeze-dried urine	F	-
NIST	2672a	Freeze-dried urine	Hg	-

BCR: Bureau Communautaire de Référence

NIST: National Institute of Standards and Technology

## Sviluppi futuri

Recentemente, da parte delle agenzie di certificazione, viene fatto uno sforzo crescente nella ricerca e sviluppo di materiali di riferimento più completi ed applicabili a settori più specifici dell'analisi di tracce. Tuttavia, restano ancora scoperti molti settori sia a livello di matrici che di elementi. Per quanto riguarda i bioelementi, c'è manifesto bisogno di valori certificati a livello dei metalli duri (esposizione professionale verso, ad esempio, Hf, Ta, W e Zr), dei metalli nobili come Au, Ir, Pd, Pt e Rh (per esempio, il cisplatino usato come antitumorale) ed altri elementi di cui è nota la potenziale tossicità, come Be, F, Ga, I, Sn e Tl.

Nel campo delle analisi chimico-cliniche si stanno sviluppando materiali relativi ai fluidi biologici umani, come siero ed urina, ma non esistono ancora materiali su tessuti umani (ossa, denti, fegato, polmone, unghie). Solo recentemente si sono resi disponibili due materiali di riferimento multielementari a base di capelli umani [4, 5]. Le ricerche sulla biochimica e in genere sugli effetti tossicologici dei metalli in traccia per valutare la relazione dose-risposta a basse esposizioni (inquinamento ambientale) devono basarsi su valori di riferimento nell'uomo quanto più possibile precisi. Solo avendo a disposizione questi valori è possibile stabilire le quantità che dovranno essere utilizzate negli esperimenti di laboratorio (*in vitro*, *in vivo* e nei saggi alternativi di citotossicità).

I nuovi materiali di riferimento dovranno inoltre fornire dati ancora più precisi sull'omogeneità del materiale stesso. In alcuni casi si dovranno dare valori di omogeneità specifica elemento per elemento, tenendo conto che il miglioramento delle tecniche analitiche porta ad usare quantità sempre minori di campione da analizzare. La composizione macroscopica del materiale di riferimento (percentuali dei macrocostituenti) dovrà essere più dettagliata e quanto più possibile quantificata con precisione in modo da valutare *a priori* le possibili interferenze di matrice.

Infine, è ormai giunto il momento di valutare le possibilità reali di fornire informazioni anche sulle specie e forme chimiche con cui gli elementi in traccia sono presenti nel materiale di riferimento. Il passo immediatamente successivo alla conoscenza precisa ed accurata delle quantità in gioco è quello di sapere in che forma gli elementi in traccia interagiscono con l'ambiente e quali sono le specie chimiche, gli stati di ossidazione ed i complessi responsabili della loro biodisponibilità. Per valutare l'impatto sull'uomo è necessario conoscere come questi elementi si comportano e quali ne sono gli effetti (metabolismo, escrezione, citotossicità, ecc.).

Quanto sopra esposto costituisce naturalmente un settore di ricerca molto vasto e difficile, che richiede l'impiego e l'integrazione di diverse discipline scientifiche e di diverse tecniche analitiche. Le possibilità, però, di avvalersi di campioni "noti" rappresenta di per sé uno strumento di eccezionale efficacia.

Lavoro presentato su invito.

Accettato il 10 gennaio 1995.

## BIBLIOGRAFIA

- MUNTAU, H. 1986. The problem of accuracy in environmental analysis. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **324**: 678-682.
- GRIEPINK, B., MUNTAU, H. & COLINET, E. 1983. Certification of the contents of cadmium, copper, manganese, mercury, lead and zinc in two plant materials of aquatic origin and in Olive Leaves. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **315**: 193-196.
- GRIEPINK, B., MUNTAU, H. & GONSKA, H. 1984. Certification of the contents of Ca, Cl, K, Mg, Na and P in milk powder. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **319**: 296-299.
- OKAMOTO, K., MORITA, M., QUAN, H., UEHIRO, T. & FUWA, K. 1985. Preparation and certification of human hair powder reference material. *Clin. Chem.* **31**: 1592-1596.
- GRIEPINK, B., QUEVAUVILLER, P., MAIER, E.A., VERCOUTERE, K. & MUNTAU, H. 1991. *The certification of the contents (mass fractions) of Cd, Hg, Pb, Se and Zn in human hair.* (European Research Report, EUR 13433 EN).
- CAROLI, S. 1992. The accuracy syndrome in trace elements analysis of biological samples. In: *Proceedings of the Fifth Italo-Hungarian symposium on spectrochemistry: quality control and assurance in life sciences.* 9-13 September, 1991. *Microchem. J.* **45**: 257-271.
- CAROLI, S. 1993. Certified reference materials: use, manufacture and certification. *Anal. Chim. Acta* **283**: 573-582.
- ALVAREZ, R. 1986. Certified reference materials for validating spectroscopic methods and experimental data. *Fresenius' Z. Anal. Chem.* **324**: 376-383.
- WAGSTAFFE, P.I., GRIEPINK, B., HECHT, H., MUNTAU, H. & SCHRAMMEL, P. 1986. The certification of the contents (mass fraction) of Cd, Pb, As, Hg, Se, Cu, Zn, Fe and Mn in three lyophilised animal tissue reference material. (European Research Report EUR 10618 EN).
- CAROLI, S. 1995. Element speciation: challenges and prospects. In: *Proceedings of the Sixth Hungarian-Italian symposium on spectrochemistry: advances in environmental sciences.* GY. Zaray & T. Kantor (Eds). 23-27 August 1993. *Microchem. J.* (in press).
- GALLORINI, M. 1992. *Materiali standard di riferimento per l'analisi di elementi in tracce in campioni biologici e biomedici: situazione attuale e prospettive future.* Fondazione Clinica del Lavoro, Pavia. (Quaderni di Medicina del Lavoro e Medicina Riabilitativa). p. 53-69.