

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Determinazione di elementi inorganici
di interesse tossicologico in matrici
ambientali, biologiche e alimentari**

A cura di
Alessandro Alimonti e Nicola Violante
Laboratorio di Tossicologia Applicata

ISSN 1123-3117
Rapporti ISTISAN
03/45

Istituto Superiore di Sanità

Determinazione di elementi inorganici di interesse tossicologico in matrici ambientali, biologiche e alimentari.

A cura di Alessandro Alimonti e Nicola Violante

2003, iii, 155 p. Rapporti ISTISAN 03/45

Si riporta una visione d'insieme dei vari aspetti relativi alla determinazione di elementi in traccia in matrici ambientali quali aria e suolo, biologiche come tessuti e fluidi ed alimentari. Viene esaminato l'intero percorso delle procedure analitiche adottate partendo dal campionamento fino al trattamento statistico del risultato, prendendo in considerazione le più recenti applicazioni analitiche nel campo della spettrofotometria di assorbimento atomico, della spettrometria di emissione atomica a plasma e della spettrometria di massa. Viene inoltre illustrato l'accoppiamento tra tecniche separative e tecniche analitiche per la speciazione degli elementi. Un particolare approfondimento è dedicato al controllo di qualità e all'impiego dei materiali di riferimento nell'analisi per l'accertamento dell'accuratezza dei metodi. Conclude un'ampia dissertazione sulla valutazione dei metodi statistici per il trattamento del dato analitico e per la pianificazione degli esperimenti.

Parole chiave: Spettroscopia di assorbimento atomico, Spettrometria a plasma induttivo di emissione, Spettrometria a plasma induttivo con rilevazione di massa, Alimenti, Suolo, Acque, Fluidi biologici, Tessuti

Istituto Superiore di Sanità

Determination for toxic trace elements in environmental and biological matrices, and foods.

Edited by Alessandro Alimonti and Nicola Violante

2003, iii, 155 p. Rapporti ISTISAN 03/45 (in Italian)

This report gives an overall view of various aspects of the determination of trace elements in environmental matrices as air and soil, biological matrices like tissues and fluids and some food matrices. The whole path of the adopted procedures is examined, from the sampling to the statistical treatment of the data. The most recent analytical applications of the atomic absorption spectroscopy, atomic emission plasma spectrometry and mass spectrometry are described. Further, the combination of separation and analytical techniques for the speciation of elements species is illustrated. Particular attention is also devoted to the quality control and to the use of reference materials to obtain adequate analytical accuracy. Finally, a wide dissertation upon the evaluation of statistical methods for treatment of analytical data as well as for planning of the experimental design has been included.

Key words: Atomic absorption spectroscopy, Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, Inductively coupled plasma mass spectrometry, Food, Soil, Water, Biological fluids, Tissues

Per informazioni su questo documento scrivere a: alessandro.alimonti@iss.it; nicola.violante@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it/pubblicazioni.

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2003 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

INDICE

Premessa	iii
Elementi inorganici in matrici alimentari: campionamento, conservazione e trattamento del campione <i>Francesco Cubadda, Paolo Stacchini</i>	1
Campioni di materiale particellare aerodisperso: campionamento, conservazione e trattamento <i>Giovanni Ziemacki</i>	16
Campionamento e pre-trattamento dei campioni di suoli <i>Eleonora Beccaloni</i>	29
Elementi in traccia in fluidi biologici e campioni tissutali: campionamento, conservazione e trattamento <i>Alessandro Alimonti, Francesco Petrucci, Giovanni Forte</i>	39
Spettroscopia di assorbimento atomico nell'analisi di matrici complesse <i>Laura Ciaralli</i>	50
Analisi multielementare tramite la spettrometria di emissione atomica a plasma: esempi applicativi <i>Oreste Senofonte, Nicola Violante</i>	59
Spettrometria di massa nelle analisi di elementi in tracce in matrici complesse <i>Francesco Petrucci, Beatrice Bocca, Alessandro Alimonti</i>	77
Tecniche combinate nella speciazione di elementi in traccia <i>Nicola Violante, Oreste Senofonte</i>	88
Ottimizzazione di metodi di analisi multivariata mediante il disegno sperimentale <i>Maria Carla Gennaro, Valentina Gianotti</i>	105
Spazio multivariato e analisi delle componenti principali <i>Maria Carla Gennaro, Elisa Robotti</i>	121
Controllo qualità nell'analisi: materiali di riferimento <i>Stefano Caimi, Sonia D'Ilio, Oreste Senofonte</i>	148

PREMESSA

L'accurata determinazione degli elementi chimici essenziali o tossici in matrici ambientali, biologiche ed alimentari riveste, oggi, notevole importanza come indispensabile strumento per una concreta valutazione dell'esposizione, per la stesura delle norme conseguenti e, in ultima analisi, per una migliore definizione del rischio per la salute dell'uomo.

Le difficoltà poste dalla loro quantificazione nelle varie matrici sono d'altronde numerose e richiedono un corretto approccio globale per il loro superamento. Infatti, il livello di concentrazione di detti analiti, riscontrabili anche a tenori di ultra-traccia (es. ng L-1), richiede l'attuazione di misure specifiche durante l'intero ciclo analitico, dalle fasi pre-analitiche di raccolta, conservazione e trattamento, a quelle più direttamente strumentali di quantificazione finale. Ciò al fine di evitare o almeno di limitare al minimo contaminazioni o perdite dell'informazione analitica. Nella fase propriamente di determinazione, sia per le esigue concentrazioni che per i modesti volumi di campione disponibile (almeno nel caso di campioni biologici relativi all'uomo), risulta indispensabile l'adozione di raffinate e complesse tecniche di misura in grado di garantire adeguata sensibilità, specificità, accuratezza e riproducibilità.

Emerge, quindi, con chiarezza l'esigenza di disporre di affidabili metodi analitici, che contemplino l'adozione di sistemi di assicurazione di qualità del dato, di sistemi per il miglioramento delle prestazioni analitiche nonché di tecniche strumentali appropriate. Tutte le precauzioni sopra indicate presuppongono la necessità di affidare l'intera procedura a personale consapevole, preparato e costantemente aggiornato.

Le monografie contenute in questo rapporto si riferiscono ad un corso per gli operatori dei laboratori periferici del Servizio Sanitario Nazionale, tenuto nell'ottobre 2001 presso l'Istituto Superiore di Sanità. Il corso si proponeva di dare informazioni sulle procedure operative correnti nonché sulle innovazioni e prospettive analitiche nei vari aspetti della determinazione di elementi chimici in matrici ambientali, biologiche ed alimentari.

Ogni argomento è stato trattato nel modo più esauriente ed articolato possibile, partendo dalle esigenze di natura sanitaria, passando attraverso i criteri operativi da adottare per arrivare infine alle soluzioni applicative disponibili. In particolare si è potuto esaminare il ventaglio delle possibilità analitiche offerte dalla spettrometria di massa, di assorbimento atomico e di emissione atomica con sorgente a plasma induttivo. È stata affrontata, inoltre, l'individuazione e la determinazione delle diverse forme chimiche sotto cui gli elementi stessi possono essere presenti nelle varie matrici. Al fine del conseguimento della massima qualità dell'informazione, particolare rilevanza è stata, infine, data al controllo di qualità, all'impiego di materiali di riferimento ed al trattamento statistico del dato analitico.

Spero che quanto appresso riportato rappresenti un utile e proficuo contributo all'acquisizione di sempre maggiori competenze nelle particolari problematiche trattate.

Luciana Gramiccioni
*Laboratorio di Tossicologia Applicata
Istituto Superiore di Sanità*

ELEMENTI INORGANICI IN MATRICI ALIMENTARI: CAMPIONAMENTO, CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO DEL CAMPIONE

Francesco Cubadda, Paolo Stacchini
Laboratorio Alimenti, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Campionamento

Il criterio fondamentale del campionamento è la selezione di porzioni che siano rappresentative del materiale da sottoporre ad analisi, considerato nel suo complesso. Statisticamente parlando, infatti, lo scopo ultimo dell'analisi è la conoscenza delle caratteristiche della popolazione dalla quale sono stati estratti i campioni: se questi ultimi vengono scelti in modo inadeguato – cioè non riflettono le caratteristiche della popolazione originaria – l'intero iter analitico risulta pregiudicato indipendentemente dalla cura posta dall'analista nell'esecuzione delle operazioni successive (1).

L'incertezza legata al campionamento viene spesso trattata separatamente dall'incertezza legata alle altre operazioni analitiche. Nell'ipotesi di errori casuali, la deviazione standard complessiva s_{tot} è legata alla deviazione standard associata al campionamento s_c e a quella associata alle altre operazioni analitiche s_a dalla relazione: $s_{tot}^2 = s_c^2 + s_a^2$. Se il processo di misura è in uno stato di controllo statistico in modo che s_a è nota, s_c può essere valutata dalla s_{tot} trovata mediante l'analisi di campioni.

Nel caso specifico della determinazione del contenuto di elementi inorganici nei prodotti alimentari, la varietà ed eterogeneità delle matrici da esaminare rendono in generale il campionamento alquanto complesso (2). Le proprietà reologiche e compositive dei prodotti oggetto di indagine sono estremamente variabili e pongono di volta in volta problemi specifici che vanno affrontati con soluzioni *ad hoc*. L'omogeneità della matrice è generalmente un'eccezione e può solo di rado venire assicurata da facili manipolazioni. Nel campionamento condotto nell'ambito della produzione, questo è talvolta il caso di alcuni alimenti sfusi (matrici solide con granulometria adeguata, es. zucchero) o in fase liquida (es. latte), mentre a valle dei processi di trasformazione si ha generalmente a che fare con alimenti confezionati – e quindi dotati di un'individualità definita – con l'intervento di variabili esogene quali l'interazione con il contenitore (si pensi agli alimenti inscatolati e alla possibile cessione di metalli come Sn, Fe, Pb dalle pareti dei recipienti stagnati). Nel caso dei prodotti animali e vegetali campionati a livello della produzione primaria, un'attenta valutazione di una serie di variabili biologiche e ambientali è spesso assolutamente decisiva – come si vedrà nel dettaglio più avanti – per la predisposizione e l'esecuzione di un piano di campionamento efficace.

Un altro fattore che complica le procedure di campionamento è il tenore estremamente basso di alcuni elementi di interesse tossicologico in numerose matrici alimentari (3). Nel caso di elementi dotati di elevata tossicità ed ubiquitariamente diffusi come cadmio e piombo, anche livelli di presenza relativamente contenuti negli alimenti possono determinare un'assunzione significativa da parte della popolazione in relazione ai limiti cautelativi fissati dagli organismi internazionali. Per questo motivo si rende necessaria un'attività di sorveglianza e di monitoraggio capace di determinare in modo accurato tracce di questi elementi negli alimenti.

Un attento controllo e prevenzione di qualsiasi contaminazione in fase di campionamento sono quindi necessari e richiedono l'adozione di speciali precauzioni.

In termini generali, per assicurare la rappresentatività dei campioni destinati all'analisi occorre che questi siano estratti dalla popolazione in modo casuale (random). Si parla di campionamento casuale quando tutti gli elementi nella popolazione hanno uguale e costante probabilità di essere estratti e tutti i possibili campioni hanno uguale (o fissata e determinabile) probabilità di essere formati (4). I campioni casuali hanno proprietà particolarmente utili nel trattamento statistico, in quanto assicurano probabilità costanti e indipendenti. In concreto, per randomizzare la selezione dei campioni si può ricorrere ad una tavola o a un generatore di numeri casuali. Questo può essere talvolta difficile da realizzare, ma è l'unico modo per agire in modo rigoroso escludendo ogni interferenza legata alla soggettività dell'operatore.

In talune circostanze un campionamento del tutto casuale può non essere opportuno. Nel caso di prelievi effettuati da grandi contenitori dove solo singole porzioni o strati del prodotto alimentare sono presumibilmente omogenei per quanto riguarda il contenuto dell'elemento x da determinare, è preferibile procedere con un campionamento rappresentativo in ciascuno strato. Questo dovrà tenere conto delle dimensioni relative dello strato rispetto al tutto: il numero di campioni da prelevare dovrà essere proporzionale a tali dimensioni.

Una volta selezionati i campioni, è possibile procedere in due modi. Il primo è quello di combinare i campioni (solitamente attraverso un'ideale omogeneizzazione) al fine di ottenere un campione composto o pool. In questo modo, attraverso l'analisi di un unico campione è possibile conoscere il valore medio della grandezza incognita (contenuto dell'elemento x) nella matrice originaria. Tuttavia l'informazione relativa alla variabilità tra i campioni – e quindi, di riflesso, alla distribuzione di valori della grandezza nella popolazione originaria – viene persa. Se si è interessati a questa informazione, non resta altra via che l'analisi dei singoli campioni (ovvero, come spesso avviene, di loro sotto-campioni), il che determina però un maggiore carico di lavoro analitico.

In due casi è possibile assumere che un unico campione sia rappresentativo della matrice alimentare indagata. Il primo caso si ha quando il materiale campionato è ragionevolmente omogeneo. Il secondo si verifica quando il campione viene definito a priori come rappresentativo, per una data finalità, da specifiche norme tecniche o disposti legislativi. Questo avviene ad esempio nel controllo ufficiale dei prodotti alimentari, dove il numero n di campioni da prelevare indicato a norma di legge (in alcune circostanze può essere $n=1$) è per definizione rappresentativo ai fini dell'obiettivo perseguito. Quindi, nell'ambito dell'attività di sorveglianza, il numero di campioni da prelevare in relazione all'ampiezza del lotto o della partita alimentare non va di regola individuato mediante procedure statistiche ma è indicato dal riferimento normativo; il campionamento così eseguito è, per definizione, rappresentativo.

La direttiva 2001/22/CE, ad esempio, stabilisce i metodi di prelievo dei campioni per il controllo ufficiale dei livelli di piombo, cadmio e mercurio nelle derrate alimentari (6). Tale direttiva è collegata al regolamento CE n. 466/2001, di recente emanazione, che definisce i tenori massimi di tali contaminanti in una serie di prodotti agro-alimentari non trasformati (7). L'allegato I della direttiva introduce una serie di definizioni necessarie per la descrizione dei criteri di campionamento. Viene definita 'partita' una quantità identificabile di prodotto alimentare, contenuta in un'unica consegna e avente caratteristiche comuni ufficialmente riconosciute, quali l'origine, la varietà, il tipo di imballaggio, l'imballatore, lo speditore e la marcatura (nel caso del pesce, è comparabile anche la dimensione del pesce), mentre col termine 'sottopartita' viene indicata una porzione di partita, fisicamente separata e identificabile, designata per essere sottoposta a campionamento secondo le modalità stabilite. Il 'campione elementare' viene definito come il quantitativo di materiale prelevato in un solo punto della partita o sottopartita. Esso viene distinto dal 'campione globale' (aggregazione di tutti i campioni elementari) e dal 'campione di laboratorio'.

I campioni elementari devono essere prelevati per quanto possibile in vari punti distribuiti nell'insieme della partita o sottopartita. Il campione globale è costituito da tutti i campioni elementari ed è di almeno 1 kg (tranne che in caso di campionamento di una singola confezione). I campioni di laboratorio prelevati in esecuzione di provvedimenti amministrativi giudiziari a fini di attuazione, difesa e riferimento sono ottenuti dal campione globale omogeneizzato, a condizione che tale procedura non sia in contrasto con la regolamentazione degli Stati membri. Le dimensioni dei campioni di laboratorio devono essere tali da consentire almeno lo svolgimento di analisi duplici.

La direttiva stabilisce che il prelievo dei campioni deve essere effettuato, per quanto possibile, nel punto in cui il prodotto entra nella catena alimentare e diventa identificabile una partita distinta. Nel caso di prodotti liquidi per i quali è lecito presumere che gli analiti siano distribuiti in modo omogeneo nelle partite è sufficiente prelevare un campione elementare per partita, che costituisce il campione globale. I prodotti liquidi contenenti proteine vegetali idrolizzate o salsa di soia liquida devono essere bene agitati o omogeneizzati prima che il campione elementare venga prelevato. Per gli altri prodotti, il numero di campioni elementari da prelevare per partita è indicato nella Tabella 1 (valida nel caso di una partita unica, cioè non suddivisa in singole confezioni o unità) e nella Tabella 2 (valida nel caso di una partita costituita da singole confezioni o unità).

Tabella 1. Numero minimo di campioni elementari da prelevare in una partita unica ai sensi della direttiva 2001/22/CE ¹

Peso della partita (in kg)	N. minimo di campioni
< 50	3
Da 50 a 500	5
> 500	10

¹ I campioni elementari devono essere di peso analogo

Tabella 2. Numero minimo di campioni elementari da prelevare in una partita costituita da singole unità ai sensi della direttiva 2001/22/CE ¹

N. di confezioni o unità della partita	N. minimo di campioni
Da 1 a 25	1
Da 26 a 100	ca 5% (min 2)
> 100	ca 5% (max 10)

¹ Ciascuna confezione o unità rappresenta un campione elementare

La direttiva precisa che ciascun campione globale e di laboratorio deve essere collocato in un recipiente pulito, di materiale inerte, che lo protegga adeguatamente da qualsiasi forma di contaminazione, dalla perdita di analiti per adsorbimento sulla parete interna del recipiente e dai danni che potrebbero essere causati dal trasporto. Devono inoltre essere prese tutte le precauzioni necessarie ad evitare alterazioni della composizione dei campioni globale e di laboratorio durante il trasporto e la conservazione.

Quando il campionamento non è legato al controllo ufficiale, ma è svolto nell'ambito di attività di monitoraggio o di ricerca, devono essere adottati i criteri generali delineati in precedenza per assicurarne la rappresentatività. Le specifiche modalità di campionamento sono però determinate dalle finalità dell'indagine e la loro definizione richiede uno studio preliminare che tenga conto delle ipotesi che si vogliono verificare sperimentalmente e di tutte le variabili

implicate. In termini generali, si possono distinguere due casi: il campionamento di prodotti trasformati e/o confezionati e quello di organismi animali o vegetali (o di loro prodotti) eseguito a livello della produzione primaria.

Nel primo caso, la messa a punto di un piano di campionamento rigoroso richiede di norma solo la conoscenza dell'omogeneità relativa del prodotto da campionare (1). Se questa non è nota, la si può stimare attraverso uno studio preliminare, consistente nel prelievo di alcuni campioni, nella loro analisi e nel calcolo della deviazione standard s_c associata alla concentrazione dell'analita da misurare (*between-sample standard deviation*). Attraverso opportune equazioni, alcune delle quali – valide nel caso di distribuzioni normali – sono riportate a titolo di esempio nella Tabella 3, è possibile calcolare la massa minima di ogni singolo campione e il numero di campioni che è necessario prelevare per non eccedere un predeterminato livello di incertezza legata al campionamento. Nel caso di lotti o partite suddivise in unità discrete, la varianza associata al risultato analitico è influenzata anche dal numero di unità presenti in ciascuna partita ed è data dalla somma di tre contributi: quello legato alla varianza tra le unità nella partita, quello legato alla varianza media di serie di campioni prelevati da una singola unità, e quello dovuto alla varianza associata alle restanti operazioni analitiche (Tabella 3).

Tabella 3. Equazioni utili nel campionamento di prodotti alimentari trasformati e/o confezionati¹

Massa minima dei singoli campioni

$$M = \frac{K_c}{R^2}$$

M = massa del campione
 K_c = costante di campionamento (massa di campione necessaria a limitare l'incertezza legata al campionamento all'1% con un livello di confidenza del 68%)²
 R = deviazione standard relativa tra i campioni (CV%)

Numero minimo di campioni

$$n = \frac{t^2 s_c^2}{R^2 \bar{x}^2}$$

t = valore t di Student per il livello di confidenza desiderato³
 s_c = deviazione standard tra i campioni⁴
 R = deviazione standard relativa (CV%) accettabile in media
 $\bar{x}$ = valore medio di concentrazione dell'analita nel campione⁴

Varianza nel caso di partite costituite da singole unità

$$\sigma_x^2 = \frac{\sigma_b^2}{n_b} \frac{(N - n_b)}{N} + \frac{\sigma_w^2}{n_b n_w} + \frac{\sigma_t^2}{n_t}$$

σ_x^2 = varianza della media
 σ_b^2 = varianza delle unità nella partita
 σ_w^2 = varianza media di campioni presi da uno strato⁵
 σ_t^2 = varianza delle operazioni analitiche
 N = numero di unità nel lotto
 n_b = numero di unità prelevate in modo casuale
 n_w = numero di campioni prelevati in modo casuale da ciascuna unità campionata
 n_t = numero totale di analisi condotte su tutti i campioni (incluse le repliche)

¹ Altre equazioni possono essere applicate nel caso di materiali con più porzioni o strati omogenei, o per determinare la massa da prelevare nel caso di campioni con una definita granulometria (1).

² Può essere determinata stimando la deviazione standard tra i campioni S_c da una serie di misure con campioni di massa M .

³ Inizialmente si può fissare t a 1,96 con un livello di confidenza del 95% e calcolare n . Il valore di t per questo n può quindi essere sostituito e il sistema iterato a un n costante.

⁴ Possono essere determinati mediante misure preliminari o in base a precedente conoscenza del materiale da campionare.

⁵ Uguale a zero per matrici omogenee (ad esempio liquidi non stratificati).

Il prelievo di campioni dalle linee di produzione può essere effettuato manualmente o mediante l'uso di appositi dispositivi automatici (8). Esistono diversi tipi di campionatori, le cui modalità di prelievo possono essere regolate agendo su parametri quali l'ampiezza dell'apertura di ingresso del dispositivo, la velocità di spostamento lungo il flusso di materiale da campionare, la frequenza di campionamento. Alcuni di questi dispositivi sono anche utilizzati nei laboratori per la suddivisione di grandi campioni in aliquote rappresentative aventi una massa idonea per l'analisi.

Nel caso di prodotti animali e vegetali prelevati a livello della produzione primaria, la predisposizione di un piano di campionamento adeguato implica la valutazione di una serie di variabili addizionali, di tipo biologico e ambientale. Queste possono influenzare profondamente la variabilità del contenuto di elementi inorganici degli organismi da esaminare. Tra le variabili più importanti vi sono:

- specie;
- varietà;
- sesso;
- età;
- peso/dimensioni;
- fase del ciclo vitale;
- stagione;
- livello di elementi naturalmente presenti in forma biodisponibile nell'ambiente;
- influenze antropiche.

Come esempio può essere citato il caso del campionamento di molluschi bivalvi e gasteropodi eduli da diversi siti per confrontarne il contenuto in microelementi tossici quali cadmio e piombo. È noto che la concentrazione di questi e altri elementi inorganici nei tessuti molli di tali organismi è legata al peso corporeo da una funzione potenza del tipo: $C = a W^b$, dove C è la concentrazione dell'elemento nei tessuti molli del mollusco e W è il peso dello stesso (9-10). Questa relazione può essere linearizzata mediante una trasformazione logaritmica, ottenendo: $\log_{10}C = a + b \log_{10}W$. È evidente che, tranne il caso in cui $b = 0$ (concentrazione indipendente dal peso), se si vogliono confrontare i livelli di elementi in organismi provenienti da aree differenti, il peso degli esemplari da selezionare è un fattore che deve essere preso in considerazione nella predisposizione del piano di campionamento.

Un possibile approccio consiste nella selezione di organismi aventi lo stesso peso da tutti i siti di campionamento (11). Alternativamente, si possono campionare esemplari su un ampio intervallo di dimensioni (e quindi di pesi corporei), generare regressioni concentrazione/peso e includere il peso corporeo come covariante nell'analisi statistica (12). Analoghe considerazioni possono essere fatte per la determinazione dei livelli di mercurio nel pesce: anche in questo caso, negli studi comparativi, la variabile dimensione degli esemplari – e quelle correlate, età e peso – devono sempre essere considerate nella predisposizione dei piani di campionamento.

Nel caso di piante, ortaggi e frutta, occorre tenere presente nel campionamento tutti i fattori che influenzano i livelli e la biodisponibilità degli elementi nel suolo e regolano quindi il loro uptake e bioaccumulo nei tessuti vegetali. Tra questi vanno annoverate sia le caratteristiche del suolo su cui i vegetali sono coltivati (come capacità di scambio cationico, pH, contenuto organico, drenaggio, livelli di altri elementi) che le pratiche agricole utilizzate (come impiego di fertilizzanti – si pensi ad alcuni concimi fosfatici contenuti elevati livello di cadmio – o di fitofarmaci a base di composti contenenti metalli) (13-14). Campioni della stessa specie vegetale provenienti da lotti di uno stesso campo possono presentare livelli differenti di elementi come conseguenza della diversa influenza di questi fattori nei vari lotti. Altro aspetto da tenere presente è il patrimonio genetico: esemplari della stessa specie vegetale possono presentare diverse capacità di bioaccumulo in relazione alla loro diversa appartenenza varietale.

Ad esempio, la relazione tra genotipo e livelli di cadmio è stata dimostrata nel caso del frumento duro (15). Un campione di granella di frumento può presentare una bassa omogeneità dei tenori di elementi se prelevato da una partita industriale ottenuta miscelando diverse varietà, come avviene comunemente.

In generale, per la definizione di piani di campionamento efficaci in ricerche di una certa complessità è utile introdurre il concetto di potenza statistica di uno studio (16). Questa può essere definita come la probabilità di rifiutare correttamente l'ipotesi nulla nel test delle ipotesi utilizzato per valutare statisticamente i risultati dello studio. Tanto maggiore è la potenza, tanto minore è la probabilità di commettere errori di II tipo. In sostanza, uno studio di potenza adeguata ha maggiore probabilità di individuare delle differenze di entità fissata nei livelli degli analiti da determinare (ad es. tra campioni provenienti da siti diversi o tra campioni raccolti nello stesso sito in tempi diversi).

La valutazione della potenza è il modo più idoneo per valutare l'adeguatezza del piano sperimentale e in particolare del campionamento: fissato un dato livello di significatività per il test delle ipotesi, la grandezza della variazione che si vuole apprezzare e la varianza entro i gruppi, è possibile determinare quanto il campione deve essere grande. Come esempio si può prendere in considerazione uno studio per l'individuazione di un trend lineare in un indice di contaminazione. L'indice di contaminazione può essere la concentrazione media di un dato elemento in una popolazione di pesci o molluschi campionati in T anni successivi a un dato sito (17). Indicando con b l'entità della variazione dell'indice che si vuole apprezzare ($b = 0$ significa che non c'è trend, ovvero che la concentrazione dell'elemento preso in considerazione è costante negli anni) e con ψ^2 la varianza, la potenza dipende dalla durata dello studio e dal rapporto $|b|/\psi$ (segnale/rumore). Come si evince dalla Tabella 4, in uno studio della durata di 10 anni vi è il 90% di probabilità di individuare un trend tale che $|b|/\psi = 0,409$. Se, ad esempio, $\psi = 0,2$, questa è la probabilità di individuare un trend annuale pari a $\pm 0,0818$.

Tabella 4. Valori del rapporto $|b|/\psi$ corrispondenti a differenti livelli di potenza e durata dello studio T (in anni)¹

T	Potenza				
	0.70	0.80	0.90	0.95	0.99
5	1.176	1.344	1.584	1.786	2.175
6	0.791	0.899	1.051	1.178	1.421
7	0.586	0.664	0.773	0.864	1.037
8	0.459	0.520	0.604	0.674	0.806
9	0.373	0.422	0.490	0.546	0.653
10	0.312	0.352	0.409	0.455	0.544
11	0.266	0.300	0.348	0.388	0.462
12	0.230	0.260	0.301	0.335	0.400
13	0.202	0.228	0.264	0.294	0.350
14	0.179	0.202	0.234	0.261	0.311
15	0.161	0.181	0.210	0.233	0.278

¹ Nelle seguenti ipotesi: regressione con indici annuali distribuiti normalmente, varianza costante, test-F con $\alpha=5\%$.

Se l'indice di contaminazione preso in esame è la media aritmetica delle concentrazioni log-trasformate (la trasformazione logaritmica delle concentrazioni è frequentemente utilizzata per ottenere distribuzioni normali con varianza costante), indicato con N il numero totale di organismi campionati ogni anno nello stesso periodo dell'anno (al fine di eliminare ogni effetto

stagionale) e analizzati separatamente, la varianza ψ^2 può essere espressa in funzione delle sue componenti come:

$$\psi^2 = \sigma_y^2 + \frac{\sigma_w^2}{N} + \tau_y^2 + \frac{\tau_w^2}{N}$$

dove: σ_w^2 e σ_y^2 sono le varianze associate al campionamento tra ed entro gli anni

τ_w^2 e τ_y^2 sono le varianze analitiche tra ed entro gli anni.

Come si vede, aumentando la dimensione del campione N diminuisce la varianza totale e aumenta il rapporto $|b|/\psi$ (vedi Tabella 4). In altri termini diminuisce la durata T dello studio necessaria per individuare il trend. Con l'ausilio di software statistici è possibile, in questo come in altri casi, determinare la potenza statistica dello studio e le dimensioni del campione necessario.

Nel campionamento di prodotti animali e vegetali occorre tenere presente, oltre alla variabilità tra gli individui legata a fattori biologici e ambientali, quella all'interno del singolo individuo o della singola parte od organo da analizzare, dovuta a fenomeni di distribuzione dell'elemento in esame nei tessuti. In alcuni casi le differenze di concentrazione possono essere notevoli. Il cadmio, ad esempio, si accumula nelle cellule dei tubuli renali dando luogo ad un gradiente di concentrazione attraverso il rene. Olsson e Oskarsson, in uno studio sulla distribuzione del cadmio nel rene di animali da reddito, hanno trovato che la concentrazione nella corteccia, nella zona intermedia e nel midollo è pari rispettivamente a 1,37, 0,79, e 0,10 volte quella media dell'intero organo nel caso del rene bovino, e a 1,14, 0,78 e 0,23 volte nel caso del rene suino (18). Il prelievo di singole parti del rene espone quindi al rischio di un campionamento non rappresentativo e di grossolani errori nella stima del livello medio di cadmio nell'organo. È evidente, in questo caso, l'importanza di una completa omogeneizzazione prima di procedere al sotto-campionamento e all'analisi.

Indipendentemente dal tipo di prodotto alimentare da analizzare, devono essere prese tutte le precauzioni necessarie per prevenire qualunque forma di contaminazione così come di perdita di analiti durante il campionamento. A riguardo, particolare cura deve essere rivolta nel caso della determinazione di elementi in traccia. In tale circostanza, è essenziale che anche il campionamento sia ricondotto nell'ambito del piano generale volto ad assicurare la qualità dell'intero iter analitico. Tra gli aspetti salienti di una campionamento idoneo sotto il profilo della prevenzione di contaminazioni positive o negative vanno ricordati i seguenti:

- è importante evitare di esporre il campione all'aria (particolato atmosferico) e prevenire il contatto con la polvere;
- l'uso di recipienti e utensili metallici deve essere evitato, almeno che non si abbia la certezza dell'assenza dei componenti della lega metallica di cui sono composti dal novero degli analiti;
- i contenitori per i campioni devono essere preferibilmente monouso e di idoneo materiale inerte e non contaminante;
- ogni contenitore deve essere preventivamente sottoposto ad un adeguato trattamento decontaminante (esposizione a soluzioni acide per un sufficiente periodo di tempo e risciacquo con acqua ultrapura);
- particolare attenzione deve essere rivolta ai punti precedenti in caso di campionamento di liquidi (acque potabili e minerali, bevande).

Per garantire il rispetto di tutte le precauzioni e gli accorgimenti citati è necessario che il personale addetto al campionamento sia lo stesso che esegue le analisi oppure, quando ciò non sia possibile, che venga opportunamente istruito. Il protocollo di campionamento deve essere tanto più dettagliato quanto meno il personale addetto è specializzato. Nella stesura del protocollo è d'uopo prevedere il prelievo di un numero di campioni in lieve eccesso rispetto alle

esigenze analitiche. È inoltre utile precisare che i recipienti contenenti i campioni devono essere scrupolosamente etichettati e che, nella misura in cui ciò è possibile, matrici diverse devono essere campionate, trasportate e conservate separatamente.

Conservazione e trattamento del campione

La conservazione per brevi periodi di tempo di prodotti alimentari trasformati (confezionati, inscatolati, refrigerati, congelati o surgelati) non pone particolari problemi. In attesa dell'analisi il campione, opportunamente etichettato e registrato al momento del suo ingresso nel laboratorio, viene stoccato secondo le norme di conservazione indicate in etichetta. Se i tempi necessari per l'analisi eccedono quelli di conservazione indicati in etichetta, occorre trasferire il campione in un recipiente adatto e ricorrere alla tecnica di conservazione più idonea per la matrice in questione.

Nel caso di prodotti agroalimentari non trasformati (come frutta, verdura, ortaggi, prodotti di origine animale) occorre ricorrere all'utilizzo del freddo per prevenire la degradazione dei tessuti col rischio di rilascio e perdita di analiti. Le basse temperature minimizzano anche le interazioni tra campione e contenitore, circostanza particolarmente importante nel caso di matrici liquide. Per la conservazione di breve durata di prodotti freschi si utilizzano temperature tra i 4 e i -20°C , mentre per tempi più lunghi si ricorre a temperature inferiori (-80°C). Nel caso di cereali granulati con un'attività dell'acqua non elevata, la conservazione in recipienti ben chiusi a 10°C in ambiente secco previene lo sviluppo di muffe e parassiti infestanti. Per mantenere l'integrità del campione per tempi più lunghi si può ricorrere alla conservazione in atmosfera di gas inerte in recipienti adatti.

Se per la conservazione dei campioni in vista dell'analisi si ricorre al congelamento, è bene raffreddare i medesimi il più velocemente possibile al fine di evitare la formazione di cristalli di ghiaccio e la lisi cellulare, col rischio di perdita di analiti. La separazione di liquidi durante lo scongelamento dei campioni viene spesso ignorata, ma è una fonte di errore non trascurabile sia per la potenziale perdita di analiti sia, nel caso in cui i risultati vengano riportati sulla base del peso fresco, per la variazione del contenuto di acqua del campione. In tale circostanza è bene che le due fasi vengano rimescolate e omogeneizzate prima del sotto-campionamento e dell'analisi.

Anche l'irraggiamento con radiazioni γ è utilizzato per sterilizzare e conservare prodotti freschi. Si tratta di una tecnica limitata dalla disponibilità dell'apposita strumentazione, usata generalmente per applicazioni avanzate come la produzione di Materiali di Riferimento Certificati (MRC). Un metodo alternativo ed efficiente è la liofilizzazione, che ha anche il vantaggio di concentrare gli analiti. Tuttavia si tratta di una tecnica non applicabile all'analisi routinaria. Inoltre, i parametri operativi della liofilizzazione (vuoto, tempo) vanno opportunamente scelti al fine di evitare la perdita di elementi volatili. I MRC utilizzati per l'analisi degli alimenti sono liofilizzati e/o sterilizzati e si prestano perlopiù alla conservazione a temperatura ambiente (ad esempio in essiccatore). Le condizioni di conservazione sono comunque specificate nel certificato che accompagna il materiale.

L'aspetto dell'idonea conservazione del campione ha uno specifico rilievo nel caso delle determinazioni di contaminanti metallici nell'ambito del circuito del controllo ufficiale dei prodotti alimentari. La presenza di un numero significativo di aliquote campionarie – 4-5 – che costituiscono il referente formale dell'intero percorso del controllo, rende necessario garantire la conservabilità del campione per tutte le aliquote durante le fasi di trasferimento da un istituto all'altro ed all'interno dello stesso istituto. Attualmente, essendo l'aspetto analitico del controllo ufficiale degli alimenti regolato dal DL.vo 156/1997 (conformità alle norme della serie EN

45000) (19), i laboratori preposti a questa attività devono necessariamente dedicare adeguate risorse e predisporre le necessarie procedure operative al fine di garantire la qualità dell'intero iter analitico e quindi l'affidabilità del dato analitico finale ed il suo utilizzo in ambito legale. Il mantenimento dell'integrità del campione, ivi inclusi la sua percentuale di umidità e tutte le caratteristiche reologiche influenzabili da un errato processo di conservazione dell'aliquota campionaria, è essenziale anche ai fini dell'applicazione del regolamento comunitario CE n. 466/2001, il quale stabilisce che i limiti massimi di piombo e cadmio negli alimenti lavorati o comunque sottoposti a processo di trasformazione devono essere ricavati da quelli fissati per gli alimenti freschi utilizzando fattori di conversione che tengano conto di concentrazioni o diluizioni determinatesi durante il ciclo di lavorazione (7).

Nel caso di analisi di speciazione, occorre generalmente prendere precauzioni ancora maggiori rispetto alla determinazione del contenuto totale di elementi. Alcuni composti organometallici sono infatti relativamente instabili e risultano sensibili alla luce e alla temperatura. Altri, come alcune specie dell'arsenico presenti nei prodotti ittici, possono essere degradati e convertiti in altre forme chimiche dall'azione microbica (20). In questi casi è bene definire un protocollo di conservazione e trattamento del campione *ad hoc* che stabilisca tutte le misure atte a prevenire l'alterazione e l'interconversione delle diverse specie chimiche da determinare nell'alimento.

Una volta giunto il momento della preparazione del campione per le determinazioni analitiche, questo viene generalmente sottoposto ad omogeneizzazione e sotto-campionamento, in modo da ottenere aliquote rappresentative di massa idonea da sottoporre ai trattamenti successivi. Questo passaggio si rende necessario sia nel caso di campioni elementari di grandi dimensioni, sia nel caso di pool di piccoli campioni (esempio molluschi bivalvi) che non vengono analizzati singolarmente in quanto si è interessati al solo valore medio di concentrazione dell'elemento *x* in essi presente. Se invece si vuole conoscere anche la variabilità del tenore dell'analita nei singoli esemplari, questi devono essere analizzati separatamente. In ogni caso, deve essere sottoposta a trattamento ed analisi la sola porzione commestibile del campione elementare. Nel caso dei molluschi bivalvi, dei crostacei e dei piccoli pesci consumati interi questa include le viscere, come precisato anche dalla direttiva 2001/22/CE (6).

In base alla loro natura e al loro contenuto in acqua, le matrici alimentari possono venire omogeneizzate attraverso dispositivi operanti in modo continuo (molini, blender) o discontinuo (mortai). È essenziale assicurarsi che le parti di tali dispositivi a contatto col campione non contengano elementi da analizzare. Il rischio di contaminazione è viceversa assai elevato, ed aumenta con la durezza del campione e con la sua aggressività (ad esempio, il basso pH nei campioni semiliquidi). Cubadda *et al.*, in uno studio volto a valutare la cessione di elementi nell'omogeneizzazione di campioni di granella di frumento da parte di sei molini e mortai comunemente impiegati nei laboratori di analisi agroalimentari, hanno riscontrato cessioni statisticamente significative di uno o più elementi da parte di tutti i dispositivi esaminati (21). Nel complesso, 10 dei 15 elementi studiati sono risultati a rischio contaminazione (Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb), con una cessione superiore nel caso del frumento duro, caratterizzato da una maggiore durezza della cariosside.

Nella Tabella 5 sono riportati i materiali e le leghe utilizzate nella fabbricazione di pestelli e mortai montati sui dispositivi per uso analitico disponibili in commercio. I materiali più frequentemente utilizzati sono gli acciai inox e speciali, che rilasciano però sostanziali quantità di ferro, cromo e – in relazione alla loro composizione – anche di nichel e di altri elementi. Dispositivi in ossido di zirconio e in carburo di tungsteno sono preferibili nel caso che Zr, Mg, Ca e W, Co e Cu, rispettivamente, non siano tra gli analiti. Alternativamente posso essere impiegati il titanio, il corindone sinterizzato e l'agata. Quest'ultima ha il vantaggio di contenere

tenori trascurabili di tutti gli analiti comunemente determinati negli alimenti a scopo di controllo o di ricerca.

Tabella 5. Materiali e leghe costitutivi di pestelli e mortai nei dispositivi di laboratorio per l'omogeneizzazione dei campioni

Materiale	Composizione
Acciai inox e speciali ¹	Fe (84-85%), Cr (12-13%), Ni, C, Al, Co, Mn, Mo, Nb, P, S, Si, Ti, V, W
Carburo di tungsteno	WC (94%), Co (~ 6%), Cu
Ossido di zirconio	ZrO ₂ (97%), MgO, CaO, SiO ₂ , Fe ₂ O ₃
Porcellana dura	Si (61%), Al ₂ O ₃ (34%), K ₂ O (3%), MgO, CaO, Pb
Titanio	Ti (99,4%), impurezze
Agata	SiO ₂ (99,9%), Al ₂ O ₃ , Na ₂ O, Fe ₂ O ₃ , K ₂ O, MnO, MgO, CaO
Corindone sinterizzato	Al ₂ O ₃ (99,7%), SiO ₂ , MgO, CaO, Na ₂ O, Fe ₂ O ₃

¹ Composizione assai variabile in relazione al tipo di acciaio.

Oltre all'omogeneizzazione e al sotto-campionamento, un'altra comune operazione analitica è la determinazione dell'umidità, utile specialmente per gli alimenti con un contenuto di acqua elevato e/o variabile, o prima del congelamento per tenere conto della perdita di acqua indotta dallo stesso. Le concentrazioni espresse sulla base del peso secco sono immediatamente confrontabili e pertanto preferibili. In alcune circostanze (ad esempio in studi sulla stima dell'assunzione di elementi con la dieta o in studi di cessione dai recipienti di cottura), è necessario analizzare gli alimenti pronti per il consumo. A tal fine occorre preparare e cuocere gli alimenti secondo le comuni procedure domestiche. Alcuni laboratori specialistici dispongono di cucine sperimentali per questo scopo.

Generalmente, l'ultima fase del trattamento dei campioni è la loro dissoluzione. Le tecniche comunemente impiegate per l'analisi di elementi inorganici nelle matrici alimentari, specialmente quelle basate sui principi della spettroscopia atomica (FAAS, ETAAS, IPC-AES, ICP-MS), richiedono infatti che gli analiti siano presenti in soluzione. L'analisi di campioni solidi è possibile – tramite tecniche sofisticate, alcune delle quali richiedono particolari sistemi di introduzione del campione (*solid sampling*, ad esempio laser ablation ICP-MS), oppure mediante la preparazione di sospensioni (*slurry analysis*) – ma è poco diffusa. Più diffusa è l'analisi diretta di campioni liquidi (acque potabili e minerali, vino, succhi di frutta), che comporta comunque l'utilizzo di opportuni accorgimenti analitici per limitare l'effetto matrice. Di norma, sia i campioni solidi che i campioni liquidi con matrici complesse vengono sottoposti a procedimenti di digestione ossidativa con acidi concentrati (HNO₃, HClO₄, H₂SO₄), che distruggono la componente organica.

Esistono varie alternative per la digestione dei campioni alimentari:

- mineralizzazione a secco (ceneri);
- mineralizzazione per via umida a pressione atmosferica;
- mineralizzazione ad alta pressione (forni a microonde).

La scelta del metodo più adeguato è legato al tipo di matrice, agli analiti da determinare e al grado di distruzione della sostanza organica richiesto dalla tecnica di misura utilizzata (22-27). L'incenerimento a secco consente di trattare grandi quantità di campione, presenta un rischio limitato di contaminazione da reattivi e richiede un impegno minimo da parte dell'analista. Tuttavia è soggetto al rischio di contaminazione atmosferica (inclusa la contaminazione crociata di campioni inceneriti contemporaneamente) e alla perdita di analiti volatili come il mercurio. Per ridurre questo rischio si è ricorso per molti anni, in alternativa, alla mineralizzazione per via umida, che comporta però tempi lunghi di trattamento, uso di reattivi particolarmente pericolosi

(HClO_4), costante attenzione da parte dell'operatore; inoltre, è più soggetta all'inquinamento da reattivi.

Negli ultimi anni, la mineralizzazione in recipienti chiusi ad alta pressione mediante l'impiego delle microonde si è andata sempre più imponendo. I suoi vantaggi sono la semplicità, la rapidità, la sicurezza, il minor rischio di contaminazioni e di perdita di analiti volatili. Con questa tecnica, mediante l'impiego dell'acido nitrico come agente ossidante (generalmente con l'aggiunta di H_2O_2), si ottiene la distruzione della componente organica di tutte le comuni matrici alimentari. Questo è un vantaggio per quei laboratori che utilizzano la spettrometria di massa con sorgente a plasma (ICP-MS), una tecnica di misura per la quale l'utilizzo di altri acidi è sconsigliato per i problemi legati alle interferenze spettrali da essi generate.

L'unica limitazione della mineralizzazione in forno a microonde con acido nitrico e perossido di idrogeno è l'incompleta solubilizzazione di elementi come l'alluminio, il cobalto e il cromo, riportata da vari autori per matrici ad alto tenore di silicati, specialmente prodotti vegetali. Per ottenere buoni recuperi per tali elementi è necessario, in questi casi, ricorrere all'aggiunta di piccole quantità di acido fluoridrico alla miscela $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$. L'eccesso di acido fluoridrico, che per il suo potere corrosivo è un pericolo per la strumentazione (ad esempio per il sistema di introduzione del campione e la torcia degli spettrometri a plasma), viene di solito eliminato per riscaldamento o mediante aggiunta di acido borico. Alcuni autori hanno suggerito alternative all'uso di H_3BO_3 – come l'impiego di quantità minime di HF (28) o l'aggiunta di ossido di silicio dopo la mineralizzazione (29) – al fine di ridurre il rischio di contaminazioni e di consentire l'analisi del contenuto di boro dei campioni.

Per la conservazione dei campioni dopo la mineralizzazione è bene utilizzare esclusivamente recipienti monouso, opportunamente testati prima della loro adozione per l'uso routinario. Il materiale del contenitore deve minimizzare il rischio di contaminazioni sia positive (per fenomeni di rilascio dalle pareti dello stesso) che negative (perdite di analita per adsorbimento). I materiali più usati sono plastiche come polietilene, polipropilene, politetrafluoroetilene. Il vetro, anche se di ottima qualità, è generalmente più contaminante del materiale plastico. Questo non avviene per il quarzo, il cui impiego è però limitato dal costo e dalla fragilità. Un altro materiale inerte e non contaminante è il Teflon, che però non può essere impiegato come materiale monouso per il suo costo. A seconda del livello di accuratezza richiesto e del tipo di contenitore utilizzato sono necessarie operazioni di pulizia più o meno complesse, basate generalmente su lavaggi con detergenti, successivi risciacqui, quindi lavaggi prolungati con acidi (specialmente HNO_3 , HCl , o loro miscele) e accurati risciacqui con acqua ultrapura.

Nel caso della speciazione il trattamento del campione differisce sostanzialmente da quello adottato per la determinazione del contenuto totale dell'elemento. Lo scopo della preparativa è in questo caso la rimozione della matrice organica senza produrre alterazioni delle specie chimiche presenti, seguita da purificazione, separazione e preconcentrazione delle stesse in vista della successiva quantificazione (23). Il primo obiettivo viene solitamente raggiunto mediante estrazione con solventi organici o acidi, mentre per separazione e preconcentrazione si ricorre all'utilizzo di tecniche cromatografiche. Numerosi metodi sono stati proposti in letteratura per una varietà di analisi (metilmercurio, Cr(III)/Cr(VI) , arsenico organico/inorganico, composti organici dello stagno e del piombo e altri ancora) in specifiche matrici alimentari, ma l'individuazione di protocolli generalmente accettati e validati a livello internazionale è ancora in gran parte di là da venire.

Come esempio di trattamento del campione in questo ambito può essere citata la speciazione dell'arsenico nei prodotti ittici (20). Le specie che tipicamente vengono – tutte o in parte – identificate in questo tipo di alimenti sono quelle inorganiche (As(III) , As(V)), quelle metilate (acido monometilarsonico (MMAA), acido dimetilarsonico (DMAA), ossido di trimetilarsona

(TMAO)), e altri composti organici come l'arsenobetaina, l'arsenocolina, lo ione tetrametilarsonio, gli arsenozuccheri. Le specie inorganiche e quelle metilate sono le più importanti dal punto di vista tossicologico, mentre le altre specie organiche – complessivamente predominanti nei prodotti ittici – presentano tossicità debole o trascurabile. Le specie organiche solubili nei lipidi possono essere estratte mediante l'uso di miscele cloroformio-metanolo. L'arsenobetaina, il composto ubiquitariamente presente negli organismi marini, è solubile in acqua e metanolo; miscele acquose di quest'ultimo vengono frequentemente utilizzate per estrarre l'arsenobetaina e gli altri composti arsenicali solubili in acqua dagli omogenati di prodotti ittici. Le specie inorganiche e quelle metilate possono quindi essere convertite in idruri volatili mediante trattamento con sodio boroidruro in ambiente acido e separate mediante gascromatografia. L'arsenobetaina può essere convertita in idruro dopo digestione alcalina.

Varie tecniche strumentali sono state utilizzate per la quantificazione nell'analisi di speciazione (AAS, ICP-AES, ICP-MS). Oggi, l'attenzione dei ricercatori in questo campo è rivolta soprattutto allo sviluppo e al perfezionamento di metodi basati sull'utilizzo di tecniche combinate online, in particolare dell'accoppiamento tra cromatografia liquida ad alta pressione e ICP-MS, onde ridurre manipolazione e trattamento del campione prima della rivelazione finale. In ragione del sempre maggiore interesse destato dall'analisi di speciazione anche nel campo degli alimenti, la letteratura inerente questo tipo di analisi si sta rapidamente accumulando: ad essa si rimanda per ulteriori approfondimenti (20, 23, 30-37).

Tutte le operazioni relative al trattamento del campione finora descritte sono potenziali causa di contaminazioni. Le maggiori fonti di contaminazione durante la manipolazione dei campioni sono:

- atmosfera del laboratorio (pulviscolo, fumi);
- reagenti (impurezze);
- strutture, apparecchiature e utensili del laboratorio (specialmente metallici);
- operatore (capelli, pelle, abiti, oggetti metallici).

Tutte queste fonti di contaminazione devono essere tenute sotto controllo per garantire l'affidabilità dell'analisi, specialmente quando gli elementi da determinare sono al livello delle tracce e delle ultratracce. La contaminazione per via aerea è la più difficile da combattere. La soluzione più efficace è il ricorso a laboratori ad atmosfera controllata (clean rooms), con un adeguato grado di purezza dell'aria. L'accesso a questo tipo di laboratori deve essere limitato al personale addetto, munito di idonei indumenti monouso (camici, copriscarpe, cuffie, guanti privi di polveri lubrificanti).

Un sistema di controllo di qualità (QC) stringente è poi indispensabile per monitorare il corretto funzionamento del laboratorio. Il QC può essere sia interno (uso di MRC, carte di controllo) che esterno (partecipazione a esercizi interlaboratorio). L'uso di MRC è particolarmente importante, in quanto consente la verifica dell'accuratezza non solo della misura finale, ma di tutti i passaggi analitici ai quali il materiale di riferimento viene sottoposto in parallelo al campione incognito. Molte matrici alimentari sono oggi disponibili sul mercato e altre ancora sono in preparazione (si consultino i cataloghi online dei maggiori enti produttori (38-41)). Per alcuni di questi materiali sono certificati non solo i tenori totali di elementi, ma anche i tenori di singole specie (ad esempio: metilmercurio per Hg, arsenobetaina e acido dimetilarsinico per As, tributil-, dibutil e monobutil-stagno per Sn) (42).

Bibliografia

1. Kratochvil B, Taylor JK. Sampling for chemical analysis. *Analytical Chemistry* 1981;53(8):924-38A.
2. Reilly C. *Metal contamination of food*. London: Elsevier; 1991. p. 84-5.

3. Stoeppler M. Analytical chemistry of metals and metal compounds. In: Merian E (Ed.). *Metals and their compounds in the environment: occurrence analysis and biological relevance*. Weinheim: VCH; 1991. p. 113.
4. Winer BJ, Brown DR, Michels KM. *Statistical principles in experimental design*. 3rd edition. New York: McGraw-Hill; 1991. p. 12-3.
5. Kelley WD, Ratliff TA Jr, Nenadic C. *Basic statistics for laboratories*. Van Nostrand Reinhold: New York; 1992. p. 4-5.
6. Commissione Europea. *Direttiva 2001/22/CE dell'8 marzo 2001 relativa ai metodi per il prelievo di campioni e ai metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di piombo, cadmio, mercurio e 3-MCPD nei prodotti alimentari*. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee*, L77, 16 marzo 2001.
7. Commissione Europea. *Regolamento (CE) 466/2001 dell'8 marzo 2001 che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari*. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee*, L77, 16 marzo 2001.
8. Pomeranz Y, Meloan CE. Sampling. In: Pomeranz Y, Meloan CE (Ed.). *Food analysis: theory and practice*, 3rd edition. New York: Chapman & Hall; 1994. p. 16-25.
9. Boyden CR. Trace element content and body size in molluscs. *Nature* 1974;251:311-4.
10. Boyden CR. Effect of size upon metal content of shellfish. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 1977;57:675-714.
11. Campanella L, Conti ME, Cubadda F, Sucapane C. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environmental Pollution* 2001;111(1):117-26.
12. Cubadda F, Conti ME, Campanella L. Size dependent concentrations of trace metals in four Mediterranean gastropods. *Chemosphere* 2001;45:561-69.
13. Berrow ML, Burridge JC. Uptake, distribution, and effects of metal compounds on plants. In: Merian E (Ed.). *Metals and their compounds in the environment: occurrence analysis and biological relevance*. Weinheim: VCH; 1991. p. 399-410.
14. Weigert P. Metal loads of food of vegetable origin including mushrooms. In: Merian E (Ed.). *Metals and their compounds in the environment: occurrence analysis and biological relevance*. Weinheim: VCH; 1991. p. 449-479.
15. Clarke JM, Leisle D, Kopytko GL. Inheritance of cadmium concentrations in five durum wheat crosses. *Crop Science* 1997; 37(6):1722-1726.
16. Winer BJ, Brown DR, Michels KM. *Statistical principles in experimental design*. 3rd edition. New York: McGraw-Hill; 1991. p. 120-1.
17. Nicholson MD, Fryer RJ, Ross CA. Designing monitoring programmes for detecting temporal trends in contaminants in fish and shellfish. *Marine Pollution Bulletin* 1997;34(10): 821-6.
18. Olsson IM, Oskarsson A. Sampling of kidneys from cattle and pigs for cadmium analysis. *Analyst* 2001;126(1):114-20.
19. Italia. Decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 156. Attuazione della direttiva 93/99/CEE concernente misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 268, 15 ottobre 1999.
20. Shibata Y, Morita M. Arsenic and organoarsenicals. In: Kiceniuk JW, Ray S (Ed.). *Analysis of contaminants in edible aquatic resources*. Weinheim: VCH, 1994. p. 159-74.
21. Cubadda F, Baldini M, Carcea M, Pasqui LA, Raggi A, Stacchini P. Influence of laboratory homogenization procedures on trace element content of food samples: an ICP-MS study on soft and durum wheat. *Food Additives and Contaminants* 2001;18(9): 778-787.
22. Reilly C. Metal contamination of food. London: Elsevier; 1991. p. 87-90.

23. Subramanian KS. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta B* 1996;51:291-319.
24. Hoenig M, de Kersabiec AM. Sample preparation steps for analysis by atomic spectroscopy methods: present status. *Spectrochimica Acta B* 1996;51:1297-1307.
25. Carlosena A, Gallego M, Valcárcel M. Evaluation of various sample preparation procedures for the determination of chromium, cobalt and nickel in vegetables. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1997;12:479-86.
26. Wu S, Feng X, Wittmeier A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1997;12:797-806.
27. Jorhem L, Engman J. Determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL collaborative study. *Journal of AOAC International* 2000;83(5):1189-1203.
28. Feng X, Wu S, Wharmby A, Wittmeier A. Microwave digestion of plant and grain standard reference materials in nitric and hydrofluoric acids for multi-elemental determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1999;14:939-946.
29. Sun DH, Waters JK, Mawhinney TP. Determination of thirteen common elements in food samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: comparison of five digestion methods. *Journal of AOAC International* 2000;83(5):1218-1224.
30. Yasuyuki S, Morita M, Fuwa K. Selenium and arsenic in biology: their chemical forms and biological functions. *Advances in Biophysics* 1992;28:31-80.
31. Lobinski R, Adams FC. Lead and organolead compounds. In: Kiceniuk JW, Ray S (Ed.). *Analysis of contaminants in edible aquatic resources*. Weinheim: VCH, 1994. p. 115-58.
32. Cappon CJ. Mercury and organomercurials. In: Kiceniuk JW, Ray S (Ed.). *Analysis of contaminants in edible aquatic resources*. Weinheim: VCH, 1994. p. 175-204.
33. Cappon CJ. Selenium and organic selenides. In: Kiceniuk JW, Ray S (Ed.). *Analysis of contaminants in edible aquatic resources*. Weinheim: VCH, 1994. p. 205-24.
34. Sturgeon RE, Siu KWM. Selenium and organic selenides. In: Kiceniuk JW, Ray S (Ed.). *Analysis of contaminants in edible aquatic resources*. Weinheim: VCH, 1994. p. 225-56.
35. Bettmer J, Buscher W, Cammann K. Speciation of mercury, platinum and tin – focus of research and future developments. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1996;354:521-8.
36. Quevauviller P. Atomic spectrometry hyphenated to chromatography for elemental speciation: performance assessment within the Standards, Measurements and Testing Programme (Community Bureau of Reference) of the European Union. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 1996;11:1225-31.
37. Carro AM, Mejuto MC. Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compound in food analysis. *Journal of Chromatography A* 2000;882: 283-307.
38. IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) – IRMM catalogues. Disponibile all'indirizzo: <http://www.irmm.jrc.be>; ultima consultazione 13/01/02.
39. IAEA-MEL (International Atomic Energy Agency - Marine Environment Laboratory), Austria – List of available marine reference and intercomparison materials. Disponibile all'indirizzo: <http://www.iaea.org/monaco/aqcs.html>; ultima consultazione 13/01/02.
40. NIST (National Institute of Standards and Technology), USA – Standard reference materials program. Disponibile all'indirizzo: <http://ts.nist.gov/ts/htdocs/230/232/232.htm>; ultima consultazione 13/01/02.

41. INMS-NRC (Institute for National Measurements Standards - National Research Council), Canada – Certified reference materials. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ems.nrc.ca/ems1.htm>; ultima consultazione 13/01/02.
42. Cornelis R, Crews H, Donard OFX, Ebdon L, Quevauviller Ph. Trends in certified reference materials for the speciation of trace elements. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 2001;370:120-125.

CAMPIONI DI MATERIALE PARTICELLARE AERODISPERSO: CAMPIONAMENTO, CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO

Giovanni Ziemacki

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Premessa

L'interesse indotto dalle problematiche sanitarie inerenti l'esposizione al materiale particellare atmosferico ha portato, nell'ultimo decennio, a rivolgere l'attenzione a particolari frazioni granulometriche e, di conseguenza, ad affinare e normalizzare i metodi di prelievo.

L'evoluzione del monitoraggio del materiale particellare aerodisperso è passata dal prelievo delle polveri totali sospese (PTS), regolarizzate dalla normativa italiana con il DPCM 28.03.83 e il DPR 24.05.88 [1, 2], al DM 25.11.94 [3] in cui l'attenzione viene rivolta al PM₁₀, cioè al monitoraggio della frazione definita toracica (con diametro aerodinamico D_a inferiore ai 10 µm). Accanto alle leggi italiane vanno considerate le normative dell'Unione Europea, che l'Italia in quanto membro è tenuta a recepire (EN 12341, Direttiva 99/30/CE del 22.04.99 in fase di recepimento) [4, 5], e altre norme internazionali quali US-EPA 18.07.97 [6] (Tabella 1).

Tabella 1. Metodi di riferimento per la determinazione del materiale particellare aerodisperso

Normativa	Argomento
DPCM 28.03.1993	Polveri totali sospese (PTS)
DPR 24.05.1988	Polveri totali sospese (PTS)
DM 25.11.1994	PM ₁₀
US-EPA 18.07.1997	PM ₁₀ e PM _{2.5}
EN 12341 1998	PM ₁₀
Direttiva 99/30/CE 22.04.1999	PM ₁₀
CEN/TC264/WG15	Metodo europeo per il PM _{2.5} entro il 2005

Campionamento

Il principale campionatore di riferimento della frazione toracica è il "dicotomo", designato come riferimento dalla USEPA nel 1990 [7].

Lo strumento lavora ad una portata complessiva di 16,7 L/min ed è in grado di raccogliere la frazione toracica suddividendola in due frazioni costituite rispettivamente dalle particelle con D_a compreso tra 10 e 2,5 µm (*Coarse*) e da quelle con D_a inferiore a 2,5 µm (*Fine*), depositandole su due filtri distinti, costituiti da membrane di PTFE con porosità pari a 2 µm e diametro di 37 mm. In seguito la normativa USEPA del 1997 riportava alcune caratteristiche tecniche ed operative incentrate principalmente sul controllo del flusso, parametro peculiare per un corretto campionamento (infatti variazioni sostanziali del flusso porterebbero a campionare una frazione granulometrica diversa da quella teorica) e su controlli di durata e condizioni ambientali (Tabella 2).

Tabella 2. Specifiche costruttive riportate nella normativa USEPA (1997)

Parametro	Specifiche costruttive
Controlli automatici	- Flusso medio: $1 \text{ m}^3/\text{h} \pm 5 \%$. - Coefficiente di variazione %: < 4. - Accuratezza della misura istantanea: $\pm 2 \%$.
Allarmi	- Deviazioni $> 5 \%$ sul flusso per più di 5 min. - Stop alle deviazioni $> 10 \%$ per più di 1 min.
Parametri visualizzabili	- Flusso istantaneo. - Flusso medio. - CV % ($s.d. / media \cdot 100$). - Volume totale campionato. - Portata volumetrica alla testa del campionatore. - Caduta di pressione sul dispositivo filtrante. - Interruzioni di rete.
Condizioni operative	- Temperatura ambiente: $-30 \div +45 \text{ }^\circ\text{C}$ (misura ogni 5 min con risoluzione = $0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ e accuratezza = $2 \text{ }^\circ\text{C}$). - Umidità relativa: $0 \div 100 \%$ - Pressione ambiente: $600 \div 800 \text{ mmHg}$ (misura ogni 5 min con risoluzione = 5 mmHg e accuratezza = $\pm 10 \text{ mmHg}$). - Controllo della temperatura sul filtro (differenza rispetto T ambiente $\leq 5 \text{ }^\circ\text{C}$ con allarme dopo 10 min di superamento e registrazione della ΔT massima). - Controllo della durata del campionamento: accuratezza = $\pm 1 \text{ min}$. - Possibilità di controllo remoto.

Nella Tabella 3, relativa alle normative italiana ed europea, vengono riportate le caratteristiche tecniche dei campionatori nonché i campionatori di riferimento a livello europeo.

Tabella 3. Caratteristiche dei campionatori di riferimento

Normativa	Caratteristiche tecniche
DM 25.11.1994	- Certificazione idonea. - Testa omnidirezionale. - Misuratore di portata (accuratezza = $\pm 2 \%$). - Precisione $\leq 10 \%$. - Timer accurato entro $\pm 15 \text{ min}$. (durata $24 \text{ h} \pm 1 \text{ h}$). - Non richiesti controlli automatici ma solo verifiche della portata letta contro quella misurata da uno standard primario di riferimento certificato dal NIST. - Possibilità di usare campionatori certificati con sistema automatico di determinazione della massa (es. raggi β, IR, microbilancia oscillante).
Direttiva europea EN 12341 - 1998	
<i>Campionatori di riferimento</i>	- Low Volume Sampler (LVS – PM_{10}) portata: $2,3 \text{ m}^3/\text{h}$ - High Volume Sampler (HVS – PM_{10}) portata: $68 \text{ m}^3/\text{h}$ - Wild Range Aerosol Collector (WRAC PM_{10}) portata: $77,9 \text{ m}^3/\text{h}$
<i>Controlli di portata</i>	- Flusso istantaneo: entro $\pm 10 \%$ rispetto al flusso impostato inizialmente. - Flusso medio: entro $\pm 5 \%$. - Accuratezza del controllo di portata: entro $\pm 2 \%$. - Calibrazione del flusso in condizioni standard (STP): $273 \text{ }^\circ\text{K}$, $101,3 \text{ kPa}$ (ISO 8756). - Misurare durante il campionamento T e P ambiente.

La normativa europea (EN 12341) consente l'uso di campionatori alternativi che, attraverso un procedimento di confronto, rispettino i seguenti test di comparabilità [8]:

- Eseguire almeno 10 campionamenti in parallelo su quattro postazioni diverse.
- Calcolare la relazione funzionale $y = ax + b$.
- Valutare se:
 - $R^2 \geq 0,95$.
 - $0,9 \leq a \leq 1,1$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).
 - $-10 \leq b \leq +10$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).
 - Le differenze tra le concentrazioni devono essere $<$ di $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per concentrazioni $<$ di $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ oppure inferiori del 10 % per concentrazioni superiori.

La Figura 1 mostra il confronto tra il dicotomo (campionatore di riferimento) e un campionatore alternativo (progettato in conformità alla normativa USEPA 40 CFR 50 – 1996) montante la testa di prelievo per PM_{10} . Si può notare come vengano rispettati i parametri “ R^2 ”, “a” e “b”.

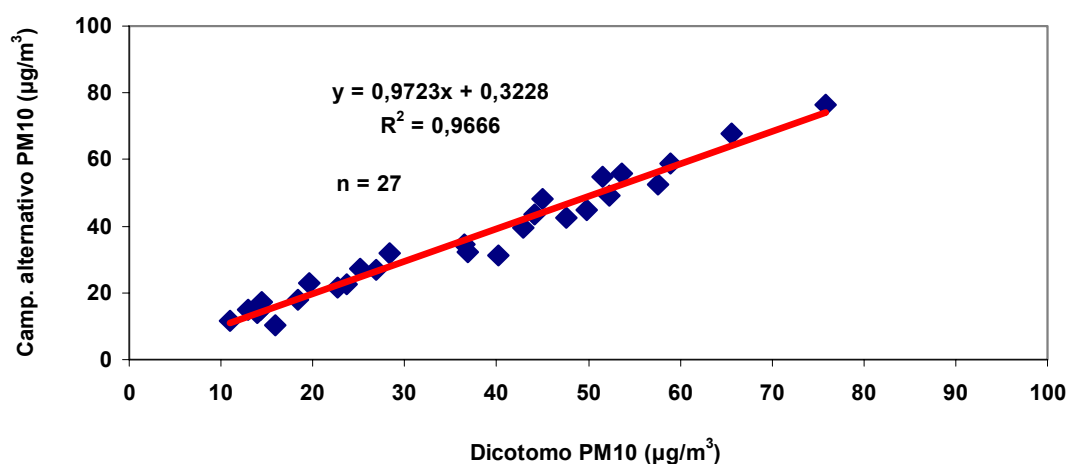


Figura 1. Confronto tra il dicotomo e un campionatore alternativo (PM_{10})

È raccomandabile fare attenzione nell'eseguire un monitoraggio di materiale particolato il posizionamento dell'apparecchiatura di prelievo:

- il campionatore deve essere posizionato a 20 metri da alberi, edifici o da altri grandi ostacoli;
- la testa di prelievo deve essere a 2-7 metri dal terreno;
- il campionatore non deve avere impedimenti di flusso;
- la testa di prelievo di un campionatore deve essere ad almeno 2 metri da quella di un altro campionatore (per impedire reciproche perturbazioni dell'aria ambiente);
- non posizionare il campionatore direttamente sul terreno o sulla ghiaia (questo per evitare che piccoli cedimenti del terreno falsino la posizione perfettamente perpendicolare della testa di prelievo rispetto al terreno stesso);
- posizionare il campionatore lontano da sorgenti locali.

Mezzi filtranti

Nella Tabella 4 vengono riportate leggi e norme italiane ed internazionali riguardanti le caratteristiche dei mezzi filtranti adottate, negli anni, da vari Paesi.

Tabella 4. Mezzi filtranti nelle normative e loro caratteristiche

Normativa	Caratteristiche
UNICHIM 316 (Edizione 1977)	Filtri in cellulosa, porosità 0,8 µm o analoghi in fibra di vetro, diametro 20 mm.
DPCM 28.05.83 e DPR 24.05.88	Filtri in esteri di cellulosa, porosità 0,4÷0,5 µm, diametro 50 mm.
NIOSH 0500 e 0600 [9]	Filtri in PVC, porosità 2÷5 µm, diametro 37 mm o equivalenti, idrofobi, cassette conduttive.
DM 25.11.94	Filtro in funzione delle esigenze analitiche, efficienza di campionamento ≥ 99 %, alcalinità < 25 µeq/g.
US EPA 1997	Filtri in PTFE, diametro 47 mm, porosità 2 µm, efficienza di campionamento ≥ 99,7 %, massima umidità raccolta: meno di 10 µg di incremento di peso dopo 24 h a 40 % di umidità relativa rispetto al peso determinato dopo 24 h a 35 % RH.
EN 12341 1998	Filtro in fibra di quarzo, diametro 47÷50 mm (40÷41 mm di area libera), efficienza di campionamento ≥ 99,5 %.

La scelta del mezzo filtrante riveste un fattore importante soprattutto per le future esigenze analitiche nella determinazione della composizione del particolato e/o nella ricerca di particolari sostanze (Tabella 5).

Tabella 5. Mezzi filtranti usati: materiali, caratteristiche e utilizzo

Materiali	Porosità (µm)	Igroscopicità	Analiti usualmente determinati
Policarbonato	0,4	bassa	Elementi (Scanning Electron Microscopy), Metalli
Esteri di cellulosa	0,45 ÷ 0,8	alta	Metalli
PTFE	2	bassa	Metalli
Fibra di vetro	-	bassa	Idrocarburi Policiclici Aromatici

Un mezzo filtrante dovrebbe avere alle seguenti caratteristiche:

- stabilità meccanica;
- stabilità chimica;
- efficienza di campionamento (> 99%);
- resistenza al flusso;
- capacità di carico;
- purezze nei bianchi.
- assenza di formazione di artefatti;
- compatibilità con i metodi analitici;
- bassi costi e reperibilità.

Per stabilità meccanica si intende la resistenza del filtro durante le operazioni di manipolazione dello stesso (durante le pesate prima e dopo il campionamento, il

posizionamento nella testa di prelievo, il trasporto, ecc.) in modo da evitare sia danneggiamenti del filtro, sia la perdita del particolato raccolto.

Il filtro, inoltre, deve essere costituito da materiale chimicamente resistente che non subisca trasformazioni chimiche sia proprie che per l'apporto del materiale filtrato.

L'efficienza di campionamento, la resistenza al flusso e la capacità di carico sono altre caratteristiche che un filtro deve possedere per avere campioni rappresentativi dal punto di vista quantitativo.

Per quanto riguarda la formazione degli artefatti o interferenze in genere si intende la ritenzione di specie gassose sui filtri che può portare ad errori positivi nella misura della concentrazione di PM_{10} . Tali errori comprendono la ritenzione del biossido di zolfo e dell'acido nitrico. La ritenzione del biossido di zolfo sui filtri, con conseguente ossidazione a solfato (solfato di reazione), è un fenomeno che aumenta con l'aumentare della alcalinità del filtro. Con l'uso di filtri che rispondono alle specifiche per l'alcalinità ($< 25 \mu eq/g$) si dovrebbe riscontrare una formazione di solfato di reazione nulla o scarsa.

La formazione di nitrato di reazione, dovuta soprattutto alla ritenzione di acido nitrico, può verificarsi, in modo più o meno accentuato, con diversi tipi di filtri compresi i filtri in fibra di vetro, quelli di esteri di cellulosa e con parecchi filtri in fibra di quarzo. Possono anche verificarsi perdite di nitrati, effettivamente presenti nel particolato atmosferico, per dissociazione o per reazione chimica, durante o dopo il campionamento. Questo fenomeno è stato osservato con filtri in PTFE e supposto per i filtri in fibra di quarzo. L'entità dell'errore nella misure di concentrazione di PM_{10} dovuto al nitrato di reazione può variare con il punto di campionamento e con la temperatura ambiente; comunque, per la maggior parte dei punti di prelievo, ci si aspetta che questo errore sia piccolo.

Infine, i filtri utilizzati devono essere compatibili con i metodi analitici per la determinazione degli inquinanti metallici; un filtro in fibra di vetro, per esempio, presenta un bianco altamente contaminato da piombo per cui se ne sconsiglia l'utilizzo.

Taratura dei mezzi filtranti

La determinazione della concentrazione del materiale particellare aerodisperso consiste in una analisi gravimetrica dove il peso del campione è dato dalla differenza di peso del filtro prima e dopo il campionamento. Perché in questa operazione siano minimizzati, il più possibile, errori dovuti alle piccole masse da pesare, diventa importante la taratura dei mezzi filtranti.

In Tabella 6 sono riportate le tecniche di condizionamento presenti in varie leggi e norme nel corso degli anni. Abbandonato il condizionamento in stufa, a caldo, e successivo riposo in essiccatore per periodi non superiori alle 12 ore, la tecnica migliore, con delle piccole differenze nella normative di vari Paesi, è quella del condizionamento a temperatura e umidità relativa controllate per periodi superiori alle 24 ore, prima e dopo il prelievo, in stanze o box attrezzati.

Tabella 6. Condizionamento dei mezzi filtranti riportato nelle normative

Normativa	Indicazioni
UNICHIM 316 (edizione 1977)	2 h a 95 °C, 45 min in essiccatore.
DPCM 28.05.83 e DPR 24.05.88	2 h a 90÷100 °C, essiccatore almeno 12 h.
NIOSH 0500 e 0600	Condizionamento in area o stanza con condizioni ambientali controllate.
DM 25.11.94	T: 15÷30 °C $\pm$ 3 °C, RH: 20÷45 % $\pm$ 5 %, t $\geq$ 24 h.
US EPA 1997	T: 20÷23 °C $\pm$ 2 °C, RH: 30÷40 % $\pm$ 5 %, t $\geq$ 24 h.
EN 12341 1998	T: 20 °C $\pm$ 1 °C, RH: 50 % $\pm$ 5 %, t: 48 h.

La Figura 2 mostra l'influenza dell'umidità relativa all'interno del box di taratura sul peso di diversi tipi di filtri (p = policarbonato; aa = acetato di cellulosa; tf = PTFE).

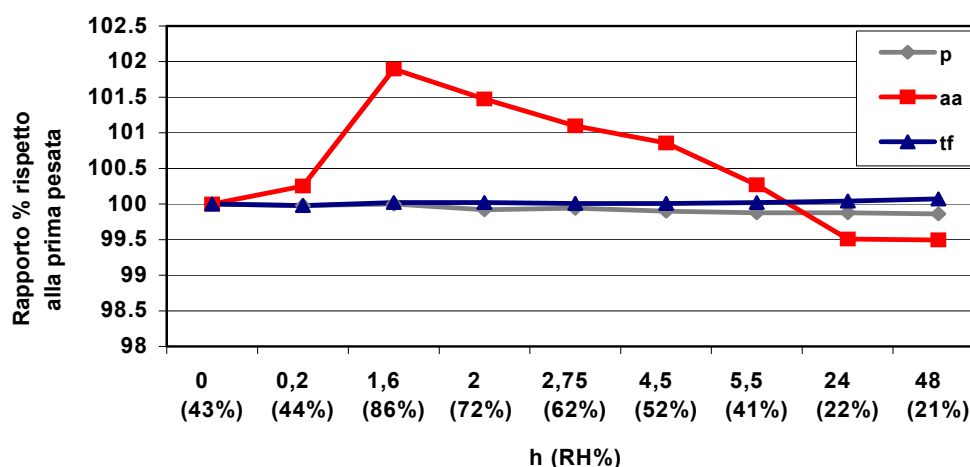


Figura 2. Influenza dell'umidità su diversi tipi di filtri

Da 0 a 0,2 ore i filtri sono stati pesati in presenza dell'umidità ambientale; da 1,6 a 5,5 ore l'operazione è stata ripetuta in presenza, nel box, di alcuni piccoli becher con acqua in modo da avere un aumento incontrollato dell'umidità relativa. Al termine delle 5,5 ore i piccoli becher sono stati sostituiti con altri contenenti gel di silice in modo da uniformare l'umidità presente nel box; infatti nelle pesate effettuate a 24 e 48 ore il valore di RH si è stabilizzato su 21-22% in perfetto accordo con la normativa.

Il controllo di qualità nelle operazioni di pesata si articola in vari punti:

- bilancia all'interno della camera di condizionamento;
- controllo di T e RH all'interno della camera stessa;
- pesate ripetute almeno due volte (errore <20 µg);
- valutazione dell'accuratezza con pesi di riferimento;
- utilizzo di un sistema per eliminare le cariche elettrostatiche;
- correzione della spinta dell'aria;
- almeno due bianchi di laboratorio per ogni gruppo di filtri;
- verifica nel tempo dei bianchi di campo;
- possibilmente lo stesso operatore.

La scelta della bilancia con cui effettuare le pesate dipende dalla risoluzione che le norme richiedono (Tabella 6). È ovvio che bilance con risoluzioni più spinte ($\leq 0,01$ mg) comportano da una parte una stima più accurata del peso e d'altra parte una possibilità maggiore di errori dovuta all'intrinseca instabilità delle ultime cifre ($1 \div 10$ µg) se la bilancia non è appropriatamente posizionata.

Altri parametri da prendere in considerazione durante le operazioni di pesata di filtri sono l'effetto della cariche elettrostatiche e l'effetto della spinta dell'aria. Il primo effetto può essere eliminato (Tabella 8) mediante una sorgente radioattiva; il sistema più comunemente usato si basa su sorgenti di Po_{210} . Oggi in commercio esistono delle bilance che hanno inserito un meccanismo di abbattimento della cariche elettrostatiche che, oltre ad eliminare l'effetto, conferisce una maggiore stabilità alla pesata stessa.

Tabella 7. Caratteristiche delle bilance analitiche nelle normative

Normativa	Sensibilità
DPCM 28.05.83 e DPR 24.05.88 NIOSH 0500 e 0600 DM 25.11.94	Risoluzione 0,02 mg. Risoluzione 0,001 mg. Alto volume con portata > 0,5 m ³ /min: risoluzione 0,1 mg; basso volume: risoluzione < 0,1 mg.
US EPA 1997 EN 12341 1998	Risoluzione 0,001 mg. Risoluzione ≤ 0,01 mg (bilancia nella stanza dove si condizionano i filtri).

Tabella 8. Attenuazione delle cariche elettrostatiche secondo le varie normative

Normativa	Indicazione fornita
UNICHIM 316 (edizione 1977)	Nulla.
DPCM 28.05.83 e DPR 24.05.88	Nulla.
DM 25.11.94	Nulla.
NIOSH 0500 e 0600	Sorgente radioattiva (Po ₂₁₀).
US EPA 1997	Usare una tecnica efficace.
EN 12341 1998	Nulla.
PROGETTO EXPOLIS [10]	La dev. Stand. di 25 pesate ripetute su filtri di PTFE si riduce da 23 µg a 1,7 µg usando un sistema efficace di abbattimento delle cariche (Po ₂₁₀).

Quando la massa netta raccolta nel prelievo è piccola rispetto a quella del filtro (< 1/1000) diventa importante tenere conto della spinta dell'aria ed eseguire la correzione per la variazione della densità dell'aria tra le pesate *pre* e *post* campionamento. I parametri che influenzano maggiormente sono (Tabella 9) la pressione, la temperatura e l'umidità relativa. Il parametro più significativo appare essere l'effetto della variazioni della pressione ambiente (effetto totale fino a 10 ÷ 15 µg).

Tabella 9. Effetto della spinta dell'aria sull'accuratezza pesata

Parametro ambientale	Effetto
Per ΔP = + 30 mmHg	Variazione di - 5,9 ÷ - 7,9 µg.
Per ΔRH = + 20 %	Variazione di + 0,25 ÷ + 0,32 µg.
Per ΔT = + 2 °C	Variazione di + 1,1 ÷ + 1,3 µg.

* I valori relativi alle variazioni si riferiscono a filtri di Ø = 37 e 47 mm [10].

Un'altra correzione dell'instabilità del peso è quella da effettuare mediante l'utilizzo dei bianchi:

- il filtro testimone o bianco di campo dovrebbe subire tutte le manipolazioni del filtro esposto ad eccezione dell'esposizione;
- seguire una procedura scritta (SOP = *Standard Operation Procedure*);
- utilizzare 1 ÷ 4 bianchi di campo ogni 10 campioni;
- pesarli in ordine casuale tra un eventuale campionamento e l'altro (al fine di determinare una sistematica variazione in massa).

Altro passo, non meno importante, consiste nella determinazione del LOD (*Limit Of Detection*) e del LOQ (*Limit Of Quantitation*) secondo la procedura ISO/TC 146 – 2000 [9]:

- condizionare e pesare almeno 6 filtri bianchi;
- esporli per 24 h nelle vicinanze del luogo di prelievo;
- condizionare e pesare nuovamente;
- ripetere per almeno 6 set di filtri dello stesso tipo;
- calcolare la stima dell'impresione dalla:

$$s_w^2 = (s^2) \cdot (1 + 1 / n_b)$$

dove: s_w^2 = stima della deviazione standard (μg) nella determinazione della massa campionata.

s^2 = media delle varianze ottenute.

n_b = numero di bianchi.

da cui:

$$\text{LOD} = 3 s_w$$

$$\text{LOQ} = 10 s_w$$

Trasporto, manipolazione e conservazione dei campioni

Tutte le norme esaminate (Tabella 10) sono concordi nel raccomandare il trasporto dei filtri negli appositi contenitori (capsule *petri* o analoghi) a loro volta racchiusi in opportune cassette.

Una volta trasportati rapidamente in laboratorio i filtri devono essere tarati e pesati in tempi più brevi possibili (DM 25.11.94). Per le successive analisi è opportuno conservarli ad una temperatura di 4 °C.

Tabella 10. Trasporto, manipolazione e conservazione dei campioni in base alle normative

Normativa	Indicazioni
DM 25.11.94	Riporre il filtro in contenitore chiuso (capsula <i>petri</i> o analoghi), trasportare "al più presto" e pesare "prima possibile".
DPCM 28.05.83 e DPR 24.05.88	Appositi contenitori.
UNICHIM 316 (edizione 1977)	Riporre il filtro in contenitore chiuso, conservabilità 2 ÷ 3 mesi (<i>variazione di peso inferiore a 0,02 mg</i>).
NIOSH 0500 e 0600	Cassette conduttive.
US EPA 1997	Rimuovere il filtro entro 4 giorni (con il portafiltri), riporlo in contenitore metallico. Portarlo in laboratorio entro 24 h, pesare entro 10 giorni (o al massimo 30 se conservati a 4 °C), utilizzare sempre bianchi di campo, archiviazione per successive analisi a 4 °C ± 3 °C.
EN 12341 1998	Riporre il filtro in contenitore chiuso (capsule <i>petri</i> o analoghi).

Espressione dei risultati

I risultati vengono espressi tramite i valori di concentrazione ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) riferiti al volume totale campionato e, generalmente, nelle condizioni standard di T e P (Tabella 11).

Tabella 11. Espressione dei risultati

Normativa	Indicazioni
DM 25.11.94	Riportare i valori di concentrazione ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) riferiti al volume totale campionato in condizioni standard (298 °K, 101,3 kPa).
US EPA 1997	Riportare i valori di concentrazione ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) riferiti al volume totale campionato in condizioni standard (273 °K, 101,3 kPa).
EN 12341 1997	Riportare i valori di concentrazione ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) riferiti al volume totale campionato nelle condizioni di T e P medie rilevate durante il campionamento.

Trattamento dei campioni per la ricerca di inquinanti metallici

I campioni, una volta determinato il contenuto di materiale particellare aerodisperso, possono essere utilizzati per la ricerca degli inquinanti metallici. Le tecniche analitiche più comunemente usate prevedono la dissoluzione del campione con attacco acido.

Diverse sono le procedure di mineralizzazione del campione; le più utilizzate sono:

- in pallone di vetro, a caldo su piastra o becco bunsen, con refrigerante (ad acqua o aria) a ricadere;
- a freddo in pallone tarato (solo in casi di accertata solubilità del metallo in esame);
- in “bomba” di PTFE, a caldo in stufa;
- mediante forno a microonde.

Quest’ultima tecnica che, a differenza delle altre, presenta una grande versatilità nella realizzazione dei programmi di mineralizzazione con le più disparate matrici, è quella utilizzata nella dissoluzione acida di campioni di polveri atmosferiche.

Nel caso specifico viene usato il metodo degli inserti di quarzo: il campione, composto dal filtro con il materiale particellare, viene posto in un inserto cilindrico di quarzo con l’aggiunta di 1 mL di acido nitrico. L’inserto, chiuso senza forzare con il suo tappo in quarzo, viene posto all’interno del contenitore di PTFE; nell’intercapedine dei due vengono aggiunti 5 mL di acqua ossigenata al 6%. Il tutto viene chiuso e posto nel forno a microonde con un programma di mineralizzazione di cui un esempio è riportato in Tabella 12.

Tabella 12. Programma di mineralizzazione

Step	Durata	Potenza
1	5 min	250 W
2	5 min	400 W
3	5 min	500 W
4	2 min	ventilazione

La Figura 3 riporta lo schema della dissoluzione con l’inserto di quarzo.

Il compito dell’acqua ossigenata è quello di sottrarre dall’equilibrio i prodotti di decomposizione dell’acido nitrico (ossidi di azoto) e spostare la reazione fino a completa dissoluzione del campione. Dopo raffreddamento il campione viene raccolto e portato a volume (normalmente 10 mL), mentre l’acqua ossigenata viene eliminata; in alcuni casi si è

proceduto a determinare nella stessa gli stessi inquinanti metallici del campione senza, peraltro, trovarne traccia.

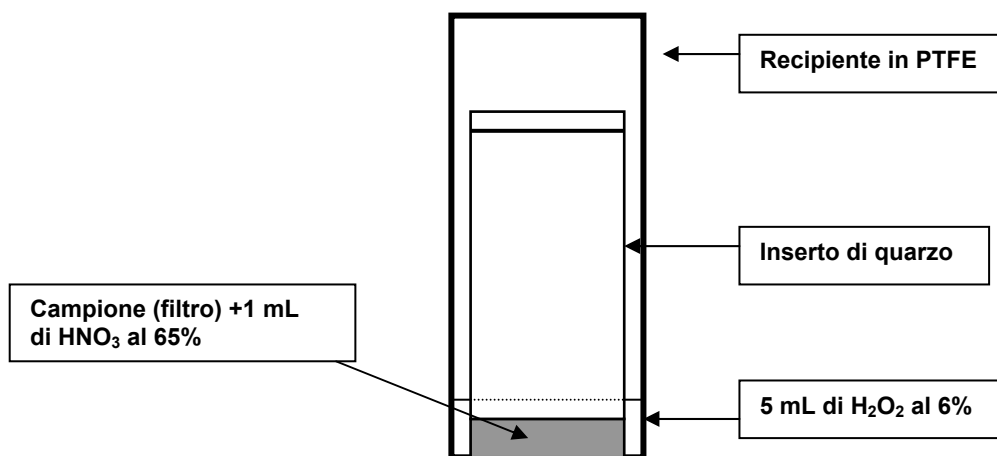


Figura 3. Metodo degli inserti di quarzo mediante forno a microonde

Il metodo di dissoluzione mediante forno a microonde, a parte l'alto costo dello strumento, presenta diversi vantaggi:

- efficacia di decomposizione;
- rapidità di esecuzione;
- assenza di dispersione di vapori;
- elevata qualità analitica dei bianchi;
- ridotto volume di reattivo per la dissoluzione.

Nel caso si presenti la necessità di operare una dissoluzione con acido fluoridrico, non è possibile usare l'inserto di quarzo, in quanto è attaccato dall'acido stesso, ma si può comunque servirsi del forno a microonde depositando il campione direttamente nel contenitore in PTFE.

Conclusioni

Vengono riportati, come esempio, alcuni risultati ottenuti in una campagna di monitoraggio effettuata nella postazione prospiciente l'Istituto Superiore di Sanità. Nello studio sono state seguite le tecniche e le procedure di campionamento, taratura e trattamento dei campioni contenute nelle normative trattate.

La Figura 4 riporta l'andamento del materiale particolato PM₁₀ campionato con un dicotomo, per 24 ore, nel mese centrale della stagione indicata.

È da notare come la media delle concentrazioni giornaliere del PM₁₀ si attesti su un valore intorno ai 40 µg/m³, valore che il DM 25.11.94 indica come obiettivo di qualità per concentrazioni di 24 ore a decorrere dal 01.01.99.

La Figura 5 riporta l'andamento delle concentrazioni del piombo determinate negli stessi campioni di polveri PM₁₀ dell'esempio precedente.

La normativa comunitaria, di prossimo recepimento da parte dell'Italia, fissa un limite di 0,5 ng/m³.

Dal grafico si può notare come questo limite non venga mai superato anche nelle stagioni (autunno ed inverno) dove maggiore risulta l'inquinamento che presenta valori massimi 2-3 volte maggiori di quelli riscontrati in primavera ed estate.

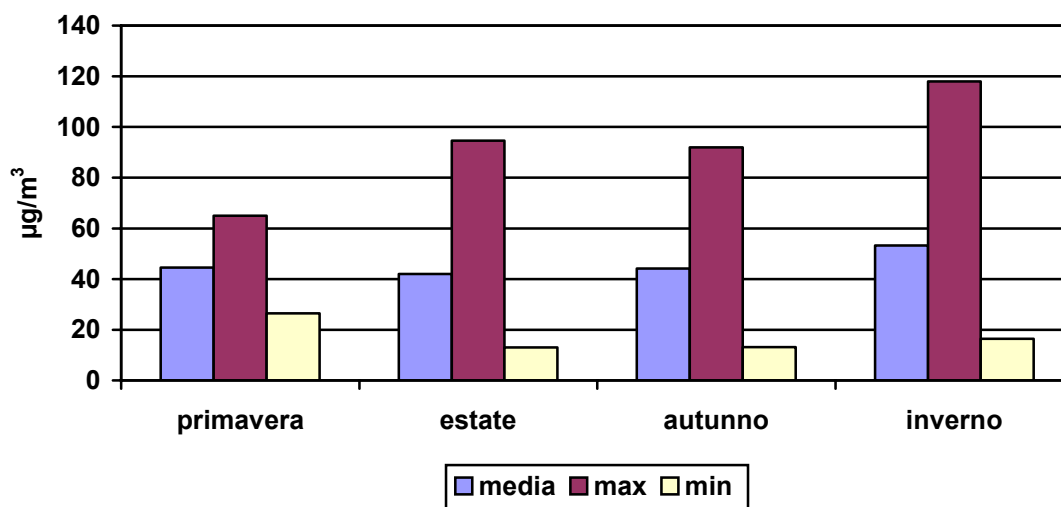


Figura 4. Andamento della concentrazioni del materiale particolato PM₁₀

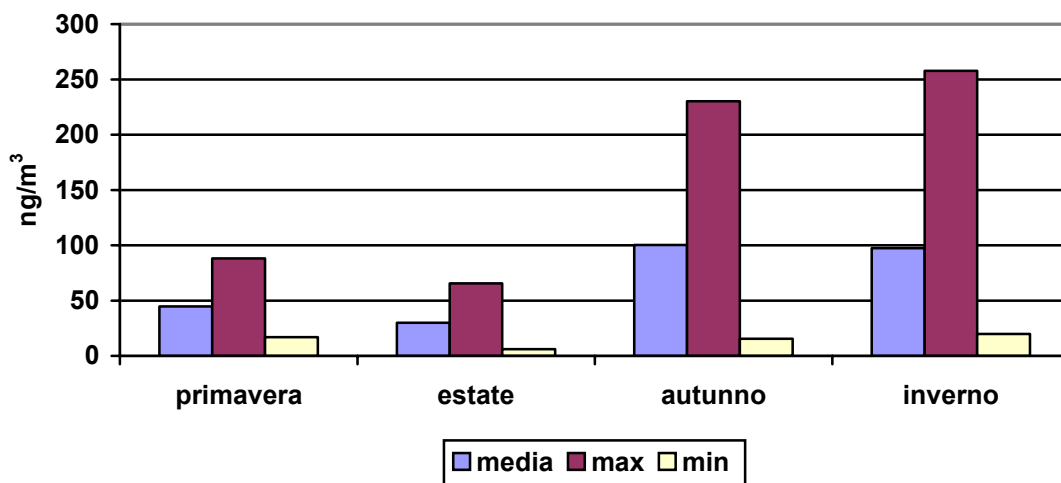


Figura 5. Andamento delle concentrazioni in aria del piombo presente nel materiale particolato PM₁₀

Le Figure 6 e 7 mostrano le distribuzioni del ferro e del piombo nel PM₁₀ considerando le due frazioni “fine” (< 2,5 µm) e “coarse” (particelle da 2,5 a 10 µm). Da notare come per il piombo, che proviene principalmente dalla combustione dei motori autoveicolari a benzina, la frazione più fine rappresenti l’80%; mentre per il ferro, dovuto a fenomeni di usura ed abrasione di parti metalliche, la frazione più ricca è quella con le particelle di diametro maggiore (coarse).

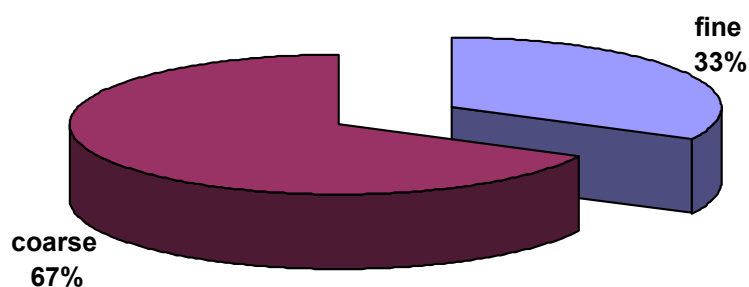


Figura 6. Distribuzione del ferro nelle due frazioni campionate con il dicotomo

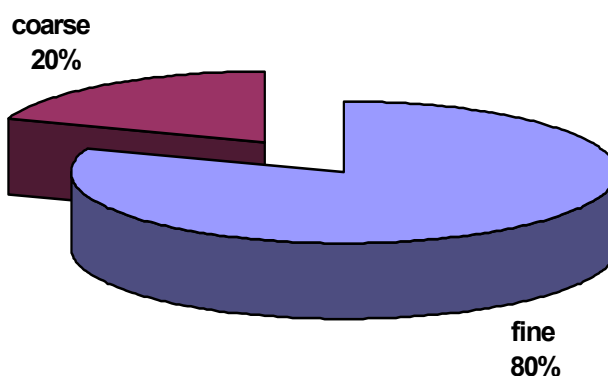


Figura 7. Distribuzione del piombo nelle due frazioni campionate con il dicotomo

Bibliografia

1. Italia. Decreto del Presidente del Consiglio dei Ministri 28 marzo 1983. Limiti massimi di accettabilità delle concentrazioni e di esposizione relativi ad inquinanti dell'aria nell'ambiente esterno. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n. 145, 28 maggio 1983.
2. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 28 maggio 1988, n. 203. Attuazione delle direttive CEE numeri 80/779, 82/884, 84/360 e 85/203 concernenti norme in materia di qualità dell'aria, relativamente a specifici agenti inquinanti, e di inquinamento prodotto dagli impianti industriali, ai sensi dell'art. 15 della legge 16 aprile 1987, n. 183. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale, Supplemento Ordinario* n. 140, 16 giugno 1988.
3. Italia. Decreto Ministeriale 25 novembre 1994. Aggiornamento delle norme tecniche in materia di limiti di concentrazione e di livelli di attenzione e di allarme per gli inquinamenti atmosferici nelle aree urbane e disposizioni per la misura di alcuni inquinanti di cui al decreto ministeriale 15 aprile 1994. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale, Supplemento Ordinario* n. 290, 13 dicembre 1994.

4. Comunità Europea. PrEN 12341. Air quality: field test procedure to demonstrate equivalence of sampling methods for the thoracic fraction of suspended particulate matter (SPM) with a reference sampling method for the thoracic fraction of SPM. *CEN* 1996.
5. Comunità Europea. Direttiva 1999/30/CE del Consiglio del 22 aprile 1999 concernete i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, le particelle e il piombo. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 163, 29 giugno 1999.
6. Stati Uniti. United States Environmental Protection Agency. National ambient air quality standards for particulate matter. *Fed. Reg.* 1997;62: 38652-38760.
7. Stati Uniti. United States Environmental Protection Agency. Reference method for the determination of particulate matter as PM₁₀ in the atmosphere. *Fed. Reg.* 1990;40: CFR Part. 50.
8. Cattani G, Stacchini G, D'Innocenzio F, Marconi A, Ziemacki G. Confronto tra campionatori per il prelievo della frazione di polveri aerodisperse PM₁₀. In: *I congressi della Fondazione Maugeri*. Vol. 2. Maugeri Foundation Books; 2000. p. 411-4.
9. National Institute for Occupational Safety and Health. *Manual of analytical methods*. 4th edition. Cincinnati (OH): NIOSH; 1994.
10. Koistinen KJ, Kousa A, Tenhola V, Hänninen O, Jantunen MJ, Oglesby L, Kuenzli N, Georgoulis L. Fine particle (PM_{2.5}) measurement methodology, quality assurance procedures, and pilot results on the EXPOLIS Study. *J Air & Waste Manage Assoc* 1999;49:1212-20).
11. ISO/DIS 15767. *Workplace atmospheres – Controlling and characterizing errors in weighing collected aerosols*. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.

CAMPIONAMENTO E PRE-TRATTAMENTO DEI CAMPIONI DI SUOLI

Eleonora Beccaloni

Laboratorio di Igiene Ambientale, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La problematica dei suoli contaminati è esplosa in tutta la sua gravità solo negli ultimi anni.

L'identificazione, la caratterizzazione e il recupero di aree contaminate costituiscono un problema ambientale di prioritaria importanza sia a livello nazionale che europeo.

L'emanazione del D.L.vo n. 22/97 del Ministero dell'Ambiente, ha posto le basi affinché a livello nazionale, si elaborassero dei criteri di valutazione per i suoli contaminati univoci per tutto il territorio da adottare per le operazioni di bonifica dei suoli (D.L.vo 22/97). La definizione dei suoli contaminati, che viene valutata attraverso il criterio dei valori soglia/valore limite di concentrazione degli inquinanti, è legiferata in un apposito Decreto/Regolamento n. 471 emanato dal Ministero dell'Ambiente il 25 ottobre 1999 (DM 471/99). Tale decreto definisce che cosa si deve intendere per sito contaminato, fissa i limiti di accettabilità di contaminazione dei suoli e le procedure per elaborare i piani di bonifica. Pertanto al fine di individuare se si è in presenza o meno di un sito contaminato, si dovrà procedere ad una caratterizzazione dell'area ed allo sviluppo di un piano di campionamento.

Un accettabile piano di campionamento deve essere sviluppato prima del campionamento poiché un adeguato numero di campioni deve essere prelevato per poter condurre un corretto piano valutativo.

L'importanza del campionamento è sottolineata dal fatto che nessun valore è completo e affidabile se non lo è il campione su quale è basato. Infatti inadeguatezza o errori sul campionamento si manifestano limitando l'accuratezza e/o il risultato dell'intero studio.

L'obiettivo deve essere quindi quello di ottenere campioni che consentano una più completa possibile caratterizzazione dell'area in studio.

Un piano di campionamento per raggiungere l'obiettivo deve avere una struttura del tipo:

- indagine preliminare;
- scelta del metodo di campionamento;
- preparazione di un piano di analisi.

Indagine preliminare

Per avviare uno studio di caratterizzazione di un'area e delle possibili contaminazioni devono essere raccolti tutti i dati e le informazioni già esistenti. Le informazioni storiche costituiscono la base per definire i requisiti della successiva indagine (suddivisione dell'area), il piano delle analisi chimico-fisiche e l'analisi del rischio di contaminazione.

Il sito deve essere descritto dettagliatamente in modo da stabilire i possibili effetti dell'attività ivi svolta.

Pertanto è opportuno conoscere e valutare i seguenti punti:

– *Raccolta, analisi e valutazione dei dati esistenti*

Consiste, ad esempio, nel conoscere:

- tipologia del sito (area industriale dismessa, discarica illegale, area industriale in attività, sversamento, ecc.);
- uso attuale del sito e destinazione d'uso prevista;
- mappatura dettagliata dell'area presente e passata;
- descrizione di tutte le attività (produttive, stoccaggio, raccolta rifiuti, minerarie, militari, ecc.);
- tipologia ed elenco completo di materiali e sostanze utilizzati per le lavorazioni (classificazione della loro pericolosità e tossicità);
- discariche presenti nell'area (tipo e volume dei rifiuti, condizioni di impermeabilizzazioni e ricoprimento, presenza di percolato).

– *Vie di migrazione degli inquinanti e potenziali bersagli*

Le vie di migrazione sono i possibili percorsi degli inquinanti a partire dalle zone contaminate, dei quali occorre individuare quelli più probabili da sottoporre ad indagine:

- trasporto tramite opere artificiali quali: aste fognarie, bacini di sedimentazione, drenaggi, condutture interrate varie;
- trasporto dovuto a dilavamento superficiale dei terreni e diffusione attraverso canali, torrenti, fiumi, laghi (caratteristiche idrogeologiche, direzione e velocità dei flussi, conducibilità idraulica, permeabilità ecc);
- trasporto verticale ed orizzontale nella zona insatura del sottosuolo (infiltrazione dell'acqua, raggiungimento delle sottostanti acque di falda, potabili e non, e potenziale assunzione da pozzi);
- trasporto dovuto alla dispersione nell'atmosfera del particolato contaminato attraverso l'azione dei venti;
- trasporto dovuto ad esposizione diretta alla sostanze pericolose, ovvero attraverso la catena alimentare;
- descrizione degli ambienti naturali;
- analisi della distribuzione della popolazione residente e delle attività antropiche.

È anche utile effettuare un sopralluogo diretto sul sito e sull'area circostante teso alla identificazione delle vie di migrazione degli inquinanti ed alla valutazione della vulnerabilità dell'ambiente naturale circostante il sito, per un intorno significativo dipendente dalle dimensioni del sito.

L'elaborazione dei dati dell'attività preliminare sopra descritta consentirà di definire l'estensione dell'area contaminata e permetterà una preventiva suddivisione del sito in subaree, aventi caratteristiche sostanzialmente omogenee e tali da orientare le successive scelte riguardanti le sostanze inquinanti da ricercare e i relativi metodi di campionamento da adottare.

Scelta del metodo di campionamento

La scelta del metodo di campionamento da applicare dovrà principalmente tener conto della geologia del sito e del fatto che, in genere, i contaminanti presenti in un sito non sono distribuiti secondo criteri di tipo casuale, essendo il più delle volte localizzati in determinate aree.

Suddivisione dell'area

Il criterio della suddivisione dell'area maggiormente utilizzato è quello della suddivisione a griglia. Le maglie della griglia di campionamento possono avere dimensioni comprese fra i 25 ed i 100 metri di lato, a seconda dell'ampiezza dell'area e della densità di informazioni desiderata.

I punti di indagine possono essere localizzati in corrispondenza dei nodi della griglia (ubicazione sistematica) oppure all'interno di ogni maglia (almeno 1) in posizione opportuna (ubicazione sistematica casuale) a seconda dei dati conoscitivi ottenuti dalla fase di indagine preliminare o della situazione logistica (presenza di infrastrutture, ecc.).

La "scelta ragionata" può trovare applicazione nei siti in cui la contaminazione è di connotazione ben definita, specie se di piccola entità, e/o quando non si possono prelevare campioni in numero elevato. Quando invece si ha a che fare con aree di cui non si hanno informazioni e/o dove non ci sono evidenti indizi di contaminazione, si può ricorrere a sondaggi di tipo statistico.

Profondità dei sondaggi

La profondità del prelievo di suolo, sottosuolo o materiali di riporto varia con la necessità di definire la profondità dell'inquinamento, la variabilità orizzontale e verticale della contaminazione, la presenza di contatto diretto con gli acquiferi e le fonti d'inquinamento e deve essere definita nelle indagini preliminari mediante analisi speditive di campo e indagini geofisiche.

La frequenza dei prelievi in senso verticale potrà essere modificata e integrata sulla base delle osservazioni effettuate in sede di campionamento e dell'omogeneità idrogeologica degli strati attraversati.

Tipo di perforazione

La scelta del tipo di perforazione deve essere guidata dalle necessità conoscitive poste dal singolo caso tenendo conto del tipo di terreno da perforare, nonché dalla necessità di conoscere con esattezza la litologia e la sua successione nel sottosuolo, di effettuare il prelievo di campioni indisturbati o rimaneggiati di terreno.

Il carotaggio è il campionamento da preferire nella maggior parte dei casi poiché permette di controllare le variazioni di contaminazione rispetto alla profondità, soprattutto in sedimenti da tempo depositati. La percentuale di recupero sui carotaggi dovrà essere almeno del 70% per il primo metro di profondità e del 60% per la parte restante a meno di situazioni geologiche particolari, nel qual caso la validità del sondaggio sarà giudicata e motivata.

In situazioni particolari vengono ammesse anche tipologie di campionamento alternative, come nel caso in cui sia prevista una caratterizzazione limitata unicamente ai primi 50 cm.

Nella Tabella 1 sono riportati alcuni tipi di campionatori con i relativi campi di applicazioni, vantaggi e svantaggi.

Tabella 1. Attrezzatura per il campionamento di suoli

Attrezzatura	Campo di applicazione	Vantaggi e svantaggi
Carotatore manuale	Suolo soffice, strati superficiali	Relativamente facile da usare; preserva il campione (adatto per raccolta di campioni indisturbati); profondità limitate; può essere difficile da pulire e decontaminare.
Carotatore a tubo sottile	Suolo soffice, profondità 0-3 metri	Facile da usare; (adatto per raccolta di campioni indisturbati); può essere utilizzato insieme con "bucket auger"; può essere utilizzata una guaina (ad esempio in acetato) per mantenere l'integrità dei campioni; facile da decontaminare; può risultare difficile rimuovere le parti interne dal campionatore.
Cucchiaio campionatore apribile (Split spoon sampler)	Suolo per profondità da piano campagna fino al substrato roccioso	Eccellente intervallo di profondità; preserva il campione (adatto per raccolta di campioni indisturbati); può essere utilizzata una guaina (es. in acetato) per mantenere l'integrità dei campioni; utilizzabile per suoli duri; spesso usato con macchine campionatrici per ottenere campioni profondi.
Campionatore "Shelby"	Suolo soffice per profondità da piano campagna fino al substrato roccioso	Eccellente intervallo di profondità; preserva il campione (adatto per raccolta di campioni indisturbati); il tubo può essere inviato tal quale al laboratorio di analisi; può essere utilizzato con macchine campionatrici per ottenere campioni profondi e per prove di permeabilità; non adatto in suoli rocciosi.
Trivella a fustella (Bucket auger)	Suolo soffice per profondità da 10 cm a 3 metri	Di facile utilizzo; buon intervallo di profondità; diametro e volume dei campione uniformi; può essere utilizzata una guaina (es. in acetato) per mantenere l'integrità dei campioni; può distruggere e mischiare orizzonti di suolo aventi spessori maggiori di 10 cm.
Trivella meccanica azionabile manualmente	Suolo per profondità da 10 cm a 4,5 metri	Buon intervallo di profondità; generalmente utilizzato insieme con il "bucket auger" per la raccolta del campione; funziona a distruzione di nucleo (non adatto per raccolta di campioni indisturbati); richiede 2 o più operatori; può essere difficile da decontaminare; azionata da motore a gasolio (potenziale "cross- contamination").

Fonte: USEPA - Removal Program Representative Sampling Guidance Volume 1 – Soil (1988)

Pulizia degli strumenti di prelievo

Prima di operare il prelievo garantire la pulizia di strumenti, attrezzi e utensili di perforazione rimuovendo completamente, sia internamente che esternamente, i materiali potenzialmente inquinanti che potrebbero aderire alle pareti degli strumenti; tali operazioni sono compiute con acqua in pressione e getti di vapore acqueo. Alla fine di ogni perforazione decontaminare tutti gli attrezzi e gli utensili. Per garantire che dopo le operazioni di decontaminazione l'acqua e l'umidità presenti sulle pareti esterne ed interne delle apparecchiature evaporino naturalmente, è consigliato ricorrere all'uso alternato di due carotieri. Nel caso in cui le condizioni climatiche non garantiscano l'evaporazione naturale, si può procedere all'asciugatura con carta da filtro esente da contaminazione. Qualora alcuni utensili

non possano essere decontaminati per la presenza di superfici non facilmente pulibili, questi dovranno essere eliminati al termine di ogni trivellazione. Gli attrezzi e le apparecchiature decontaminati al termine delle operazioni o in attesa di essere riutilizzati, devono essere conservati in condizioni tali da evitare la contaminazione. Nel maneggiare le attrezzature utilizzare guanti puliti monouso per prevenire il diretto contatto con il materiale estratto.

Numero di campioni

Uno degli aspetti più importanti, è determinare il numero di campioni da prelevare, per ottenere sufficienti informazioni. In generale, il numero di campioni richiesti è inversamente proporzionale alla quantità di informazioni conosciute ed è proporzionale al grado di confidenza che si vuole ottenere nei risultati e non per ultimo al livello di contaminazione presunto.

Non è prevista nessuna guida specifica per quanto riguarda la definizione del numero di campioni, ma possono essere forniti dei concetti generali:

- La quantità in peso ed il numero dei campioni devono definire al meglio la zona in esame.
- Il valore medio di più misure di ciascuna stazione di prelievo risulta meno variabile che non misure singole.
- L'analisi statistica richiede più repliche poiché misure singole sono inadeguate per descrivere la variabilità.
- Il numero necessario di campioni è proporzionale all'eterogeneità della matrice e al grado di significatività statistica richiesto nei test, basato sul campionamento.

In ogni caso l'obiettivo da raggiungere è quello di avere sufficienti informazioni per poter garantire un'accurata valutazione dello stato di contaminazione del sito.

Deve essere anche previsto un prelievo per campioni di bianco di riferimento. I campioni di bianco prelevati in prossimità, ma al di fuori, dell'area contaminata servono per verificare se la concentrazione di un contaminante differisce e di quanto differisce rispetto a quelle naturalmente presenti nel sito. La profondità ed il tipo di materiale da campionare dovrebbe corrispondere a quelli degli altri campioni raccolti. Al fine di determinare il valore del "bianco di riferimento" il numero di campioni prelevati dovrebbe essere tale da permettere una trattazione statistica dei dati ottenuti.

Formazione dei campioni da avviare ad analisi

Dal materiale estratto da ogni posizione di sondaggio possono essere prelevati campioni relativi a profondità prestabilire, oppure relativi a medie di determinati intervalli di profondità. Nel primo caso, il campionamento permette di ricostruire l'andamento della concentrazione degli inquinanti lungo tutto il profilo del sottosuolo in esame. Nel secondo caso, invece, si possono ottenere indicazioni sul contenuto medio di inquinanti nella massa riducendo i costi di analisi ma con il rischio di perdere eventuali picchi di concentrazione e di diluire il composto analizzato, producendo un falso negativo.

In ogni caso, i campionamenti dovrebbero riguardare tutti i singoli strati omogenei, non trascurando quelli evidentemente anomali.

Quando sono oggetto di studio le masse di materiali interrati (discariche), in particolare quando sia prevista la loro rimozione e smaltimento come rifiuto, può essere valido procedere al prelievo e all'analisi di un campione medio di tutto il materiale estratto da ogni posizione di sondaggio.

Un apposito campione dovrà essere prelevato nel caso in cui si debba provvedere alla classificazione granulometrica del terreno, raccogliendo parte del campione, ottenuto con il

metodo delle quartature come indicato da IRSA-CNR, quaderno 64 del gennaio 1985. Conoscere le classi granulometriche di cui è composto il suolo è importante per definire l'eventuale concentrazione di inquinanti, in quanto alcuni contaminanti hanno una maggiore affinità per l'argilla ed il limo che non per la sabbia.

Dopo l'estrazione, le carote saranno sezionate, imballate, catalogate e conservate in appositi contenitori a temperatura adeguata e successivamente trasportate presso i laboratori di analisi.

L'aliquota del campione da sottoporre ad analisi al fine di determinare il contenuto di inquinanti, dovrà essere predisposta scartando in campo, dopo quartatura, i ciottoli ed il materiale grossolano.

Nella formazione del campione da inviare alle analisi occorre tenere presente alcuni accorgimenti:

- identificare e scartare materiali estranei che possono alterare i risultati finali (pezzi di vetro, ciottoli, rami, foglie, ecc.), indicandoli opportunamente nel rapporto di campionamento;
- omogeneizzare il campione per avere una distribuzione uniforme dei contaminanti;
- suddividere il campione in più parti omogenee, adottando metodi di quartatura.

Qualora fosse necessaria la preparazione di un campione composito, è importante in primo luogo decidere se del singolo campione deve essere preso solo la parte centrale, solo lo strato superficiale oppure l'intero campione. Definito ciò il campione deve essere completamente omogeneizzato e diviso in due aliquote, delle quali una verrà conservata e sarà eventualmente utilizzata in seguito per effettuare analisi di controllo sul campione primario, l'altra andrà a formare il campione composito. Lo stesso trattamento verrà eseguito su tutti i campioni scelti per ottenere il campione finale.

Unite le singole aliquote di cui il nuovo campione sarà composto si procederà ad un'ulteriore omogeneizzazione dell'intero campione composito.

Per evitare la contaminazione dei campioni particolare attenzione deve essere fatta sia durante il campionamento che durante la manipolazione degli stessi.

Campioni designati all'analisi di metalli in tracce non devono entrare a contatto con superfici metalliche ed i contenitori indicati per questi campioni sono dei contenitori in polietilene.

Stoccaggio e conservazione dei campioni

Tutti i contenitori, prima di ricevere il campione, devono essere lavati con acido nitrico Suprapure e abbondantemente sciacquati con acqua deionizzata.

Il campione deve riempire completamente il contenitore, che deve essere sigillato, etichettato e inoltrato subito al laboratorio per l'analisi insieme alle note di campionamento. Ove ciò non è possibile si può procedere alla conservazione del campione. Non ci sono tecniche universali di conservazione dei campioni, poiché una tecnica può essere idonea per alcune analisi e non esserlo per altre. Quindi è consigliabile avere a disposizione una discreta quantità di campione così da poter utilizzare diverse tecniche di conservazione (refrigerazione, congelamento o aggiunta di sostanze chimiche) a seconda dei casi.

Se non c'è disponibilità di un'idonea tecnica di conservazione, il campione può essere conservato temporaneamente in borse termiche. Borse termiche contenenti siberini sono indicate per campioni che necessitano solo di refrigerazione e borse termiche contenenti ghiaccio secco per campioni ove è previsto il congelamento. Ove siano previste anche analisi biologiche è opportuno conservare i campioni a 4 °C ed in ogni caso evitare processi di congelamento o essiccamento.

Documentazione dell'attività di campionamento

Durante il campionamento deve essere mantenuta una rendicontazione completa delle procedure di prelievo e devono essere incluse le seguenti informazioni:

1. località delle stazioni di prelievo;
2. metodi di campionamento utilizzati;
3. manipolazione e procedure di conservazione e stoccaggio dei campioni;
4. date e tempi di prelievo, manipolazione e stoccaggio dei campioni;
5. ogni circostanza che potenzialmente abbia interferito o condotto al cambio delle modalità di prelievo.

I campioni devono essere chiaramente etichettati così da poter essere individuati in ogni occasione. Un minimo di informazione deve comunque seguire tramite etichettatura il campione, le informazioni minime sono di seguito riportate:

- codice unico di identificazione del campione;
- localizzazione e profondità del prelievo (numero della stazione);
- analisi o test che devono essere eseguiti sul campione;
- metodo di conservazione e/o stoccaggio;
- data e tempo di prelievo;
- note se necessario;
- iniziali della persona o persone che hanno contribuito alla collezione del campione.

Piano di analisi

Scelta degli analiti

Se dalla ricerca preliminare dei dati storici non si possono trarre sufficienti informazioni per sviluppare una lista di potenziali inquinanti chimici da controllare, questi devono essere selezionati tra quelli prioritari comunemente ricercati, che per i suoli sono: antimonio, arsenico, berillio, cadmio, cobalto, cromo_{tot}, cromo_{vi}, mercurio, nichel, piombo, rame, selenio, stagno, tallio, vanadio, zinco, cianuri (liberi), fluoruri;

Alla lista dei prioritari, comunque, si possono anche aggiungere altri contaminanti dedotti da informazioni storico-commerciali e/o applicazioni effettuate in agricoltura che ne suggeriscano la presenza nella zona specifica di studio.

Metodi di analisi

Una volta che la lista degli analiti è stata compilata, devono essere determinati i metodi di analisi più idonei. La selezione del metodo è legata al limite di rivelabilità del metodo stesso. Molti sono i fattori che determinano il limite di rivelabilità di un metodo non per ultimo la quantità di campione disponibile all'analisi. Per gli inquinanti prioritari l'USEPA (1986a) stabilisce i limiti di rivelabilità dei metodi (MDLs) come linee guida generali. Questi limiti sono da considerare come obiettivo analitico da raggiungere e non come requisito obbligato. Questo parametro è necessario per valutare quanto la concentrazione dell'analita sia prossima al valore critico e quindi quanto un dato ottenuto con la metodica scelta sia accettabile. L'USEPA, comunque, suggerisce che un limite di rivelabilità del metodo che va da 1/10 a 1/5 del valore della concentrazione prevista per la specifica sostanza è desiderabile e in alcuni casi sufficiente. Comunque occorre considerare che se alcuni analiti sono presenti a basse concentrazioni, sono

necessari: strumentazioni molto sensibili, quantità maggiori di campioni e passaggi di preconcentrazione.

I metodi di analisi prevedono il trattamento del campione e la determinazione strumentale dell'analita in esame.

Trattamento del campione

Il campione di suolo viene sottoposto a:

– *Vagliatura*

Per i campioni di suolo la determinazione di tutti gli analiti deve essere effettuata sulla frazione granulometrica passante al vaglio di 2 mm, ed i risultati ottenuti vanno riferiti al peso secco del suolo passato a tale vaglio. Ove si accerti o si sospetti che la contaminazione sia presente anche nella frazione granulometrica di suolo avente particelle con diametro maggiore a 2 mm, si consiglia di sottoporre tale frazione un test di eluizione così da poter definire l'eventuale lisciviazione degli inquinanti presenti. Il test di eluizione da adottare è quello che utilizza come soluzione eluente acqua deionizzata saturata di CO₂; il rapporto solido-liquido è di 1:20 in peso ed il test deve essere condotto sotto agitazione a temperatura ambiente per 24 ore ("Premessa" Tabella 1 dell'Allegato 1 del DM 471/99). L'espressione dei risultati ottenuti andrà eseguita riferendo la concentrazione degli inquinanti riscontrati nella soluzione eluente al peso secco della frazione granulometrica sottoposta al test.

– *Omogeneizzazione*

L'omogeneizzazione del campione migliora la riproducibilità delle risultanze analitiche soprattutto in una matrice così eterogenea come quella suolo. L'uso di mortai in agata o in titanio garantiscono che durante il trattamento non ci sia inquinamento dovuto al rilascio di sostanze indesiderate da parte dello strumento utilizzato per l'omogeneizzazione.

– *Dissoluzione del campione mediante digestione acida*

Una volta omogeneizzato, il campione va sottoposto a digestione acida per la dissoluzione totale della matrice. Le migliori tecniche di dissoluzione oggi disponibili sono quelle che fanno uso di forni a microonde ad alta e/o a bassa pressione. Per la dissoluzione della matrice suolo l'uso del forno a microonde ad alta pressione è quello consigliato, poiché permette di accorciare i tempi di trattamento mantenendo una resa molto buona di mineralizzazione anche senza l'uso dell'acido fluoridrico (unico acido che permette la completa mineralizzazione del suolo).

Di seguito vengono riportati tre esempi di miscele acide comunemente utilizzate per la mineralizzazione di suoli in forno a microonde ad alta pressione:

- 1° esempio

soluzione di acqua regia HNO₃ e HCl del tipo Suprapure in rapporto 1:3 nel primo ciclo di microonde e aggiunta di HNO₃ nel secondo ciclo (dissoluzione non totale ma efficace per terreni ad alto contenuto di sostanza organica) la soluzione viene ripresa e portata a volume con acqua deionizzata;

- 2° esempio

HNO₃ nel primo ciclo di microonde con aggiunta di H₂O₂ nel secondo ciclo di microonde, in questo caso si ottiene una estrazione abbastanza spinta alle volte

anche sufficiente per la determinazione di analiti facilmente estraibili (Cd) la soluzione viene ripresa e portata a volume con acqua deionizzata;

- 3° esempio

nel primo ciclo di microonde si può decidere di utilizzare le soluzioni del 1° o del 2° esempio ma con l'aggiunta di HF Suprapure nel secondo ciclo di microonde. Terminati i cicli di microonde riprendere il campione con una soluzione satura di acido borico (precedentemente preparata) in rapporto di 1:5 per neutralizzare l'acido fluoridrico, portando poi a volume con acqua deionizzata. Non sempre comunque è possibile l'uso dell'acido fluoridrico poiché questo può danneggiare la strumentazione utilizzata per la determinazione degli analiti.

La quantità in peso di campione da sottoporre ad analisi dipende sia dalla concentrazione presunta del contaminante da ricercare che dal grado di omogeneità raggiunta. Comunque per metodi che prevedono l'uso di forni a microonde la quantità normalmente utilizzata è tra i 250-500 mg. Le metodiche ufficiali prevedono 1 g di campione (DM 13 settembre 1999).

Determinazione strumentale

La determinazione dei microinquinanti inorganici si effettua mediante tecniche di spettroscopia in assorbimento o emissione atomica come:

- Assorbimento atomico in fiamma (*Flame Atomic Absorption Spectroscopy*, FAAS);
- Assorbimento atomico con fornace di grafite (*Graphite Furnace – Atomic Absorption Spectroscopy*, GF-AAS);
- Emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente con sistema ottico (*Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*, ICP-AES);
- Emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente con sistema a massa (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, ICP-MS);
- Determinatore di Hg;
- Determinazione spettroscopica con sviluppo di idruri.

Queste tecniche presentano range di sensibilità molto differenti. La scelta del metodo strumentale più idoneo dipende dalla concentrazione del campione. Nell'analisi di molti metalli si possono avere inaccettabili interferenze che possono essere facilmente controllate utilizzando appropriate strategie.

Metodi di analisi ufficiali riconosciuti a livello nazionale e/o internazionale per la matrice suolo sono riportati nel:

- DM 13 settembre 1999 “Approvazione dei Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” (Supplemento G.U. n. 248 del 21/10/1999) per la sola frazione granulometrica inferiore a 2 mm;
- Metodi elaborati dall'Environmental Protection Agency statunitense (US-EPA) - Serie 3050B per la digestione acida di sedimenti, fanghi e suoli; Serie 7000 per la determinazione strumentale in Assorbimento Atomico; Serie 6010 per la determinazione strumentale in ICP-ottico; Serie 6020 per la determinazione strumentale in ICP-MS.

Qualità del dato analitico

Le procedure di Controllo Qualità (QC) sono necessarie per garantire che i risultati analitici soddisfino i criteri di precisione e accuratezza. L'uso del materiale di riferimento certificato dà

la sicurezza dell'accuratezza e della precisione del dato, poiché questo è accompagnato da un certificato per il quale uno o più valori di specifiche proprietà sono certificati attraverso una procedura che ne stabilisce la loro riferibilità secondo specifiche unità di misura e per le quali ciascun valore presenta un'incertezza ad uno stabilito livello di confidenza.

La scelta del materiale da utilizzare cade naturalmente su quello che presenta la stessa matrice del campione, se ciò non è possibile si può ripiegare su un materiale con matrice simile o molto vicina ma tenendo comunque presente che le concentrazioni degli analiti certificati siano più prossime a quelli degli analiti in studio.

L'elaborazione dei risultati analitici deve esprimere l'incertezza del valore di concentrazione determinato per ciascun campione: in considerazione della eterogeneità delle matrici suolo, sottosuolo e materiali di riporto la deviazione standard per ogni valore di concentrazione determinato, può essere stabilita nel 10%.

Nella relazione che accompagna la presentazione dei risultati delle analisi devono essere riportati i metodi e calcoli statistici adottati nell'espressione dei risultati e della deviazione standard.

Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22. Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggi. *Gazzetta Ufficiale - Serie Ufficiale* n.278, 28 novembre 1997.
2. Italia. Decreto Ministeriale 25 ottobre 1999, n. 471. Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'art. 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22 e successive modifiche e integrazioni. *Gazzetta Ufficiale - Serie Ufficiale* n.293, 15 dicembre 1999.
3. Italia. Decreto Ministeriale 13 settembre 1999. Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". *Gazzetta Ufficiale - Serie Ufficiale* n.248, 21 ottobre 1999.
4. USEPA. *Removal program representative sampling guidance*. Volume 1-Soil. Washington: USEPA; 1988.
5. USEPA. *QA/QC Guidance for Sampling and analysis of sediments, water and tissues for dredged material evaluations*. Washington: USEPA; 1995.

ELEMENTI IN TRACCIA IN FLUIDI BIOLOGICI E CAMPIONI TISSUTALI: CAMPIONAMENTO, CONSERVAZIONE E TRATTAMENTO

Alessandro Alimonti, Francesco Petrucci, Giovanni Forte.
Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le attività di un moderno laboratorio di chimica analitica devono essere predisposte, organizzate e condotte conformemente ad una serie di indicazioni e raccomandazioni che la comunità scientifica è andata sviluppando nel corso degli anni con sempre maggiore consapevolezza. Tutto ciò si estrinseca in norme e procedure che dovrebbero essere incorporate nel lavoro quotidiano al fine di rendere valide e credibili le informazioni sperimentali ottenute, evitando inutili dispendi di tempo, energie e risorse. Il conseguimento di risultati comparabili tra laboratori ed il contenimento degli errori sistematici sono, infatti, tra gli obiettivi prioritari di ogni sistema che tenda a garantire la qualità delle determinazioni analitiche. A tal fine è necessario, fin dalla fase di pianificazione dell'analisi, considerare le possibili cause di errore lungo la catena analitica e sviluppare procedure idonee per le informazioni che si vogliono ottenere. In questa relazione ci occuperemo, in particolare, delle prime fasi del ciclo analitico relative al campionamento, alla conservazione ed al trattamento di fluidi biologici e di campioni tissutali per la successiva quantificazione del loro contenuto in elementi in traccia. È opportuno riportare alcune considerazioni preliminari che sono in stretto rapporto con le fasi suddette e che, seppur ovvie, risultano utili criteri generali nella definizione delle procedure preanalitiche:

- il rischio di alterazione dell'informazione sugli analiti di interesse è potenzialmente tanto maggiore quanto minori sono le loro concentrazioni;
- il campionamento di piccole quantità di campione (es. i prelievi ematici capillari) può dilatare enormemente l'effetto dell'inquinamento;
- meno numerose e complesse sono le operazioni preanalitiche che si effettuano e minore diventa il rischio di alterare l'informazione analitica del campione;
- la durata del periodo di conservazione è proporzionale al rischio di influenzare negativamente l'accuratezza delle determinazioni finali.

Campionamento

La procedura di campionamento è di fondamentale importanza per i risultati finali: è evidente, infatti, che la singola analisi, per quanto eseguita con metodi strumentali di dosaggio altamente accurati e precisi, non possa avere qualità migliore di quella del corrispondente prelievo. È purtroppo esperienza ancora frequente sottoporre ad analisi campioni biologici già contaminati al momento del campionamento, con una conseguente significativa alterazione del loro contenuto in elementi. Tra i molti fattori che possono influenzare questa prima fase, con perdita o indebita aggiunta di analiti, non possono essere trascurati l'*ambiente* in cui si effettua il prelievo, l'*operatore-prelevatore* e gli *utensili* utilizzati per il campionamento stesso.

È sicuramente molto elevato il rischio di contaminazione da parte dell'*ambiente* in cui si svolge il campionamento a causa di polvere, sporcizia, vernici, disinfettanti, e/o suppellettili ed oggetti in esso presenti. È il caso frequente dei prelievi ematici effettuati in ambulatorio o dei prelievi di urine e capelli che sono eseguiti, talvolta, direttamente in ambito domestico o sul luogo di lavoro, in situazioni di facile contaminazione per l'inadeguatezza dei locali. Questo aspetto può essere tenuto meglio sotto controllo prelevando in ambienti accuratamente puliti, non direttamente in contatto con l'atmosfera esterna, non polverosi e dotati di rivestimenti plastici. La soluzione ottimale è quella di effettuare queste operazioni in camere pulite, dove l'atmosfera è controllata per mezzo di idonei filtri. Anche l'atmosfera dei laboratori può, infatti, non risultare adatta soprattutto per alcuni elementi (Tabella 1) (1). Differente è il caso dei campionamenti di tessuti, sia autoptici che biotici che, essendo realizzati in sale operatorie costruite con caratteristiche simili a quelle sopra descritte per i laboratori puliti, offrono in genere maggiori garanzie.

Tabella 1. Livelli di elementi in traccia nella polvere contenuta nell'atmosfera del laboratorio

Elemento	Concentrazione (mg kg ⁻¹)	Elemento	Concentrazione (mg kg ⁻¹)
Al	3000	Mn	116
As	55, 22* (0.001)*	Na	2950
Br	23	Ni	70
Ca	2690	P	1150
Cd	3	Pb	2150
Cl	2	S	20000
Co	9	Sb	15
Cr	39, 14* (<0.0015)*	Se	0.3* (<0.008)*
Cu	213	Sn	10
F	1	Sr	14
Fe	3230	Ti	258
I	3	V	259
K	7920	Zn	1640
Mg	2390		

Dal nostro punto di vista, la *persona addetta al campionamento* può essere considerata "inquinante". Capelli, cute e abiti sono, infatti, notevoli fonti di contaminazione, a causa della polvere, del sudore e dell'uso di prodotti cosmetici e per l'igiene personale (creme, saponi, talco, shampoo, ecc.). È bene, quindi, creare una barriera tra operatore e campione attraverso l'uso di guanti, camici e quant'altro necessario, non soltanto a difesa dell'operatore, ma anche come tentativo di limitare quanto più possibile l'influenza dell'operatore stesso sul campione (2, 3). Basti ricordare che, ad esempio, le concentrazioni di Cr e Ni nel sudore (del prelevatore ma anche del soggetto in esame) sono, rispettivamente, 10 e 20 volte superiori i livelli normalmente ritrovati nel siero. L'utilizzo di camici puliti e di guanti (in PVC, lattice, ecc.) ma senza polveri (talco, polvere di mais, ecc.) rappresenta, quindi, un requisito minimo indispensabile.

Altro aspetto essenziale è l'impiego di *utensili* adatti, costruiti in modo tale da non rilasciare analiti durante il contatto con il campione. Un utensile come una normale forbice di acciaio quando utilizzato per campionare capelli o unghie può cedere, ad esempio, Cr, Mn, Ni e V (4). La Tabella 2 riporta l'entità del trasferimento di alcuni metalli in campioni epatici biotici prelevati con *ago* o con *bisturi* di acciaio (4). È evidente che la contaminazione è particolarmente alta nel caso di biopsie con ago, soprattutto nella prima serie di prelievi, a causa anche del rapporto volume del campione/superficie interna dell'ago. Se rapportati con le

concentrazioni attese nell'organo, la contaminazione diventa ovviamente più o meno importante: del 5-10 % per il Fe, del 25-40% per Mn, Cu, Zn o anche maggiore del 100% per Co, Cr e Ni. Nel caso, invece, di biopsie epatiche di pazienti affetti da Morbo di Wilson o da altre patologie che prevedono un livello epatico di Cu enormemente elevato la contaminazione dovuto all'ago del prelievo può diventare trascurabile. Utensili (*forbici, bisturi, aghi*, ecc.) costruiti o ricoperti con particolari materiali, quali il nitrato di titanio o carburo di tungsteno, possono essere convenientemente utilizzati in questi casi.

Tabella 2. Cessione di elementi durante biopsie epatiche eseguite con ago o bisturi di acciaio

Elemento	Prelievo	Cessione*	
		<i>biopsia con ago</i>	<i>biopsia con bisturi</i>
Co (ng g ⁻¹)	1°	235	0,98
	2°	33	0,12
Cr (µg g ⁻¹)	1°	9,75	0,016
	2°	1,2	0,006
Cu (µg g ⁻¹)	1°	1,09	7,85 10 ⁻³
	2°	1,10	NR
Fe (µg g ⁻¹)	1°	20	2,85
	2°	2,4	0,37
Mn (µg g ⁻¹)	1°	0,36	3.63 10 ⁻³
	2°	0,15	NR
Ni (µg g ⁻¹)	1°	9,1	0,039
	2°	3,15	0,0036
Zn (µg g ⁻¹)	1°	10,1	7,75 10 ⁻³
	2°	6,75	0,66 10 ⁻³

*:sono riportate le medie di 2 primi prelievi e dei 2 prelievi successivi, tranne che per le biopsie con ago di Cu e Mn per i quali le medie sono relative ai 4 primi e ai 4 successivi prelievi. NR: non riportato.

In Tabella 3 è riportato il coefficiente di rilascio (R), inteso come il rapporto tra la cessione di elementi in siero di un bisturi non ricoperto e quella di un analogo strumento ricoperto con strato di titanio nitrato. Il rapporto sempre superiore all'unità evidenzia l'inadeguatezza dell'utensile in acciaio non ricoperto, in special modo per alcuni elementi quali Mn (R=125), Cr (R=12) e Ni (R=10,8) (5).

Tabella 3. Coefficiente di rilascio (R) in siero di bisturi in acciaio rispetto a bisturi con lama ricoperta di TiN

Elemento	R*	Elemento	R*
Au	1,67	Mo	> 3,3
Cd	> 3,3	Ni	10,8
Co	> 8	Sb	> 3,3
Cr	12,5	Sc	2,5
Cs	2,9	Ta	3,2
Cu	> 4	Tb	1
Fe	> 2,5	Ti	> 3,1
Hg	> 2	V	> 8
La	5	W	> 3,8
Mn	125	Zn	> 8

*: rapporto tra quantità di elemento rilasciato da bisturi in acciaio inox e quella di un bisturi con lama ricoperta con TiN.

Precauzioni particolari devono essere prese nella raccolta di campioni di sangue. Gli *aghi* in platino o sue leghe (Pt-Ir, Pt-Ru, ecc.) risultano perfettamente idonei al prelievo del sangue dal punto di vista analitico (eccetto ovviamente per l'analisi degli elementi con cui l'ago è costruito) essi hanno però lo svantaggio di essere estremamente costosi. Gli aghi di acciaio, così come le lancette per i prelievi capillari dello stesso materiale, sono inutilizzabili per la successiva determinazione di alcuni elementi quali Co, Cr e Ni (l'acciaio può contenere qualche unità percentuale di questi elementi) e possono essere fonti di accidentali contaminazioni anche per altri metalli (Cd, Mn, Pb, V, ecc.). Il contributo di Cr, ad esempio, a seguito di un prelievo capillare o venoso effettuato con utensili di acciaio può risultare di uno o due ordini di grandezza superiore alle concentrazioni di questo elemento attese nel sangue, che rientrano normalmente nell'intervallo tra 0,1 e 0,5 mg L⁻¹.

In Tabella 4 sono riportati i livelli di rilascio nel sangue di Cr, Mn, Co e Ni da parte di normali aghi di acciaio inox: anche dopo 4 prelievi (ciascuno di 20 mL di sangue) il contributo di contaminazione è ancora consistente soprattutto per Cr e Ni (4). Tali inconvenienti sono riscontrati anche per gli aghi di acciaio siliconato, in quanto la ricopertura di silicone a volte interessa la sola parte esterna per facilitare l'introduzione in vena. Problemi simili si possono incontrare con le siringhe di plastica del tipo a perdere, il cui impiego può rappresentare un'ulteriore aggiunta al campione di analiti, quali Al e Zn od altri elementi utilizzati come coadiuvanti tecnologici nella sintesi del materiale plastico.

Se non si è in grado di trovare alternative per il prelievo, è, comunque, indispensabile valutare l'idoneità del sistema impiegato (ago inox e siringa a perdere) attraverso prove di cessione in soluzioni debolmente acide (HNO₃ 1%, HCl 1%) analizzate a tempi diversi. Un'idonea alternativa al sistema "ago inox + siringa a perdere" è rappresentata oggi dalla disponibilità di *cannule e cateteri in materiale plastico* e/o ricoperti di teflon che, in ogni caso, devono essere preventivamente testati per la cessione.

Tabella 4. Rilascio di elementi nel sangue a seguito di prelievi successivi con lo stesso ago in acciaio inox

Prelievo	Co (µg/L)	Cr (µg/L)	Mn (µg/L)	Ni (µg/L)
1°	0,92	90	0,45-0,80	75
2°	0,22	13	0,01-0,10	10
3°	0,15	10	0,01-0,05	8,5
4°	0,18	16	0,01-0,06	13

Ogni prelievo consta di 20 mL di campione.

Altra buona norma per limitare la contaminazione nel momento del prelievo è quella di non utilizzare per l'analisi degli elementi in traccia i primi millilitri di sangue (10 e 5 mL per adulti e bambini, rispettivamente) in quanto questi servono per "lavare" il materiale degli utensili da eventuali impurezze presenti (3, 6). È in ogni caso preferibile evitare l'uso di anticoagulanti (EDTA, citrato, eparina, ecc.) in quanto nessuno di essi è privo di metalli, soprattutto Ba, Ca, Mn e Zn. Dovendo analizzare il sangue intero si può, in alternativa all'uso di anticoagulanti, lasciar coagulare un'aliquota precisamente misurata di sangue nella provetta di prelievo e travasarlo quantitativamente nel contenitore di trattamento prima dell'analisi. È consigliabile, inoltre, utilizzare il siero piuttosto che il plasma, se non espressamente richiesto dal significato fisio-tossicologico dello studio (7-9). La separazione del siero è realizzata con la normale procedura, si lascia, cioè, formare il coagulo (circa 1 ora) a temperatura ambiente e si centrifuga a 800 g per circa 20 min. Eventualmente si ripete la centrifugazione. Occorre eliminare quei

campioni di siero che presentano un elevato grado di emolisi già ad un esame visivo: nei casi in cui è necessaria una valutazione dell'emolisi più attendibile si può analizzare spettrofotometricamente il contenuto di emoglobina oppure la concentrazione di Fe o Cu.

Conservazione

La conservazione è l'insieme delle procedure e delle tecniche, atte a garantire la stabilità del campione e a contribuire all'accuratezza finale dell'analisi. L'esigenza di conservare il campione prelevato può derivare, in genere, da: 1) intervallo di tempo sufficientemente lungo che intercorre tra prelievo ed analisi; 2) lontananza del luogo di prelievo dal laboratorio di trattamento ed analisi; 3) implementazione di banche biologiche (per future investigazioni) e 4) necessità di ripetere l'analisi (per ragioni medico-legali e di controllo). Rientrano nella categoria dei campioni da conservare in maniera idonea i materiali di riferimento utilizzati nella routine di laboratorio. Durante il periodo di conservazione una significativa alterazione dell'informazione analitica è funzione di:

- tipo di matrice del campione;
- materiale del contenitore (interazioni fisiche e chimiche tra campione e materiale del contenitore);
- condizioni di conservazione (incluso il pre-trattamento del campione subito dopo il prelievo);
- periodo previsto prima che il campione venga analizzato.

I materiali dei *contenitori* nei quali il sangue e gli altri fluidi e tessuti biologici vengono raccolti dopo il prelievo dovrebbero garantire: 1) inerzia chimica nei confronti del campione e dei reagenti aggiunti; 2) assenza, o ridotta presenza, di fenomeni di adsorbimento e/o rilascio degli elementi di cui si richiede la quantificazione; 3) soddisfacente rapporto tra volume del campione e superficie del contenitore e 4) chiusura ermetica per evitare perdite per diffusione o sublimazione (evitare eventuali chiusure con guarnizioni ed o-ring). I materiali maggiormente utilizzati sono: *vetro e quarzo, polietilene (PE) ad alta o bassa densità, polipropilene (PP), policarbonato (PC), polistirene (PS), politetrafluoroetilene (PTFE) e polivinilcloruro (PVC)*. Il vetro in determinate condizioni (intorno alla neutralità) agisce come un vero scambiatore cationico grazie alla carica negativa dei gruppi silicei. Per questo motivo, anche se di ottima qualità, il vetro deve essere evitato nella determinazione di elementi chimici a livelli di tracce mentre il suo impiego può essere utile per la quantificazione di composti organici. Per le materie plastiche vale quanto precedentemente detto per le siringhe: è necessario effettuare prove di cessione per verificare il rilascio di quegli elementi derivanti dal processo produttivo. In particolare, comunque, il *PE* è un materiale plastico relativamente a buon mercato, infrangibile e non tossico che può essere utilizzato in genere con ottimi risultati per l'analisi di metalli con qualche eccezione. Ad esempio non è idoneo per la determinazione del mercurio, a causa della combinazione tra la volatilità del metallo e la porosità del materiale. Il *PP* è simile al *PE* e può essere impiegato come sua alternativa: ha ottime caratteristiche di inerzia chimica, ma è leggermente più sensibile del *PE* agli agenti fortemente ossidanti. Può, quindi, dar luogo più facilmente del *PE* a fenomeni di adsorbimento superficiale di metalli. Anche il *PS*, resina particolarmente rigida, trasparente e resistente all'urto, rappresenta un buon materiale per contenitori di fluidi biologici. I contenitori in *PTFE* (resina con elevatissima inerzia chimica agli acidi ed ai solventi e con eccezionali caratteristiche autolubrificanti e antiurto) o anche in quarzo sono senza dubbio le migliori soluzioni per l'analisi degli elementi. Hanno però lo svantaggio di essere costosi e di poter essere riutilizzati solo previa un'accurata decontaminazione (10). In

conclusione, è preferibile impiegare contenitori in *PTFE*, *quarzo*, *PS* e *PP* per conservazioni a lungo termine (anche due mesi), mentre per periodi più brevi è possibile utilizzare *PC* od anche *PVC*, stante la minore resistenza chimica che questi ultimi materiali presentano (11). Scelto il tipo contenitore che si ritiene più adatto, occorre assicurarsi che effettivamente non sia fonte di contaminazione o perdita degli elementi di interesse soprattutto quando questi ultimi sono attesi a livelli di traccia (mg mL^{-1} oppure ng mL^{-1}). La verifica della eventuale *contaminazione* è indispensabile quando si intraprende un nuovo studio o quando si utilizzano per la prima volta nel laboratorio nuovi materiali e/o contenitori. Tale operazione può essere effettuata analizzando soluzioni di lavaggio debolmente acide (per esempio, HNO_3 allo 0,03 M in acqua deionizzata ad alta purezza) o, meglio, materiali di riferimento certificati dopo che sono stati lasciati nel contenitore per 5 giorni a $+4\text{ }^\circ\text{C}$. Anche la *perdita* di analiti per fenomeni di adsorbimento sulle pareti del contenitore o di diffusione attraverso di esse può essere controllata utilizzando le soluzioni dette sopra con l'accorgimento di analizzarle ad intervalli di tempo prestabiliti (ad esempio, dopo 0, 1, 4, 8, 16, 32 giorni, ecc.) prendendo nota dell'eventuale tendenza delle concentrazioni a diminuire col passare dei giorni. Nel caso di campioni solidi i fenomeni diffusivi o di adsorbimento sono ovviamente molto più limitati.

Quasi sempre le esigenze dell'analisi rendono necessario un ciclo di *decontaminazione*. Per far ciò si ricorre all'uso di acidi ultrapuri (HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , HClO_4) usati anche singolarmente. Quando possibile, è consigliabile evitare l'uso di HCl in quanto in grado sia di diffondere facilmente nelle pareti del contenitore che di disturbare la successiva analisi per spettrometria di assorbimento atomico o spettrometria di massa. Una delle procedure maggiormente utilizzate per decontaminare consiste nel riempire il contenitore di plastica o vetro per 48 h con una soluzione acida pari a circa 1-2 % v/v in HNO_3 . Sono riportati anche altri metodi più aggressivi che impiegano soluzioni acide in HNO_3 più concentrate, ad esempio al 10 % v/v (12). Il contenitore viene infine risciacquato più volte con acqua deionizzata per completare la pulizia avendo cura di analizzare l'ultimo risciacquo per quantificare gli analiti di interesse e, quindi, verificarne il livello nei bianchi.

Per mantenere integre le qualità del campione durante il periodo di conservazione generalmente si agisce sulla temperatura e/o sul contenuto d'acqua dei campioni. A *temperatura ambiente* il materiale biologico va normalmente incontro a rapide trasformazioni chimiche, microbiologiche ed enzimatiche.

La Tabella 5 riassume per alcuni elementi le combinazioni possibili relative al materiale degli utensili di prelievo e dei contenitori di raccolta, alla temperatura di conservazione, nonché al periodo di tempo massimo entro cui è possibile effettuare l'analisi con un adeguato margine di accuratezza (7).

L'abbassamento della temperatura del campione riduce proporzionalmente la velocità di tali trasformazioni. All'interno dell'intervallo di temperatura tecnicamente utilizzabile (da $+4\text{ }^\circ\text{C}$ a $-190\text{ }^\circ\text{C}$), le temperature usualmente impiegate sono:

- 1) $+4\text{ }^\circ\text{C}$, equivalente alla temperatura di frigorifero, per periodi più brevi di una settimana. Si conservano in queste condizioni *sangue*, *siero*, *plasma*, *liquor* e *tessuti*, ma non l'urina;
- 2) l'intervallo tra -5 e $-25\text{ }^\circ\text{C}$ (temperatura di un freezer) per periodi di tempo più lunghi. Queste temperature più basse riducono anche i fenomeni di adsorbimento/rilascio dei contenitori e permettono conservazioni più dilatate nel tempo.

Tabella 5. Possibili modalità di raccolta e conservazione del siero per l'analisi di alcuni elementi in traccia

Elemento	Materiale		Temperatura di conservazione (°C)	Tempo massimo di conservazione (giorni)
	siringa/ago di prelievo	provetta di raccolta		
Ag	PS o PP / acciaio	PS	-20	30
Al	PS o PP / acciaio	Vacutainer, PS	-20	60
Au	PS o PP / acciaio	PS	-20	60
Be	PS o PP / acciaio	quarzo, PS	-20	60
Cd	PS o PP / acciaio	PS	-20	30
Co	PS o PP / acciaio	PS	-20	20
Cr	catetere endovenoso	quarzo, PS	-20	30
Cu	PS o PP / acciaio	PS	-20	60
Hg	PS o PP / acciaio	PS	+5	10
Mn	catetere endovenoso	polycarbonato, PS	-20	60
Ni	catetere endovenoso	PS	-20	30
Pb	catetere endovenoso	quarzo, PS	+5	10
V	catetere endovenoso	quarzo, PS	-20	45

L'urina deve essere prima possibile raffreddata a -20 °C, previa acidificazione a pH <2 con HNO₃, anche se alcuni autori non la ritengono sempre indispensabile (Tabella 6) (7).

Tabella 6. Materiali e modalità di conservazione dell'urina

Elemento	Materiale del contenitore	Additivo (per 100 mL di campione)	Temperatura di conservazione (°C)	Tempo massimo di conservazione (giorni)
Ag	PE (alta densità)	NI	- 20	30
Al	PE (alta densità), PP	NI	- 20	30
As	PE (alta densità)	NI	- 20	45
Au	PE (alta densità)	NI	- 20	45
Be	PE (alta densità), PP	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	20
Bi	PE (alta densità), PP	NI	- 20	20
Cd	PE (alta densità), PC	NI	- 20	30
Co	PE (alta densità), PP	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	30
Cr	PE (alta densità), PP	NI	- 20	30
Cu	PE (alta densità), PP	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	60
Hg	vetro borosilicato, PE (alta densità)	NI	+ 5	3
Mn	PE (alta densità), PP	NI	- 20	30
Ni	PE (alta densità), PP	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	30
Pb	PE (alta densità), PP	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	30
Pd	PE (alta densità)	NI	- 20	30
Pt	PE (alta densità)	NI	- 20	30
Sb	PE (alta densità)	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	30
Se	PE (alta densità)	NI	- 20	20
Sn	PE (alta densità), PC	NI	- 20	20
Tl	PE (alta densità)	NI	- 20	30
V	PE (alta densità), PP	NI	- 20	30
Zn	PE (alta densità), PP	1 mL HNO ₃ 1 %	- 20	30

Refrigerate a 4 °C, infatti, le urine subiscono comunque una rapida degradazione microbica, con trasformazione dell'urea a carbonato d'ammonio e conseguente aumento del pH che facilita la formazione di magnesio fosfato ed urato d'ammonio. Se, invece, nelle urine prevalgono crescite microbiche che diminuiscono il pH si verifica una precipitazione degli urati metallici e dell'acido urico: in ogni caso il risultato è, comunque, la rimozione di metalli dalla fase liquida per adsorbimento e/o inclusione nel sedimento.

Quando si utilizza l'abbassamento della temperatura come metodo di conservazione occorre ricordarsi di alcune ovvie regole operative: 1) non riempire completamente il contenitore per evitare perdite durante il congelamento per effetto dell'aumento di volume della soluzione campione; 2) lasciar scongelare a temperatura ambiente e, infine, 3) agitare energicamente prima di effettuare il prelievo analitico, per eliminare il gradiente di concentrazione formatosi (Tabella 7).

Tabella 7. Gradiente di concentrazione nella provetta per Cu (%) dopo scongelamento e prima di agitare

Posizione nella provetta	Campione di siero (%)	Campione di sudore (%)
Alta	19	25
Media	101	57
Bassa	143	145

La tecnica d'elezione per conservare materiale biologico è la *liofilizzazione*. È però una procedura complessa che necessita di una particolare attrezzatura e che richiede tempi lunghi per la sua realizzazione. È utilizzata soprattutto per campioni che devono essere immagazzinati per lunghi periodi di tempo e/o che devono essere trasportati anche in situazioni in cui non si è certi che un'adeguata catena del freddo possa essere mantenuta. Attraverso la drastica riduzione dell'acqua presente nel campione la liofilizzazione permette, infatti,

- 1) la conservazione anche a temperatura ambiente (possibilmente in essiccatore);
- 2) la riduzione della reattività chimica;
- 3) una distruzione batterica quasi completa;
- 4) la concentrazione del campione per riduzione del suo volume;
- 5) la facilità di ricostituzione del campione.

Trattamento

Il trattamento del campione è l'insieme delle operazioni minime ed indispensabili per rendere il campione idoneo all'analisi, mantenendo nel contempo integra l'informazione analitica richiesta. La manipolazione è quindi funzione:

- 1) del tipo di matrice del campione (solido, liquido, più o meno ricco di materiale organico, di sali, ecc.);
- 2) del tipo e del livello di concentrazione degli analiti che si vogliono determinare;
- 3) della tecnica di quantificazione che si utilizzerà.

Durante le operazioni di trattamento valgono le medesime considerazioni fatte precedentemente (e alle quali si rimanda), concernenti l'*idoneità dell'ambiente*, l'*operatore* ed i *materiali* delle provette e dei contenitori che vengono a contatto con le soluzioni analitiche. In particolare, il *laboratorio* dove si effettuano le varie operazioni dovrebbe essere attrezzato in

modo da permettere un controllo delle particelle pulviscolari, soprattutto per determinazioni di tracce od ultratracce di elementi. La soluzione ideale è dotarsi di laboratori di Classe 100, che garantiscono, cioè, la presenza di un numero di particelle (di grandezza maggiore di $0,5 \mu\text{m}$) inferiore a 100 per 30 cm^3 di aria. Un'alternativa meno dispendiosa può essere rappresentata da creazione di "zone pulite" su banconi attrezzati con cappe a flusso laminare anche di modeste dimensioni. In Tabella 8 sono confrontati, a titolo di esempio, i livelli dei bianchi analitici che tipicamente si ottengono in un laboratorio convenzionale ed in uno "pulito" (del tipo Classe 100). Si nota come la concentrazione dei bianchi preparati nel laboratorio "pulito" può essere contenuta a livelli di anche di 3 ordini di grandezza inferiori rispetto ai bianchi di un laboratorio convenzionale.

Tabella 8. Livelli dei bianchi analitici riscontrabili in funzione del tipo di laboratorio

Elemento	Concentrazione nei bianchi ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	Laboratorio convenzionale	Laboratorio pulito
Cd	$0,05 \pm 0,002$	$0,001 \pm 0,001$
Co	1 - 8	$0,005 \pm 0,005$
Cu	5 - 50	$0,05 \pm 0,003$
Ni	1 - 15	$0,005 \pm 0,003$
Pb	5 - 50	$0,02 \pm 0,001$
Se	$< 0,01$	$< 0,01$
Zn	5 - 50	$0,05 \pm 0,003$

Rimane ovviamente valido il criterio di controllare l'idoneità di tutti i *materiali* a contatto con il campione e con la soluzione analitica, non trascurando neanche quelli utilizzati per pochi attimi. È il caso dei micro-puntali delle pipette, che possono, ad esempio, rilasciare Cd e per i quali è preferibile ricorrere alle prove di cessione secondo i criteri detti. Particolare attenzione deve essere riposta nella scelta dei *reagenti*, prima fra tutti l'acqua. Utilizzare acqua "ultra-pura" che abbia subito una duplice distillazione oppure una distillazione seguita da un processo di ulteriore purificazione per osmosi inversa e/o scambio ionico. Anche gli acidi impiegati nelle mineralizzazioni e nelle estrazioni devono corrispondere all'esigenza dell'analista di limitare al massimo il contributo dei bianchi. Per quantificazioni a livelli di traccia ed ultratraccia ($\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1}) si possono utilizzare acidi di grado Suprapur oppure acidi anche di grado reagente ma che abbiano subito una doppia distillazione in laboratorio. È preferibile limitare al minimo indispensabile l'impiego di H_2O_2 , in quanto questo reagente, anche se di grado Suprapur, contiene concentrazioni non del tutto trascurabili di alcuni metalli.

Nel programmare il pre-trattamento dei campioni è opportuno prevedere di effettuare soltanto quelle manipolazioni che si ritengono effettivamente indispensabili. La semplice diluizione di fluidi come siero od urina può essere trattamento sufficiente purché non sia di ostacolo per la successiva analisi strumentale. Una lunga serie di determinazioni di siero o di urina soltanto diluiti, ad esempio, può provocare l'otturazione del nebulizzatore e/o dell'iniettore della torcia di uno spettrometro a plasma induttivo, compromettendo la qualità dell'analisi finale. Dipende dalla capacità e dalla sensibilità dell'analista valutare il *giusto compromesso* tra qualità della mineralizzazione e rischio di diminuire le prestazioni strumentali, tenendo anche in conto che un pre-trattamento più spinto (maggior numero di fasi e di quantità di reagenti aggiunti) aumenta il rischio di possibili contaminazioni. Ciò vuole significare che le differenti procedure riportate in letteratura e/o proposte nei manuali, alcune delle quali sono di

seguito suggerite, hanno comunque bisogno di una convalida sul campo e di eventuali adattamenti alle reali esigenze analitiche del laboratorio.

Date queste premesse, si riportano alcuni schemi di preparazione all'analisi di vari tipi di campioni. Per l'*urina*, come già accennato, può essere sufficiente una semplice diluizione con acqua deionizzata in funzione delle concentrazioni di analita attese. In presenza di sedimento però diventa indispensabile effettuare una blanda mineralizzazione del fluido utilizzando, ad esempio, una lampada ad ultravioletti (con potenza di 1000 W per 30 min) previa aggiunta di H_2O_2 e HNO_3 . Anche per il *siero* ci si può limitare ad una semplice diluizione con una soluzione acidula per HNO_3 (0,14 M). Il *sangue*, invece, richiede in genere una vera digestione, ricorrendo per esempio ad un trattamento in forno a microonde (Tabella 9). L'aggiunta di H_2O_2 deve essere evitata per l'analisi di quegli elementi per i quali può apportare un contributo di contaminazione non trascurabile.

Tabella 9. Schemi possibili per la digestione di sangue, capelli e tessuti molli

Matrice	Mineralizzazione	
	Reagenti	Ciclo in forno a microonde
Sangue (1 ml)	HNO_3 (2 ml) H_2O_2 (0,5 ml) ^a	5 min a 250 W - 5 min a 0 W 5 min a 400 W 5 min a 600 W
Capelli ^b (circa 200-300 mg)	HNO_3 (2 ml) ^c , quindi HNO_3 (1 ml) e H_2O_2 (1 ml)	3 min a 250 W - 6 min a 0 W 5 min a 250 W - 5 min a 0 W 5 min a 400 W 5 min a 500 W

^a verificare per la contaminazione caso per caso

^b effettuare un ciclo preventivo di lavaggio (13)

^c lasciare a riposo per 24 ore.

Un programma di mineralizzazione simile a quello riportato per il sangue in Tabella 9 è applicabile anche per i *tessuti molli*. Per l'analisi dei *capelli* è opportuno effettuare, prima ancora della digestione acida in forno a microonde, una procedura di lavaggio preventivo del campione per limitare la presenza di elementi di origine esogena. Tale procedura prevede lavaggi successivi con acetone, etilere ed EDTA (Tabella 9).

Conclusioni

Da quanto sopra esposto emerge che per assicurare la qualità dei risultati delle determinazioni è indispensabile definire, per ogni metodo analitico, un preciso ed accurato protocollo che contempli ogni aspetto relativo al prelievo, alla conservazione ed al pre-trattamento dei campioni. La verifica dell'idoneità delle procedure messe in atto e dei materiali impiegati deve essere effettuata su base sperimentale attraverso prove di cessione, analisi preliminari, valutazione dei bianchi risultanti al fine di limitare al minimo il rischio di contaminazione del campione. Tutto ciò al fine di rendere la qualità dell'analisi effettivamente commisurata con l'obiettivo analitico che ci si propone.

Riferimenti bibliografici

1. Sabbioni E, *et al.* Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. II. Examples of strategy adopted and trace element analysis of blood, lymph nodes and cerebrospinal fluid of Italian subjects. *Sci Total Environ* 1992;120:39-62.
2. Caroli S, Coni E, Violante N, Petrucci F, Caimi S. Alcuni aspetti del trattamento di materiale biologico prima della determinazione di elementi in traccia. *Ann Ist Super Sanità* 1995;31(2):219-24.
3. Kosta L. Contamination as limiting parameter in trace analysis. *Talanta* 1982;29:985-92.
4. Pietra R, Sabbioni E, Brossa F, Gallorini M, Faruffini G, Fumagalli M. Titanium nitride as a coating for surgical instruments used to collect human tissues for trace metal analysis. *Analyst* 1990;115:1025-8.
5. Versieck J. Trace elements in human body fluids and tissues. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci* 1985;22:97-184.
6. Versieck J, Barbier F, Cornelis R, Hoste J. Sample contamination as a source of error in trace element analysis of biological samples. *Talanta* 1982;29:973-84.
7. Minoia C. Esame dei fattori di variabilità preanalitici. *Ann Ist Super Sanità* 1995;31(2):225-32.
8. Minoia C, Pietra R, Sabbioni E, Ronchi A, Gatti A, Cavalleri A, Manzo L. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. III. The control of preanalytical factors in the biomonitoring of trace elements in biological fluids. *Sci Tot Environ* 1992;120:63-79.
9. Cornelis R, Heinzow B, Herber RFM, Christensen JM, Paulsen OM, Sabbioni E, Templeton DM, Thomassen Y, Vahter M, Vesterberg O. Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine. *Pure Appl Chem* 1995;67:1575-608.
10. Stroomberg GJ, Freriks IL, Smedes F, Cofino WP. Quality assurance and quality control of surface water sampling. In: Ph. Quevauvillier (Ed.). *Quality assurance in environmental monitoring*. Weinheim, Germany: VCH; 1995. p. 51-90.
11. Moody JR, Lindstrom RM. Selection and cleaning of plastic container for storage of trace element samples. *Anal Chem* 1977;49:2264-7.
12. Karin RW, Buono JA, Fasching JL. Removal of trace elemental impurities from polyethylene by nitric acid. *Anal Chem* 1975;47:2296-9.
13. Senofonte O, Violante N, Caroli S. Assessment of Reference Values for elements in human hair of urban schoolboys. *J Trace Elements Med Biol* 2000;14:6-13.

SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO ATOMICO NELL'ANALISI DI MATRICI COMPLESSE

Laura Ciaralli

Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La spettroscopia di assorbimento atomico è, tra i metodi ottici, una tecnica di notevole diffusione e versatilità, poiché le ampie possibilità analitiche offerte dalle moderne soluzioni strumentali quali fiamma, fornetto di grafite, sviluppo di idruri e sviluppo di vapori freddi, coprono il campo analitico della maggior parte degli elementi interessanti sia dal punto di vista della tossicità che dell'essenzialità.

Poiché il fenomeno dell'assorbimento atomico è determinato dalla popolazione atomica allo stato fondamentale, il sistema che ne determina la formazione costituisce la prima scelta che l'analista si trova ad effettuare nella messa a punto della metodica. Infatti, le soluzioni strumentali per la formazione della popolazione atomica presente vanno discriminate in base alla valutazione della sensibilità intrinseca dell'elemento, dei livelli di concentrazione ricercati, della complessità della matrice trattata, nonché della quantità del campione disponibile. Pertanto, non esiste il sistema di atomizzazione migliore in assoluto, ma certamente quello più idoneo ad una particolare esigenza analitica.

I numerosi campi d'applicazione per i quali è richiesta la determinazione di elementi inorganici (alimentare, industriale, biologico, ambientale) e la notevole varietà di matrici che ci si può trovare ad analizzare, implicano di solito la necessità di pretrattare il campione. Per la sua dissoluzione, esistono oggi vari tipi di digestione, il cui numero non è però proporzionale alla grande varietà dei campioni stessi.

È necessario quindi porre particolare attenzione nella scelta del tipo di trattamento del campione che risulterà poi critico per l'intero ciclo analitico.

Modalità di trattamento del campione

Essenzialmente i metodi di digestione possono essere riconducibili ai seguenti:

- incenerimento a secco;
- digestione ad umido;
- digestione acida in recipienti chiusi sotto pressione sottoposti all'azione delle microonde.

Saranno, di seguito, brevemente esposti gli aspetti positivi e quelli negativi dei suddetti metodi di digestione.

Incenerimento a secco

A seconda della natura del campione può richiedere una prima lunga fase di asciugatura del campione su piastra scaldante o stufa, che prelude lo step di incenerimento in muffola termoregolata per poi ottenere un residuo che sarà disciolto con acidi.

La fase di asciugatura può divenire più lunga qualora, per facilitare la distruzione della matrice, il campione venga prima addizionato con acidi.

I vantaggi di questo metodo sono: offrire la possibilità di utilizzare una quantità di campione relativamente grande; minimo impegno da parte dell'operatore (anche se il controllo nella fase di asciugatura deve essere costante per essere certi che non si verifichino perdite di campione per proiezione di materiale all'esterno del contenitore), limitato impiego di reattivi con conseguente diminuzione del valore dei bianchi; costi di esercizio contenuti.

La sua principale limitazione, comunque, è rappresentata dalla volatilità dell'analita che condiziona notevolmente la temperatura applicabile, per evitare perdite dell'elemento nel corso del pretrattamento.

Pertanto, una temperatura di incenerimento relativamente bassa può comportare una incompleta distruzione della matrice del campione, e quindi la necessità di trattare il residuo con piccole aliquote di acidi e di ripetere il trattamento in muffola con conseguente aumento del tempo d'analisi.

Digestione ad umido in contenitori aperti

Si effettua con aggiunta di acidi quali HNO_3 , HCl , H_2SO_4 , HClO_4 , HF usati singolarmente o in miscela.

Presenta alcuni aspetti negativi, quali quelli di essere condizionato dalla volatilità dell'analita, richiedere una costante presenza dell'operatore e, di non essere esente dal rischio di contaminazioni dovute, oltre che al contenuto endogeno di elementi dei reattivi, alla potenziale cessione da parte dei contenitori utilizzati come conseguenza del severo attacco acido subito. Questi due apporti possono comunque essere minimizzati con l'utilizzo di reattivi Suprapur e di contenitori di quarzo.

Comunque, la validità e l'applicabilità di questo procedimento sono correlate all'individuazione di una ottimale miscela acida per il tipo di matrice.

Digestione acida con microonde in recipiente chiuso

Questo tipo di pretrattamento è particolarmente indicato per la digestione di matrici complesse nelle quali determinare elementi molto volatili (As, Cd, Hg) in quanto, grazie alla concomitanza di più fattori (contenitore chiuso+miscela acida+azione delle microonde+sviluppo di alte pressioni), presenta il vantaggio di consentire l'utilizzo di alte temperature e di una quantità di acidi ridotta, con conseguente riduzione della contaminazione accidentale ed accorciamento dei tempi di applicazione permettendo, comunque, di ottenere soluzioni di buona qualità.

I suoi aspetti negativi, invece, sono essenzialmente rappresentati dalla limitata quantità di campione utilizzabile, dai contenitori che possono avere effetti memoria e necessitano di cicli successivi di decontaminazione, e dal costo di gestione molto elevato, sia per l'organizzazione iniziale sia per la sostituzione successiva di parti soggette ad usura.

Anche in questo caso è necessario trovare il giusto accoppiamento fra, tempo potenza della radiazione elettromagnetica utilizzata e qualità della miscela acida, fattori dai quali dipende l'efficienza del processo di digestione.

Alla luce di quanto premesso, la scelta del sistema di digestione può essere operata soltanto considerando una serie di fattori quali:

- *natura dell'analita*

degli elementi si possono definire "semplici" dal punto di vista del trattamento del campione, mentre altri presentano problematiche di recupero non indifferenti, in quanto

strettamente legati alla matrice; è per questo che elementi come: Al, Cr, Fe, V sono spesso usati come indice di valutazione dell'efficacia del metodo adottato.

- *tipo di matrice (organica, inorganica)*
 - *livelli di concentrazione attesa per l'analita*
 - *tecnica di determinazione utilizzata*
- qualità e versatilità della strumentazione a disposizione.

In ogni caso la validità del metodo di digestione prescelto deve essere necessariamente verificata attraverso l'utilizzo di un materiale di riferimento la cui matrice sia il più possibile simile a quella che si andrà a trattare, qualora ciò non fosse possibile, sarà necessario effettuare prove di recupero su campioni addizionati in laboratorio di opportune quantità dell'analita in esame.

La digestione acida in recipiente chiuso riscaldato e sotto pressione sottoposti all'azione delle microonde è oggi un metodo molto utilizzato, in quanto particolarmente confacente alle esigenze analitiche che prevedono il trattamento di matrici complesse.

Per tali matrici, un esempio di apparecchiatura può essere quello costituito da mineralizzatori che hanno le seguenti caratteristiche:

- possibilità di lavorare ad alta pressione;
- possibilità di essere dotati di sensore per la temperatura che, inserito in un vessel, permette di controllare il processo di digestione modificando automaticamente l'emissione delle microonde in modo da seguire un profilo termico preventivamente impostato dall'operatore;
- possibilità di poter utilizzare contenitori in quarzo inseriti nei vessel in teflon, assetto questo che permette di eliminare effetti memoria del teflon stesso e di ridurre drasticamente le fasi di decontaminazione, ad esempio nel caso del trattamento di campioni contenenti notevoli quantità di Hg.

Influenza del pretrattamento del campione sulla determinazione analitica

È necessario però considerare come la scelta del modo e dei reagenti con i quali il campione viene pretrattato potrà influenzare il dosaggio dell'elemento, ponendo a volte l'analista di fronte a notevoli difficoltà nella messa a punto della fase finale del procedimento analitico, prettamente strumentale

Ad esempio qualora si utilizzasse la fiamma per il dosaggio di un elemento in una soluzione derivante dalla digestione acida di un campione e la cui densità e/o viscosità sia diversa da quella della soluzione in cui vengono preparati gli standards, la velocità di aspirazione, o resa di nebulizzazione, sarà differente. Si avrà perciò una diversa velocità con cui campione e standard arrivano alla fiamma, determinando così un diverso numero di atomi presenti per unità di tempo nel fascio luminoso, per cui la misura sarà influenzata da un'interferenza di tipo fisico dovuta alla matrice

È noto come la fiamma, rispetto alla fornace di grafite, sia meno sensibile alle interferenze della matrice proprio per quello che è il suo modo di formare la popolazione atomica, ma che ci possono comunque essere situazioni in cui la complessità della matrice analizzata può creare dei problemi.

Questo tipo di problema si può presentare, ad esempio, nel caso del dosaggio alla fiamma di Fe, Mn e Zn in soluzioni derivanti dalla digestione acida in recipiente chiuso riscaldato sotto pressione sottoposto all'azione delle microonde acida di preparazioni erboristiche.

Queste matrici, si sono rivelate particolarmente difficili, in quanto in esse sono contemporaneamente presenti sia la componente minerale sia quella vegetale. Per la loro digestione è stato messo a punto un metodo secondo il quale un'aliquota del campione, opportunamente macinato ed omogeneizzato, è posta in contenitori di teflon, addizionata di opportune quantità di HNO_3 , HCl , HF ed H_2O_2 , per poi essere sottoposta ad un programma di tempi e potenza di microonde.

Per l'analisi in fiamma di questo tipo di soluzioni gli standard, preparati in una soluzione di HNO_3 all'1%, come viene fatto di solito per matrici meno complesse, presentava una sensibilità maggiore rispetto a quella ottenuta sull'incremento delle aggiunte note. Per evitare la sottostima del campione, e quantificare con il più agevole metodo della retta di calibrazione, è stato sufficiente preparare gli standard nei bianchi di mineralizzazione a livelli di analita al di sotto del limite di rivelabilità della tecnica a fiamma.

In questo caso si può ipotizzare che la matrice della soluzione eserciti un effetto che viene neutralizzato ponendo standard e campione nella stessa condizione di acidità. Per mantenere costante la velocità di trasporto, anche i campioni la cui concentrazione cade al di fuori del range analitico, sono stati diluiti con bianchi di mineralizzazione.

Per quanto riguarda invece la fornace di grafite, come sistema per la produzione della popolazione atomica, il discorso è più complesso anche in relazione al fatto che esistono svariate possibilità di assetto strumentale.

Le condizioni che più comunemente si utilizzano nella routine per la determinazione di molti elementi sono:

- strumento in cui la correzione degli assorbimenti non specifici sia di tipo Zeeman;
- tubo di grafite pirolitica, il trattamento pirolitico dei tubi è in grado di isolare lo strato poroso della grafite dal campione, impedendo così interferenze in fase di atomizzazione; inoltre, prolunga la durata del tubo anche se esso viene utilizzato con alte temperature di atomizzazione;
- piattaforma di L'Vov, in quanto permette all'analita di atomizzare a temperatura stabilizzata cioè soltanto quando le pareti del tubo e l'atmosfera inerte di argon hanno già raggiunto la temperatura di atomizzazione.

Il tubo con piattaforma è da preferire a quello senza piattaforma in quanto consente un uso più adeguato dei modificatori di matrice.

Un esempio dell'utilizzo di questo assetto strumentale è fornito dal dosaggio del Pb in soluzioni acetiche derivanti dal contatto di contenitori in cartone per pizza e acido acetico al 3% realizzato secondo metodo ufficiale.

In questo caso, la necessità dell'aggiunta di un modificante (fosfato d'ammonio 20 g/L + nitrato di magnesio 2g/L) è dimostrata dal diverso comportamento che hanno le soluzioni standard in acido acetico al 3% e le soluzioni campione. Come mostrato in Figura 1, l'elemento nella soluzione standard di acido acetico al 3% non risente eccessivamente della temperatura di incenerimento, mentre per le soluzioni da contatto l'incremento della temperatura risulta critico già a 350° C con conseguente diminuzione della sensibilità. Da notare come questa matrice, a differenza di quanto accade ad esempio nell'analisi di soluzioni provenienti da digestioni acide, non eserciti un effetto di depressione del segnale per formazione di composti stabili ma favorisca la volatilizzazione dell'analita. Normalmente nelle soluzioni mineralizzate la matrice ha effetto stabilizzante sull'analita e l'incremento di temperatura ha spesso un effetto benefico sulla sensibilità.

Quest'esempio fornisce l'occasione per descrivere quali sono le fasi di messa a punto di un metodo analitico e della scelta di un programma termico.

L'operatore può partire da metodi precedentemente utilizzati per la determinazione dell'analita in una matrice simile a quella da trattare; qualora questi non fossero ottimali per il campione da analizzare è necessario apportare delle modifiche. Bisogna ad esempio eliminare la presenza della matrice durante la fase dell'atomizzazione e minimizzare gli effetti dovuti all'assorbimento del fondo ed alle interferenze chimiche; è necessario perciò usare rampe con opportuni tempi e temperature durante la fase di essiccazione e di incenerimento, per poi passare ad un brusco innalzamento della temperatura per raggiungere, nel minor tempo possibile, l'atomizzazione.

In questo modo si può ottenere un miglioramento della forma dei picchi, caratteristica molto importante in quanto il segnale a forma di picco che si ottiene è proporzionale in area o in altezza alla massa dell'analita presente allo stato atomico nel tubo di grafite.

Per conoscere il comportamento dell'analita nella matrice da analizzare si possono costruire delle curve di incenerimento (Figura 1), cioè per ogni elemento, avendo preventivamente fissato un'opportuna temperatura di atomizzazione, individuare la migliore temperatura di incenerimento graficando la risposta in area di picco (qualora si scelga di lavorare in area) ottenuta su una soluzione di analita in presenza di matrice al variare della temperatura di questo step. Si ottiene così un profilo termico; in presenza di un plateau di temperatura, è opportuno scegliere un valore centrale per trovarsi in una situazione di maggiore stabilità.

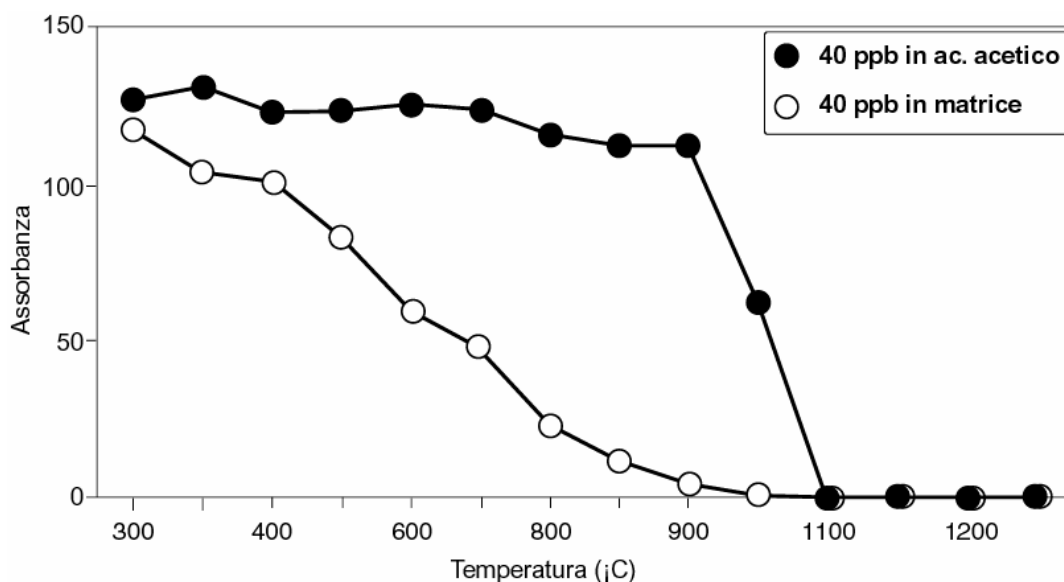


Figura 1. Curve di incenerimento relative al piombo

Si verifica poi la sensibilità del metodo analitico messo a punto mediante la lettura di uno standard ed il calcolo della massa caratteristica che deve essere il più possibile simile a quella fornita dalle specifiche dell'apparecchio per l'elemento in esame.

Le principali limitazioni all'utilizzo dell'ETA-AAS (*Electro-Thermal – Atomic Absorption Spectroscopy*) sono generalmente imposte dalla matrice del campione, cioè dal tipo e dall'entità delle interferenze che essa può provocare e che possono influire sia sull'accuratezza dell'analisi sia sulla sensibilità del metodo adottato. Infatti, durante il riscaldamento del campione in fornace, l'analita e la matrice subiscono delle modificazioni fisiche e chimiche.

Le interferenze si possono avere qualora nel corso del programma termico, messo a punto dall'analista, si abbia la formazione, rilascio o volatilizzazione di forme chimiche della matrice e dell'analita temporalmente sovrapponibili, capaci perciò di interferire tra loro. Tale comportamento può essere dovuto a svariate cause, quali ad esempio alta o scarsa volatilità della matrice, o di alcuni suoi componenti, e quindi formazione di composti stabili analita-matrice. Il problema delle interferenze si può risolvere, intervenendo sulla cinetica stessa di volatilizzazione agendo sul programma termico; qualora questo intervento non bastasse si può modificare la forma chimica o fisica dell'analita o della matrice al fine di ottenere una volatilizzazione selettiva cioè a temperature, e quindi a tempi differenti, durante la fase del trattamento termico del campione in esame.

Le interferenze che si possono riscontrare più di frequente si possono raggruppare in due categorie:

– *Interferenze spettrali*

Si verificano quando il riscaldamento della matrice in fornace genera la formazione di sostanze che provocano assorbimenti indesiderati che si sovrappongono al segnale analitico. In questo caso, la soluzione potrebbe essere quella di scegliere una lunghezza d'onda in una zona spettrale dove tali interferenze non si verifichino. Questo rimedio tuttavia peggiora la situazione in quanto comporta perdita di precisione analitica; inoltre, in caso di assorbimenti aspecifici molto elevati o non uniformi, si avrebbe anche l'impossibilità di effettuare una loro adeguata correzione con conseguente perdita di accuratezza.

– *Interferenze chimiche o chimico fisiche*

Sono provocate dalla matrice sul meccanismo stesso dell'atomizzazione, cioè sull'equilibrio e sulla formazione del vapore atomico. Verosimilmente esse derivano direttamente dal binomio analita-matrice, ossia dal tipo di interazione che si instaura tra essi, tale da anticipare o ritardare la volatilizzazione dell'analita e, di conseguenza, eliminare, ritardare o anticipare eccessivamente la sua atomizzazione.

Per neutralizzare quest'ultimo tipo di interferenze esistono due vie:

- variare il programma termico;
- utilizzare un modificante.

Per quanto riguarda la scelta del modificatore di matrice, numerosi sono quelli proposti in letteratura: tuttavia, sebbene la scelta sia circoscritta ad alcuni è necessario, di volta in volta, nelle diverse situazioni di contorno, individuare quelli più idonei e le concentrazioni di essi che meglio soddisfino le diverse esigenze analitiche.

Gli interventi di modifica possono essere rivolti alla matrice o all'analita, nel caso di un elemento volatile, ad esempio, è necessario ottenerne la stabilizzazione permettendo così l'utilizzo di temperature più alte. Un'opportuna modifica chimica è anche in grado di produrre il livellamento dei segnali analitici dovuti ai differenti stati di ossidazione dell'elemento stesso o dai suoi diversi stati di legame.

Nel caso in cui sia nota la composizione della matrice, la modifica può essere rivolta ad essa per ottenere un'aumentata volatilità delle specie interferenti consentendone l'eliminazione prima dell'atomizzazione, oppure può agire stabilizzando le specie interferenti ritardandone l'uscita. Si può anche operare facilitando il contatto fra campione e superficie di atomizzazione per mezzo di detergenti o tensioattivi ad esempio l'utilizzo del triton X nell'analisi dei sieri.

Intervenire sulla matrice significa, da un punto di vista chimico, provocare una trasformazione del o dei componenti interferenti in un composto chimico diverso che non abbia la possibilità di combinarsi con l'analita, e che sia termicamente più stabile o meno stabile.

Ad esempio nell'analisi di campioni biologici, le interferenze vengono provocate soprattutto dai componenti della parte inorganica, ovvero cloruri, solfati e fosfati; ciò è dovuto sia alla loro elevata concentrazione, sia alla loro incompleta eliminazione nella fase di incenerimento. Per quanto riguarda la parte organica, decomponibile a più bassa temperatura, essa viene generalmente eliminata prima dell'atomizzazione dell'analita, con uno step di incenerimento a temperatura elevata e tempi relativamente lunghi. Per evitare perdita di analiti si utilizzano modificanti per stabilizzarli.

Un altro esempio di intervento di modifica sulla matrice si può considerare l'aggiunta di acido nitrico in campioni contenenti una notevole quantità di cloruri.

Intervenire sull'analita significa invece provocare modifiche sul meccanismo di atomizzazione, modificandone la forma chimica prima dell'atomizzazione, o favorendo un diverso cammino della reazione di atomizzazione mediante l'aggiunta di opportuni reagenti.

Azioni di modifica sull'analita si possono concretizzare ad esempio aggiungendo Acido Fosforico al Piombo in varie soluzioni (acetiche, cloridriche, nitriche, ecc.) al fine di consentire la formazione di pirofosfati più stabili, oppure l'aggiunta di sali di Magnesio nell'analisi di Alluminio, Nichel o Cromo che agirebbero occludendo l'analita nell'ossido di Magnesio. Le Figure 2 e 3 mostrano chiaramente come possa essere importante nella risposta analitica la scelta del modificante e della sua concentrazione.

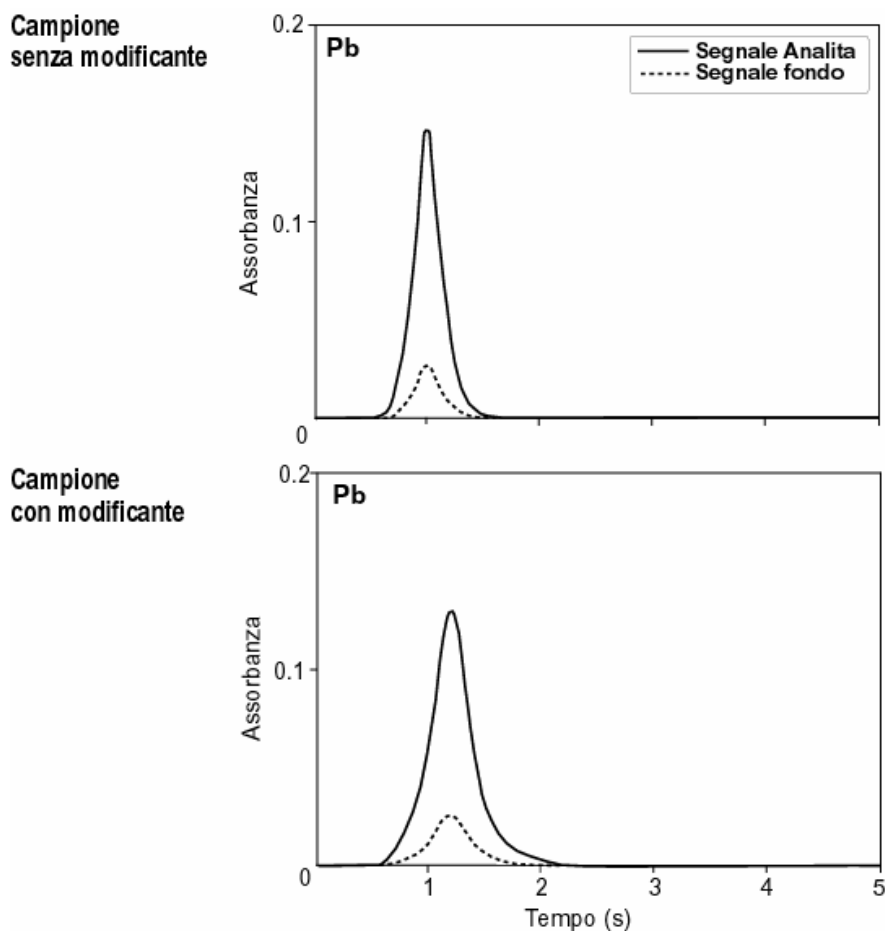


Figura 2. Influenza del modificante sulla risposta analitica

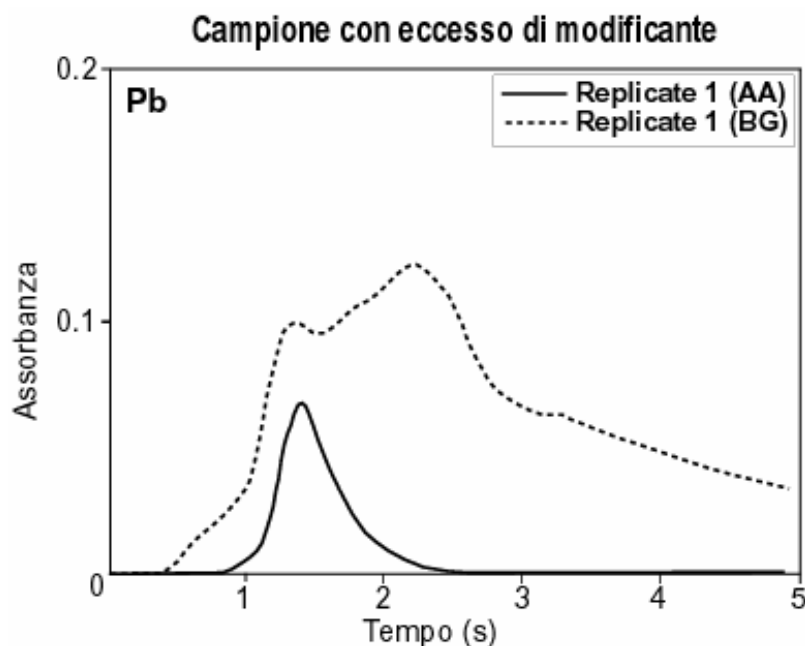


Figura 3. Influenza della concentrazione del modificante sulla risposta analitica

Le figure si riferiscono al dosaggio del Piombo in un mineralizzato di preparati erboristici diluito (nel primo grafico) soltanto con il suo bianco di mineralizzazione e nel secondo con un modificante ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 5 g/L+ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). Come si può vedere dal più alto valore di assorbanza del campione in modificante, l'elemento ha bisogno di essere stabilizzato, pur avendo utilizzato un programma termico con temperature relativamente basse.

Nella Figura 3 invece è rappresentata una situazione in cui il campione è stato diluito con il modificante sopraindicato, ma a maggiore concentrazione. È evidente come il segnale del background sia così elevato da interferire con l'analita al momento dell'atomizzazione, provocando una diminuzione dell'assorbanza misurata. Tale diminuzione è probabilmente dovuta alla formazione di composti stabili dell'elemento con i componenti della matrice e del modificante stesso.

Una volta ottimizzate le temperature di incenerimento e di atomizzazione è necessario verificare la linearità della risposta costruendo una curva di calibrazione. È opportuno verificare la sensibilità dell'elemento (slope della retta) in assenza (soluzioni standard) ed in presenza (campione) di matrice.

L'accuratezza del metodo può essere verificata con materiali certificati costituiti dalla matrice in esame o da una molto simile. Qualora ciò non fosse possibile, si può utilizzare il metodo delle aggiunte standard (MAS). Questo metodo, che potenzialmente consente di superare il problema delle interferenze della matrice sulla sensibilità, richiede che siano soddisfatte alcune condizioni, ovvero l'assoluta necessità che tali interferenze siano proporzionalmente costanti nel range di concentrazione utilizzato e che la risposta dell'analita endogeno sia la stessa di quello esogeno.

Quest'ultima condizione, che si verifica frequentemente nella tecnica a fiamma, non è così scontata nella fornace. Un utile accorgimento può essere quello di verificare che i risultati ottenuti applicando il MAS con diversi rapporti di diluizione del campione non forniscano risultati statisticamente differenti. Bisogna inoltre ricordare che il MAS corregge le interferenze

di tipo moltiplicativo e non quelle di tipo additivo (le più importanti sono quelle spettrali, ma non sono trascurabili anche errori dovuti a contaminazione, perdite di analita durante il pretrattamento del campione, errori nella misura di piccoli volumi ecc.).

Relativamente al numero ed alla entità delle aggiunte, l'indicazione più comune suggerisce di operare in modo che quella più bassa non sia tanto piccola da essere indistinguibile dal campione e che la più alta sia sempre entro il range di linearità. Per quanto riguarda il numero delle aggiunte, anche se alcune trattazioni statistiche riportano che la seconda aggiunta può non avere un effetto benefico sulla precisione del risultato, essa costituisce comunque una forma di controllo di qualità interno ed un controllo della linearità del range analitico. In merito alla loro entità può essere conveniente che la concentrazione della prima aggiunta sia paragonabile a quella del campione, mentre la seconda ammonti almeno al doppio di essa. La concentrazione del campione viene solitamente ricavata per estrapolazione usando una regressione lineare tra i segnali di assorbanza e le concentrazioni di analita aggiunto, imponendo come primo punto quello individuato dalle coordinate: assorbanza del campione, concentrazione zero.

L'utilizzo del MAS come sistema di quantificazione routinario, oltre ad essere più laborioso, quasi sempre produce dei risultati caratterizzati da migliore accuratezza ma da minore precisione, in quanto tale sistema utilizza una estrapolazione per il calcolo della concentrazione e quindi l'imprecisione è maggiore; sarebbe quindi opportuno che il metodo delle aggiunte venga utilizzato unicamente come mezzo di verifica di un metodo di analisi.

Da quanto esposto si può evincere come la complessità della matrice influenzi la qualità dei risultati analitici, e di quante siano le scelte e le accortezze che si debbono attuare per ottenere analisi affidabili.

ANALISI MULTIELEMENTARE TRAMITE LA SPETTROMETRIA DI EMISSIONE ATOMICA A PLASMA: ESEMPI APPLICATIVI

Oreste Senofonte, Nicola Violante

Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

L'incremento delle attività antropiche, specialmente negli ultimi decenni, ha suscitato negli organismi pubblici preposti alla tutela della salute ambientale e della popolazione, un sempre maggiore interesse nella valutazione del loro impatto al fine di poter intraprendere eventuali azioni correttive. La contaminazione chimica nei vari comparti ambientali ha reso necessaria una evoluzione progressiva delle strategie di controllo e di intervento. Questa necessità si manifesta soprattutto quando si studiano sistemi complessi che necessitano di risorse tecnico-scientifiche tali da poter evidenziare tutti gli aspetti relativi alla contaminazione (trasporto, diffusione e destino ambientale) di un dato ecosistema.

In linea generale, la comunità scientifica riconosce sempre più l'importanza dell'adozione dei Principi di Buona Pratica di Laboratorio (BPL) e delle procedure per l'Assicurazione e Controllo di Qualità (AQ e CQ) nella conduzione di studi sperimentali per l'ottenimento di dati validi, affidabili e comparabili.

In questo contesto, le attività tipiche di un laboratorio moderno di chimica analitica vanno predisposte, organizzate e condotte in conformità ad una serie di indicazioni, raccomandazioni e regole che la comunità scientifica è andata sviluppando con sempre maggiore consapevolezza nel corso degli anni. Tutto ciò oggi si estrinseca in una serie di norme che vanno concretamente e decisamente incorporate nel lavoro quotidiano al fine di rendere valide e credibili le informazioni sperimentali prodotte dal laboratorio ed evitare inutili dispendi di tempo, energie e risorse che, peraltro, possono condurre ad azioni errate e dannose, con conseguenze negative anche di vasta portata e a volte non del tutto reversibili.

Emerge quindi con chiarezza che l'adozione di principi e norme idonei alla conservazione dell'informazione analitica sono tanto più essenziali quanto più bassi sono i livelli di concentrazione degli analiti riscontrabili nelle matrici ambientali, biologiche ed alimentari. Pertanto, l'eliminazione o il contenimento degli errori sistematici lungo tutta la catena analitica (campionamento, conservazione, trattamento e tecnica strumentale) sono certamente tra gli obiettivi principali di un sistema di assicurazione di qualità che garantisca la conservazione e l'affidabilità dell'informazione.

Campionamento e conservazione dei campioni

L'influenza degli errori di campionamento può essere di fondamentale importanza per i risultati finali di uno studio. È assiomatico, infatti, che la qualità della singola analisi non può essere migliore della qualità del singolo prelievo. L'obiettivo è quindi quello di raccogliere uno o più campioni, di dimensioni contenute, che siano massimamente rappresentativi dell'area di

interesse e che eventuali sottocampioni siano comunque rappresentativi del campione originale. Inoltre, le aliquote campionate dovranno essere caratterizzate sia da diversità spaziale che da variabilità temporale.

La conservazione del campione è, a sua volta, una fase molto delicata della procedura analitica e deve essere adeguata dal momento della campionatura al momento dell'analisi. Ad esempio, il contatto tra un campione liquido ed il materiale del suo contenitore può provocare tanto il rilascio di elementi dalla superficie della bottiglia che l'eventuale adsorbimento sulle pareti della stessa di analiti provenienti dalla soluzione. Le superfici in vetro a valori di pH intorno alla neutralità agiscono come dei veri e propri scambiatori cationici grazie alla carica negativa presente sui gruppi silicei del vetro. Generalmente, i recipienti utilizzati per la conservazione di campioni d'acqua sono in vetro borosilicato o in materiale polimerico, come Teflon[®], policarbonato, polietilene o polipropilene. Il loro utilizzo può innescare processi di contaminazione dovuti sia alla presenza nel materiale di metalli utilizzati nei processi produttivi (catalizzatori) che all'evaporazione del solvente, con l'inevitabile cambiamento delle concentrazione degli analiti. Inoltre, la scelta di uno specifico materiale è dettata anche dalle tecniche strumentali che si dovranno utilizzare per l'analisi. In ogni caso, è necessario che i contenitori prescelti siano decontaminati prima dell'utilizzo. Ciò è generalmente realizzato attraverso un prolungato trattamento con HNO₃ diluito seguito da ripetuti risciacqui con H₂O deionizzata e verifica finale del rilascio di eventuali contaminanti.

Trattamento e manipolazione del campione

Dal momento che normalmente i campioni vengono analizzati in luoghi distanti dal punto di raccolta, è fondamentale adottare precauzioni idonee a garantirne la stabilità chimica e biologica. Infatti, molti campioni, necessitano prima dell'analisi di trattamenti che possono costituire a loro volta cause di errori e/o di contaminazioni rilevanti. La stabilizzazione, per esempio di campioni di acqua, può essere conseguita attraverso l'aggiunta di acidi minerali (HNO₃, HCl) subito dopo il prelievo. L'aggiunta dell'acido blocca ogni attività biologica e allo stesso tempo impedisce l'adsorbimento degli analiti sulle pareti del contenitore. In questo modo fenomeni come l'idrolisi o la precipitazione sono fortemente inibiti. D'altro canto, dovranno essere valutate le alterazioni apportate da ogni singolo trattamento alle forme chimiche degli elementi presenti nel campione originario, soprattutto per studi di speciazione chimica. Inoltre, le condizioni di conservazione dipendono ampiamente dagli elementi da quantificare; ad esempio, quelle che vengono applicate per alcuni metalli pesanti sono poco opportune per altri, come nel caso del Hg dove le migliori condizioni di conservazione si realizzano con aggiunta di HCl. Per campioni ambientali (terreni, sedimenti, ecc.) o biologici (sangue, siero, urina, ecc.) oltre a ricorrere a procedure di conservazione particolari è necessario mineralizzare i campioni attraverso procedure di digestione acida in forno a microonde al fine di distruggere la matrice e portare in soluzione tutti gli analiti presenti.

Va da sé che le procedure di campionamento e di trattamento devono essere realizzate in funzione dei livelli attesi per i vari analiti. Da questo punto di vista, va ricordato che ampi intervalli di variabilità possono essere riscontrati per elementi in traccia in qualunque tipologia di matrice.

Tecniche analitiche di quantificazione

Da quanto detto in precedenza, appare evidente che l'identificazione e la determinazione quantitativa di elementi inorganici in matrici ambientali, biologiche ed alimentari, possono

essere di difficile esecuzione specialmente se si considerano elementi che si trovano a livelli di concentrazione in traccia ($\mu\text{g ml}^{-1}$) o ultratraccia ($\mu\text{g l}^{-1}$). In generale, le tecniche analitiche devono possedere due requisiti fondamentali:

- adeguato limite di rivelabilità;
- possibilità di essere impiegate correttamente dalla maggior parte dei laboratori.

Attualmente, le tecniche che posseggono i requisiti sopra citati sono: la spettrometria di emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente (ICP-AES, *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*), la spettrometria a plasma-massa (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*), la spettroscopia di assorbimento atomico (AAS, *Atomic Absorption Spectroscopy*) e la voltammetria di ridissoluzione anodica (ASV, *Anodic Stripping Voltammetry*).

Tra le tecniche analitiche la spettroscopia atomica di emissione e di assorbimento può essere considerata tra le più antiche tecniche analitiche strumentali. La spettroscopia atomica, senza ombra di dubbio, è uno dei campi della fisica che ha avuto nell'ultimo cinquantennio un notevolissimo sviluppo. Aldilà delle diversificazioni possibili, entrambe si basano sul principio basilare dell'assorbimento o dell'emissione di radiazioni elettromagnetiche dalle quali si può risalire sia all'atomo che le ha emesse sia alla sua concentrazione. L'assorbimento atomico, nelle sue varie diversificazioni, è una tecnica molto diffusa e di larghissimo impiego grazie soprattutto alla facilità d'uso ed al notevole potere di rivelabilità. Vantaggi che sino a qualche tempo fa avevano relegato le tecniche di emissione, quali arco, scintilla, raggi X, (XR, X-Ray), scarica luminescente (GD, Glow Discharge), catodo cavo (HCD, Hollow Cathode Discharge) ad un ruolo secondario nelle determinazioni analitiche.

Negli ultimi quindici anni la spettroscopia di emissione, attraverso la messa a punto di nuove sorgenti analitiche come il plasma accoppiato induttivamente (ICP), ha compiuto dei notevoli passi in avanti rispetto all'assorbimento atomico sia dal punto di vista del potere di rivelabilità che della facilità d'uso. Le proprietà fondamentali di una sorgente analitica ideale possono essere riassunte come segue:

- applicabilità a tutti gli stati della materia;
- capacità di eccitare in modo efficace tutti gli elementi;
- libertà da interferenze chimiche, spettrali, ecc.;
- facilità di utilizzazione, elevata precisione;
- grande potere di rivelabilità.

Il rispetto contemporaneo di tali requisiti, da parte di una sorgente emissiva, probabilmente è una chimera, pur se il plasma accoppiato induttivamente è sicuramente ritenuta la migliore approssimazione a tale idealità.

Il termine "plasma" è stato introdotto nel 1920 da Langmuir e Tonks per designare un gas ionizzato elettricamente neutro. Un gas si classifica ionizzato a seconda del grado di ionizzazione (α), ossia:

$$\alpha = n/n_0 + n$$

dove n è la densità degli atomi ionizzati, n_0 la densità degli atomi neutri. Un gas è debolmente ionizzato quando ha un $\alpha < 10^4$, mentre è fortemente ionizzato con un $\alpha > 10^4$.

Essenzialmente, un plasma può essere prodotto elettricamente o termicamente. I diversi tipi di plasma possono essere ricondotti a due grandi categorie:

- plasma a bassa pressione: $0,1 \div 10$ torr, plasma freddo, come le scariche luminescenti, dove si verifica un basso numero di collisioni e l'equilibrio termodinamico non è mantenuto;
- plasma a pressione atmosferica: plasma caldo, dove il numero delle collisioni elevato favorisce l'equilibrio termodinamico, almeno localmente, tra differenti particelle. In tali condizioni la densità elettronica è $n_e \cong 10^{14} - 10^{16} \text{ cm}^{-3}$ e la temperatura di 10^4 K .

La sorgente a plasma consiste in una torcia formata da tre tubi concentrici di quarzo nei quali viene fatto fluire un gas inerte (Ar, He, N₂) e da una spirale di induzione di Cu esterna che avvolge i tre tubi. Alla spirale è collegato un generatore a radiofrequenza che ha lo scopo di generare all'interno della torcia un campo magnetico oscillante (generalmente tra i 20 e i 60 MHz) le cui linee di forza sono parallele all'asse della torcia stessa. La Figura 1 riporta in modo schematico una sorgente a plasma induttivo.

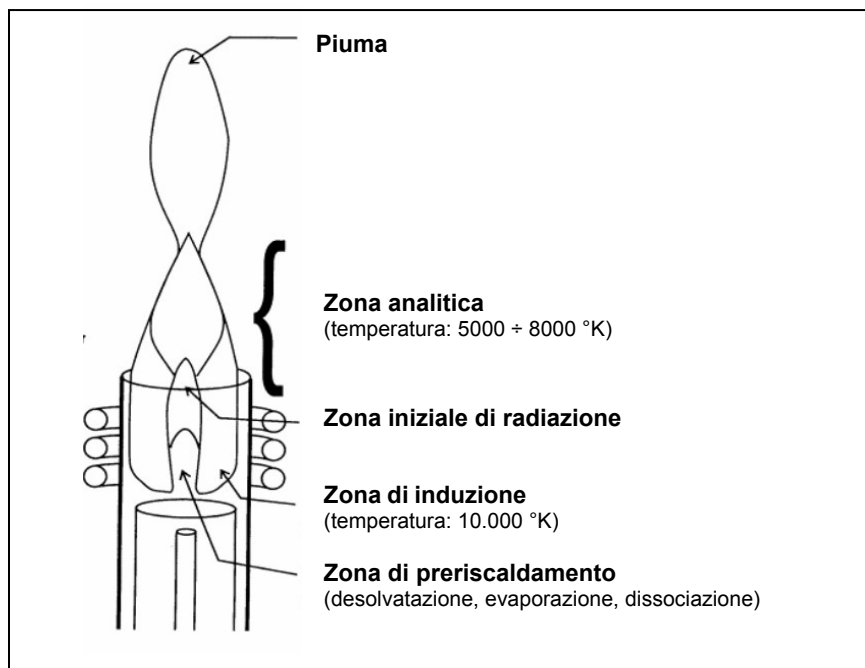


Figura 1. Sorgente di emissione a plasma induttivo

L'innesco del plasma avviene attraverso l'azione del campo elettromagnetico sugli elettroni, preventivamente seminati, i quali subendo una accelerazione notevole collidono con gli atomi neutri del gas. Le collisioni fanno aumentare notevolmente il numero di elettroni che sono costretti a percorrere traiettorie circolari secondo le linee del campo magnetico con immediato aumento della temperatura, per effetto joule, a causa della resistenza incontrata dagli elettroni lungo il loro cammino Figura 2. Il plasma così innescato è stabile e può autosostenersi.

Se fosse presente solo questo fenomeno nella formazione del plasma, questo avrebbe una forma sferica (Figura 3A) inadatta agli scopi analitici in quanto il campione nebulizzato si troverebbe distribuito su tutto il volume dello sferoide, con limitata emissione per unità di superficie e conseguente instabilità dovuta all'alterazione delle proprietà elettriche al momento dell'introduzione del campione. Invece, grazie a più fenomeni concomitanti, come l'elevata radiofrequenza e la particolare configurazione della torcia, fanno sì che il plasma abbia sembianze toroidali (Figura 3B). La configurazione ottenuta ci permette di far passare l'aerosol al centro del toroide con aumento della concentrazione delle particelle per unità di volume e con il conseguente aumento dell'emissione. Come abbiamo detto in precedenza, nel plasma induttivo si ottengono temperature elevatissime che si aggirano intorno alla decina di migliaia di °K. La Figura 4 riporta le temperature riscontrabili in un plasma ad induzione.

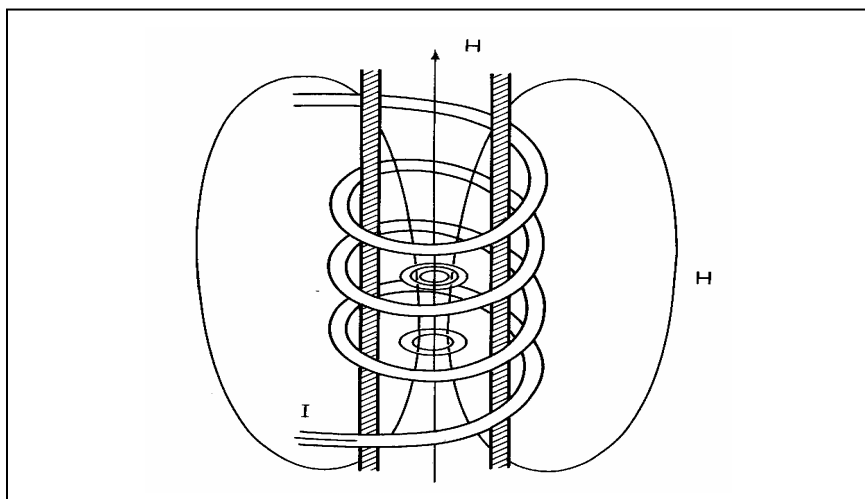


Figura 2. Spirale di induzione e campo magnetico indotto (H) da un campo elettrico (I)

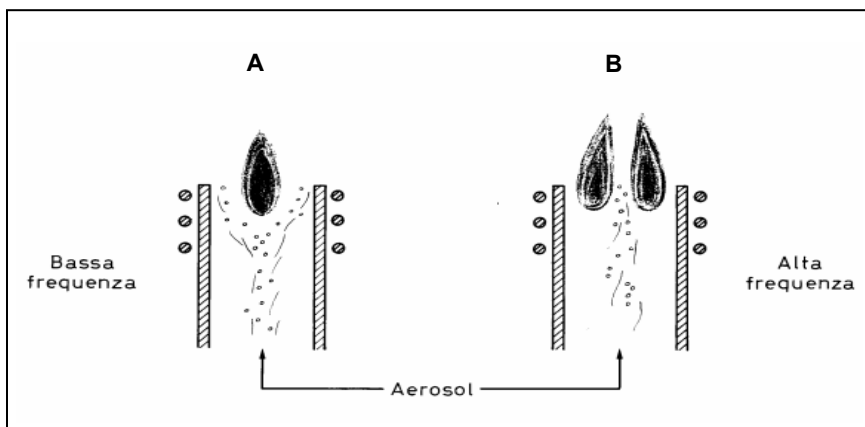


Figura 3. Forma geometrica del plasma in funzione della frequenza

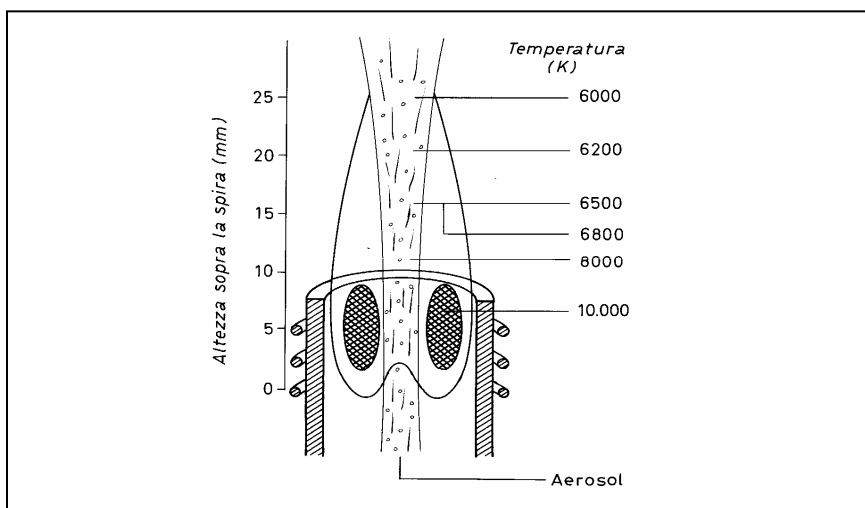


Figura 4. Distribuzione della temperatura in un plasma ad induzione

Nella Figura 5 è riportato il sistema di campionamento dell'ICP. L'introduzione del campione è il punto critico dell'ICP in quanto il plasma non tollera la presenza di particelle con dimensioni $>10\text{ }\mu\text{m}$. Un nebulizzatore è collegato ad una camera di espansione che ha il compito di separare le particelle più leggere, che vanno in torcia, da quelle più pesanti che vanno verso il drenaggio.

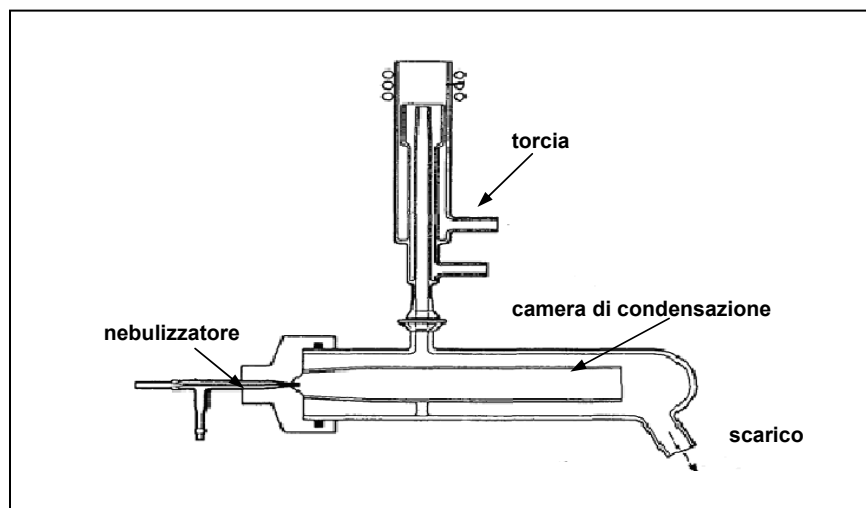


Figura 5. Sistema di campionamento di uno spettrometro a plasma

In questo modo si calcola che solo il 5% del campione (particelle con diametro di ca. $10\text{ }\mu\text{m}$) arriva in torcia, con l'inevitabile ripercussione sui limiti di rivelabilità. Principalmente possiamo distinguere due categorie di nebulizzatori: pneumatici ed ultrasonici. I primi sono certamente i più diffusi, e possono essere a flusso concentrico o incrociato, per il loro funzionamento richiedono un'alta velocità del gas di trasporto (1 l min^{-1}). A tali velocità, l'effetto vortice che si crea sulla punta del nebulizzatore assicura la formazione dell'aerosol. I nebulizzatori concentrici di tipo Meinhard (Figura 6) offrono, rispetto a quelli a flusso incrociato, una maggiore stabilità dimensionale (particelle di ca. $100\text{ }\mu\text{m}$) ed una sensibilità superiore. Per contro tendono, visti gli orifizi estremamente ridotti, all'occlusione quando vengono aspirate soluzioni molto saline o complesse.

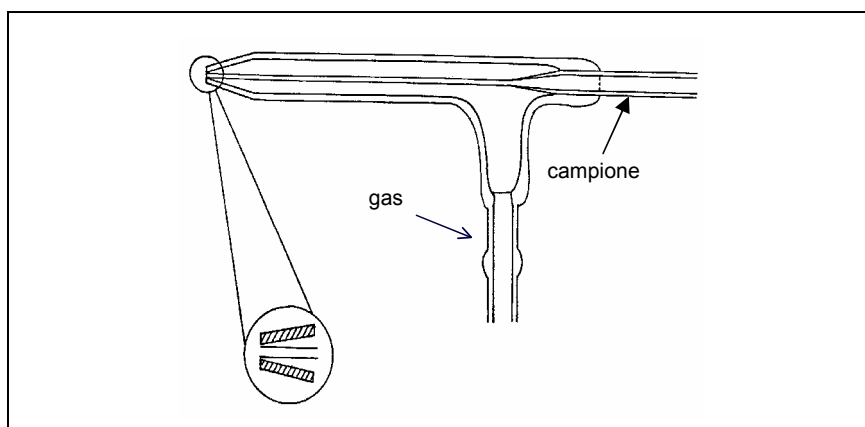


Figura 6. Schema di un nebulizzatore pneumatico di tipo Meinhard

I nebulizzatori ad ultrasuoni (US) sono certamente una valida alternativa a quelli pneumatici (Figura 7). Il trasduttore ultrasonico riesce a formare un nebulizzato assai fine con una efficienza che si aggira intorno al 75%.

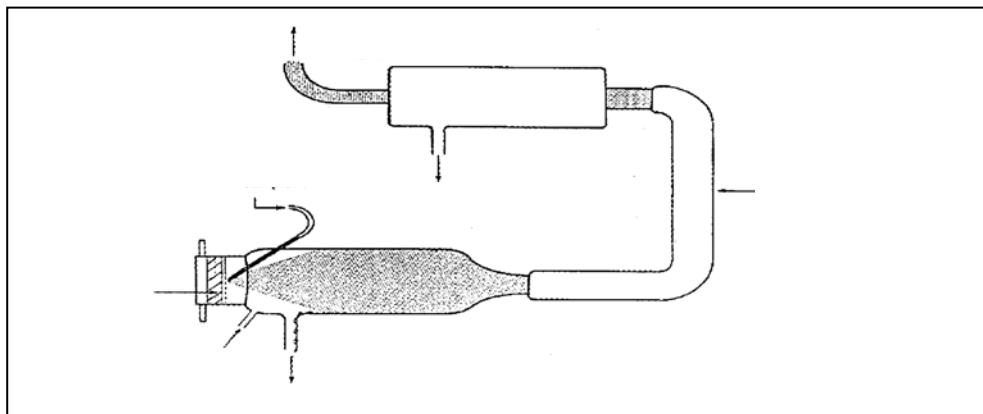


Figura 7. Sistema di nebulizzatore ad ultrasuoni

L'aerosol così formato viene fatto passare attraverso un sistema di desolvatazione, mediante un riscaldamento intorno ai 140 °C e un successivo raffreddamento a temperature prossime a 0 °C. In questo modo si ottiene un vapore secco, arricchito di analiti, che a sua volta viene convogliato nella torcia. Con tale sistema i limiti di rivelabilità risultano inferiori, anche di un ordine di grandezza, rispetto a quelli ottenibili con i nebulizzatori pneumatici (Tabella 1).

Tabella 1. Confronto dei limiti di rivelabilità (ng l⁻¹) tra il nebulizzatore ad ultrasuoni (USN) e quello pneumatico (Meinhard) in soluzione acquosa

Elemento	λ (nm)	USN	Meinhard
Ag	328,1	0,6	1,9
As	193,8	7,6	17
Sb	206,8	12	45
Cd	214,4	0,3	1,5
Co	228,6	0,6	4,8
Pb	220,3	4,7	22
Ni	231,6	1,9	7,2
Se	196,1	4,3	45

Gli spettrometri ICP attualmente sono in versione simultanea e sequenziale. A scopo di indagine preliminare, di ricerca o anche nel caso di analisi sistematicamente diversificate, gli spettrometri sequenziali sono senz'altro da preferire per la loro flessibilità e versatilità, permettendo in tal modo di risolvere nella maniera migliore il problema delle interferenze spettrali. Gli spettrometri simultanei garantiscono, invece, una velocità di analisi assai superiore con un consumo minimo di campione, risultando perciò del tutto adatti ad eseguire programmi analitici ben definiti e di routine. I due tipi di apparecchiature sono schematizzate nelle Figure 8 e 9.

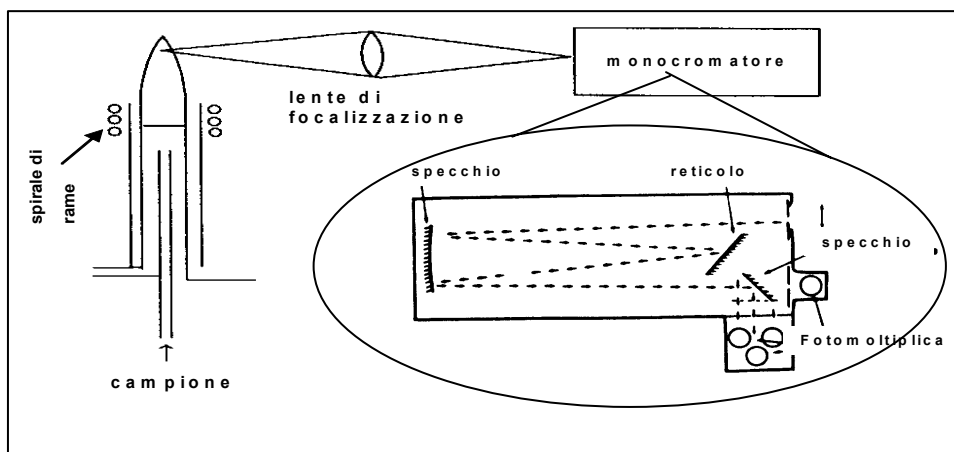


Figura 8. Schema di uno spettrometro a plasma di tipo sequenziale

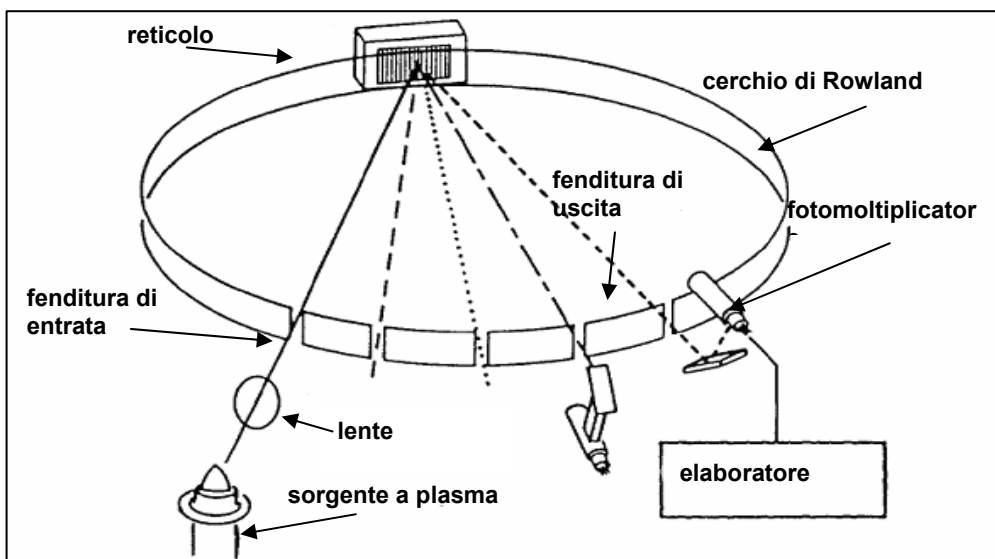
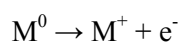


Figura 9. Spettrometro ICP di tipo simultaneo simultaneo

La spettrometria atomica, in generale, risente di interferenze di vari tipo tra i quali l'effetto della matrice ossia della non completa disponibilità in forma libera degli atomi degli analiti. È frequente che componenti presenti nella matrice si combinino con gli atomi degli analiti con formazione di composti refrattari od ossidi. Tali interferenze nella spettrometria ICP sono assai limitate viste le elevatissime temperature raggiungibili in un plasma che favoriscono la dissociazione e l'atomizzazione del campione. Un ulteriore effetto delle alte temperature, è quello dell'aumento in modo considerevole della densità elettronica a causa di elementi facilmente ionizzabili (K, Na, Mg, ecc.) che tendono a spostare l'equilibrio tra atomi neutri e ionizzati:



Risulta chiaro che nel plasma tale fenomeno non sia presente ma l'elevata temperatura di esercizio fa sì che la frazione degli atomi ionizzati dell'analita sia notevole e che l'influenza della densità elettronica risulti trascurabile.

Le interferenze di tipo spettrale, d'altro canto, costituiscono fattori importanti nella determinazione analitica ICP in quanto le condizioni di eccitazione generano una moltitudine di righe spettrali che possono coprire le righe analitiche prescelte. Tuttavia, se non è possibile risolvere l'interferenza tra due righe, la numerosità stessa degli spettri permetterà la scelta di righe alternative non interferite dell'analita, ugualmente idonee all'analisi. A tale riguardo, sono stati realizzati appositi atlanti spettrali per semplificare la scelta delle migliori righe analitiche a seconda del tipo di campione in esame.

La determinazione quantitativa di un analita, come per ogni altra tecnica spettroscopica, richiede la calibrazione preliminare con soluzioni standard a contenuto noto. Le curve di calibrazione con il plasma risultano lineari per 4-6 ordini di grandezza a partire dal valore del limite di rivelabilità (*Limits of Detection*, LOD). Nella Tabella 2 sono riportati i LOD di alcune tecniche spettroscopiche e della voltammetria di ridissoluzione anodica.

Tabella 2. Confronto dei limiti di rivelabilità ($\mu\text{g l}^{-1}$) di alcune tecniche strumentali

Elemento	ICP-AES	ICP-MS	F-AAS	ETA-AAS	ASV
Ag	2	0,02	2	0,05	-
Al	2	0,4	30	0,4	-
As	60	0,02	300	0,4	0,2
B	1	0,2	500	50	-
Ba	0,1	0,06	20	0,9	-
Be	0,2	0,02	1	0,04	-
Bi	50	0,04	50	0,45	-
Ca	0,05	5	1	0,03	-
Cd	0,2	0,04	2	0,01	3×10^{-4}
Co	7	0,03	5	0,2	1×10^{-3}
Cr	6	0,1	6	0,1	2×10^{-2}
Cu	2	0,2	3	0,3	4×10^{-3}
Fe	2	1	6	0,1	3×10^{-2}
Hg	50	0,01	200	8	2×10^{-2}
K	10	10	-	-	-
Mg	0,1	0,1	0,3	0,01	-
Mn	0,5	0,1	2	0,01	1
Na	1	0,2	0,2	0,005	-
Ni	6	0,03	10	0,3	1×10^{-3}
Pb	50	0,03	10	0,3	1×10^{-3}
Pt	20	0,08	100	4	-
S	20	500	-	-	-
Sb	60	0,02	40	0,5	-
Se	60	0,5	500	1	5×10^{-2}
Si	5	10	250	0,8	-
Sn	50	0,03	100	0,5	1×10^{-1}
Sr	0,02	0,02	2	0,1	-
Te	20	0,04	30	0,5	-
Ti	16	0,06	80	0,8	-
Zn	0,8	0,1	1	0,01	2×10^{-2}

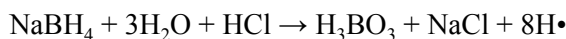
Tuttavia, è utile ricordare che l'ICP-AES, a differenza di FAAS, ETA-AAS e ASV, è una tecnica multielementare ed è applicabile in un ampio intervallo dinamico di concentrazione per le più svariate matrici ambientali o biologiche.

Combinazione della sorgente a plasma con altre tecniche strumentali

La flessibilità e le potenzialità della spettrometria ad ICP sono tali che può essere accoppiata con altre tecniche strumentali con notevoli vantaggi nell'esecuzione dell'analisi. Con tali combinazioni è possibile non solo migliorare i limiti di rivelabilità di alcuni elementi poco sensibili (As, Se, ecc.) ma anche effettuare analisi di speciazione chimica ($\text{Cr}^{+3}/\text{Cr}^{+6}$) o di determinazioni analitiche su matrici solide. Gli esempi più comuni di tecniche combinate con la sorgente al plasma possono essere riassunti nel modo seguente:

- idruri volatili (*Hydride Generation*, HG) e plasma (HG – ICP-AES);
- fornello di grafite e plasma (ETA-AAS – ICP-AES);
- analisi ad iniezione di flusso (*Flow Injection Analysis*, FIA) e plasma (FIA – ICP-AES);
- cromatografia liquida ad alta efficienza (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) e plasma (HPLC – ICP-AES);
- laser e plasma (LASER – ICP-AES).

La combinazione dell'ICP con un separatore gas-liquido risulta molto efficace soprattutto per alcuni elementi che hanno una scarsa sensibilità con la sorgente a plasma. Con tale sistema, come riportato in Figura 10, si sfrutta la capacità di un elemento a trasformarsi in idruro volatile attraverso una reazione con un riducente come il NaBH_4 a pH controllato secondo le reazioni:



e

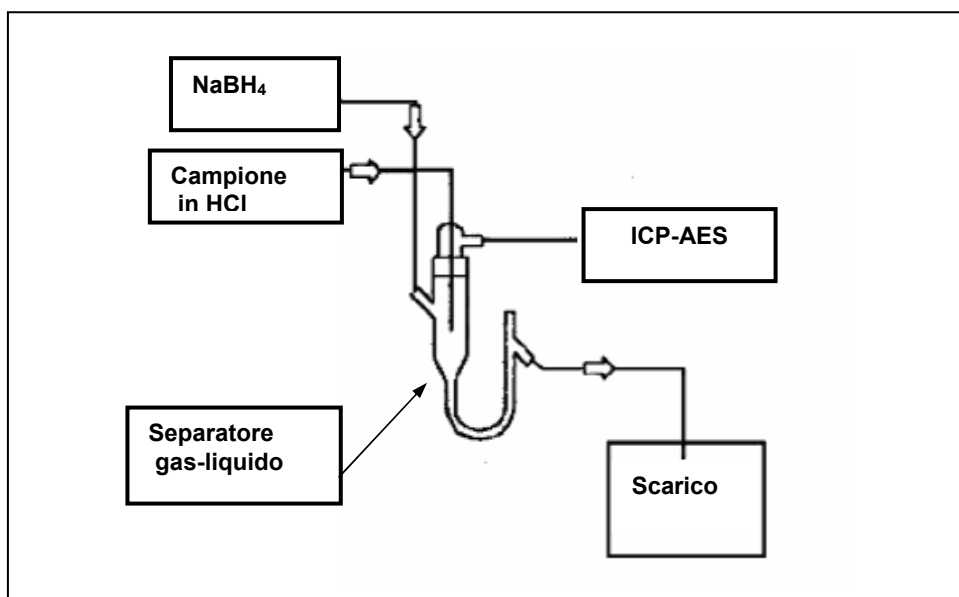
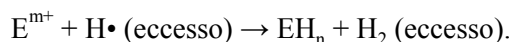


Figura 10. Combinazione di un separatore gas-liquido con ICP-AES

Nel separatore che è collegato direttamente alla torcia, avviene la reazione e l'idruro volatile che si forma va direttamente al plasma. In questo modo tutto l'elemento presente in soluzione

può essere determinato. Con tale tecnica combinata si ottengono dei limiti di rivelabilità molto inferiori, anche di più di un ordine di grandezza, rispetto a quelli ottenibili con l'ICP. Nella Tabella 3 sono riportati i LOD con entrambe le tecniche.

Tabella 3. Confronto dei limiti di rivelabilità ($\mu\text{g l}^{-1}$)

Elemento	HG – ICP	ICP
As	1	60
Bi	1	50
Hg	0,1	50
Pb	5	50
Sb	0,1	60
Se	1	60

Con altre combinazioni di tecniche come l'accoppiamento fornello di grafite ed plasma (ETAS – ICP) o accoppiamento Laser – ICP si possono eseguire anche analisi su campioni solidi senza che si debba ricorrere alla dissoluzione acida, passaggio non privo di rischio di eventuali contaminazioni esterne. Nelle Figure 11 e 12 sono schematizzati gli accoppiamenti dell'ETAS – ICP e Laser – ICP.

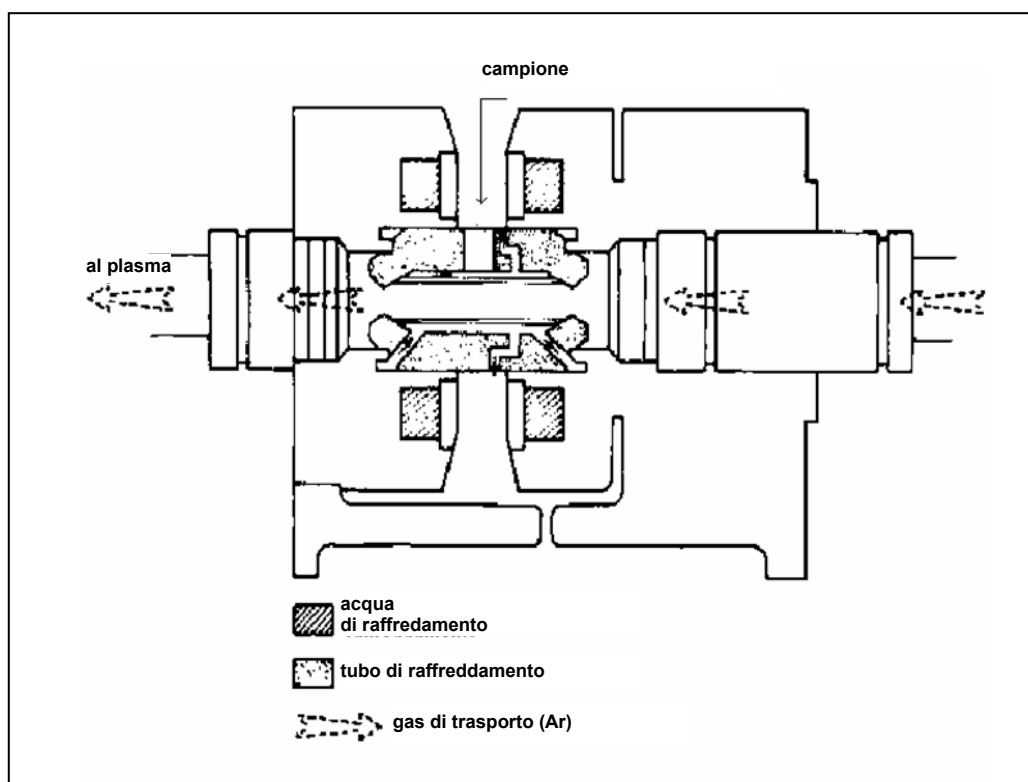


Figura 11. Fornetto di grafite modificato per connessione all'ICP

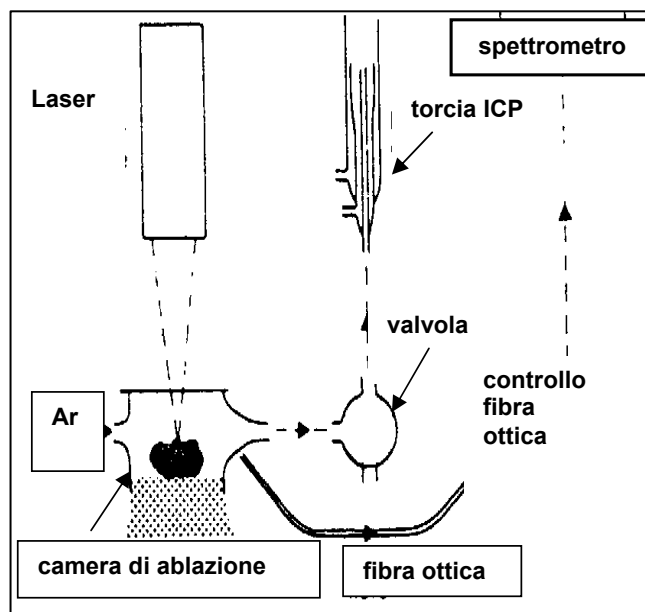


Figura 12. Schema abbinamento Laser e spettrometro a plasma (ICP-AES)

Tabella 4. Confronto dei limiti di rivelabilità ($\mu\text{g l}^{-1}$)

Elemento	LASER	Nebulizzatore Pneumatico
Cr	15	2
Cu	20	1,5
Mn	80	2
Mo	60	4,5
Ni	70	1,0
P	10	35
V	10	1,5
Cr	15	2

Tecniche di preconcentrazione, come la FIA, possono aiutare nel superamento delle scarse capacità di rivelazione del ICP-AES. Il principio è quello del passaggio della soluzione da analizzare attraverso una colonna in cui è presente una resina a scambio ionico (quale, ad esempio la resina CHELEX[®] 100, suprapur, Merck, Germania) a pH controllato (Figura 13). In un momento successivo, in controcorrente, si fa passare una quantità minima di acido (HNO_3), l'eluato risultante viene inviato al plasma. In questo modo si possono ottenere fattori di arricchimento anche di 50 volte.

Un'ulteriore tecnica combinata con la sorgente a plasma è la spettrometria a plasma induttivo con rivelatore di massa (ICP-MS). Con questa combinazione vengono sfruttate le proprietà rilevanti del plasma di generare elevate popolazioni di ioni positivi e quella dell'altissima sensibilità di uno spettrometro di massa (Figura 14).

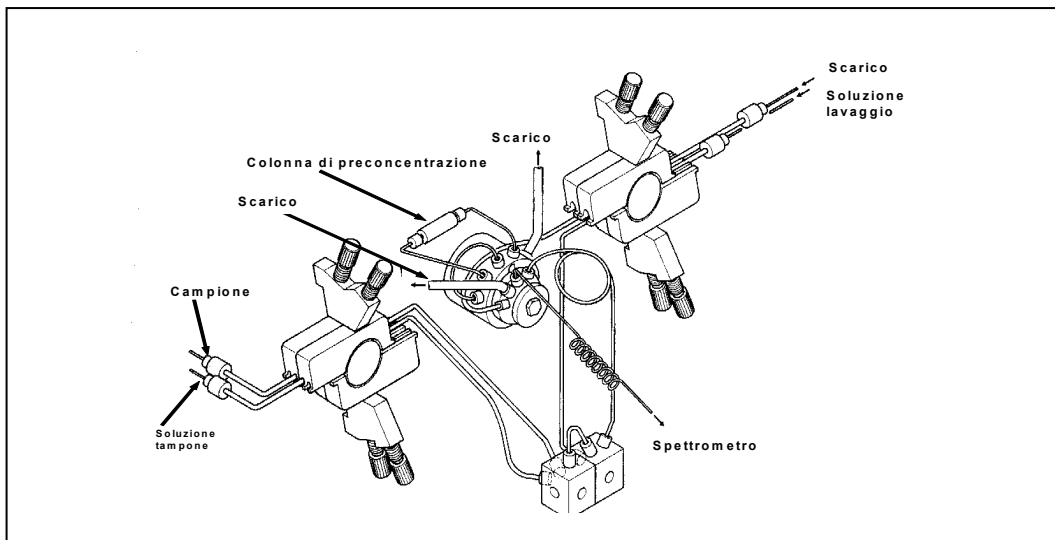


Figura 13. Schema di analisi ad iniezione di flusso (FIA)

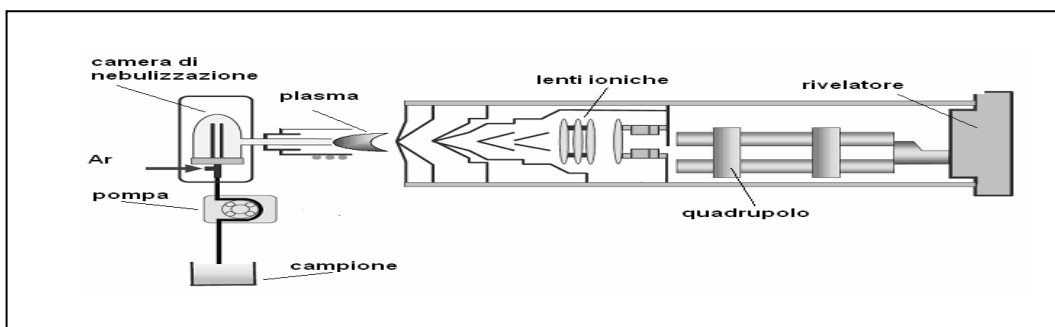


Figura 14. Schema di un plasma induttivo con rivelatore di massa quadrupolare (Q-ICP-MS)

In questo caso la torcia ICP funge da sorgente di ioni a pressione atmosferica, che poi vengono introdotti attraverso opportuni orifizi in uno spettrometro di massa a quadrupolo o a settore magnetico. Questa combinazione oltre ad esibire dei limiti di rivelabilità eccellenti, generalmente pari ad uno o due ordini di grandezza al di sotto dei $\mu\text{g l}^{-1}$, offre la possibilità di effettuare analisi di miscele isotopiche con risultati estremamente accurati senza dover ricorrere a tecniche più sofisticate.

Applicazioni analitiche dell' ICP-AES

Come si è detto in precedenza una limitazione tipica di questa tecnica è dovuta alla non adeguata capacità di rivelazione. Questo ostacolo, in alcuni casi, può essere superato accoppiando al plasma un sistema di analisi ad iniezione di flusso (FIA). Un esempio di tale applicazione è la determinazione di alcuni elementi in acqua di mare. Infatti, la salinità dell'acqua, i bassi livelli di concentrazione di elementi come As, Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb

e Zn, nonché i limiti di rivelabilità della tecnica non permettono di effettuare misure dirette. In tali determinazioni uno dei fattori preliminari fondamentali da considerare è la necessità di purificare tutti i reagenti che dovranno essere impiegati. Nella Tabella 5 sono riportati i procedimenti essenziali per la purificazione dei reagenti.

Tabella 5. Reagenti e trattamenti di purificazione

Reagente	Processo	Apparato
HNO ₃ (suprapur, Merck, Germania)	distillazione a pressione ridotta	sistema di distillazione DUO-pur (FKV-MILESTONE, Sorisole, Italia)
CH ₃ COONH ₄ (suprapur, Merck, Germania)	chelazione	resina a scambio ionico (Chelex-100®)

Le condizioni operative per il sistema FIA possono essere riassunte come segue:

- attivazione della resina per mezzo di una soluzione tampone basica;
- riempimento e passaggio della soluzione da analizzare;
- eluizione di specie interferenti o non di interesse come per esempio la matrice salina presente nell'acqua di mare;
- eluizione, in contro corrente, degli analiti di interesse con piccole quantità note di acido diluito.

Nella Tabella 6 è riportato uno schema di lavoro e le condizioni operative di un sistema FIA. Nella Tabella 7 sono riportate le determinazioni analitiche di alcuni elementi in acqua oceanica antartica e di un materiale di riferimento certificato in acqua di mare.

Tabella 6. Condizioni operative di un sistema FIA per l'analisi di acqua di mare

Programma	Tempo (s)	Velocità (gpm)	Posizione valvola
Attivazione della resina (a)	100	40	R
Riempimento	300	40	R
Eluizione alcalini (a)	100	40	R
Eluizione elementi (b)	30	20	I
Pulizia (b)	25	50	I

I = iniezione; R = riempimento; a) CH₃COONH₄ 0,025 M, pH = 9,5; b) HNO₃ 2,5 M

Tabella 7. Determinazione di alcuni elementi in acqua antartica e in un materiale di riferimento

Elemento	Acqua antartica (µg l ⁻¹)	Materiale di riferimento CRM NASS-4 (µg l ⁻¹)	
		certificato	trovato
As*	1,76±0,12	1,26±0,09	1,3±0,2
Cd*	0,074±0,006	0,016±0,003	0,017±0,003
Cu	1,42±0,12	0,228±0,011	0,238±0,024
Fe	0,06±0,002	0,105±0,016	0,106±0,012
Mn	0,24±0,01	0,380±0,023	0,396±0,024
Pb*	0,06±0,01	0,013±0,005	0,015±0,006
Zn	0,14±0,01	0,115±0,018	0,117±0,009

* Determinazioni effettuate con ICP-MS

Si può notare l'eccellente rispondenza di risultati, sia in termini di accuratezza che di precisione, che si possono raggiungere con questo tipo di analisi. Attraverso la FIA è possibile, inoltre, effettuare analisi di *speciazione* ovvero l'individuazione dello stato di valenza a cui si trova un elemento in una matrice oppure su quale frazione di composti biologici è legato. L'interesse sempre maggiore per questo tipo di analisi è dipesa soprattutto dal fatto che l'azione tossica prodotta da un elemento può dipendere dallo stato di ossidazione dello stesso. Infatti, il cromo è considerato un elemento essenziale per l'uomo, in particolare la specie Cr^{3+} interviene nel metabolismo degli zuccheri, dei grassi e delle proteine, a differenza della specie Cr^{6+} che soprattutto esplica una rilevante azione tossica. Il cromo può entrare nell'ambiente attraverso numerose vie antropogeniche: lavorazioni dell'acciaio, industrie della conciatura, colorifici, ecc. Una volta immesso può raggiungere le falde sotterranee ed attraverso meccanismi ossidativi può trasformarsi nella forma tossica. Quindi, nelle comuni analisi, è importante conoscere oltre al contenuto totale anche la concentrazione delle singole specie.

I metodi tradizionali per la speciazione del Cr inorganico, basati sull'estrazione con solvente, coprecipitazione o separazione elettrochimica, sono tutti metodi certamente validi ma lunghi e laboriosi. Negli ultimi anni si sono sempre più affermate queste tecniche di preconcentrazione selettiva interfacciate ad un sistema di rilevazione come l'ICP. Nella Figura 15 è riportato l'andamento delle intensità riscontrabili delle specie Cr^{3+} e Cr^{6+} con il plasma ottico su una lunghezza d'onda del cromo (Cr(II) 267,7 nm), in funzione del pH, attraverso l'analisi ad iniezione di flusso. Dal grafico si desume chiaramente che a pH 1÷4 la specie trattenuta è il Cr^{3+} a differenza della specie Cr^{6+} che è eluita. Invece, a pH basici 7÷8 il fenomeno si inverte, la specie che eluisce è il Cr^{3+} e quella che viene trattenuta è il Cr^{6+} .

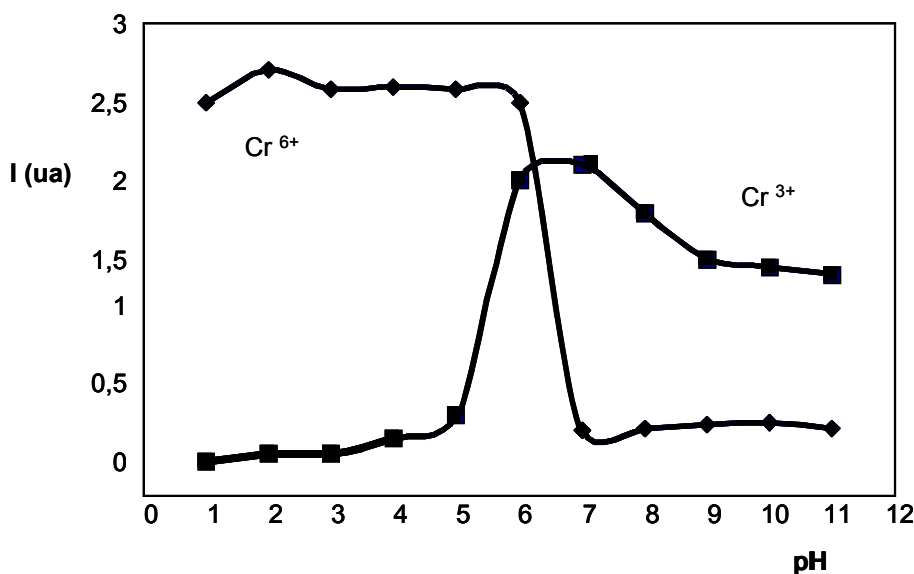


Figura 15. Speciazione Cr^{3+} / Cr^{6+} per mezzo di resina a scambio ionico CHELEX®- 100

Uno dei settori di maggiore applicazione della spettrometria ICP è la determinazione degli elementi in campioni di origine biologica. Un esempio è la determinazione di elementi in traccia in capelli umani. Con tali determinazioni è possibile valutare, sia a scopo diagnostico che preventivo, le esposizioni che possono verificarsi nell'ambiente di vita e di lavoro. Per mezzo di tali analisi è anche possibile accertare lo stato nutrizionale degli individui esposti ed eventuali

fenomeni di intossicazione, nonché diagnosticare effettivi stati patologici. Le ragioni che fanno ritenere utile questo tipo di analisi, in aggiunta a quelle sui fluidi biologici solitamente impiegati in diagnostica clinica (sangue, siero, urine, etc.), sono sostanzialmente due. I capelli riflettono meglio dei fluidi biologici l'accumulo corporeo totale di taluni elementi e la loro concentrazione risulta anche più elevata (di almeno un ordine di grandezza) rispetto a quella riscontrabile nei fluidi stessi. Nella Figura 16 sono riportati gli elementi costituenti l'apparato pilo-sebaceo.

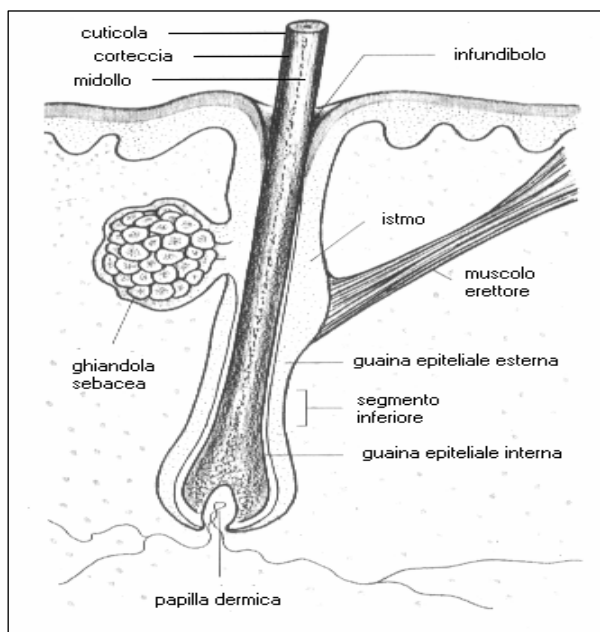


Figura 16. Apparato pilo-sebaceo

Gli elementi chimici possono fissarsi in questo tessuto tramite due meccanismi:

- *esogeni*: presenza di contaminanti ambientali che danno origine a deposizione sulla superficie esterna del capello;
- *endogeni*: elementi presenti nei fluidi circolanti all'interno del follicolo che si legano alla struttura cheratinica in maniera continua durante la crescita del capello. Eventuali variazioni del loro contenuto nei fluidi vengono regolarmente registrate nel verso della lunghezza.

Lo studio di questi fenomeni fornisce preziose informazioni sia sotto il profilo diagnostico che epidemiologico. Per la rimozione delle particelle esogene è necessario eseguire dei lavaggi utilizzando prima miscele di solventi (etere e acetone nel rapporto 1:3) per togliere la pellicola sebacea che ricopre il capello e successivamente una soluzione di EDTA (5%) che rimuove, complessandoli, gli elementi presenti sulla superficie del pelo. Dopo un lavaggio finale con acqua bidistillata i capelli vengono messi in stufa ad essiccare per circa 12 ore. Da prove preliminari si è potuto constatare che i risultati ottenuti, in due serie di analisi sugli stessi campioni lavati e non lavati, non presentavano differenze statisticamente significative salvo per il Ca, Cu, Mg, Ni e Pb, elementi presenti anche nella parte esogena. I campioni una volta essiccati subiscono una digestione acida (HNO_3 , H_2O_2) in forno a microonde e conseguentemente analizzati previa diluizione con acqua bidistillata. L'accuratezza della metodologia è stata valutata, per ogni ciclo di campioni, attraverso l'utilizzo di materiali di riferimento certificati.

Anche l'analisi di materiale geologico come suoli e sedimenti occupa un posto di rilievo nell'ampio e diversificato panorama dei possibili impieghi della spettrometria ICP. Un esempio applicativo è l'analisi multielementare di un sedimento marino. In particolare, il sedimento in questione è un sedimento marino prelevato in Antartide per la preparazione e produzione di un materiale di riferimento certificato per Al, As, Cd, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, nell'ambito delle attività di preparazione e certificazione di materiali di riferimento in matrici ambientali antartiche (Programma Nazionale di Ricerche in Antartide, PNRA). Lo stadio prettamente analitico è stato preceduto da una fase preliminare in cui il materiale raccolto ha subito un trattamento di setacciatura, macinazione ed omogeneizzazione. La dissoluzione del sedimento (circa 100 mg) è avvenuta mediante mineralizzazione acida in forni a microonde attraverso l'utilizzo di acidi forti (HNO_3 , H_3PO_4 , HClO_4 , H_3BO_3 , HF , e HCl). Il campione così dissolto, in maniera completa, è stato sottoposto all'analisi. Nelle Figure 17 e 18 sono riportati alcuni esempi dei grafici a barre relativi ai risultati ottenuti dalle singole tecniche impiegate nella certificazione del sedimento antartico.

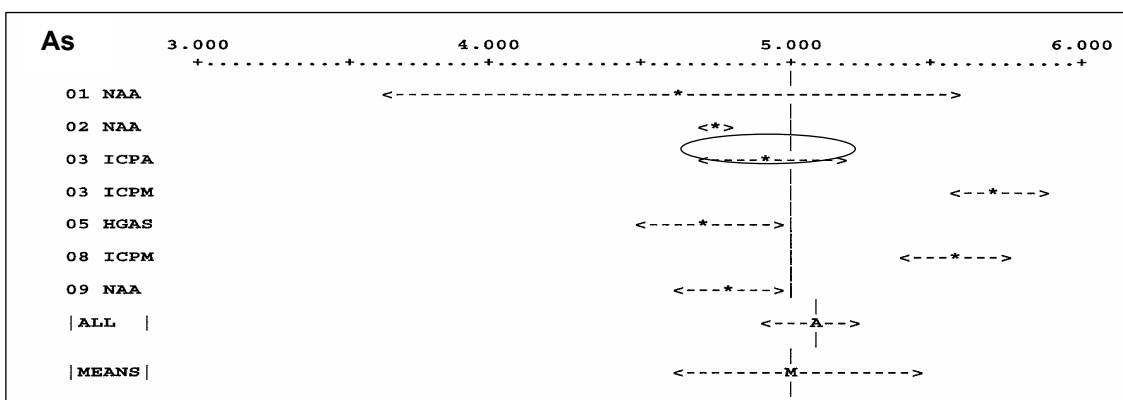


Figura 17. Risultati relativi ad As nella certificazione di un sedimento antartico

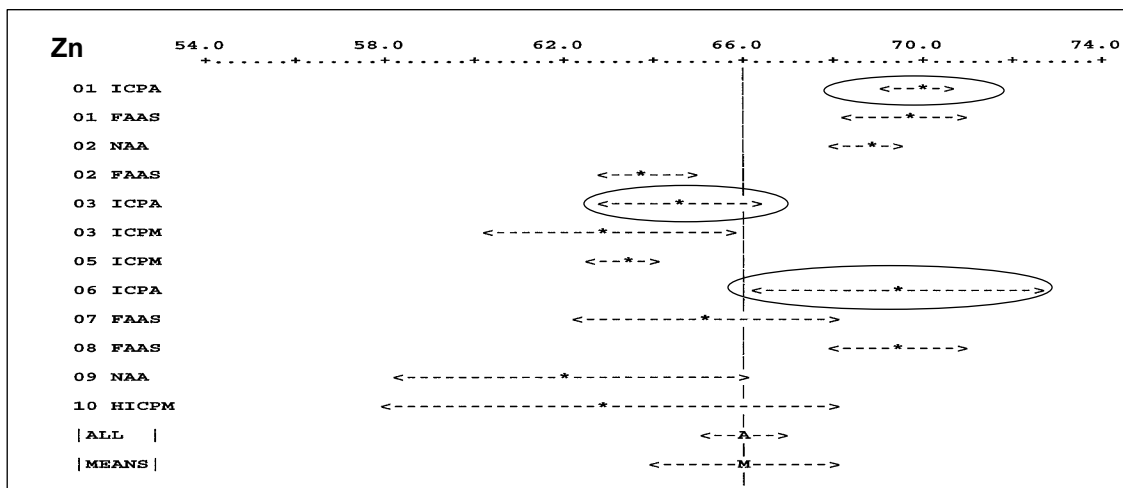


Figura 18. Risultati relativi a Zn nella certificazione di un sedimento antartico

Dall'esame dei due grafici appare chiaro che i risultati ottenuti con l'ICP-AES si collocano, pressoché, in posizioni centrali rispetto all'insieme dei valori forniti mediante tutte le tecniche strumentali impiegate, confermando il buon livello di accuratezza e di precisione che si può raggiungere con questa tecnica.

Conclusioni

Dalle considerazioni fatte, le applicazioni dell'ICP-AES nelle attività tipiche di un laboratorio moderno, sono numerose e possono assumere carattere rilevante per la tutela della salute pubblica. I vantaggi possono essere riassunti come segue:

- ampio intervallo dinamico di concentrazione;
- riproducibilità elevata;
- applicabilità a vari stati della materia;
- esecuzione di analisi multielementari;
- quantità di campione moderata;
- costi contenuti d'acquisto ed esercizio.

Per contro gli svantaggi risultano essere:

- limiti di rivelabilità sostanzialmente buoni, ma non comparabili con quelli relativi a ETA-AAS o a ICP-MS;
- interferenze spettrali.

Questa disamina, pur se concisa, sulle potenzialità e sulle applicazioni analitiche offerte dalla spettrometria di emissione atomica a plasma, è un tentativo di descrizione delle varie alternative di cui un ricercatore può disporre per effettuare analisi precise ed accurate. Appare chiaro che la scelta dell'approccio più idoneo, come è stato evidenziato in precedenza, dipende da molti fattori non ultimo l'esperienza personale acquisita sulle particolari matrici.

SPETTROMETRIA DI MASSA NELLE ANALISI DI ELEMENTI IN TRACCE IN MATRICI COMPLESSE

Francesco Petrucci, Beatrice Bocca, Alessandro Alimonti
Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Descrizione della strumentazione

Il plasma accoppiato induttivamente con rivelatore di massa (*Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, ICP-MS) è una delle metodologie multielementari più potenti e versatili. Consente la determinazione di elementi a bassissima concentrazione in matrici diverse coniugando un'ottima sorgente di ioni come l'ICP con uno spettrometro di massa ad elevata sensibilità e selettività. Dal 1983, anno della sua commercializzazione, l'ICP-MS è diventata la tecnica di elezione per le analisi multielementari di ultratracce in matrici ambientali, biologiche ed in settori come l'elettronica ed il nucleare. L'alto potere di rivelabilità e la capacità analitica multielementare sono le maggiori ragioni del successo di questa tecnica. In quasi 20 anni, circa 2000 ICP-MS sono stati installati in tutto il mondo. Nelle strumentazioni attuali possiamo distinguere una zona detta sorgente (dove vengono prodotti gli ioni), un'interfaccia ed un analizzatore di massa che può essere un quadrupolo o un settore magnetico. La *sorgente* di ioni è rappresentata dalla torcia ICP, formata da tre tubi concentrici di quarzo nei quali è fatto fluire un gas inerte (Ar, He, N₂) e da una spirale di induzione di rame, esterna, che avvolge i tre tubi. Alla spirale è collegato un generatore di radiofrequenza (generalmente compresa tra i 20 e i 60 MHz) che ha lo scopo di generare all'interno della torcia un campo magnetico oscillante le cui linee di forza sono parallele all'asse della torcia stessa. Sotto l'azione del campo elettromagnetico gli elettroni, preventivamente seminati, sono notevolmente accelerati. Le collisioni conseguenti con gli atomi neutri del gas fanno aumentare notevolmente la presenza di elettroni, che sotto l'azione del campo magnetico sono costretti a percorrere traiettorie circolari chiuse e producono un immediato aumento della temperatura. L'*interfaccia* è costituita da due coni (generalmente di Ni o di Pt-Rh) che hanno un orifizio di diametro di 0,8 mm e che mettono in comunicazione una zona a pressione atmosferica (la sorgente) con una zona a vuoto spinto (all'interno dello spettrometro generalmente la pressione varia tra 10⁻⁵ e 10⁻⁸ torr). La particolare conformazione dei due coni e l'utilizzo di appropriate lenti ioniche dietro l'interfaccia permettono un'ottimale trasmissione degli ioni ed una loro focalizzazione. Nell'*analizzatore* gli ioni vengono separati dal campo magnetico presente in base al loro rapporto m/q. In funzione della forza di Lorenz F abbiamo, infatti,:

$$F = q \cdot v \cdot H$$

dove q è la carica, v la velocità, H il campo magnetico. Nell'analizzatore a quadrupolo la separazione degli ioni si ottiene variando opportunamente il voltaggio applicato alle barre (poli). Nel settore magnetico la separazione delle masse avviene in base al principio per cui nella traiettoria circolare gli ioni hanno raggi diversi a seconda della forza di Lorenz cui sono soggetti. Una volta separati gli ioni sono convogliati al rivelatore che produrrà dei segnali elettrici proporzionali al flusso ionico.

Il campione da analizzare per poter essere introdotto nella sorgente di eccitazione deve essere in forma liquida o gassosa. I campioni allo stato liquido devono prima essere nebulizzati per ottenere un aerosol. La miscelazione tra il liquido (campione) ed il gas (gas di trasporto) può

essere effettuata con *nebulizzatori pneumatici*, che si distinguono in nebulizzatori a flusso *concentrico* ed a flusso *incrociato*. Il loro funzionamento richiede un flusso gas di trasporto di circa 1 L min^{-1} con un consumo di campione intorno a $1\text{-}2 \text{ mL min}^{-1}$. A tali velocità del gas, l'effetto vortice che si crea sulla punta è in grado di assicurare la formazione dell'aerosol. I nebulizzatori concentrici offrono una stabilità dimensionale maggiore (con particelle di circa $100 \text{ }\mu\text{m}$) ed un'efficienza superiore rispetto a quelli a flusso incrociato ma, avendo orifizi estremamente ridotti, tendono ad occludersi soprattutto quando vengono aspirate soluzioni molto saline. Il plasma della torcia non tollera la presenza di particelle nebulizzate con dimensioni superiori ai $10 \text{ }\mu\text{m}$. Per tale motivo il nebulizzatore è provvisto di una camera di condensazione per separare le particelle più leggere, che sono inviate in torcia, da quelle più pesanti che sono drenate via. In questo modo si calcola che solo il 5% del campione (soltanto le particelle di circa $10 \text{ }\mu\text{m}$) arriva in torcia, con l'inevitabile ripercussione sui limiti di rivelabilità. Recentemente sono stati sviluppati sistemi pneumatici (nebulizzatore *microconcentrico* e ad *iniezione diretta*) che non richiedono l'utilizzo di camere di espansione-condensazione poiché le particelle formate durante la nebulizzazione sono inferiori ai $10 \text{ }\mu\text{m}$. In questo caso l'efficienza di nebulizzazione è circa il 100 % ed il consumo di campione è dell'ordine dei microlitri. Essi sono particolarmente adatti nel caso procedure di speciazione online con microcolonne.

I *nebulizzatori ad ultrasuoni* rappresentano una valida alternativa a quelli pneumatici. Il campione liquido è inviato ad un trasduttore ultrasonico che riesce a formare un nebulizzato assai fine, con particelle inferiori a $10 \text{ }\mu\text{m}$. L'efficienza in questo caso si aggira intorno al 75%. Quest'alta efficienza, però, creerebbe un raffreddamento della torcia a causa della notevole quantità di campione per unità di tempo che entra nella zona analitica. Al fine di evitare questo problema che porterebbe ad perdita di sensibilità, l'aerosol passa attraverso un sistema di desolvatazione (riscaldamento e raffreddamento) che ha il compito di togliere il solvente e concentrare l'analita. In questo modo l'efficienza della torcia rimane inalterata e si ottengono così limiti di rivelabilità migliori, anche di un ordine di grandezza, rispetto a quelli ottenibili con i nebulizzatori pneumatici.

La tecnica ICP-MS permette di analizzare anche campioni solidi come ad esempio un blocco di metallo o di una lega. Il loro strato superficiale può, infatti, essere vaporizzato per mezzo di nebulizzatori speciali che utilizzano un raggio laser (*laser ablation*) o una scarica a bassa pressione (*glow discharge*). Il vapore atomico formato è opportunamente inviato nella sorgente ionica tramite un flusso di gas. Esistono attualmente in commercio strumenti affidabili che riescono a campionare porzioni solide con estrema precisione. Tali sistemi assicurano limiti di rivelabilità molto buoni anche perché viene eliminata tutta la fase di dissoluzione del campione.

È possibile vaporizzare micro quantità di campione allo stato liquido o solido utilizzando le fasi di evaporazione ed atomizzazione di un fornetto di grafite del tipo usualmente a corredo degli strumenti per l'assorbimento atomico. Questi evaporatori sono direttamente collegati al plasma. Attraverso idonei programmi termici è anche possibile controllare alcune interferenze sia spettrali che non spettrali.

Analisi di matrici complesse: potenzialità e problemi analitici

La spettrometria ICP-MS presenta un eccellente *intervallo di concentrazione analitica*. In altre parole, possono essere analizzate, con una sola diluizione del campione, concentrazioni che vanno dai ng L^{-1} ai mg L^{-1} , coprendo un intervallo anche di 6 ordini di grandezza. Questo è particolarmente utile in analisi multielementari di campioni con contenuto incognito di

elementi. L'elevata *sensibilità* strumentale, l'ottima *riproducibilità* analitica, la possibilità di *analisi multielementari* ed il relativamente *basso consumo* del campione sono le altre proprietà positive che rendono l'ICP-MS la tecnica di elezione per l'analisi degli elementi in traccia. La caratteristica che, insieme ai costi d'acquisto e di esercizio elevati, rappresenta il vero problema della tecnica è la presenza di *interferenze spettrali*. Per il controllo delle interferenze diverse strategie dovranno essere considerate, soprattutto nell'analisi di matrici complesse quali possono essere i campioni ambientali o biologici.

Vediamo come le interferenze possono deteriorare la sensibilità e la specificità della tecnica. È utile ricordare che per *sensibilità* s'intende la capacità di rilevare in maniera univoca il segnale di un dato analita, mentre la *specificità* può essere considerata come l'abilità di differenziare un segnale proveniente dall'analita da quello derivante dalla specie interferente. Elevate sensibilità e specificità insieme risulteranno indispensabili per ottenere bassi limiti di rivelabilità ed alte accuratèzze. Nell'esempio della Tabella 1, si riporta il confronto tra due strumentazioni ICP-MS, una delle quali è 10 volte più sensibile dell'altra.

Tabella 1. Comparazione tra due sistemi ICP-MS con diverse sensibilità

Parametro	Sensibilità normale	Sensibilità alta
Sensibilità x 1000 (conteggi/s/ppm)	35	350
Conteggi del segnale (100 ppt)	3.500	35.000
Conteggi del fondo (25 ppt BEC *)	875	8.750
Deviazione Standard del fondo	29,6	94
Limite di Rivelabilità	2,5	0,8

* BEC, Background Equivalent Concentration

Come possiamo notare la maggiore sensibilità, da sola, non si traduce direttamente in un proporzionale miglioramento del limite di rivelabilità che passa da 2,5 a 0,8, cioè soltanto 3 volte migliore, mentre la sensibilità è superiore di 10 volte. La Figura 4 mostra come varia il limite di rivelabilità (LR) in funzione dell'aumento della sola sensibilità strumentale. Dopo un netto miglioramento iniziale, il successivo incremento di sensibilità non produce quasi alcun effetto sul LD. Questo perché l'ulteriore miglioramento in termini di potere di rivelabilità dipende dalla specificità strumentale, cioè alla capacità dello strumento di eliminare gli interferenti, che, anche a bassi livelli, rappresentano il reale limite alle prestazioni strumentali. Quindi, obiettivo primario nelle analisi di elementi in matrici complesse tramite ICP-MS è il controllo delle interferenze spettrali.

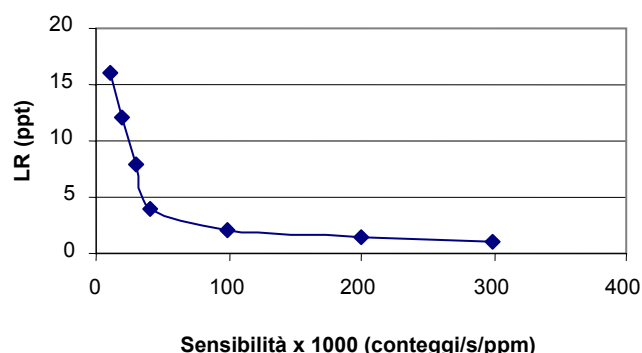


Figura 1. Andamento del Limite di Rivelabilità (LR) in funzione della sensibilità

Eliminazione interferenze spettrali

Nell'ICP-MS le interferenze spettrali sono essenzialmente di tre tipi: ioni atomici con la stessa massa di isotopi analitici (^{40}Ar su ^{40}Ca , ^{106}Cd su ^{106}Pd), ioni con doppia carica ($^{208}\text{Pb}^{++}$ su ^{106}Pd) e ioni poliatomici ($^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ su ^{52}Cr).

Tabella 2. Interferenze più comuni in ICP-MS

Analita	Interferente	Risoluzione necessaria
^{24}Mg	$^{12}\text{C}_2$	1605
^{28}Si	$^{14}\text{N}_2$, $^{12}\text{C}^{16}\text{O}$	958, 1557
^{31}P	$^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2$	1458
^{32}S	$^{16}\text{O}_2$	1801
^{39}K	^{39}ArH	5690
^{40}Ca	^{40}Ar	192498
^{44}Ca	$^{12}\text{C}^{16}\text{O}_2$	1281
^{51}V	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$	2573
^{52}Cr	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}$	2376, 1672
^{48}Ti	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}$	2519
^{55}Mn	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$	2248
^{56}Fe	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$	2503
^{63}Cu	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}$	2792
^{64}Zn	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}_2$, $^{32}\text{S}_2$	1952, 4261
^{75}As	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$	7775
^{80}Se	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$	9688
^{103}Rh	$^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}$	60603
^{105}Pd	$^{89}\text{Y}^{16}\text{O}$	24373

Questi ultimi sono formati dalla combinazione di due o più specie atomiche che sono presenti nel gas plasmogeno, nei gas atmosferici, nell'acqua, nei reagenti e nella matrice. La formazione degli ioni molecolari può avvenire nella zona di plasma più fredda e sulle pareti dei coni. In particolare le molecole ad alta energia di dissociazione, come gli ossidi refrattari, possono rimanere indissociati nel plasma e dare luogo ad interferenze. Nella Tabella 2 sono riportate le interferenze più comuni e la risoluzione ($m/\Delta m$) necessaria per poterle risolvere. Come si può osservare negli esempi riportati, in alcuni casi le interferenze non sono risolvibili neanche con strumenti ad alta risoluzione che come è noto possono raggiungere risoluzioni fino a circa 12.000 $m/\Delta m$. Per tenere sotto controllo o per eliminare le interferenze spettrali sono state sviluppate differenti strategie in funzione del tipo di interferenza, dell'analita e della matrice interessata. Per eliminare le interferenze si può intervenire:

1) in *fase preanalitica*:

- durante la preparazione del campione,
- intervenendo sui sistemi di introduzione del campione in torcia;

2) in *fase analitica*:

- agendo sui parametri strumentali (per esempio, tramite la tecnica del “Plasma Freddo”),
- utilizzando equazioni di correzione almeno nei casi in cui il segnale dell'interferente è minore del 10 % del segnale dell'analita,
- tramite strumenti dotati di celle di reazione post-ionizzazione,
- tramite spettrometri ad alta risoluzione.

Fase preanalitica

Preparazione del campione

L'intorno chimico, ovvero la matrice in cui è presente l'elemento, rappresenta il punto cruciale nel controllo delle interferenze. La matrice di un determinato campione è costituita da un solvente e da una serie di composti organici ed inorganici. Il solvente è rappresentato essenzialmente da acqua e da altri reagenti (prevalentemente acidi minerali e acqua ossigenata) usati per la digestione e la dissoluzione del campione. I composti inorganici sono per lo più sali di metalli quali Na, K, Mg, Ca; questi cationi tendono a rappresentare la maggior fonte di interferenze e richiederebbero un continuo allontanamento dalla matrice. Reagenti quali acidi cloridrico e solforico sono sorgenti di ioni cloro (massa 35 o 37) e zolfo (massa 32) che combinandosi con altri elementi possono dar luogo a diversi interferenti spettrali. Potrebbe essere conveniente impiegare acido nitrico e/o l'acqua ossigenata in fase di preparazione del campione. Nella fase preanalitica si possono inoltre utilizzare delle procedure di preconcentrazione su particolari resine che hanno la capacità di trattenere gli elementi di interesse analitico, lasciando passare alcuni metalli interferenti. Ricorrendo a tecniche di *Flow Injection Analysis* (FIA) il campione viene fatto passare su una opportuna resina dove l'analita è ritenuto e, quindi, separato dalla matrice e successivamente opportunamente eluito in controcorrente e spinto nella zona di analisi. Al contrario utilizzando una separazione cromatografica su colonna con meccanismo di scambio ionico gli elementi interferenti sono ritenuti su colonna mentre gli analiti vengono eluiti. È possibile, ad esempio, determinare elementi pesantemente interferiti come As, Cr, Cu, Se, Zn e V in campioni biologici ed ambientali, trattenendo elementi interferenti come Cl e S su colonne a scambio anionico.

Sistemi di introduzione del campione

Tramite l'utilizzo di campionatori a vaporizzazione elettrotermica o a raggio laser, variando opportunamente parametri strumentali quali rampa di temperatura, flusso del gas e tempo di campionamento si possono inviare in torcia in modo selettivo alcune specie di interesse presenti nel campione. Si opera in tal modo una selezione preventiva del materiale che verrà ionizzato. Un'ulteriore soluzione è l'utilizzo della reazione di formazione dell'idruro metallico; ricorrendo a tale reazione viene campionato e raggiungerà la zona analitica solamente l'elemento che ha formato l'idruro volatile mentre gli interferenti rimangono all'interno della cella di reazione. Un discorso a parte merita l'eliminazione del sovente per eccellenza, cioè l'acqua, che produce ossidi che possono interferire su quasi tutte le zone dello spettro di massa. L'eliminazione dell'acqua (desolvatazione) dai campioni può essere realizzata sia nei nebulizzatori pneumatici che ultrasonici, attraverso camere di condensazione. La Figura 2 mostra come varia la formazione degli ossidi in funzione dell'uso di un desolvatore.

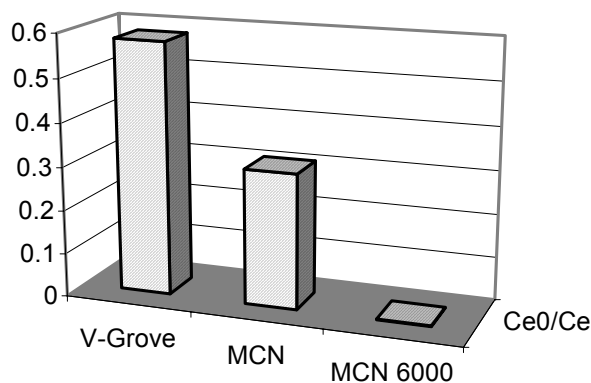


Figura 2. Formazione ossidi con tre diversi nebulizzatori: V-Grove, MCN, MCN 6000

I tre nebulizzatori considerati sono il V-Grove (un nebulizzatore pneumatico), il MCN (un nebulizzatore microconcentrico a basso volume di campione aspirato) ed il MCN 6000 (un microconcentrico con camera di desolvatazione). Il più basso rapporto CeO/Ce, pari a 0,002, lo si ottiene con il MCN 6000.

Fase analitica

Parametri strumentali

Alcuni parametri strumentali come la distanza della torcia dall'interfaccia (coni), la potenza della radiofrequenza e il flusso del gas aerosol possono influenzare notevolmente la formazione di alcune specie interferenti come gli ossidi o gli ioni a carica doppia. Nella torcia possiamo individuare zone in cui è massima la presenza di ioni singoli, zone con alta concentrazione di ioni doppi e zone con alta formazione di ossidi. Al variare della distanza della torcia dall'interfaccia si può privilegiare il campionamento di una specie sulle altre. Aumentando la potenza applicata si favorisce dapprima la dissociazione degli ossidi fino a formare specie elementari, mentre per ulteriori aumenti di potenza si facilita la formazione di ioni doppi. In Figura 3 è riportato l'andamento di formazione delle tre specie in funzione della potenza applicata.

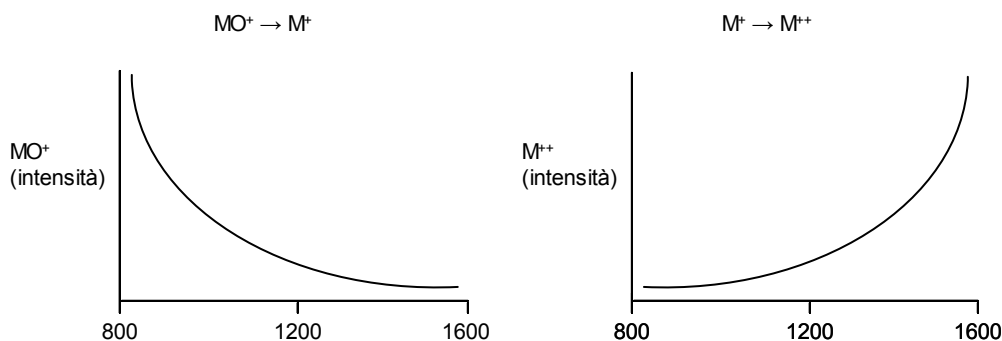


Figura 3. Formazione di specie M^{++} , M^+ , MO^+ in funzione della potenza applicata

Incrementando il flusso del gas di trasporto, come mostrato in Figura 4, il plasma viene raffreddato e conseguentemente si verifica una diminuzione di M^{++} e un aumento di MO^+ .

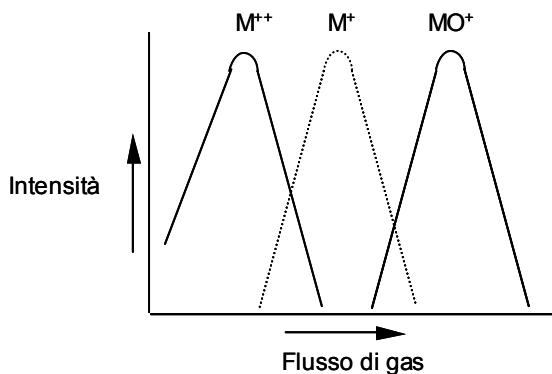


Figura 4. Andamento della formazione M^{++} , M^+ , MO^+ in funzione del flusso aerosol

L'aumento del flusso, inoltre, spingendo tutte le specie verso gli orifizi dell'interfaccia, favorisce il campionamento nella zona del plasma dove si formano la maggior parte di ossidi (MO^+) che vengono quindi campionati in modo privilegiati rispetto alle forme M^+ .

Una particolare ottimizzazione dei parametri strumentali per l'eliminazione delle interferenze è la generazione di un *plasma freddo*. Diminuendo la potenza della torcia sotto ai 1000 W e aumentando il flusso del gas aerosol si ottengono condizioni di ionizzazione più deboli simili alla "ionizzazione chimica". La quantità di specie Ar^+ e tutti gli ioni molecolari che si formano con l'Ar sono ridotti anche di un ordine di grandezza. Per poter realizzare questa condizione analitica è necessario però evitare la formazione di una scarica secondaria. A tale scopo la torcia viene schermata attraverso l'uso di un sottile foglio di platino inserito tra la torcia stessa e la spirale di induzione (Figura 5). Tale dispositivo chiamato "Guard Electrode" permette di mantenere la torcia funzionante anche con potenze di 600 W.

Tra le applicazioni del plasma freddo vi è la separazione analitica dell'isotopo ^{90}Sr dall'isotopo ^{90}Zr . Tale separazione richiederebbe una risoluzione di oltre 30.000 $m/\Delta m$ che non è possibile ottenere con le attuali strumentazioni.

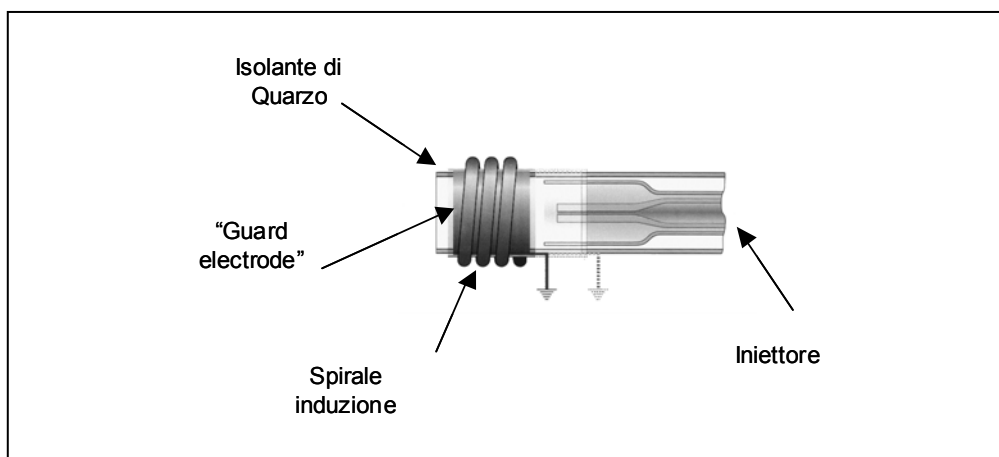


Figura 5. Schema del "Guard Electrode"

Con l'applicazione di una potenza molto bassa (circa 600-800 W) il potere di ionizzazione della torcia viene ridotto e tale riduzione risulta massima per quegli elementi refrattari come lo Zr, mentre è minima per gli elementi facilmente ionizzabili come lo Sr. In questo modo il segnale generato dallo Zr si attenua considerevolmente (ad esempio, scompare completamente il segnale relativo ad $1 \mu\text{g L}^{-1}$ di Zr) mentre è ancora possibile determinare lo Sr. Un'altra applicazione del *plasma freddo* è la determinazione del Fe alla massa 56 interferito pesantemente da $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}$. Le due masse sarebbe risolubili con uno strumento ad alta risoluzione ma con una conseguente perdita di sensibilità. Lavorando, invece, con basse potenze tutte le interferenze derivanti dalla combinazione della Ar^+ con altre specie vengono fortemente ridotte pur mantenendo una elevata sensibilità strumentale.

Equazioni di correzione

Nei casi in cui il segnale dell'interferente è circa il 10 % del segnale dell'analita si può ricorrere ad equazioni che, tenendo conto delle abbondanze relative, riescono a correggere matematicamente il segnale interferito. Nel caso delle interferenze isobariche è possibile

calcolare il fattore di correzione tramite i rapporti delle abbondanze relative. Lo ^{120}Sn , ad esempio, è interferito dall'isotopo ^{120}Te ; l'equazione di correzione, appresso indicata, tiene conto delle intensità lette (I) alle masse 120 e 126 (quest'ultima è la massa di un altro isotopo di Te) e del fattore di correzione derivante dal rapporto delle abbondanze (a) del tellurio alle due masse:

$$I(^{120}\text{Sn}) = I(^{120}\text{Sn}) - [I(^{126}\text{Te}) \times \text{FC}]$$

$$\text{con FC} = a^{120}\text{Te} / a^{126}\text{Te}.$$

L'intensità dello Sn a massa 120 è corretta per il Te andando a leggere quest'ultimo alla massa 126 e applicando il fattore di correzione FC. Un ulteriore esempio è l'interferenza di $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ su ^{75}As . L'equazione di correzione è la seguente:

$$I(^{75}\text{As}) = I(^{75}\text{As}) - [I(^{37}\text{Cl}) \times \text{FC}]$$

$$\text{FC} = a^{35}\text{Cl} / a^{37}\text{Cl}.$$

In questo caso si utilizza il rapporto di abbondanze tra gli ioni Cl 35 e 37 che combinandosi con ^{40}Ar generano i segnali alle masse 75 e 77.

Nel caso che il fattore di correzione non sia conosciuto, non sia cioè semplicemente il rapporto di due abbondanze tabulate, bisogna calcolarlo sperimentalmente. Per far ciò l'elemento che causa l'interferenza viene aggiunto in quantità crescenti (ad esempio, C_1 e C_2) alla matrice analitica e si determina il segnale generato sia alla massa interferita che alla massa propria di un isotopo dell'elemento interferente. Ad esempio, se si vuole correggere l'interferenza generata da $^{23}\text{Na}^{37}\text{Cl}$ sul ^{60}Ni si aggiungono quantità crescenti di NaCl al campione di interesse e si considerano i conteggi alla massa del ^{37}Cl e alla massa 60. Il fattore di correzione è così ottenuto:

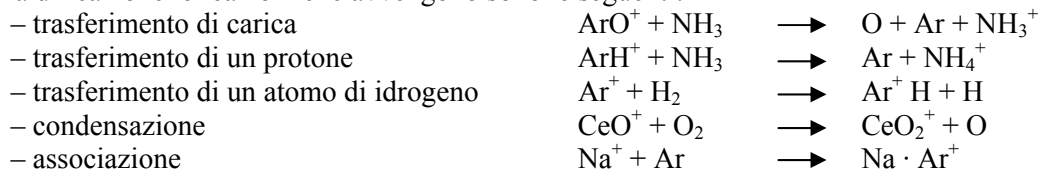
$$\text{FC} = [I_1(60) - I_2(60)] / [I_1(37) - I_2(37)]$$

dove I_1 e I_2 sono le intensità dei segnali ottenuti alle concentrazioni C_1 e C_2 . L'equazione di correzione sarà quindi:

$$I(^{60}\text{Ni}) = I(^{60}\text{Ni}) - (\text{FC} \times I(^{37}\text{Cl})).$$

Reazioni chimiche post-ionizzazione

Alcuni ICP-MS sono in grado di rimuovere le specie poliatomiche interferenti mediante l'impiego di celle di reazione collocate tra l'interfaccia ed il quadrupolo analizzatore, all'interno delle quali viene fatto passare un opportuno gas di reazione (prevalentemente idrogeno, ammoniaca o metano). All'interno della cella il gas reagisce con gli ioni interferenti producendo nuove specie poliatomiche con massa diversa da quella dell'analita. In generale all'interno della cella di reazione le reazioni che avvengono sono le seguenti:



La Figura 6 mostra uno schema semplificato di ciò che avviene all'interno della cella di reazione. Esistono due tipi di celle di reazione: a) quadrupolare con banda passante; b) cella di collisione esapolare. Tra i due sistemi sopracitati esistono delle differenze sostanziali. All'interno della cella oltre alle reazioni chimiche primarie utili ad eliminare le interferenze si

hanno reazioni secondarie con formazione di co-prodotti che possono, a loro volta, dar luogo a nuove interferenze sulla massa analitica di interesse. La cella di reazione quadrupolare a banda passante permette, in virtù della maggiore stabilità nella trasmissione degli ioni rispetto all'esapolo, di selezionare la porzione di spettro da inviare al quadrupolo analizzatore (banda passante). Nella cella collisionale esapolare gli interferenti secondari non possono essere eliminati causando nuove interferenze sulla determinazione di isotopi vicini alla zona analitica.

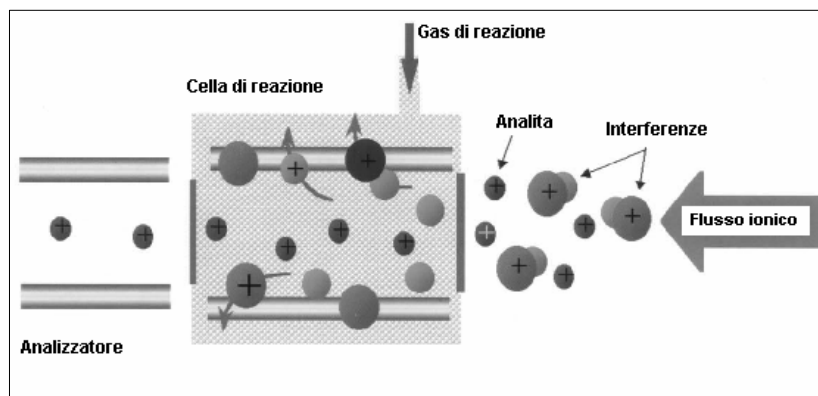


Figura 6. Schema di cella di reazione (riprodotto da Perkin-Elmer)

La Figura 7 mostra l'abbattimento dell'interferenza ArO^+ sulla massa 56 attraverso l'impiego della cella di reazione. Si passa sulla massa 56 dai 10 milioni di conteggi a circa 10 conteggi senza diminuzione della sensibilità strumentale. Purtroppo questa tecnica non è di alcun giovamento nel caso degli ossidi metallici o nel caso di altri interferenti che non vedano coinvolto come gas l'argon o l'idrogeno.

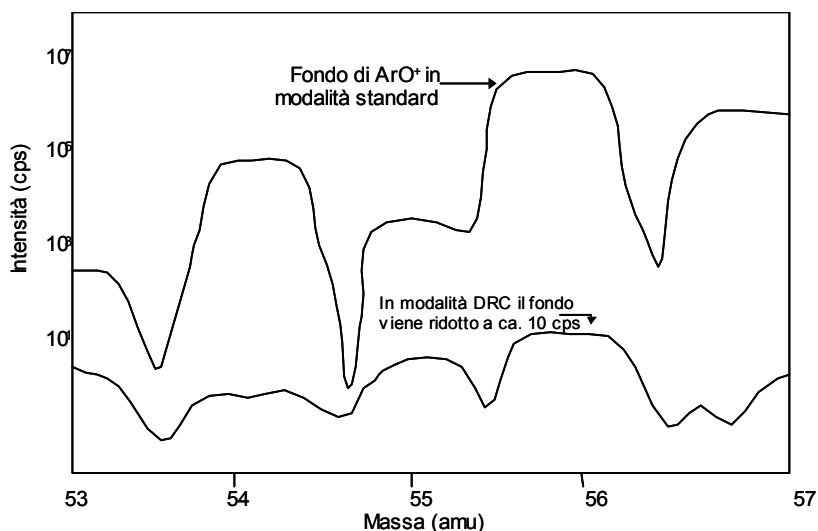


Figura 7. Diminuzione dell'interferenza ArO^+ con l'uso della cella di reazione

Strumenti ad alta risoluzione

Il recente sviluppo di nuovi sistemi a doppia focalizzazione con analizzatori a settore magnetico ha dato un grande impulso all'analisi in alta risoluzione. Lo schema di base di tali sistemi consiste in un settore magnetico nel quale gli ioni con differente rapporto massa/carica sono costretti a passare. La separazione delle masse avviene in base al principio per cui gli ioni nella traiettoria circolare hanno raggi diversi a seconda della forza di Lorenz cui sono soggetti. Gli ioni sono, inoltre, soggetti ad un secondo campo elettrico che opera una ulteriore separazione. In questo modo si possono raggiungere risoluzioni anche di 12.000. L'uso dell'alta risoluzione è indubbiamente il modo più elegante e pratico per il superamento del problema delle interferenze. Il fattore cruciale di questa tecnica è il potere risolutivo **R** che, nel caso della definizione al 10 % della valle tra i due picchi, è dato da:

$$R = (m_1 / (m_1 - m_2)) \times (a / b)$$

dove m_1 e m_2 sono le masse dei due isotopi, **a** è la distanza tra i centri dei due picchi e **b** è l'ampiezza del picco al 5 % dell'altezza (Figura 8). Ad esempio, il Se con massa 79,9165 può essere separato dall'interferente ArAr con massa 79,924 (e quindi con un Δm di 0,008) con una risoluzione superiore a 10.000.

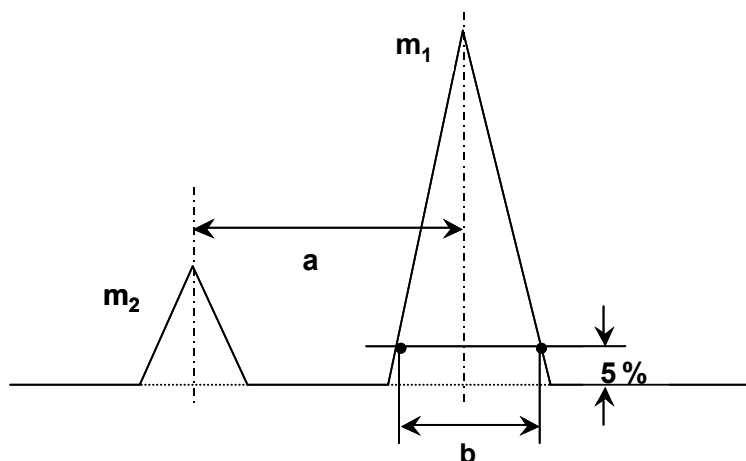


Figura 8. Definizione della risoluzione al 10% della valle

Come esempi significativi della possibilità di determinare alcuni analiti a media ed alta risoluzione si ricordano la determinazione di K a concentrazioni dell'ordine dei ng L⁻¹ separando ³⁹K da ³⁸ArH e la separazione dell'unico isotopo dell'arsenico (massa 75) dallo ione molecolare interferente ⁴⁰Ar³⁵Cl, utilizzando una risoluzione superiore a 10.000. Quest'ultima applicazione si è rivelata particolarmente utile nella determinazione di As in matrici ricche di Cl come ad esempio i fluidi biologici o l'acqua di mare.

Conclusioni

In questa sintetica panoramica sulle problematiche relative alla determinazione di elementi in traccia con la spettrometria di massa abbiamo tentato di descrivere le varie tecniche di cui che un analista può avvalersi per ottenere un'analisi accurata. Chiaramente la scelta dell'approccio

più idoneo dipende da molti fattori, non ultimo l'esperienza acquisita su una particolare matrice. Per il futuro l'attenzione dei ricercatori e delle ditte costruttrici è focalizzata su due linee di tendenza. Da una parte si stanno sviluppando sistemi che possano dare risoluzioni sempre più alte (sono stati già descritti strumenti con risoluzioni superiori a 43.000), dall'altra sono oggetto di intensa ricerca tutte quelle tecniche che provvedono a superare la formazione di specie molecolari responsabili di numerose interferenze. Tra queste ultime ricordiamo lo sviluppo della trappola ionica, vicina come principio al quadrupolo, nella quale gli ioni possono essere immagazzinati e le molecole interferenti distrutte. Gli strumenti di nuova generazione avranno sicuramente performance migliori in termini di accuratezza analitica e precisione e saranno molto più versatili ma soprattutto avranno prezzi più accessibili. Quest'ultimo aspetto è sicuramente di grande importanza affinché questa tecnica, ormai insostituibile in ogni laboratorio di analisi di elementi in traccia, conosca una adeguata diffusione.

TECNICHE COMBinate NELLA SPECIAZIONE DI ELEMENTI IN TRACCIA

Nicola Violante, Oreste Senofonte

Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

La speciazione di un elemento può essere definita come la distribuzione in un sistema tra specie chimiche definite di un elemento stesso (IUPAC). Anche la determinazione sperimentale di questa distribuzione è talvolta chiamata speciazione. Poiché la qualità e l'entità degli effetti sulla salute di un elemento dipendono dalla specie chimica, dallo stato di ossidazione e dalla matrice cui è legato, è necessario identificare le specie chimiche che lo contengono.

I metodi usati per la speciazione si basano sulla combinazione tra tecniche separative e tecniche di rivelazione. Sono illustrati diversi esempi di speciazione chimica in medicina, ambiente ed alimenti quali la speciazione di As in varie matrici, la determinazione di ferritina in prodotti farmaceutici, la determinazione di più elementi in diversi tipi di latte e la determinazione dei composti del gadolinio in farmaci impiegati come mezzi di contrasto per indagini diagnostiche tramite risonanza magnetica.

Speciazione: definizioni e significato

Per specie chimica di un elemento s'intende la forma specifica di un elemento in relazione alla sua composizione isotopica, al suo stato elettronico o di ossidazione e/o alla sua struttura complessa o molecolare. Speciazione può essere definita, secondo lo IUPAC, come la distribuzione di un elemento tra specie chimiche definite in un sistema.

L'analisi di speciazione in chimica analitica è l'identificazione analitica individuale e la quantizzazione di una o più specie chimiche presenti in un campione.

Il frazionamento è il processo di classificazione di un analita o di un gruppo di analiti presenti in un certo campione in base a proprietà fisiche (dimensioni, solubilità, ecc.) o chimiche (legami, reattività, ecc.).

Spesso la qualità e l'entità degli effetti sulla salute di un elemento dipendono dalla specie chimica, dallo stato d'ossidazione e dalla matrice cui è legato. Diventa necessario in questo contesto non solo determinare il contenuto totale dell'elemento nella matrice considerata, ma anche identificare le specie chimiche che lo contengono.

Generalmente per quanto riguarda gli elementi in traccia, le specie chimiche tossicologicamente più rilevanti sono le molecole piccole. Al contrario, gli effetti essenziali sono spesso imputabili alla presenza attiva di elementi in molecole grandi. Gli elementi in traccia sono presenti in specie chimiche sia a basso peso molecolare che in altre più complesse.

Le specie chimiche a basso peso molecolare possono essere:

- elementi la cui attività biologica dipende dal loro stato di ossidazione (es. As III/V, Cr III/VI, Fe II/III, V III/V);
- indicatori di esposizione che possono innescare meccanismi di detossificazione;
- complessi con leganti a basso peso molecolare.

Quelle ad alto peso molecolare possono essere:

- biomolecole (es. Fe in ferritina, Cu in ceruloplasmina);
- complessi leganti metalli (es., Cr in transferrina).

Separazione delle specie chimiche

In dipendenza del tipo di separazione che si attua sono possibili differenti approcci operativi che coinvolgono tecniche e strumentazioni diverse, come riportato nella Tabella 1.

Tabella 1. Tipi di separazioni e relative tecniche

Tipo di separazione	Tecnica
Gas-solido	cromatografia, sublimazione
Solido-liquido	cromatografia ad esclusione dimensionale, cromatografia d'adsorbimento, estrazione, scambio-ionico, elettroforesi, elettrodeposizione, filtrazione, centrifugazione
Liquido-liquido	estrazione, ultrafiltrazione, ultracentrifugazione, dialisi, elettrodeposizione, cromatografia di partizione

Le tecniche che sfruttano le caratteristiche fisiche dei composti per la loro separazione sono: *adsorbimento, centrifugazione, cromatografia, dialisi, trappola per vapori freddi, filtrazione*.

Quelle che sfruttano caratteristiche chimiche dei composti per la loro separazione sono a loro volta: *cromatografia (qualche tipo), complessazione, derivatizzazione, rivelazione specifica, estrazione, scambio ionico, reazioni redox*.

Infine ci sono le *reazioni enzimatiche* e i *saggi immunologici* che sfruttano le caratteristiche biochimiche.

Le tecniche di separazione più usate sono senza dubbio quelle cromatografiche, singole o combinate:

- *liquida* in fase diretta, in fase inversa, in fase inversa ad accoppiamento ionico; *esclusione dimensionale*, separazione di specie con differenti raggi molecolari senza (teoricamente) interazione chimica con il mezzo di separazione; *scambio ionico*, separazione di specie cariche in miscele complesse per mezzo di fasi mobili acquose;
- *gas cromatografia*, separazione gas-liquido di campioni che si trovano allo stato di vapore o possono passarci facilmente all'aumentare della temperatura.

Negli ultimi anni è andata affermandosi una tecnica molto promettente per la sua potenzialità separativa: l'elettroforesi capillare (EC). Questa tecnica si basa sull'effetto elettroforetico classico e utilizza come mezzo separativo, al posto della carta o delle piastrine ricoperte di gel di silice, una colonna capillare di silice fusa. Gli analiti, sottoposti ad un intenso campo elettrico, migrano ad un'estremità della colonna capillare e vengono identificati ed analizzati tramite opportuni rivelatori. Questa tecnica negli ultimi anni ha subito una rapidissima evoluzione e dal campo prettamente biochimico è stata trasferita con enormi vantaggi alla separazione di sostanze d'interesse farmaceutico e, recentemente, alla separazione di enantiomeri di farmaci chirali.

Recentissimo è l'accoppiamento online dell'EC con rivelatori a plasma accoppiato induttivamente (ICP, *Inductively Coupled Plasma*) per studi di speciazione chimica degli elementi. Gli aspetti rilevanti in questa combinazione sono:

- stabilità della connessione elettrica all'interfaccia;
- compatibilità del flusso elettroosmotico della EC con la velocità di flusso del nebulizzatore dell'ICP;
- prevenzione del flusso laminare nel capillare EC.

Speciazione dell'arsenico

Una gran quantità di composti contenenti As vengono annualmente rilasciati nell'ambiente, sia come sali inorganici che come organoarsenicali, quali acido monometilarsonico (MMA, monomethylarsonic acid) e dimetilarsinico (DMA, dimethylarsinic acid). L'ingestione per mezzo di cibo e acqua è la principale via per l'introduzione dell'elemento nell'organismo, dove viene assorbito nello stomaco e nell'intestino e in seguito rilasciato nel flusso sanguigno. L'arsenico è quindi convertito nel fegato in forme meno tossiche che sono infine eliminate tramite le urine.

Le specie contenenti As di maggior interesse sono: As (III) inorganico, As (V) inorganico, Acido monometilarsonico, Acido dimetilarsinico, Arsenocolina (AsChol, Arsenocholine), Arsenobetaina (AsBet, Arsenobetaine) e Arsenozuccheri.

Le proprietà tossicologiche e biologiche delle diverse specie arsenicali variano molto. I composti organoarsenicali sono, di regola, meno tossici rispetto a quelli inorganici. Infatti, l'AsBet e l'AsChol, prodotti metabolici finali, sono ben tollerate dagli organismi viventi. È, quindi necessario sviluppare tecniche di separazione e metodi di rivelazione delle varie specie di As contenute in matrici sia marine che di altro tipo.

Speciazione online tramite accoppiamento tra cromatografia liquida, svolgimento di idruri e ICP con rilevazione ottica

In questo metodo, sei specie a base di As (As^{III} , As^{V} , MMA, DMA, AsChol ed AsBet) contenute in una miscela, sono state separate tramite cromatografia liquida ad alta efficienza (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*). Con colonna a scambio anionico. Arsenocolina ed AsBet dopo la separazione sono state deviate in celle irradiate con raggi ultravioletti (UV, Ultraviolet) per essere distrutte e poi immesse di nuovo nel circuito. Tutte le specie sono state convertite in idruri (HG, *Hydride Generation*) online prima di essere determinate tramite spettrometria di emissione atomica a plasma (ICP-AES, *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*) (Figure 1-3 e Tabella 2).

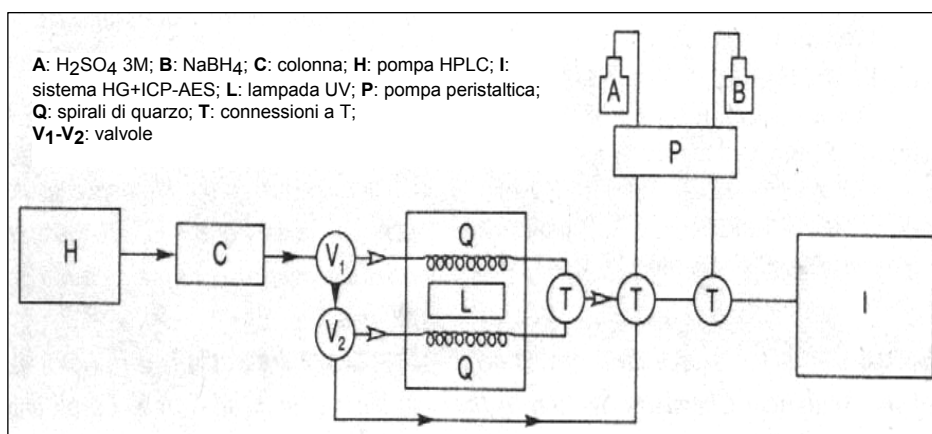


Figura 1. Accoppiamento online HPLC con UV-HG+ICP-AES

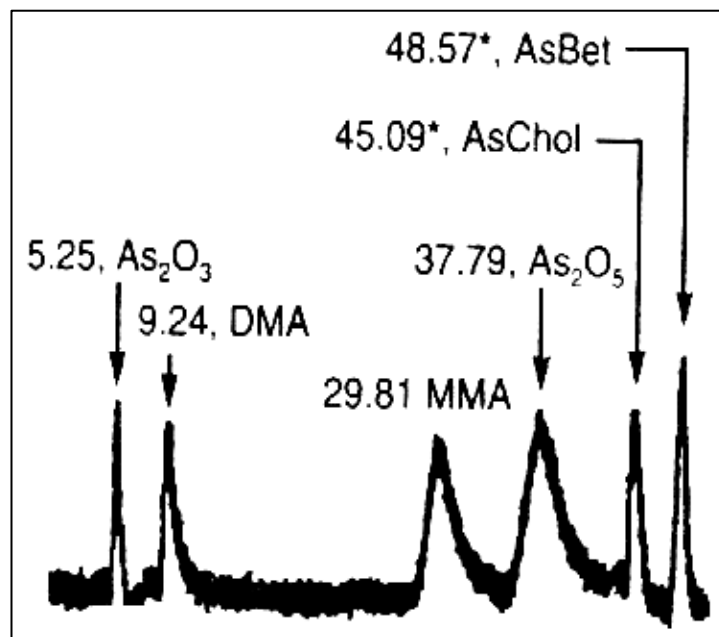


Figura 2. Tracciato cromatografico dopo la decomposizione UV e la trasformazione in idruri.
 As_2O_3 : 5 ng; DMA, MMA, As_2O_5 , AsChol e AsBet: 50 ng

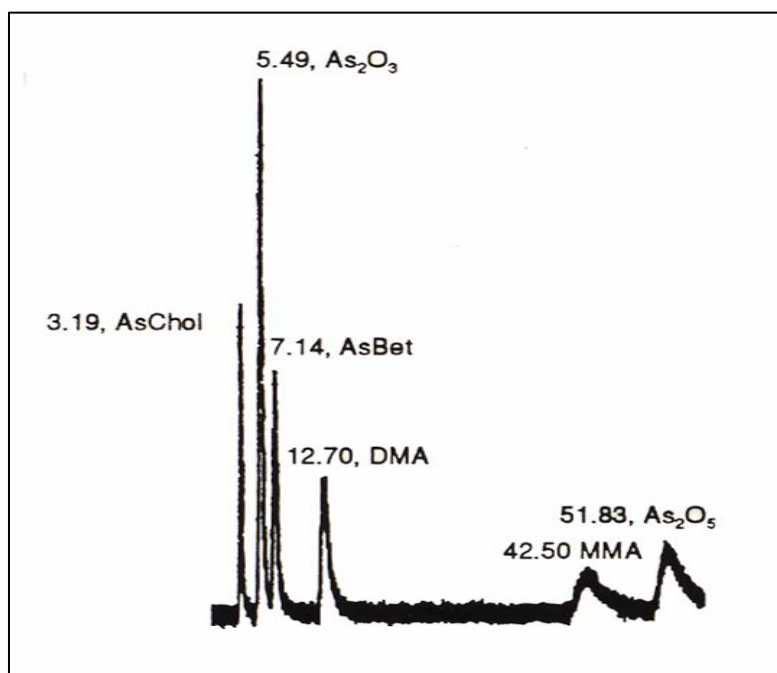


Figura 3. Separazione di sei specie arsenicali ottenuta con due colonne collegate in serie.
 Tampone $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,005 M a pH 4,75. Quantità di ogni composto: 1000 ng

Tabella 2. Tecniche analitiche e relative condizioni operative

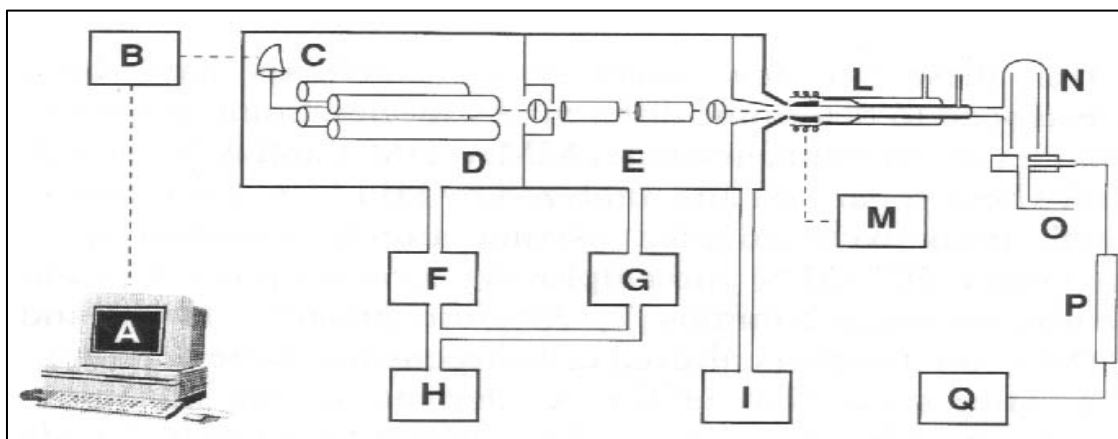
Tecnica	Parametro	Condizione
HPLC	Pompa	Serie 10 LC (Perkin Elmer, Norwalk, CT)
	Colonne	Supelcosil LC-SAX (Supelco): lunghezza 25 cm, diametro interno 4,6 mm Viosfer (Violet) a base NH ₂ : lunghezza 10 cm, diametro interno 4,0
	Eluente	NH ₄ H ₂ PO ₄ 0,005 M, pH 4,5
	Flusso pompa (mL min ⁻¹)	1
HG	Integratore	a) LC-100 (Perkin Elmer) b) Baseline 810 (Millipore Waters Chromatography, Milford, MA)
		Flusso di H ₂ SO ₄ 3M, NaBH ₄ , 1% in NaOH 0,1 M; campione, 1 mL min ⁻¹ Flusso di argon del nebulizzatore, 0,3 L min ⁻¹
ICP-AES	Spettrometro	Jobin Yvon 38 P VHR (JY Division/ISA, Longjumeau, France)
	Generatore RF	Durr JY 38-32, frequenza 56 MHz, potenza nominale uscita 2,2 kW
	Torcia	INSA smontabile
	Flussi argon (L min ⁻¹)	plasma 18, gainage ed aerosol 0,3
	Monocromatore	HR 1000 M, lunghezza focale 1 m, montaggio Czerny-Turner, con reticolo olografico piano con 3600 scanalature mm ⁻¹
	Nebulizzatore	Pneumatico di tipo concentrico con camera di Scott
	Riga analitica (nm)	As (I) 193,69

Speciazione online tramite HPLC e Spettrometrica a Plasma con rivelatore di Massa

Sette forme arsenicali costituite dalle sei indicate in precedenza e dall'acido fenilarsonico (PAA, Phenylarsonic Acid) come standard interno sono state determinate in estratti di pesce e molluschi combinando online HPLC ed ICP con Spettrometria di massa (MS, mass spectrometry). Tale accoppiamento ha permesso di sfruttare la specificità del rivelatore di massa per l'elemento, il suo ampio intervallo dinamico e l'elevato potere di rivelabilità (ca. 0,0026 µmol L⁻¹ di As). Inoltre, in questo caso, i composti arsenicali in esame non necessitavano di alcuna derivatizzazione o trasformazione (Figure 4-7 e Tabelle 3-5).

I tessuti di pesce e mitili liofilizzati sono stati sottoposti alla seguente procedura di estrazione:

- estrazione ripetuta 5 volte del liofilizzato con una miscela di 10 mL di metanolo e acqua 1+1 in bagno ad ultrasuoni;
- filtrazione;
- evaporazione del filtrato fino a secchezza;
- dissoluzione in acqua;
- estrazione ripetuta 5 volte con 10 mL di etere della soluzione acquosa;
- controllo della presenza di As nella fase organica (negativo);
- misurazione del contenuto di NaCl residuo negli estratti (pesce: 0,15 % e mitili 0,1 %);
- diluizione degli estratti 1:20 con acqua deionizzata.



A, computer; **B**, A/D convertitore; **C**, moltiplicatore di elettroni; **D**, quadrupolo; **E**, lenti ioniche; **F e G**, turbopompe; **H e I**, pompe meccaniche; **L**, ICP torcia; **M**, sorgente RF; **N**, camera di nebulizzazione; **O**, linea Argon; **P**, colonna; **Q**, pompa HPLC

Figura 4. Accoppiamento HPLC+ICP-MS.

Tabella 3. Strumentazione cromatografica e condizioni operative

Parametro	Condizione
Pompa	Biocompatible, 250 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)
Colonna	IonPac AS7 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) con IonPac AG7 come pre-colonna
Solvente	A: acqua deionizzata; B: NaHCO ₃ 0,03 M, pH 9

Programma di gradiente

Tempo (min)	Velocità di flusso (mL min ⁻¹)	% A	% B
0	0,7	100	0
3	0,7	100	0
18	1,0	0	100
33	1,5	0	100
38	0,7	100	0

* Curva di incremento convessa

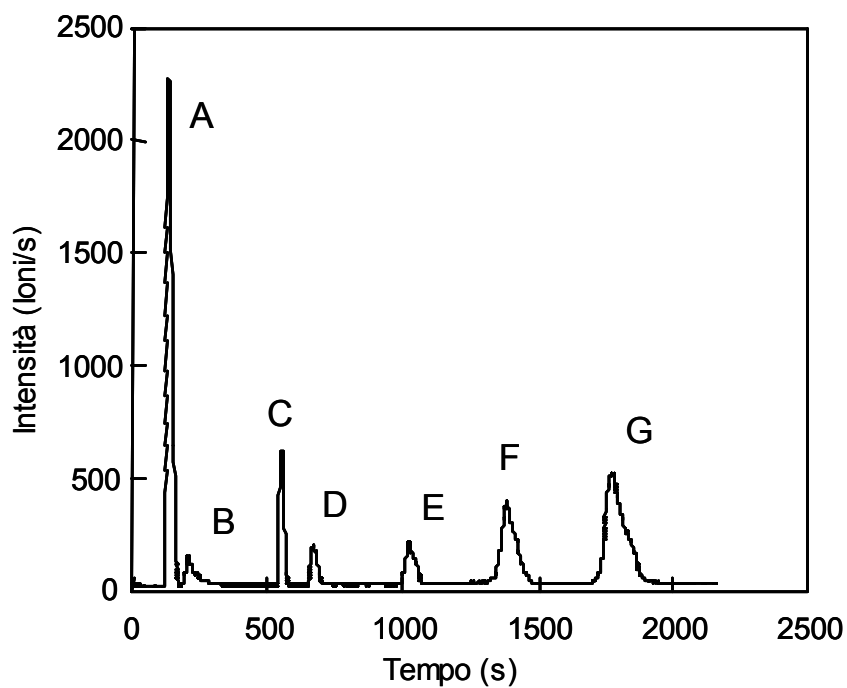
Tabella 4. Strumentazione ICP-MS e condizioni operative

Parametro	Condizione
Spettrometro	Sciex Elan 5000 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)
Nebulizzatore	Tipo cross flow, con camera di condensazione Rytan
Potenza (kW)	1000
Flusso argon (L min ⁻¹)	Plasma, 16; ausiliario, 0,9; aerosol, 1,0
Modalità di analisi	Segnale transiente, modo grafico
Massa analitica	⁷⁵ As

Tabella 5. Parametri per la determinazione delle specie di As

Specie	Equazione di calibrazione	Limite di rivelabilità ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Riproducibilità* (%)
As III	$C = 25,6 A - 0,12$ ($r = 0,9990$)	0,0015	2,5
As V	$C = 27,0 A + 0,80$ ($r = 0,9995$)	0,0013	1,4
MMA	$C = 30,0 A - 0,05$ ($r = 0,9999$)	0,0027	2,8
DMA	$C = 23,5 A - 0,11$ ($r = 0,9998$)	0,0025	2,3
AsChol	$C = 51,0 A - 0,30$ ($r = 0,9998$)	0,0024	1,7
AsBet	$C = 22,9 A - 0,44$ ($r = 0,9999$)	0,0027	1,9

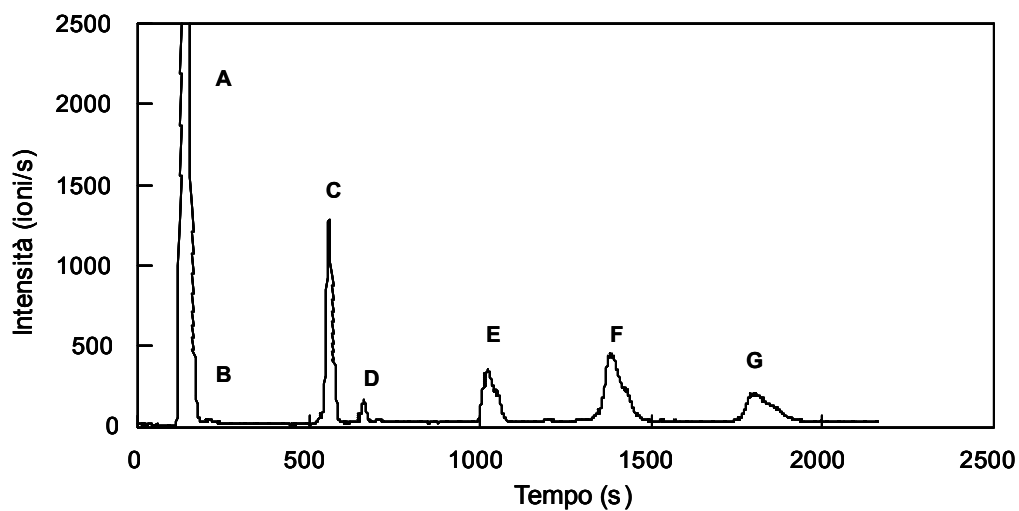
C, concentrazione; A, rapporto tra l'area dei picchi dell'analita e lo standard interno; r, coefficiente di regressione; *, 5 replicati per una concentrazione di $10 \mu\text{g L}^{-1}$



A, AsBet $0,27 \mu\text{mol L}^{-1}$;
 B, arsenito $0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$;
 C, DMA $0,062 \mu\text{mol L}^{-1}$;
 D, AsChol $0,041 \mu\text{mol L}^{-1}$;

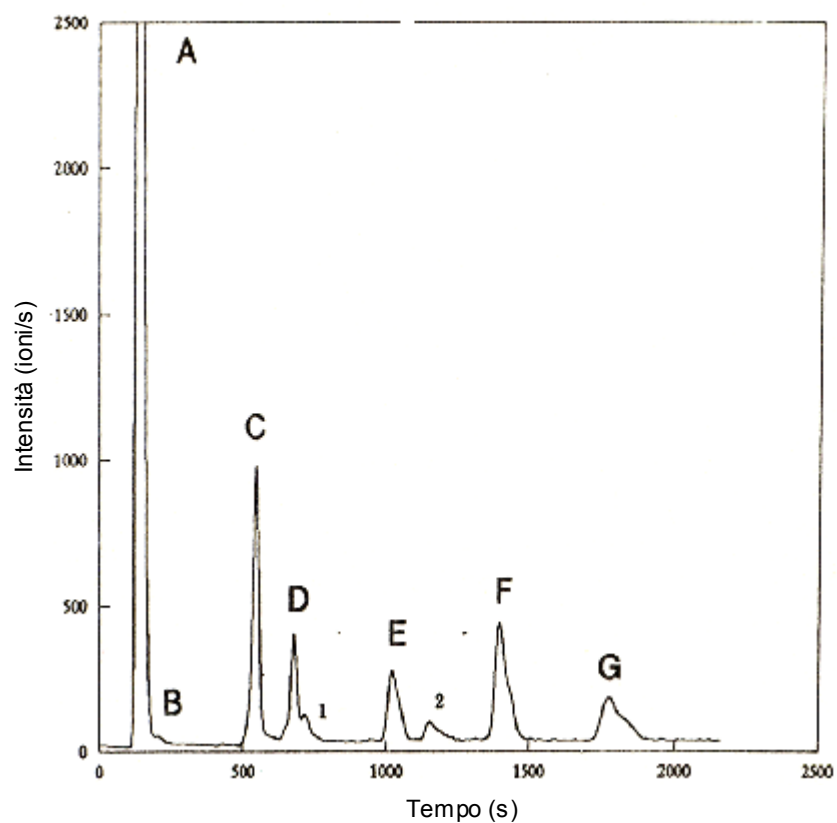
E, MMA $0,054 \mu\text{mol L}^{-1}$;
 F, PAA $0,25 \mu\text{mol L}^{-1}$;
 G, arsenato $0,22 \mu\text{mol L}^{-1}$

Figura 5. Separazione cromatografica di sette composti di As in soluzione acquosa



A, AsBet; B, arsenito; C, DMA; D, AsCchol; E, MMA; F, PAA; G, arsenato

Figura 6. Separazione cromatografica di estratto di pesce (diluito 1:20 con acqua deionizzata)



A, AsBet; B, arsenito; C, DMA; D, AsCchol; E, MMA; F, PAA; G, arsenato

Figura 7. Separazione cromatografica di estratto di mitili (diluito 1:20 con acqua deionizzata)

Identificazione di frazioni proteiche contenenti elementi nel latte umano

Questo lavoro ha riguardato lo studio della distribuzione Ba, Bi, Ca, Cd, Cu, Li, Mn, Mo, Pb, Sr, Tl e Zn tra le varie frazioni proteiche del latte umano quali caseine (Cns, Caseins), immunoglobuline (Igs, Immunoglobulins), sieroalbumina bovina (Bsa, Bovine serum albumin), α -lattoglobulina (α -Lg, α -Lactoglobulin) e β -lattoalbumina (β -La, β -Lactoalbumin). Esempi sono riportati nelle Figure 8 e 9.

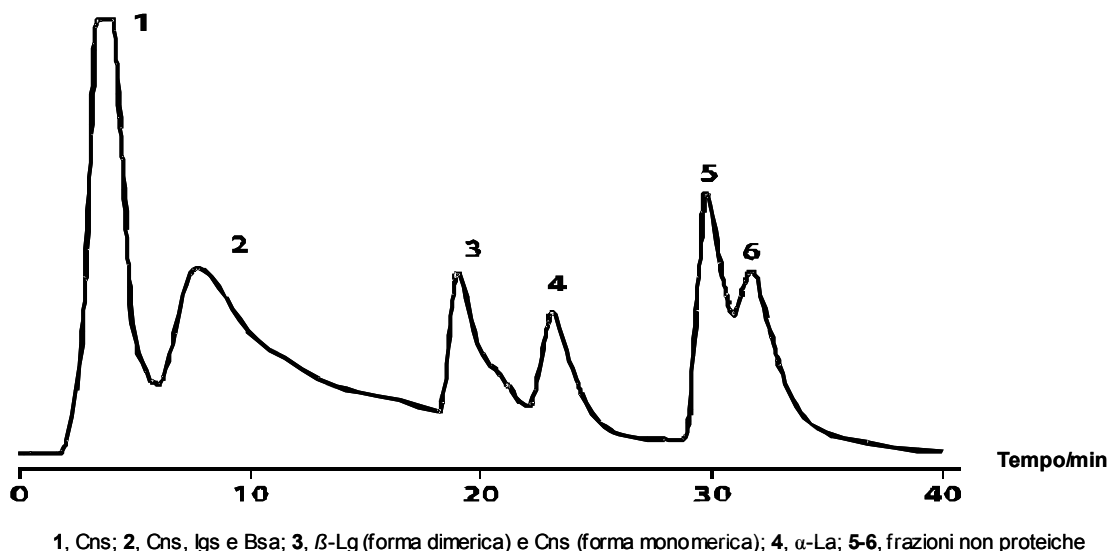
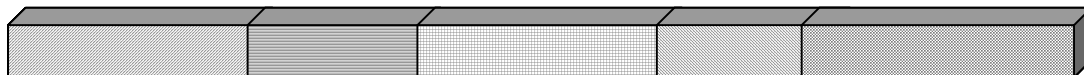
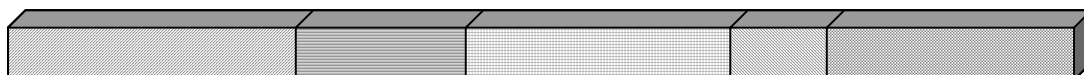


Figura 8. Esempio di diagramma ottenuto per filtrazione su gel (latte di vacca pastorizzato)

Latte sterilizzato UHT



Latte pastorizzato



Latte non trattato

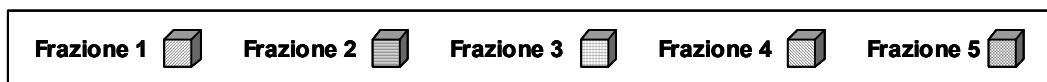
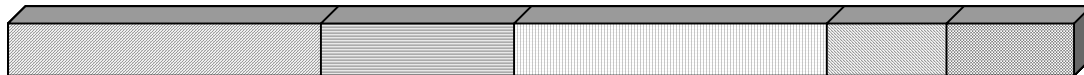


Figura 9. Esempio di distribuzione relativa di un elemento nelle frazioni cromatografate del latte: il caso del Cd

Determinazione di ferritina in prodotti farmaceutici

Ferritina ed emosiderina rimuovono e immagazzinano l'eccesso di Fe negli organismi viventi. Nei prodotti farmaceutici commerciali contenenti ferritina il Fe presente è talvolta legato anche ad altre molecole. Ciò potrebbe alterare le proprietà del farmaco (Tabella 6 e 7 e Figure 10 e 11).

Tabella 6. Condizioni cromatografiche per identificare la ferritina nei prodotti commerciali

Parametro	Condizione
Pompa	Serie 10 LC (Perkin-Elmer Co, Norwalk, CT, USA)
Rivelatore	Mod 2550, a lunghezza d'onda variabile (Varian, Palo Alto, CA, USA)
Colonne	TSK G4000SW, SW range 5000-1.000.000 (Supelco, Bellefonte, PA, USA); TSK G3000SW, MW range 1000-300.000 (Pharmacia LKB, Uppsala, Sweden)
Eluente	Tampone fosfato a pH 5,5 contenente 0,07 M KH_2PO_4 , 0,1 M NaCl e 1×10^{-4} M NaN_3
Flusso (ml min^{-1})	1
λ UV (nm)	280
Integratore	Baseline 810 (Millipore, Water Chromatography Division, Milford, MA, USA)

Tabella 7. Determinazione di Fe (%) nelle ferritine. Confronto tra ICP-AES ed HPLC/ICP-AES

Ferritina	ICP-AES*	HPLC/ICP-AES** (tipo di colonna)		
		TSK G4000 SW	TSK G5000 PW	Superose 6
1	0,88	0,90	0,92	0,93
2	2,11	2,10	2,27	2,13
3	0,98	1,02	1,02	1,00
4	1,06	1,04	1,05	1,02

* Media di 3 misure; ** media di 2-6 misure

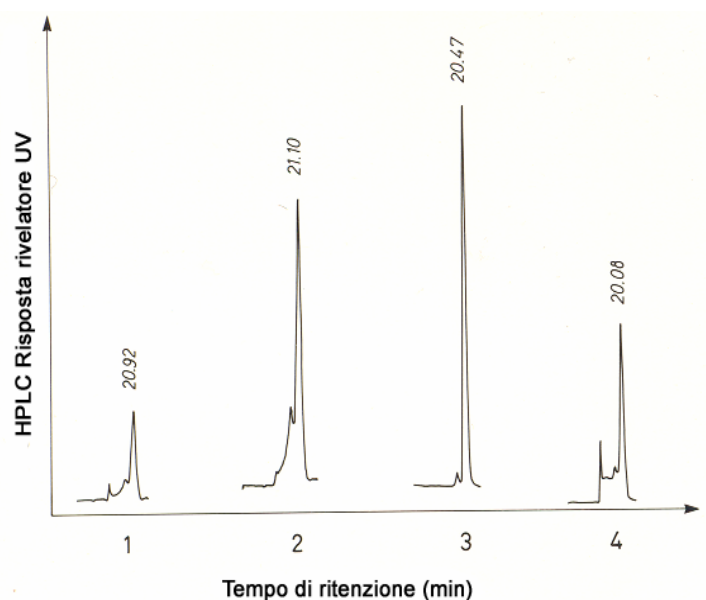


Figura 10. Profili cromatografici di differenti prodotti contenenti ferritina

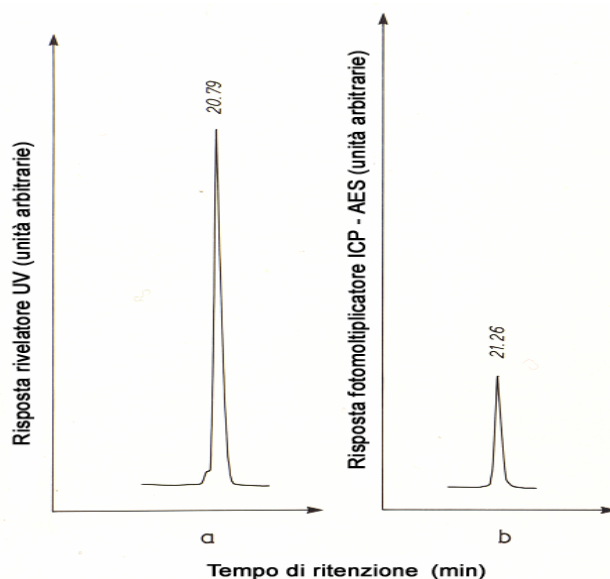


Figura 11. Tempi di ritenzione HPLC determinati tramite: (a) rivelatore UV, (b) ICP-AES di un prodotto contenente ferritina

Identificazione del platino libero nella farmacocinetica

Lo schema terapeutico per l'impiego di farmaci a base di Pt può essere sostanzialmente migliorato identificando le specie chimiche contenenti Pt più attive verso vari tipi di tumori.

L'ultrafiltrazione a diversi valori di "cut-off" del plasma di pazienti sotto trattamento mostra la presenza di differenti specie di Pt. È probabile che la frazione maggiore sia rappresentata da piccoli peptidi leganti l'elemento di peso molecolare inferiore a 10.000 kDa.

Speciazione del gadolinio in prodotti farmaceutici

La caratterizzazione analitica mediante HPLC ed ICP-AES di quattro specialità medicinali presenti sul mercato a base di gadodiamide, acido dietilentriaminopentaacetico (Gd-DTPA), acido tetrazaciclododecano N N' N'' N''' tetraacetato (Gd-DOTA) e gadoteridolo – usati come mezzi di contrasto paramagnetici in misure cerebrali e spinali in NMR per immagine – è stata effettuata per accertare in quale misura il gadolinio sia presente in forma legata a molecole diverse dal principio attivo. L'esistenza di tali molecole potrebbe poi condurre ad un maggior rilascio di gadolinio libero *in vivo* (Tabelle 8-11 e Figure 12-16).

Specie chimiche di Gd in prodotti farmaceutici:

- Gd-DTPA;
- (Gd-DOTA);
- bismetilammide dell'acido dietilentriaminopentaacetico (Gd-DTPA-BMA)
- acido tetrazaciclododecano N N' N'' triacetato N''' 2 idrossipropil (Gd-HPDO3A).

Tabella 8. Condizioni cromatografiche per Waters 625LC System e colonna Supelcosil LC-18DB 25x4,6 cm, 5 µm

Eluente	Rivelatore
Per gadodiamide Trietilammonioacetato 0,45 micromolare degassato con elio pH = 6,83 Flusso: 1 mL min ⁻¹	Fluorimetro Waters 474 λ eccitazione 210 nm λ emissione 310 nm
Per Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-HPDO3A Tampone fosfato 0,025 M (98 % v/v) + acetonitrile (2 % v/v) pH = 4,97 Flusso: 1 mL min ⁻¹	Fluorimetro Waters 474 λ eccitazione 270 nm λ emissione 311 nm

Tabella 9. Parametri strumentali per ICP-AES (OPTIMA 3100 XL, Perkin Elmer) nell'analisi delle specialità medicinali contenenti gadodiamide, Gd-DTPA, Gd-DOTA e Gd-HPDO3A

Parametro	Condizione
Generatore RF	Frequenza 40 MHz
Potenza di uscita	1,4 kW (Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-HP-DO3A) 1,3 kW (gadodiamide)
Nebulizzatore	Cross-flow con camera di condensazione Rytan
Flusso di argon (l min ⁻¹)	Plasma, 17; flusso ausiliario, 0,7; aerosol, 0,8 (Gd-DTPA, Gd-DOTA, Gd-HPDO3A) Plasma, 15; flusso ausiliario, 0,5; aerosol, 0,8 (gadodiamide)
Sistema ottico	Policromatore a reticolo piano tipo <i>échelle</i> (densità di righe 79 linee/mm); rivelatore allo stato solido tipo SCD; range di lunghezza d'onda 165-403 nm
Linee spettrali (nm)	Gd 336,2; Gd 342,2; Y 371,0 (standard interno)

Tabella 10. Risultati della speciazione di Gd (mg mL⁻¹)

Specialità medicinali a base di:	Gd totale ICP-AES		Gd HPLC/ICP-AES		Gd HPLC
	336 nm	342 nm	336 nm	342 nm	
Gd-HP-DO3A	81,1±0,2	80,6±0,2	80,5±0,7	80,5±0,7	79,5±0,4
Gd-DTPA	79,7±0,2	79,1±0,2	79,7±0,4	79,1±0,4	76,7±0,2
Gd-DOTA	78,8±0,1	78,6±0,1	78,1±0,9	78,1±1	73,9±0,2
Gadodiamide	78,7±0,6	78,4±0,6	77,8±0,1 ^(a) 0,7±0,04 ^(b)	77,3±0,07 ^(a) 0,7±0,1 ^(b)	80,0±0,1 ^(a)

(a), dati relativi alla prima frazione raccolta (gadodiamide); (b), dati relativi alla seconda frazione raccolta (impurezza)

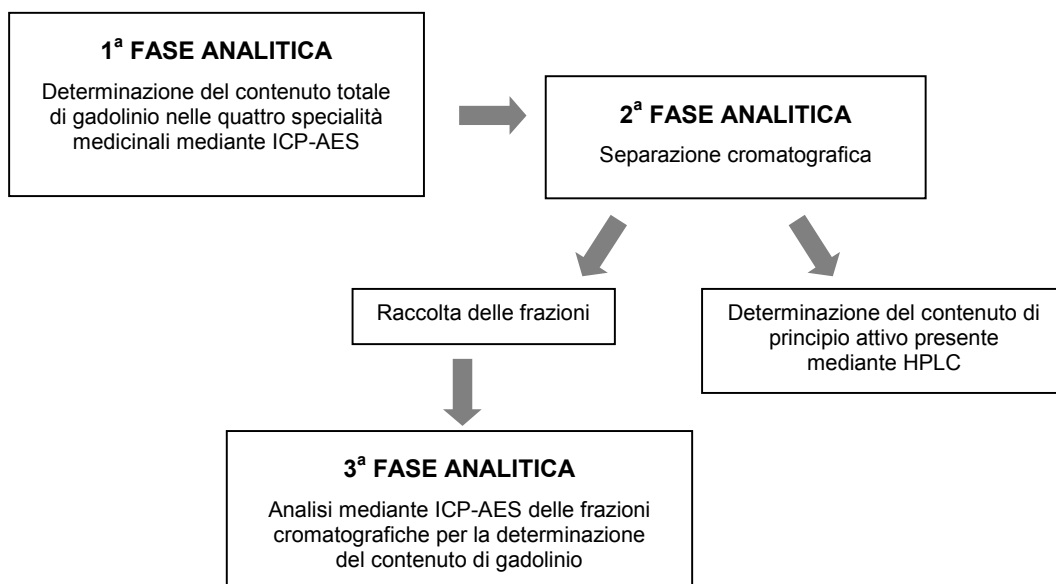


Figura 12. Schema analitico per l'analisi di specialità farmaceutiche a base di Gd

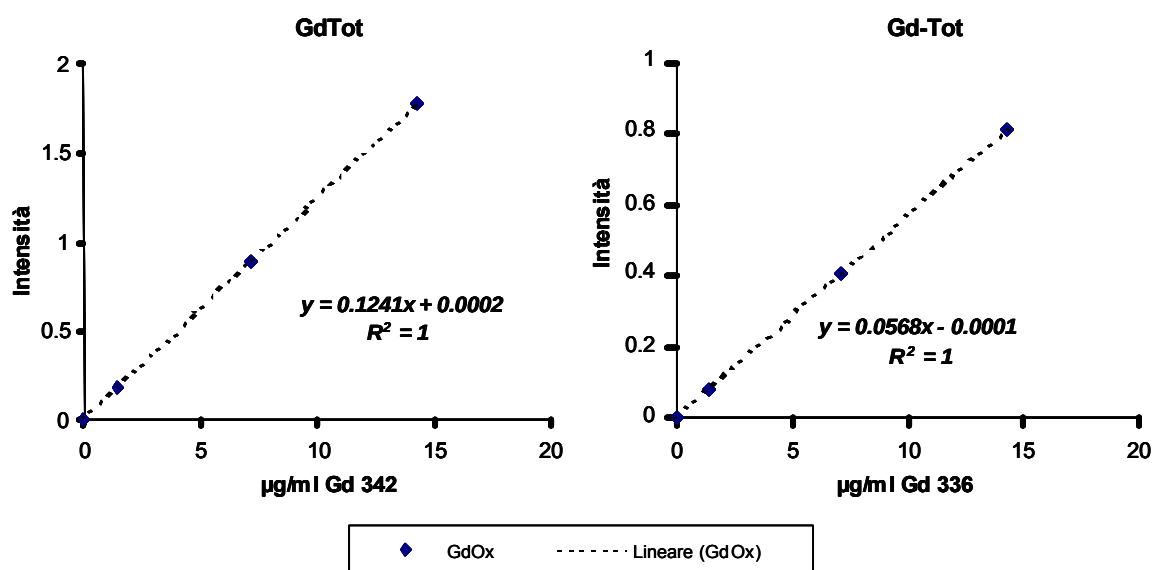


Figura13. Rette di calibrazione ICP-AES con Gd_2O_3

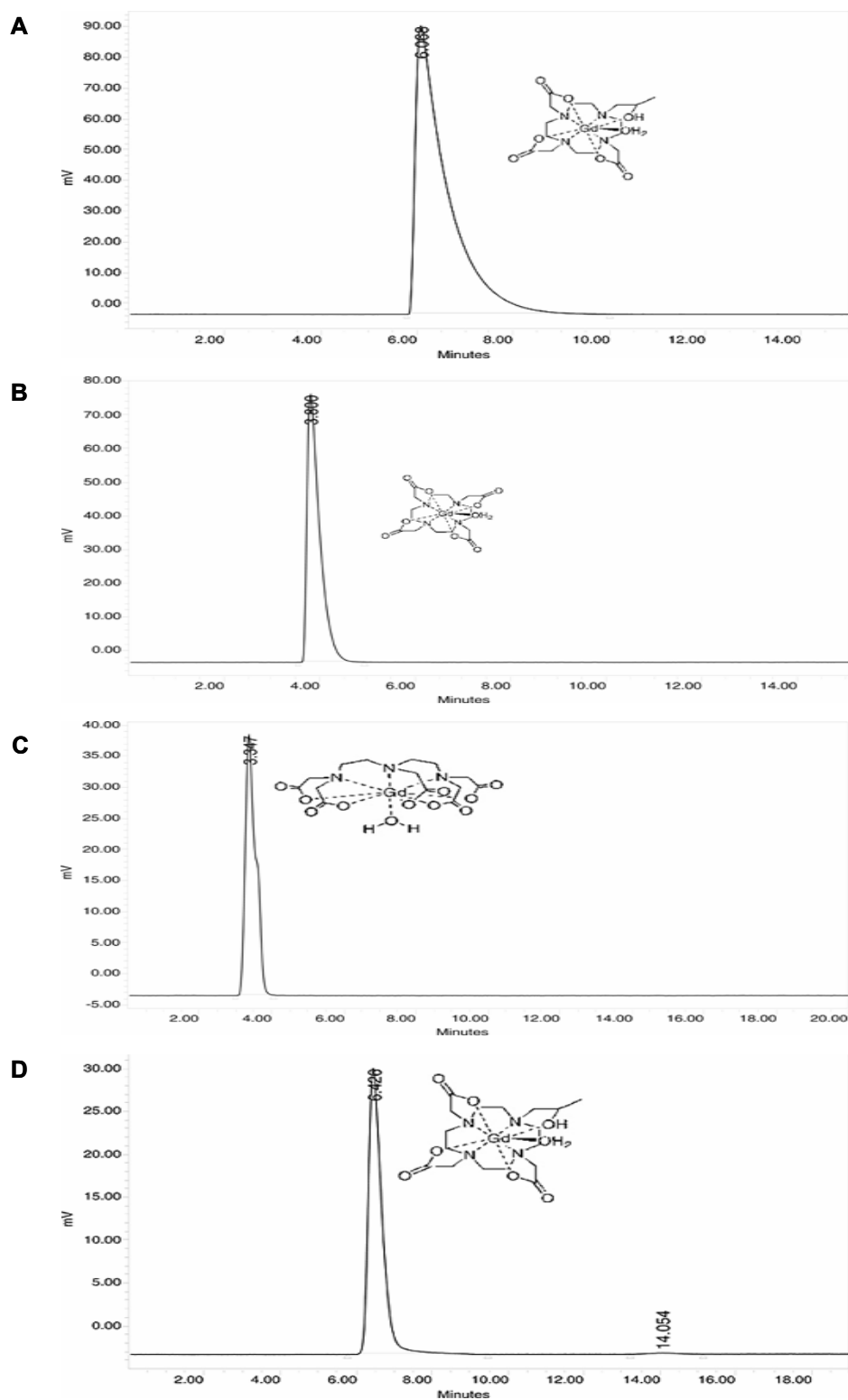


Figura 14. Cromatogrammi di: (A) Gd-HPDO3A, (B) Gd-DOTA, (C) Gd-DTPA, (D) Gadodiamide

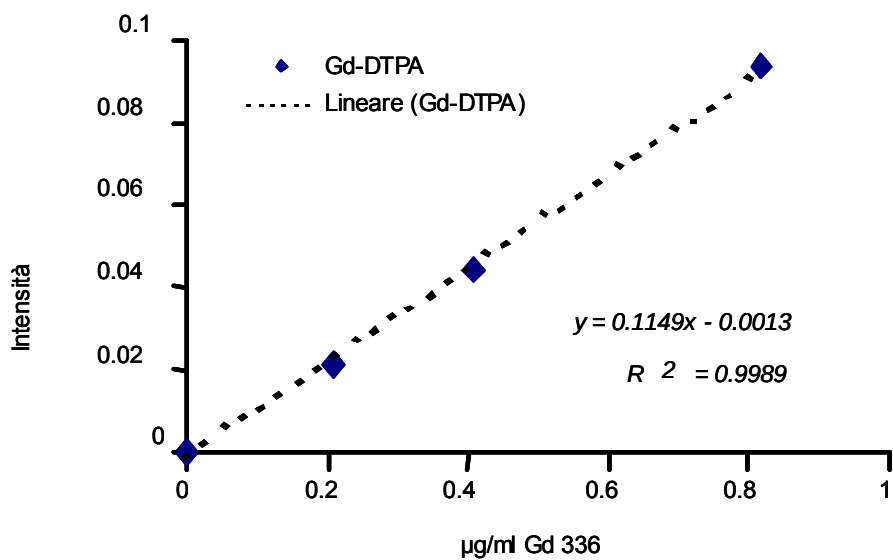


Figura 15. Analisi ICP-AES frazioni acido gadopentetico

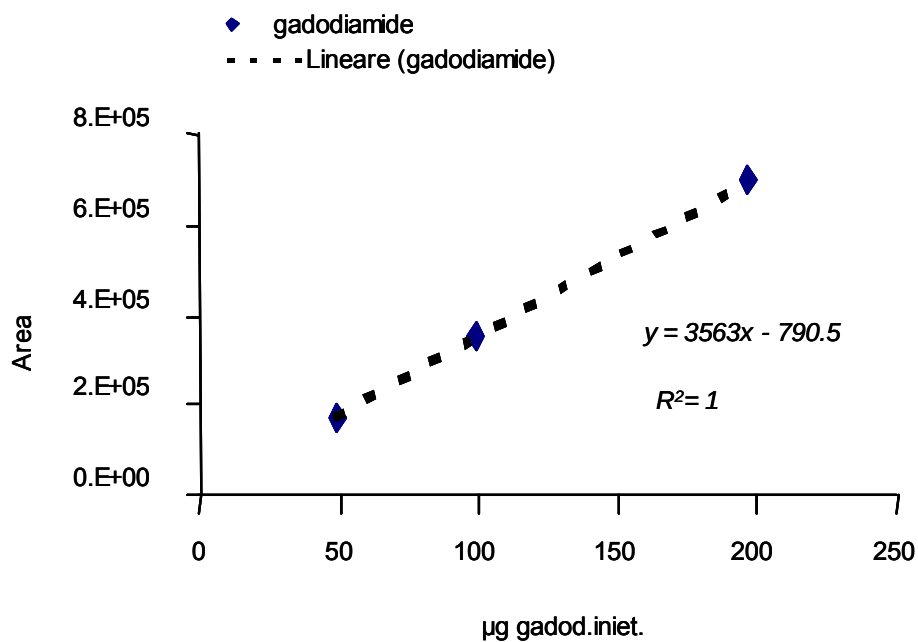


Figura 16. Analisi HPLC gadodiamide

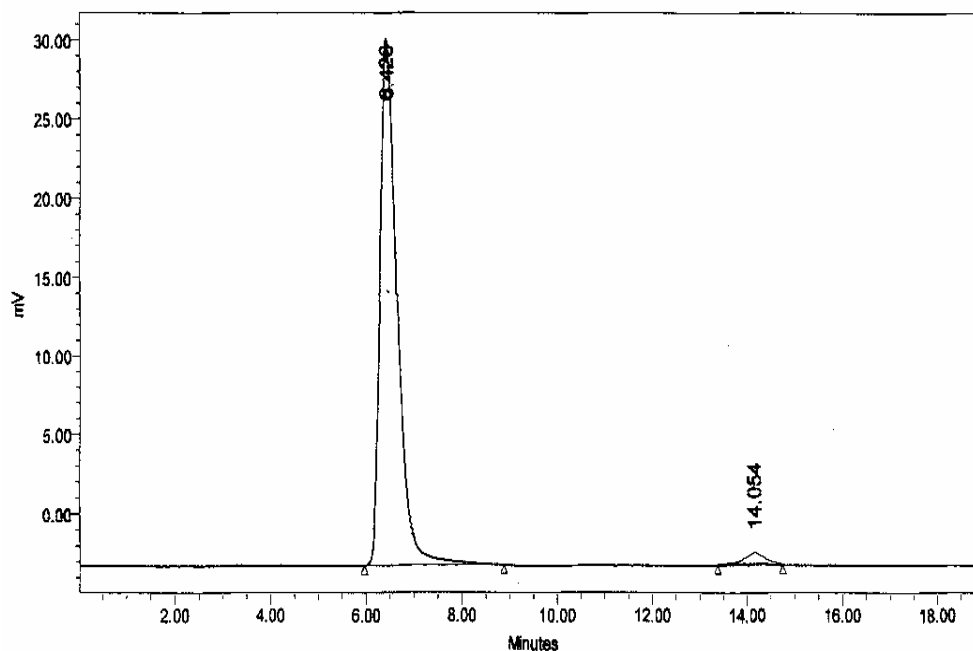


Figura 17. Cromatogramma di una specialità farmaceutica contenente gadodiamide

Conclusioni

Gli studi sulla speciazione contribuiscono enormemente alla comprensione delle interazioni tra elementi con l'ambiente e con gli organismi viventi. Si deve tuttavia tendere, sulla base dell'esperienza, a migliorare le tecniche operative tramite:

- l'approntamento di procedure affidabili sia per la speciazione diretta che per i metodi combinati;
- un aumento della disponibilità di materiali e prodotti di elevata purezza per poter arginare la contaminazione nei metodi combinati.

Rimane, comunque, non del tutto risolto il rischio di contaminazione durante tutto il processo analitico a causa delle grandi quantità di reagenti che vengono a contatto con i campioni. È inoltre auspicabile un incremento della produzione di materiali di riferimento certificati anche per le specie chimiche presenti nelle matrici biologiche al fine di ottenere una sempre maggiore accuratezza delle determinazioni analitiche.

OTTIMIZZAZIONE DI METODI DI ANALISI MULTIVARIATA MEDIANTE IL DISEGNO SPERIMENTALE

Maria Carla Gennaro, Valentina Gianotti

Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Alessandria

Pianificazione degli esperimenti

Lo scopo della teoria del disegno sperimentale è quello di effettuare il minor numero possibile di esperimenti ottenendo al tempo stesso la massima quantità e qualità di informazione.

Se gli esperimenti non sono adeguatamente progettati, può risultare del tutto inutile aver effettuato gli esperimenti. Si dimostra inoltre che è possibile scindere l'incertezza sulle conclusioni tratte dall'analisi dei risultati in due contributi di cui uno, *l'errore puramente sperimentale*, è una caratteristica del sistema studiato (per esempio è l'errore sperimentale di una procedura analitica) mentre l'altro è principalmente dovuto al modo in cui sono stati progettati gli esperimenti. Quindi mentre l'errore sperimentale è subito dallo sperimentatore, il contributo all'incertezza della risposta stimata, dovuto a come è stata effettuata la sperimentazione, può essere minimizzato scegliendo in modo opportuno gli esperimenti da effettuare.

Molto spesso ricavare relazioni causa-effetto significa calcolare dei modelli di regressione, cioè delle espressioni matematiche in cui la risposta è descritta da un'equazione in funzione dei parametri descrittivi del sistema. A questo proposito, è importante evidenziare che pianificare bene gli esperimenti non significa che si potrà poi necessariamente calcolare un buon modello di regressione ($R^2 \cong 1$). Se gli esperimenti vengono progettati male, il modello calcolato, pur avendo un ottimo R^2 potrebbe non avere alcun significato fisico (modello non affidabile).

Il primo passo consiste nella costruzione di uno schema concettuale del sistema che si sta studiando che si articola nei seguenti punti:

- definizione delle *funzioni risposta*, cioè di quei parametri sperimentali che rappresentano l'obiettivo del problema, come ad esempio la resa di un impianto, la purezza del prodotto ottenuto, il suo costo, ecc.;
- definizione degli obiettivi riferiti alle funzioni risposta scelte, per esempio massimizzare la resa, minimizzare il costo, ecc.;
- definizione dei vincoli eventuali cui alcune funzioni risposta potrebbero dover sottostare, per esempio: massimizzare l'attività antivirale di una molecola mantenendone la tossicità al di sotto di una certa soglia;
- analisi del sistema studiato (apparecchiatura, metodo, prodotto, molecola, formulazione, ecc.) nel tentativo di valutare quali siano i fattori sperimentali che possono influenzare le risposte considerate. In questa fase è importante porsi senza pregiudizi nei confronti del problema, poiché un preconconcetto relativamente ad una variabile ritenuta (a torto) non rilevante può rendere vana tutta la sperimentazione successiva;
- scelta del dominio sperimentale da studiare per ciascun fattore scelto precedentemente. Per esempio un intervallo di temperatura da 0°C a 50°C, un intervallo di pressione da 1 a 10 atm, ecc. La scelta del dominio sperimentale è particolarmente critica in quanto questo non deve essere né troppo piccolo, in quanto si correrebbe il rischio di non riuscire ad

osservare una variazione significativa delle risposte, né troppo largo, tanto da consentire dei cambiamenti troppo drastici del meccanismo che sottende al funzionamento del sistema investigato.

Esecuzione degli esperimenti

Questa fase consiste nella realizzazione pratica degli esperimenti. È chiaro che l'unico modo in cui si può agire su questa fase consiste nel cercare di mantenere le operazioni più standardizzate possibile. La valutazione dell'errore sperimentale è un passo fondamentale, preliminare a qualsiasi studio, in quanto consente di stabilire la significatività delle variazioni osservate in funzione delle variazioni che possono subire i fattori. Se l'errore sperimentale risulta essere dello stesso ordine di grandezza delle variazioni attese che ci si aspettano nelle risposte, allora bisogna ripetere la fase dell'analisi del problema e della valutazione delle ampiezze delle variabili, oppure in alternativa controllare il metodo di misura.

Trattamento statistico dei dati e analisi dei risultati

Questa fase consiste nel calcolo di un modello di regressione che correli i fattori sperimentali alle risposte di interesse. La Regressione Lineare Multipla (MLR), chiamata nella letteratura più recente *Ordinary Least Square* (OLS), è sufficiente, nella maggior parte dei casi, ad ottenere i risultati necessari. matematizzabile o matematizzata.

Il modello di regressione fornisce, attraverso i coefficienti delle variabili, le informazioni necessarie a valutare l'importanza dei fattori nel modellare il comportamento del sistema. Per esempio, i fattori caratterizzati da un coefficiente molto grande (in valore assoluto), sono generalmente i fattori più rilevanti nel modellare la risposta misurata e quindi i fattori su cui puntare l'attenzione. Il tener conto del segno fornisce un'ulteriore informazione circa la variazione della risposta. Un coefficiente positivo indica che la risposta tende ad aumentare se il fattore corrispondente viene aumentato (e viceversa).

Inoltre, attraverso opportune valutazioni (per esempio mediante l'analisi dei residui) si può stabilire se sia necessario introdurre termini non lineari o di interazione per migliorare il modello stesso, se siano stati considerati tutti i fattori sperimentali rilevanti, se vi siano anomalie di comportamento del sistema o di distribuzione dell'errore sperimentale nel dominio sperimentale.

I risultati possono portare ad un cambiamento degli obiettivi originali ovvero delle risposte da prendere in considerazione, in quanto, per esempio, si può scoprire che alcune di queste non sono indipendenti l'una dall'altra, che non variano in modo significativo o che non rispecchiano completamente le esigenze dello sperimentatore rispetto al processo studiato.

Come regola generale si suggerisce di dedicare al primo ciclo di screening delle variabili non più del 25% del budget disponibile, in modo che vi sia spazio per un'accurata fase di affinamento del modello ed ottimizzazione del sistema.

Metodi di pianificazione

I metodi di pianificazione degli esperimenti si possono suddividere in due grandi categorie: i metodi continui (Disegno Fattoriale, Disegni compositi) e quelli discontinui (*Simplex*, *Steepest Ascent*).

La pianificazione continua si realizza principalmente col metodo di ottimizzazione delle curve di risposta. Consiste nel progettare gli esperimenti e nell'eseguirli tutti, prima di analizzare il risultato ottenuto. Consente generalmente di ottenere una maggior conoscenza e comprensione del sistema studiato e viene utilizzata anche in casi in cui il fine non è costituito dall'ottimizzazione della risposta del sistema, bensì dalla ricerca di relazioni causa-effetto per comprenderne il funzionamento.

La pianificazione discontinua rappresenta di per sé un insieme di tecniche di ottimizzazione in cui dopo aver eseguito ciascun esperimento, o piccolo gruppo di esperimenti, si esegue un'analisi dei risultati ottenuti e l'esperimento successivo viene scelto sulla base di quanto ottenuto al passo precedente. Le tecniche appartenenti a questa categoria hanno come fine precipuo l'ottimizzazione e non consentono di razionalizzare il comportamento del sistema.

Metodi di pianificazione continua

I metodi di pianificazione sperimentale continua si suddividono ulteriormente in: a) piani sperimentali del primo ordine e b) piani sperimentali di ordine superiore al primo.

I primi consentono di costruire nel modo più economico possibile dei modelli del primo ordine. Vengono utilizzati spesso nelle prime fasi del ciclo di risoluzione del problema quando le conoscenze sono scarse ed i fattori sperimentali molti. In fasi successive, spesso, una volta eliminati i fattori ritenuti meno rilevanti, viene rimosso il vincolo di linearità e si impiegano piani sperimentali che consentano di calcolare modelli più complessi, cioè modelli matematici che possano adeguarsi meglio al vero comportamento del sistema.

Come visto ciò che si desidera ottenere applicando le tecniche del disegno sperimentale è di effettuare il minor numero possibile di esperimenti che contengano la massima quantità di informazione; il conseguimento di questi obiettivi, però presuppone di non commettere alcuni errori, quali quelli legati a:

- *Collinearità*. Se vi è un'elevata collinearità nelle variabili indipendenti non è possibile calcolare un modello di regressione stabile.
- *Clusterizzazione*. Questa seconda situazione pericolosa si incontra quando gli esperimenti sono divisi in gruppi. La clusterizzazione degli esperimenti porta ad una degenerazione del numero di gradi di libertà del sistema. È intuitivo che in presenza di due gruppi compatti di punti, è come se in realtà esistessero soltanto due punti, per i quali, per esempio, passerà sempre una retta. Quando ci si trova in questa situazione, è meglio scindere lo studio in due fasi in cui si calcola un modello per ciascun gruppo presente, oppure si devono scegliere meglio gli esperimenti in modo da poter trarre delle conclusioni più generali.
- *Disomogeneità di campionamento*. Le situazioni problematiche viste precedentemente sono dei casi particolari di campionamento disomogeneo dello spazio sperimentale. Questo caso si riferisce in particolare alla presenza di larghe zone nel dominio sperimentale in cui non sono stati fatti esperimenti.

Disegni fattoriali completi

Lo scopo dei disegni fattoriali è di poter stimare il più correttamente possibile quale possa essere l'influenza sulla risposta della variazione di ciascun fattore in presenza, ma indipendentemente, dal cambiamento di altri fattori e l'influenza della variazione contemporanea ed indipendente di due o più fattori. Con i disegni fattoriali tutti questi effetti possono essere determinati indipendentemente gli uni dagli altri.

Nei disegni fattoriali completi ciascun fattore viene investigato a livelli fissi e si effettuano gli esperimenti ottenuti da tutte le possibili combinazioni di valori ammessi per ciascuna variabile. Questo significa che in generale il numero di esperimenti è uguale a K^n con K numero dei livelli investigati e n numero di variabili considerate.

Il modo in cui vengono effettuati gli esperimenti fa sì che ciascuna risposta sperimentale venga utilizzata più di una volta in diverse combinazioni con le altre per il calcolo di:

- risposta media;
- effetti principali (effetti dei fattori originali);
- effetti delle interazioni a due fattori (cioè gli effetti di sinergia o antagonismo tra due fattori);
- effetti delle interazioni a tre fattori (cioè gli effetti di sinergia o antagonismo tra tre fattori).

La matrice sperimentale per un disegno fattoriale completo da 1 a 5 fattori è riportata in Tabella 1; i segni + e – si riferiscono al valore più alto e a quello più basso del range di variazione delle variabili.

Tabella 1

X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
-	-	-	-	-
+	-	-	-	-
-	+	-	-	-
+	+	-	-	-
-	-	+	-	-
+	-	+	-	-
-	+	+	-	-
+	+	+	-	-
-	-	-	+	-
+	-	-	+	-
-	+	-	+	-
+	+	-	+	-
-	-	+	+	-
+	-	+	+	-
-	+	+	+	-
+	+	+	+	-
-	-	-	-	+
+	-	-	-	+
-	+	-	-	+
+	+	-	-	+
-	-	+	-	+
+	-	+	-	+
-	+	+	-	+
+	+	+	-	+
-	-	-	+	+
+	-	-	+	+
-	+	-	+	+
+	+	-	+	+
-	-	+	+	+
+	-	+	+	+
-	+	+	+	+
+	+	+	+	+

Randomizzazione

Al fine di poter trattare i risultati degli esperimenti con le tecniche statistiche l'errore sperimentale dovrebbe risultare indipendente dalle variazioni introdotte nei fattori durante la sperimentazione; i fattori che producono l'errore sperimentale dovrebbero essere indipendenti gli uni dagli altri e l'errore sperimentale dovrebbe essere costante nell'ambito del dominio sperimentale considerato. Spesso i sistemi studiati possono essere influenzati da perturbazioni casuali e che conducono ad errori sistematici; inoltre si possono originare effetti *memori*, per cui il risultato di un esperimento è influenzato dai risultati degli esperimenti precedenti. Il rischio di avere effetti indesiderati di questo genere può essere notevolmente limitato effettuando quella che viene chiamata *randomizzazione* degli esperimenti. Questa procedura implica la scelta casuale dell'ordine in cui devono essere effettuati gli esperimenti.

Calcolo dell'effetto dei fattori

I disegni fattoriali consentono di calcolare in modo molto semplice l'effetto dei fattori. Questo deriva dal fatto che i fattori presenti nella matrice sperimentale sono ortogonali gli uni agli altri, sono cioè indipendenti tra di loro. Supponiamo che siano stati effettuati gli esperimenti riportati nelle Tabelle 2 e 3.

Tabella 2

Esperimento	X ₁	X ₂	X ₃	Y
1	-1	-1	-1	40
2	+1	-1	-1	64
3	-1	+1	-1	28
4	+1	+1	-1	56
5	-1	-1	+1	24
6	+1	-1	+1	86
7	-1	+1	+1	10
8	+1	+1	+1	80

Tabella 3

Fattori	-	+
Temperatura x ₁	100°C	200°C
Pressione x ₂	1 atm	10 atm
Catalizzatore x ₃	A	B

Per maggiore chiarezza della spiegazione supponiamo che X₁ sia la temperatura, X₂ la pressione ed X₃ il tipo di catalizzatore utilizzato in un impianto chimico, mentre Y è la resa nel prodotto (Tabelle 2 e 3). Per prima cosa calcoliamo la risposta media che otterremo come media delle 8 risposte ottenute: $(40+64+28+56+24+86+10+80)/8 = 48,5$.

Passiamo ora al calcolo dell'effetto dei fattori che definiamo come il cambiamento che viene indotto nella risposta per una variazione del fattore considerato dal valore minimo (-) al valore massimo (+).

Le prime due righe del piano sperimentale corrispondono a due esperimenti che differiscono soltanto per il valore di temperatura a cui viene fatto funzionare l'impianto: quindi dalla differenza fra la resa dell'esperimento 2 (Y₂) e la resa dell'esperimento 1 (Y₁) si può stimare

l'effetto che ha la variazione di temperatura sulla resa, indipendentemente dagli altri fattori che restano invariati.

Anche nel caso della seconda coppia di esperimenti tra i due esperimenti cambia soltanto il valore della temperatura, mentre gli altri due fattori restano costanti.

Quindi dalla differenza delle risposte per questi due esperimenti si ottiene la stima dell'effetto che ha il cambiamento di temperatura sulla resa dell'impianto. Si noti che in questo caso il valore assunto dagli altri due fattori, pressione e catalizzatore, è diverso rispetto alla prima coppia di esperimenti.

Stime analoghe dell'effetto della temperatura sulla resa si possono ottenere considerando a due a due gli altri esperimenti della tabella. La differenza fra le quattro stime dell'effetto della temperatura sulla resa è dovuta al fatto che sono state ottenute in condizioni di volta in volta costanti nell'ambito della coppia di esperimenti, ma diverse da coppia a coppia, degli altri fattori. Quindi, nell'ipotesi che l'effetto della temperatura sia indipendente da quello degli altri fattori, ipotesi da verificare successivamente, si può calcolare un effetto medio della temperatura come se fossero state effettuate 4 coppie di esperimenti in cui veniva variata soltanto la temperatura (Tabella 4).

Tabella 4

Misura individuale dell'effetto del cambiamento di temperatura	Pressione	Catalizzatore
$Y_2 - Y_1 = 64 - 40 = 24$	1	A
$Y_4 - Y_3 = 56 - 28 = 28$	10	A
$Y_6 - Y_5 = 86 - 24 = 62$	1	B
$Y_8 - Y_7 = 80 - 10 = 70$	10	B
Effetto medio = 46		

Si può vedere come la stima dell'effetto della temperatura sia stata calcolata dalla somma di 4 differenze. È come se si fossero effettuate 8 misure di cui 4 al valore alto e 4 al valore basso di questo fattore.

L'effetto medio della temperatura nel caso dell'impianto studiato è 46, il che significa che un cambiamento della temperatura da 100°C a 200°C causa mediamente un aumento del 46% della resa dell'impianto. Tutto questo è stato calcolato senza tener conto del fatto che l'effetto della temperatura potrebbe essere diverso in condizioni sperimentali diverse degli altri fattori, cosa che, come si può intuire osservando la tabella precedente, accade proprio in questo caso. Infatti il valore stimato dell'effetto della temperatura è nettamente più alto quando si usa il catalizzatore B. Questo significa che l'interazione fra la temperatura ed il catalizzatore è significativa, ma vedremo tra breve come si può determinare con facilità l'effetto delle interazioni. Allo stesso modo si possono calcolare gli effetti degli altri fattori.

Prima di passare a studiare più in dettaglio le interazioni, ribadiamo ancora una volta che gli effetti principali dei fattori sono stati stimati attraverso la differenza fra 4 coppie di risposte e quindi ciascun effetto è stato determinato con la precisione di 4 repliche delle coppie di esperimenti. Inoltre, per il calcolo degli effetti di ciascun fattore sono stati utilizzati tutti gli esperimenti.

Vediamo ora come si stimano gli effetti di interazione fra i fattori. Partendo dalla tabella utilizzata per la stima degli effetti principali, studiamo l'effetto dell'interazione tra temperatura e catalizzatore. Questo effetto viene stimato come media dalle differenze calcolate per il catalizzatore B (62, 70 con un effetto medio di 66) ed il catalizzatore A (24, 28 con un effetto medio di 26). Una misura dell'interazione della temperatura col catalizzatore si può ottenere

dalla semi-differenza fra i due effetti medi della temperatura per i due catalizzatori. Per convenzione se T rappresenta la temperatura e C il catalizzatore, la loro interazione si indica con TxC o TC ed il suo effetto in questo caso vale 20.

Come era accaduto nel caso del calcolo degli effetti principali, anche il calcolo dell'effetto delle interazioni implica l'utilizzo di tutti gli esperimenti effettuati. Infatti questo calcolo, che è stato effettuato utilizzando le differenze che erano già state impiegate per determinare gli effetti principali, porta ai risultati riportati in Tabella 5.

Tabella 5

Catalizzatore	Effetto medio della temperatura
(+) B	$66 = (62+70)/2 = (Y_6-Y_5+Y_8-Y_7)/2$
(-) A	$26 = (24+28)/2 = (Y_2-Y_1+Y_4-Y_3)/2$
	differenza = $40/2 = 20$

In modo analogo a quanto fatto per la temperatura ed il catalizzatore si possono calcolare le altre interazioni ed in questo caso si ottiene:

$$\begin{aligned} \text{TxP} &= 3 = (Y_1+Y_4+Y_5+Y_8-Y_2-Y_3-Y_6-Y_7)/4, \\ \text{Px C} &= 0 = (Y_1+Y_2+Y_7+Y_8-Y_3-Y_4-Y_7-Y_8)/4. \end{aligned}$$

Per calcolare l'interazione a 3 fattori, TxPx C, consideriamo nuovamente la stima dell'interazione Tx C. Sono disponibili due differenze che portano a stime di questa interazione in condizioni diverse di pressione. Notiamo infatti che nell'espressione scritta sopra per Tx C:

$$\text{Tx C} = (Y_6-Y_5+Y_8-Y_7)/4 - (Y_2-Y_1+Y_4-Y_3)/4$$

si ha che, delle 4 differenze di coppie di risposte che forniscono una stima dell'interazione TC:

$$\begin{aligned} (Y_8-Y_7) \text{ e } (Y_4-Y_3) &\text{ rappresentano esperimenti effettuati a } P = +, \\ (Y_6-Y_5) \text{ e } (Y_2-Y_1) &\text{ rappresentano esperimenti effettuati a } P = -. \end{aligned}$$

Calcolando la differenza fra i due valori stimati dell'interazione Tx C nelle due condizioni di pressione, possiamo ottenere una stima dell'interazione che coinvolge tutte e tre i fattori, cioè di come Tx C si comporta in funzione della variazione di pressione. In questo caso particolare si ottiene:

$$\begin{aligned} ((Y_8-Y_7) - (Y_4-Y_3))/2 &= ((80-10) - (56-28))/2 = 24, \\ ((Y_6-Y_5) - (Y_2-Y_1))/2 &= ((86-26) - (64-40))/2 = 18 \end{aligned}$$

e, per convenzione, il valore dell'interazione TxPx C, chiamata anche *interazione a tre fattori*, è definita come la semi-differenza tra i due valori ottenuti sopra. Quindi l'effetto di questa interazione in questo caso è 3.

Metodi rapidi per il calcolo degli effetti

Un metodo più rapido per il calcolo degli effetti dei fattori prende il nome di *algoritmo di Yates*. Per utilizzare questo metodo, la matrice sperimentale deve essere scritta disponendo gli esperimenti nell'ordine standard descritto precedentemente.

Convieni, per chiarezza, illustrare l'utilizzo dell'algoritmo di Yates con un esempio. Consideriamo quindi nella Tabella 6 il nostro impianto chimico.

Tabella 6

T	P	C	Y	(1)	(2)	(3)	Divisore	Effetto	Fattore
-	-	-	40	104	188	388	8	48,5	media
+	-	-	64	84	200	184	4	46	T
-	+	-	28	110	52	-40	4	10	P
+	+	-	56	90	132	12	4	3	TP
-	-	+	24	24	-20	12	4	3	C
+	-	+	86	28	-20	80	4	20	TC
-	+	+	10	62	4	0	4	0	PC
+	+	+	80	70	8	4	4	1	TPC

Viene qui presentata la tabella che deve essere costruita secondo l'algoritmo di Yates. Le risposte vengono utilizzate a coppie e la colonna (1) si ottiene dalla colonna Y nel seguente modo: la prima metà di valori (4 in questo caso) si ottiene dalla somma dalle 4 coppie di risposte, prese nell'ordine (40+64, 28+56, 24+86, 10+80); le rimanenti 4 cifre si ottengono come differenza delle 4 coppie di risposte, sottraendo per ciascuna coppia il primo termine dal secondo (64-40, 56-28, 86-24, 80-10).

La colonna (2) si ottiene dalla colonna (1) operando allo stesso modo e discorso analogo vale per la colonna (3), partendo dalla colonna (2). In questo caso particolare, ci si ferma alla terza colonna poiché il numero di fattori considerati nel disegno fattoriale completo è 3. In generale si devono calcolare tante colonne quante sono le variabili del disegno fattoriale completo.

Il risultato che si ottiene nella colonna 3, diviso per il divisore, uguale alla metà del numero di esperimenti, fatta eccezione per il termine che corrisponde alla media, che viene diviso per il numero totale di esperimenti effettuati. Il risultato corrisponde alla stima dell'effetto (identificato come descritto nel paragrafo riguardante le diverse rappresentazioni dei disegni fattoriali a due livelli) considerando i fattori che compaiono con segno positivo in ciascun esperimento.

Questo modo di effettuare il calcolo degli effetti dei fattori è veramente molto rapido, anche rispetto alla tecnica della matrice dei segni.

Regressione lineare multipla

Con l'avvento dei computer, però, si tende sempre di più ad effettuare il calcolo dei fattori in modo diverso; infatti, il disegno fattoriale può essere utilizzato per calcolare un modello di regressione col metodo dei minimi quadrati lineari. Per far questo è sufficiente utilizzare la matrice dei fattori codificati (scalati) a ± 1 .

Consideriamo il solito esempio dell'impianto chimico con tre fattori x_1 , x_2 , x_3 . Il modello di regressione che si calcolerà, al fine di tener conto dell'intercetta (media), degli effetti principali e di tutte le interazioni, sarà del tipo:

$$y = c_0 + c_1x_1 + c_2x_2 + c_3x_3 + c_{12}x_1x_2 + c_{13}x_1x_3 + c_{23}x_2x_3 + c_{123}x_1x_2x_3$$

Interpretazione dei risultati

Torniamo dunque alla tabella che contiene gli effetti calcolati per i fattori e le loro interazioni dell'esempio prima considerato:

T = 46
P = -10
C = 3

TP = 3
TC = 20
PC = 0

T PC = 1
Media = 48,5

Un'interpretazione intuitiva si può fare considerando il valore ed il segno degli effetti principali, cioè degli effetti dei fattori originali. Il significato che si può attribuire a questi effetti è relativo a quello che è l'errore sperimentale. Infatti, un effetto come quello della pressione potrebbe essere considerato significativo se l'errore sperimentale fosse molto piccolo (cioè in caso di misure molto riproducibili). Supponiamo che in questo caso, attraverso l'esecuzione di alcune repliche si sia trovato un errore sperimentale pari a 2,5: risulterebbero di conseguenza sicuramente significativi gli effetti di T, di P e dell'interazione TC.

Consideriamo T, che presenta l'effetto più vistoso. Come già visto sembra che globalmente un incremento della temperatura abbia l'effetto di far aumentare la resa dell'impianto. Tuttavia si deve fare molta attenzione alle interazioni, poiché non è corretto interpretare direttamente l'influenza sulla risposta di un fattore che è coinvolto anche in interazioni significative con altri fattori. L'esistenza di un'interazione significativa tra la temperatura ed il tipo di catalizzatore suggerisce che questo fattore venga sottoposto ad un'ulteriore analisi in modo da chiarire esattamente il ruolo che gioca.

Una volta stabilito che l'interazione fra la temperatura ed il catalizzatore è significativa, si può costruire la seguente tabella a due vie (Tabella 7) che si ottiene direttamente dalla tabella degli esperimenti calcolando, per ciascun elemento di questa matrice, la media della risposta per gli esperimenti che soddisfano i requisiti di temperatura e catalizzatore.

Tabella 7

T(+)	60	83
T(-)	34	17
	C(-)	C(+)

La tabella consente di effettuare un'analisi accurata del significato dell'interazione TC: infatti, considerando l'effetto medio della temperatura per il catalizzatore A (C(-)), si ha che quando il catalizzatore è A, il passaggio da 100°C a 200°C causa un aumento del 26% della resa. Invece, quando il catalizzatore è B, la stessa variazione di temperatura causa una variazione della resa del 66%. La temperatura influenza in modo diverso la risposta, a seconda del catalizzatore utilizzato.

La tabella può essere interpretata anche privilegiando il catalizzatore e considerando quale variazione viene causata dal cambiamento di catalizzatore alle due diverse temperature. Operando in questo modo si osserva che alla temperatura più bassa, il passare dal catalizzatore A al catalizzatore B causa una diminuzione della resa del 17%, mentre alla temperatura più alta si ha un aumento della resa del 23%. Quindi addirittura, a seconda della temperatura, l'effetto del catalizzatore può invertire il segno. Per quanto riguarda l'effetto della pressione, invece, non essendo questa coinvolta in interazioni significative, si può far riferimento all'effetto principale.

Quindi un'interpretazione globale del risultato ottenuto, per l'esempio considerato, può essere:

- la temperatura agisce in modo diverso a seconda del catalizzatore che si utilizza. Sembra che il catalizzatore B sia più interessante in quanto permette di ottenere rese più alte; si suggerisce quindi di continuare la sperimentazione utilizzando il catalizzatore B con temperature più alte;
- la pressione ha un effetto tale per cui un suo incremento conduce ad una diminuzione della resa, per cui si può tentare di ottimizzare il sistema operando a pressioni più basse.

Determinazione degli effetti rilevanti

Una volta calcolati gli effetti dei fattori, lo scopo successivo, come visto, consiste nello stabilire quali di questi siano significativamente diversi da 0. Questo porta a definire quali fattori o interazioni contribuiscano a modellare la funzione risposta. La determinazione degli effetti rilevanti può essere fatta attraverso un confronto dell'effetto calcolato con l'errore sperimentale, o meglio, con l'incertezza sulla stima dell'effetto. Questo confronto può venire eseguito in modo rigorosamente statistico mediante un t test in cui la distribuzione t di riferimento avrà un numero di gradi di libertà pari al numero di gradi di libertà utilizzati per la stima dell'errore dell'effetto ed una varianza pari alla varianza dell'effetto stesso.

Operando in questo modo si può stabilire, al livello di confidenza desiderato, se il valore di un effetto sia significativamente diverso da 0. Il test si esegue nel modo consueto, confrontando il valore dell'effetto con:

$$t_{v,\alpha} s_b$$

dove t è il valore della t di Student per v gradi di libertà al livello di confidenza α ed s_b è l'errore stimato per l'effetto b . Se l'effetto ha un valore maggiore di quello di $t_{v,\alpha} s_b$, l'effetto stesso deve essere considerato significativo ad un livello di confidenza α .

Disegni fattoriali frazionari

Spesso quando si affronta lo studio di un sistema reale, il numero di fattori da considerare è elevato. In casi come questi, il numero di esperimenti richiesti per realizzare un disegno fattoriale completo diventa rapidamente troppo elevato al crescere del numero di variabili considerate. Per esempio, se 5 fattori richiedono 32 esperimenti, che in ottimizzazione di processo sono già troppi, 7 fattori ne richiederebbero 128. I disegni fattoriali completi richiedono tanti esperimenti perché consentono la valutazione dell'importanza anche delle interazioni di secondo ordine tra i fattori e di tutte le interazioni di ordine superiore al secondo fino all'interazione di tutti i fattori studiati tra loro. In natura, in realtà, è molto raro che un fenomeno sia influenzato da interazioni di ordine superiore al secondo. Questo significa che nei disegni fattoriali completi vi è ridondanza di informazione, almeno quando le interazioni di ordine superiore non sono significative.

Dalla duplice esigenza: a) di ridurre la ridondanza d'informazione dei disegni fattoriali completi e b) di ottenere comunque la massima informazione possibile effettuando però un numero inferiore di esperimenti rispetto a quanto richiesto dai fattoriali completi, nascono i disegni fattoriali frazionari.

Il fatto di non effettuare tutti gli esperimenti richiesti dal corrispondente disegno fattoriale completo, fa sì che non sia possibile ottenere tutta l'informazione che questo avrebbe contenuto, anche se, come si è visto, ci si può aspettare che una parte di questa informazione non sia utile.

I disegni fattoriali frazionari prevedono che si effettui una frazione $1/2$, $1/4$, $1/8$, ..., $1/2^p$ degli esperimenti richiesti da un disegno fattoriale completo, per cui il numero di esperimenti necessari è uguale a 2^{k-p} dove k è il numero di variabili studiate e p il grado della frazione.

Costruzione dei disegni fattoriali frazionari

Poiché i fattori e le loro interazioni sono ortogonali, sia i fattori che le interazioni sono indipendenti gli uni dagli altri. Ciò introduce un'importante possibilità: si può cioè associare ad una colonna della tabella dei segni corrispondente ad un'interazione una nuova variabile. Questo comporta il fatto che nell'analisi successiva non si possa più discernere l'effetto della nuova variabile da quello dell'interazione che ha sostituito; questo è un rischio calcolato che consente di ridurre il numero di esperimenti.

Per esempio, se consideriamo la tabella dei segni per il disegno fattoriale completo 2^2 (Tabella 8), la terza colonna corrispondente all'interazione x_1x_2 , completamente indipendente dalle altre due colonne di segni (x_1 e x_2), può essere sostituita con un nuovo fattore x_3 . Quindi ciascuna riga rappresenta ora un esperimento a 3 variabili anziché a 2 (x_1, x_2, x_3).

Tabella 8

x_1	x_2	x_1x_2
-	-	+
+	-	-
-	+	-
+	+	+

Inoltre, la sequenza dei segni che fornisce il valore dell'effetto di x_3 è identica alla sequenza dei segni che fornisce l'effetto dell'interazione x_1x_2 , quindi i due effetti sono indistinguibili. Il vantaggio è che, invece di effettuare gli 8 esperimenti di un disegno fattoriale completo a 3 fattori, se ne effettuano soltanto 4. Tale disegno frazionario viene abitualmente indicato con 2^{3-1} dove ovviamente $3-1$ cioè 2 indica il disegno fattoriale completo utilizzato come base, 3 è il numero totale di fattori principali studiati ed 1 è il numero di fattori addizionali che sono stati introdotti, nonché la frazione $1/2$ del disegno fattoriale completo che si sarebbe dovuto effettuare (infatti invece degli 8 esperimenti se ne fanno soltanto 4, cioè $1/2$ di 8).

Come visto quando si utilizza un disegno fattoriale frazionario in luogo dell'analogo disegno fattoriale completo l'effetto di alcune interazioni diventa indistinguibile da quello di alcuni fattori principali e di altre interazioni. È utile scrivere, a questo proposito, il quadro di confusione degli effetti (*confounding pattern*) che definisce quali effetti siano indistinguibili (la trattazione specifica non viene qui riportata).

Piani sperimentali per modelli più complessi

Quando lo scopo della sperimentazione si sposta dal puro studio di screening delle variabili all'ottimizzazione vera e propria, generalmente si rendono necessari modelli matematici che contengano anche i quadrati dei fattori sperimentali. In particolare si rendono necessari dei piani sperimentali caratterizzati dalla presenza di almeno 3 livelli per i fattori per i quali si ipotizza un andamento quadratico.

Il tipo di modello matematico più utilizzato in questa fase è il modello completo del secondo ordine. Questo tipo di modello è molto utile giacché, se da una parte consente una sufficiente flessibilità nell'adattarsi al comportamento locale della funzione risposta, dall'altra consente di operare su andamenti della funzione stessa in cui sia presente un massimo o un minimo. Quando il comportamento della funzione risposta è tanto complicato da non poter essere spiegato adeguatamente con un modello del secondo ordine, significa che probabilmente il dominio sperimentale investigato è troppo ampio.

Test di curvatura

Se sono stati utilizzati nella fase di screening i disegni fattoriali a 2 livelli ed avendo a disposizione una stima dell'errore sperimentale, attraverso l'esecuzione di alcune repliche dell'esperimento posto al centro del dominio sperimentale è possibile eseguire un test F per verificare la significatività della curvatura. In effetti, se il modello vero è costituito da un iperpiano, il valore della risposta media per gli esperimenti effettuati al centro del dominio sperimentale deve essere poco differente dal valore calcolabile come media delle risposte ottenute ai vertici del dominio sperimentale. Quindi si può costruire il seguente test:

$$F = \frac{(\bar{Y}_l - \bar{Y}_0)^2}{s^2 \left(\frac{1}{n_l} + \frac{1}{n_0} \right)}$$

dove i due valori di $\bar{Y}$ si riferiscono rispettivamente alla media delle risposte per gli esperimenti sui vertici ed al centro del disegno sperimentale, gli n sono rispettivamente il numero di esperimenti effettuati sui vertici ed al centro, mentre s^2 è il valore dell'errore sperimentale stimato. Questa stima può essere ottenuta direttamente da alcune repliche dell'esperimento centrale, oppure come varianza *pooled*, se anche gli esperimenti ai vertici sono stati replicati.

Se si ha che $F > F_{1,v,\alpha}$, cioè che il valore calcolato per F eccede il valore delle tabelle per 1, v gradi di libertà si può concludere che al livello di confidenza α considerato vi è una curvatura significativa del sistema in esame, una curvatura che non può essere ovviamente spiegata con il modello lineare utilizzato. Il numero di gradi di libertà, v , è il numero di gradi di libertà con cui viene determinato l'errore sperimentale ed è uguale a $n_0 - 1$ se le repliche vengono effettuate soltanto al centro del dominio, mentre vale $n_l + n_0 - n - 1$, (essendo n il numero di esperimenti del disegno sperimentale fattoriale) se si sono eseguite n_0 repliche dell'esperimento al centro ed uno stesso numero di repliche di ciascun esperimento del piano fattoriale. La curvatura presuppone che almeno uno dei coefficienti dei termini quadratici dell'ipotetico modello del secondo ordine sia significativamente diverso da 0, ma non può dare, ovviamente, alcuna informazione circa quale di questi coefficienti sia diverso da 0.

I disegni sperimentali più utilizzati quando si intenda calcolare un modello completo del secondo ordine sono i disegni compositi.

Piano a stella

Il piano a stella (*Star Design*) rappresenta l'approccio più simile al metodo tradizionale di studiare una variabile alla volta. Nella sua forma più semplice il dominio viene investigato eseguendo due esperimenti per ogni fattore sperimentale, uno a destra e l'altro a sinistra del centro, disposti simmetricamente rispetto a questo. Agli esperimenti lungo gli assi si aggiunge l'esperimento al centro che di solito viene replicato alcune volte per poter valutare l'errore sperimentale. A volte il dominio viene studiato con un disegno a stella asimmetrico.

Questo piano sperimentale consente il calcolo di un modello del secondo ordine senza interazioni. L'esistenza di 3 livelli per ogni fattore sperimentale in effetti permette di valutare la curvatura della funzione risposta.

Disegni centrali compositi

I disegni di questo tipo si ottengono aggiungendo agli esperimenti di un disegno fattoriale a due livelli completo o frazionario, gli esperimenti di un disegno a stella. Ricordiamo che nel disegno a stella si eseguono due esperimenti per ciascun fattore considerato, sull'asse del fattore. In questi due esperimenti si attribuisce un valore alto ed uno basso ($\pm\alpha$), simmetrici rispetto al centro del dominio sperimentale, al fattore considerato di volta in volta, mentre gli altri fattori sono mantenuti ad un valore intermedio. A questi esperimenti si aggiungono normalmente alcune repliche dell'esperimento centrale che servono per stimare l'errore sperimentale o per eseguire il test di curvatura descritto in precedenza.

I disegni compositi consentono di calcolare i coefficienti di modelli del secondo ordine completi o meno di tutte le interazioni fra i fattori principali, in funzione del tipo di disegno fattoriale utilizzato.

Nella pratica il piano sperimentale centrale composito è quello più utilizzato in quanto si può facilmente inquadrare in una strategia incrementale di acquisizione delle conoscenze. Infatti, se generalmente si inizia l'investigazione delle caratteristiche del sistema studiato mediante dei piani fattoriali frazionari o completi, diventa naturale una volta selezionati i fattori significativi, di continuare lo studio su questi integrando le informazioni già acquisite mediante un piano sperimentale a stella, ottenendo così proprio un piano centrale composito.

Metodi di ottimizzazione discontinui

Con le tecniche di pianificazione discontinua si esegue un numero minimo di esperimenti iniziali terminato il quale l'esperimento successivo viene scelto sulla base dei risultati sperimentali ottenuti precedentemente. Questa procedura che vede l'esecuzione di un solo, al più due, esperimenti ad ogni ciclo viene interrotta quando si trovano delle condizioni soddisfacenti, oppure quando viene soddisfatta una qualche regola di convergenza del metodo.

Mentre il calcolo del modello di regressione fornisce spesso delle informazioni funzionali su come si comporta il sistema studiato, permettendo di capire il ruolo giocato dai fattori sperimentali rilevanti, i metodi di pianificazione discontinua hanno come scopo fondamentale l'ottimizzazione del sistema e, se da un lato consentono di ottenere un rapido miglioramento rispetto alle condizioni operative di partenza (ove possibile), dall'altro spesso gli esperimenti che richiedono non si prestano al calcolo di un modello di regressione stabile.

Simplex

La tecnica del *simplex* è una delle varie tecniche di ottimizzazione che sono nate per la minimizzazione o massimizzazione di funzioni e sono state poi utilizzate anche per la pianificazione discontinua degli esperimenti. Questo metodo appartiene alla serie delle tecniche che si arrampicano lungo la direzione di massima pendenza, per cui soffre del problema degli ottimi relativi. Quindi, per poter sperare di ottenere il valore ottimale assoluto, si dovrebbe far partire il simplex da posizioni differenti del dominio sperimentale, confrontando poi i risultati ottenuti.

Grazie al fatto che la tecnica del simplex consente di spostarsi nel dominio sperimentale fino a localizzare la zona in cui probabilmente è localizzato l'ottimo, essa viene talvolta utilizzata proprio a questo scopo, specialmente in quei casi in cui si conosce veramente molto poco del problema che si sta affrontando.

Scelta del simplex iniziale

Per la generazione del simplex iniziale, qualsiasi struttura che non presenti degenerazione può andar bene infatti è stato dimostrato che il raggiungimento dell'optimum non dipende molto dall'orientazione iniziale del simplex.

Solitamente si sceglie una figura geometrica con $k+1$ vertici se k è il numero delle variabili. In generale la generazione del simplex iniziale avviene seguendo i valori riportati nella Tabella 9.

Tabella 9

Esperimento	x_1	x_2	x_3	...	x_k
1	0	0	0	0	0
2	a	b	b	b	b
3	b	a	b	b	b
4	b	b	a	b	b
...	b	b	b	a	b
$k+1$	b	b	b	b	a

Affinché i punti siano tutti alla stessa distanza unitaria l'uno dall'altro:

$$dist_{1j} = \sqrt{(a-0)^2 + (k-1)*(b-0)^2} = 1 \rightarrow a^2 + (k-1)b^2 = 1$$

$$dist_{ij} = \sqrt{(a-b)^2 + (b-a)^2 + (k-1)*(b-b)^2} = 1 \rightarrow 2(a-b)^2 = 1$$

da cui, risolvendo il sistema di due equazioni si ha:

$$a = \frac{1}{k\sqrt{2}} \left[k-1 + \sqrt{k+1} \right]$$

$$b = \frac{1}{k\sqrt{2}} \left[\sqrt{k+1} - 1 \right]$$

La Tabella 10 riporta a e b per vari valori del numero di fattori sperimentali:

Tabella 10

K	a	b
2	0,9658	0,2580
3	0,9478	0,2357
4	0,9256	0,2185
5	0,9121	0,2050
6	0,9011	0,1940
7	0,8918	0,1847
8	0,8839	0,1768

Se si desidera utilizzare una distanza tra i vertici diversa da 1,0 è sufficiente moltiplicare il valore di a e b calcolati come sopra per la distanza desiderata.

Se si conoscono gli effetti dei fattori principali, scegliendo il segno di a e b in accordo col segno suddetto si ottiene un simpleso orientato nel miglior modo possibile per quel che riguarda uno spostamento iniziale nella direzione di massima pendenza.

Vediamo di seguito le regole per determinare l'orientazione degli esperimenti successivi. Con il simplex classico i vertici corrispondenti agli esperimenti sono sempre alla stessa distanza euclidiana tra di loro, mentre nel simplex modificato la lunghezza dei passi successivi dipende dal grado di miglioramento ottenuto con i passi precedenti.

Simplex classico regolare

- **Inizio:** effettuare i $k+1$ esperimenti previsti dalla tabella 9.
- **Regola 1:** eliminare il peggior risultato e proiettare il vertice corrispondente rispetto al baricentro degli altri secondo la formula $x_{new} = 2 * \bar{x} - x_{old} \rightarrow$ tornare a regola 1.
- **Regola 2:** se il nuovo esperimento porta ad un peggioramento rispetto al peggiore, proiettare il secondo peggior vertice $\rightarrow$ regola 1.
- **Regola 3 (stop):** se dopo $k+1$ passi un vertice rimane invariato, è probabile che si trovi nei pressi del punto ottimale (il simplex gli ha girato intorno). Sarebbe bene ripetere l'esperimento per verifica. Si può, volendo, localizzare meglio le condizioni ottimali facendo partire un nuovo simplex di dimensioni ridotte.
- **Regola 4:** se un esperimento esce dal dominio sperimentale, assegnargli un punteggio molto basso. $\rightarrow$ regola 1.

In Figura 1 vengono riportati gli spostamenti successivi del simplex nel dominio sperimentale. Come si vede, dopo un rapido miglioramento nelle prime fasi, successivamente l'ottimizzazione procede in modo molto più lento. Gli ultimi esperimenti forniscono informazione sufficiente, nell'intorno dell'optimum, per calcolare eventualmente un modello di regressione del secondo ordine che può venire utilizzato successivamente per una miglior localizzazione dell'optimum stesso.

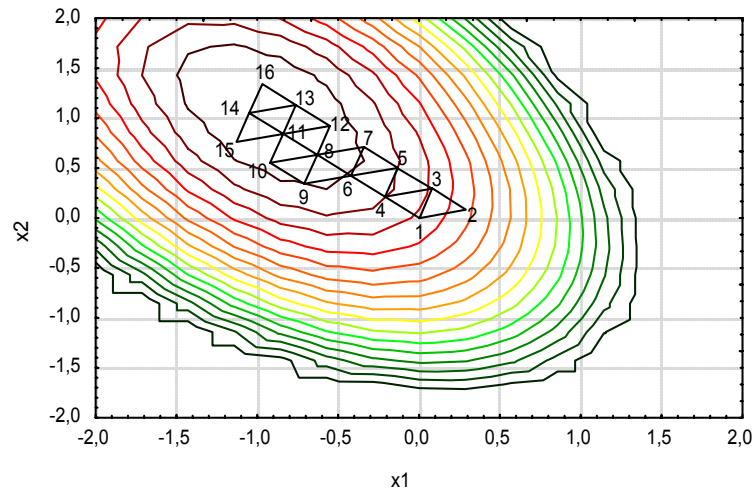


Figura 1. Ottimizzazione mediante il simplex regolare

Simplex modificato

- **Inizio:** effettuare $k+1$ esperimenti.
- **Regola 1:** si effettua la riflessione normale, si elimina il peggior risultato **P** e si proietta il vertice corrispondente rispetto al baricentro degli altri **B**: $x_{new}=2*\bar{x}-x_{old}$:
 - se $R > M \rightarrow$ regola 2,
 - se $R < P \rightarrow$ regola 3,
 - se $P < R < 2^*P \rightarrow$ regola 4,
 - se $2^*P < R < M \rightarrow$ tenere **R** come nuovo vertice e $\rightarrow$ regola 1,
 - se **R** fuori dal dominio sperimentale possibile $\rightarrow$ regola 3.
- **Regola 2:** riflessione estesa, effettuare un esperimento in **E**: $x_{new}=3*\bar{x}-2*x_{old}$:
 - se $E > R$ tenere **E** come nuovo vertice $\rightarrow$ regola 1,
 - se $E < R$ tenere **R** come nuovo vertice $\rightarrow$ regola 1.
- **Regola 3:** contrazione, effettuare un esperimento **CR**: $x_{new}=0.5*\bar{x}+0.5*x_{old}$:
 - se $CP > P$ tenere **CP** come nuovo vertice $\rightarrow$ regola 1,
 - se $CP \leq P$ riflettere $2^*P \rightarrow$ regola 1.
- **Regola 4:** riflessione parziale, effettuare un esperimento in **CP**: $x_{new}=1.5*\bar{x}-0.5*x_{old}$:
 - se $CR < P$ tenere **R** come nuovo vertice e proiettare $2^*P \rightarrow$ regola 1,
 - se $R < CR < 2^*P$ tenere **CR** come nuovo vertice $\rightarrow$ regola 1,
 - se $P < CR < R$ tenere **R** come nuovo vertice $\rightarrow$ regola 1,
 - se $CR > 2^*P$ tenere **CR** come nuovo vertice $\rightarrow$ regola 1.

- **Regola 5:** se un vertice viene mantenuto dopo $k+1$ passi, dovrebbe trovarsi nelle vicinanze del punto ottimale. Replicarlo per verifica o contrarre tutto il simplex per ottenere una miglior localizzazione.
- **Stop:** quando:
 - la riflessione non porta ad ulteriori miglioramenti;
 - tutte le risposte dell'ultimo vertice sono simili tra di loro e le differenze stanno all'interno dell'errore sperimentale;
 - il risultato ottenuto è soddisfacente.

Come si può notare dalla Figura 2, che riporta gli spostamenti del simplex nel dominio sperimentale, in fase iniziale il simplex modifica le proprie dimensioni allungandosi nella direzione dell'optimum. Una volta giunto in questa zona, viene applicata più volte la regola di contrazione che ne riduce le dimensioni. Volendo, la procedura avrebbe potuto essere continuata ulteriormente per giungere, con un simplex di dimensioni più piccole ad un'approssimazione migliore della resa massima della reazione studiata.

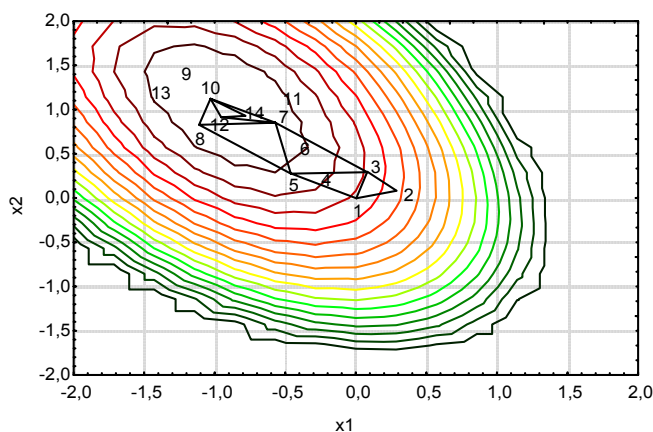


Figura 2. Ottimizzazione mediante il simplex modificato

Si vede dalla figura che l'esplorazione dell'intorno della regione ottimale non è così sistematica come nel caso del simplex regolare. Infatti in genere, gli esperimenti ottenuti col simplex modificato non si prestano ad un utilizzo per il calcolo di un modello di regressione.

SPAZIO MULTIVARIATO E ANALISI DELLE COMPONENTI PRINCIPALI

Maria Carla Gennaro, Elisa Robotti

Università del Piemonte Orientale Amedeo Avogadro, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate,
Alessandria

Lo spazio multivariato

Il concetto di *spazio multivariato* è di fondamentale importanza per affrontare problemi di tipo chimico ed in particolare il trattamento statistico dei dati chimici. Qualsiasi problema chimico può essere descritto attraverso un certo numero di variabili, i cosiddetti descrittori o variabili indipendenti. Quando il set di osservazioni (o oggetti) viene descritto in modo completo da una sola variabile, si parla di *problema monovariato*. Spesso però, si devono studiare sistemi che necessitano di un numero di variabili superiore ad uno per essere descritti in modo esauriente: questi sistemi sono detti multivariati. I problemi di tipo chimico fanno riferimento a sistemi multivariati nella quasi totalità dei casi; si rivela infatti importante valutare l'influenza di variabili diverse sul sistema ed è necessario studiarle contemporaneamente per ottenere una valutazione completa del comportamento del sistema in esame. La realtà e qualsiasi fenomeno chimico o fisico, possono essere rappresentati mediante due approcci diversi ma complementari l'uno all'altro. Il primo approccio è di tipo geometrico e si basa sulla rappresentazione dei campioni studiati, in un sistema di riferimento costituito dalle variabili che descrivono gli oggetti. Il secondo approccio è di tipo matematico e si basa sulla rappresentazione dei dati in forma matriciale. Quest'ultimo metodo risulta molto utile quando si tratta un problema multivariato, per il quale non sarebbe possibile una rappresentazione grafica dei dati considerando tutte le variabili contemporaneamente. Questi due approcci, a prima vista contrastanti, sono in realtà complementari.

Operazioni su dataset multivariati

Uno spazio a p dimensioni (multivariato) è rappresentabile graficamente da un sistema di p assi di riferimento centrati sull'origine; ogni asse rappresenta una variabile che descrive l'oggetto in esame ed è generalmente caratterizzato da un'unità di misura. La direzione degli assi è definita dai versori, vettori di modulo unitario che sono orientati nella stessa direzione degli assi ed aventi componenti nulle in tutte le direzioni eccetto quella da essi individuata, nella quale assumono valore unitario. I versori possono essere rappresentati in una matrice in cui le righe sono i versori stessi e le colonne le componenti dei versori nelle direzioni stabilite dagli assi. Di seguito è fornito un esempio di matrice contenente i versori di uno spazio a quattro dimensioni.

$$\mathbf{Z} \equiv \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Un generico punto può essere rappresentato in uno spazio p -dimensionale attraverso un vettore riga di dimensioni $(1 \times p)$:

$$\mathbf{a} \equiv [a_{1,1} \quad a_{1,2} \quad \dots \quad a_{1,p}].$$

Se si hanno n oggetti da rappresentare, ciascuno sarà caratterizzato da un vettore riga; i punti possono essere raggruppati in una matrice $\mathbf{X}$ in cui le righe rappresentano i punti e le colonne rappresentano le coordinate dei punti rispetto alle variabili.

$$\mathbf{X} \equiv \begin{bmatrix} a_{1,1} & a_{1,2} & \dots & \dots & a_{1,p} \\ a_{2,1} & a_{2,2} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{n,1} & \dots & \dots & \dots & a_{n,p} \end{bmatrix}$$

Per semplicità si prendano in esame due assi cartesiani, cioè perpendicolari l'uno all'altro; la rappresentazione grafica di due punti in questo sistema è visualizzata in Figura 1.

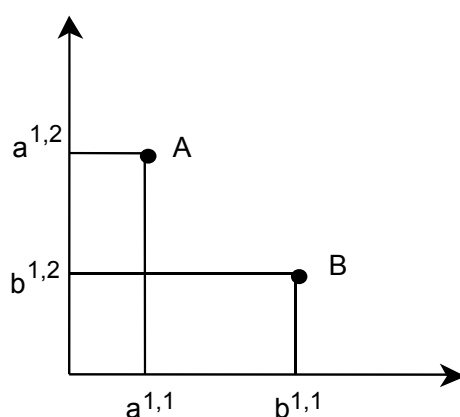


Figura 1. Rappresentazione di due punti in un piano cartesiano

In forma matriciale i due punti vengono rappresentati come due vettori riga contenenti le proiezioni dei punti stessi sugli assi:

$$\mathbf{a} \equiv (a_{1,1} \quad a_{1,2}); \quad \mathbf{b} \equiv (b_{1,1} \quad b_{1,2}).$$

Dopo aver visto come rappresentare un punto in uno spazio, si consideri la rappresentazione nello spazio di una retta e di un piano: una retta viene rappresentata da un vettore colonna (come nel caso dei versori); un piano viene invece rappresentato da una matrice a due colonne dal momento che è costituito da una combinazione lineare di due vettori.

Prodotto di una matrice per un vettore

Si consideri una matrice dei dati $\mathbf{X}$ di dimensioni $(n \times p)$ ed un vettore colonna $\mathbf{k}$ di dimensione p (Figura 2). Il prodotto della matrice $\mathbf{X}$ per il vettore $\mathbf{k}$ è rappresentato a lato. Il vettore $\mathbf{x}^*$ che si ottiene è il vettore delle proiezioni degli n punti sul vettore $\mathbf{k}$. Moltiplicare una matrice per un vettore significa perciò, dal punto di vista geometrico, proiettare gli n punti individuati dalla matrice sulla retta individuata dal vettore.

$$\begin{bmatrix} a_{1,1} & a_{1,2} & \dots & \dots & a_{1,p} \\ a_{2,1} & a_{2,2} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{n,1} & \dots & \dots & \dots & a_{n,p} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} k_1 \\ k_2 \\ \dots \\ \dots \\ k_p \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_1^* \\ x_2^* \\ \dots \\ \dots \\ x_n^* \end{bmatrix}$$

Figura 2. Prodotto di una matrice per un vettore

Prodotto di una matrice per una matrice a due colonne

Una matrice a due colonne rappresenta, in uno spazio p -dimensionale, un piano; moltiplicare la matrice dei dati $\mathbf{X}$, di dimensioni $(n \times p)$, per una matrice a due colonne significa proiettare gli n punti sul piano individuato dalla matrice bidimensionale. Matematicamente il procedimento può essere rappresentato come in Figura 3.

$$\begin{bmatrix} a_{1,1} & a_{1,2} & \dots & \dots & a_{1,p} \\ a_{2,1} & a_{2,2} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{n,1} & \dots & \dots & \dots & a_{n,p} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} k_{1,1} & k_{1,2} \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ k_{p,1} & k_{p,2} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{1,1}^* & x_{1,2}^* \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ \dots & \dots \\ x_{n,1}^* & x_{n,2}^* \end{bmatrix}$$

Figura 3. Prodotto di una matrice per una matrice a due colonne

Prodotto di due matrici

Moltiplicare una matrice di dimensioni $(n \times p)$ per un'altra matrice di dimensioni $(p \times n)$, equivale a rappresentare gli oggetti in un nuovo sistema di riferimento avente le stesse dimensioni del precedente. I casi precedenti si riferivano a situazioni in cui i punti venivano proiettati in uno spazio di dimensioni inferiori rispetto a quello originario, cioè a situazioni particolari del caso generale rappresentato dal prodotto di due matrici.

Si esamini adesso la moltiplicazione della matrice dei dati $\mathbf{X}$ di dimensioni $(n \times p)$ per una matrice $\mathbf{R}$ di dimensioni $(p \times p)$ che rappresenta la base del nuovo spazio, cioè le cui colonne sono i vettori che esprimono il nuovo sistema di riferimento rispetto al primo. La relazione risultante è data in Figura 4.

$$\begin{bmatrix} a_{1,1} & a_{1,2} & \dots & \dots & a_{1,p} \\ a_{2,1} & a_{2,2} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{n,1} & \dots & \dots & \dots & a_{n,p} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_{1,1} & r_{1,2} & \dots & \dots & r_{1,p} \\ r_{2,1} & r_{2,2} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ r_{p,1} & \dots & \dots & \dots & r_{p,p} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} x_{1,1}^* & x_{1,2}^* & \dots & \dots & x_{1,p}^* \\ x_{2,1}^* & x_{2,2}^* & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n,1}^* & \dots & \dots & \dots & x_{n,p}^* \end{bmatrix}$$

Figura 4. Prodotto di due matrici

Un caso particolare di moltiplicazione di due matrici è detta rotazione ortonormale; in questo particolare tipo di operazione, la matrice dei dati originale viene moltiplicata per la matrice $\mathbf{R}$, scelta in modo tale da soddisfare la relazione $\mathbf{R}^T \mathbf{R} = \mathbf{I}$. Con questa trasformazione si conservano invariati gli angoli tra gli assi di riferimento e le distanze tra i punti, quindi l'operazione consiste in una semplice rotazione del sistema di riferimento originale.

La complessità del dato chimico

I sistemi di tipo chimico sono sistemi caratterizzati da un'elevata complessità, basti pensare ai problemi di natura ambientale, farmacologica, cosmetica e all'ottimizzazione e controllo di processi industriali. Spesso ci si trova ad affrontare problemi in cui il numero di variabili descrittive è molto elevato e nella maggior parte dei casi non è possibile definire a priori quali e quante siano le variabili veramente importanti al fine di risolvere il problema. Le variabili mostrano in molti casi sinergie ed antagonismi o, ancora, dipendenze rilevanti tra loro; inoltre possono non essere tutte misurabili con la stessa precisione e presentare degli effetti di non linearità con la risposta e tra loro. Un'ulteriore caratteristica che complica la struttura dei dati chimici è la presenza nel set di dati di una certa quantità di informazione spuria e di rumore sperimentale. Per ultimo, è necessario considerare che in un dataset chimico si possono incontrare effetti di macroproprietà del sistema, cioè alcune variabili possono descrivere lo stesso aspetto del sistema e possono essere raggruppate in modo da formare un'unica macrovariabile. La complessità del problema si riflette ovviamente sul set di dati estratti dal sistema stesso. I dati contengono l'informazione sistematica utile alla risoluzione del problema affrontato, cioè l'informazione che interessa separare per risolvere il problema, ma contengono in parte anche informazione ancora sistematica ma non utile alla risoluzione del problema: questa parte può essere importante per problemi diversi da quello di interesse. Nei dati sono contenuti anche l'informazione ridondante e il rumore sperimentale che è importante separare dall'informazione utile al fine di permettere la risoluzione del problema.

Le tecniche chemiometriche sono volte proprio alla risoluzione di queste situazioni, attraverso l'individuazione dell'informazione utile presente nei dati ed indistinguibile a priori da quella non pertinente e dal rumore e la successiva separazione dei diversi tipi di informazione: per fare questo, la chemiometria si avvale di particolari strumenti matematici il cui approfondimento verrà affrontato nel prossimo paragrafo.

Analisi di problemi complessi

È possibile sintetizzare l'approccio ad un problema complesso attraverso i passi proposti in Figura 5. Il primo passo per affrontare un problema complesso è sempre l'analisi del problema stesso; durante questa fase vengono stabiliti gli obiettivi e vengono formulate le prime ipotesi di lavoro, considerando anche l'eventuale bibliografia presente sull'argomento. In questa fase sono anche scelte le variabili con le quali si intende studiare il sistema e l'obiettivo che ci si prefigge per ogni variabile (massimizzare la resa, minimizzare i sottoprodotti di reazione, ecc.); si tratta di un passo fondamentale perché dalla scelta più o meno buona delle variabili può dipendere la risoluzione o meno del problema. Il secondo passo è la pianificazione degli esperimenti, cioè la scelta del disegno sperimentale più appropriato. È importante scegliere gli esperimenti, in modo da campionare in modo uniforme tutto il dominio sperimentale, per non incorrere in problemi legati alla scelta sbagliata degli esperimenti: raggruppamenti negli esperimenti, disomogeneità nel campionamento del dominio sperimentale, distribuzione degli esperimenti lungo una direzione preferenziale. Il disegno sperimentale migliore permette inoltre di ottenere la

maggior quantità di informazione utile, col minor numero di esperimenti. Anche questa fase può compromettere i risultati ottenuti se la scelta è effettuata in modo non appropriato.

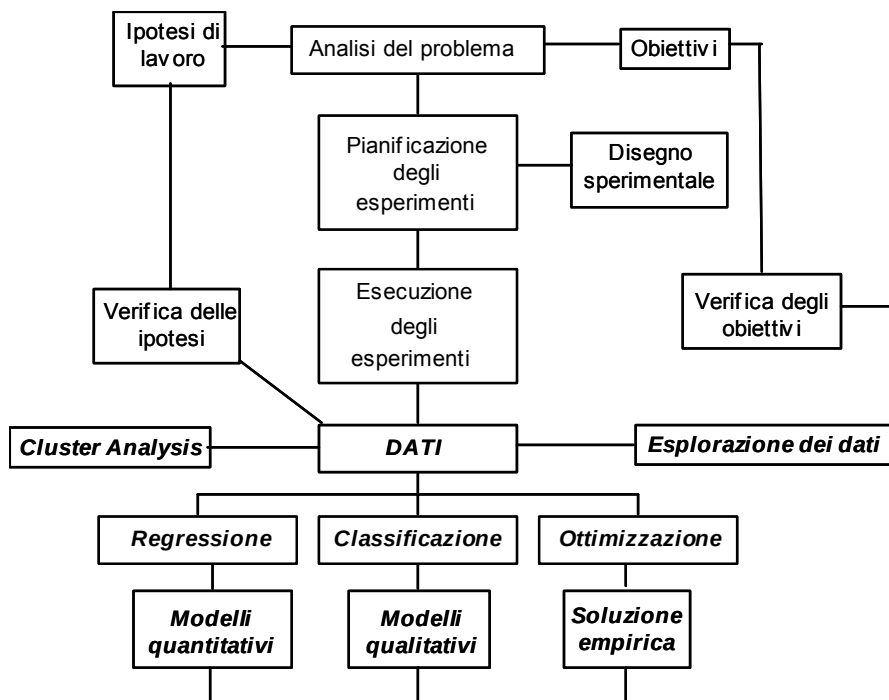


Figura 5. Schema di risoluzione di problemi complessi

Si passa poi all'esecuzione degli esperimenti e alla registrazione dei risultati ottenuti che devono successivamente essere elaborati. L'elaborazione è condotta attraverso diversi strumenti matematici, a seconda dell'obiettivo stabilito in origine. La fase successiva contempla l'esplorazione dei dati, al fine di ottenere i parametri statistici di ogni variabile, verificare eventuali correlazioni tra esse o l'esistenza di eventuali dati anomali. Lo strumento matematico più utilizzato in questa fase è sicuramente l'analisi delle componenti principali.

I metodi di Cluster Analysis consentono di valutare la presenza di classi e raggruppamenti all'interno del set di dati o delle variabili, senza che vengano ipotizzate a priori suddivisioni nei dati. È importante ricordare che i risultati ottenuti con questo tipo di analisi sono dipendenti dal metodo scelto per effettuarla e non hanno quindi validità universale.

I metodi di classificazione si basano sul concetto opposto a quello della Cluster Analysis; si tratta infatti di uno strumento che permette di attribuire un oggetto ad una classe ipotizzando quindi una divisione a priori degli oggetti presenti nel set di dati in classi. I metodi di regressione permettono invece di costruire un modello matematico per la predizione dei valori quantitativi di una variabile (la risposta) a partire dai dati ottenuti per le variabili indipendenti (i predittori o descrittori o fattori sperimentali). Nei metodi di ottimizzazione, lo scopo che ci si prefigge è quello di ottimizzare le condizioni sperimentali che caratterizzano il sistema investigato. Al termine dell'elaborazione dei dati, si passa a valutare se gli obiettivi proposti

inizialmente sono verificati: se non sono verificati il procedimento viene reiterato fino alla risoluzione finale del problema.

Struttura dei dati

Si è già accennato alla possibilità di rappresentare i dati sotto forma matriciale. Un dataset multivariato può essere rappresentato come in Figura 6. La matrice dei dati è formata da n righe e p colonne: le righe rappresentano gli oggetti o gli esperimenti; le colonne rappresentano le variabili che descrivono gli oggetti.

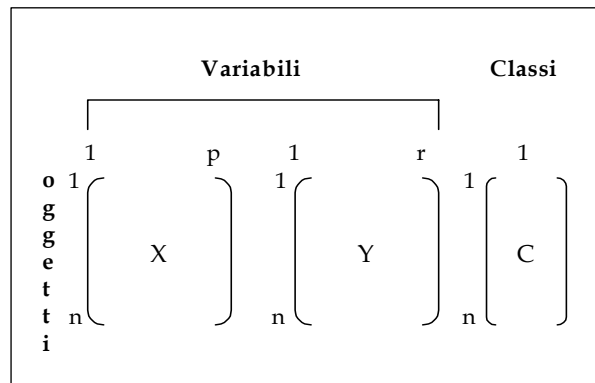


Figura 6. Rappresentazione schematica di un dataset multivariato

Nella figura si sono distinte le variabili in due parti: il gruppo **X** corrisponde alle variabili indipendenti, i predittori; il gruppo **Y** corrisponde invece alle variabili dipendenti, le risposte. Agli oggetti può essere anche associato un vettore (indicato con **C** nella figura) che definisce l'appartenenza di ogni oggetto ad una classe: ogni classe può essere definita da un numero intero, spesso si utilizza un codice. La matrice dei dati ha perciò la forma:

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{1,2} & \dots & \dots & x_{1,p} \\ x_{2,1} & x_{2,2} & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ x_{n,1} & \dots & \dots & \dots & x_{n,p} \end{pmatrix}.$$

dove il valore x_{ij} corrisponde all' i -esimo campione e alla j -esima variabile. I metodi di analisi dei dati si distinguono secondo due approcci diversi al problema:

- *modo R*: le righe rappresentano i campioni e le colonne rappresentano le variabili. La matrice di correlazione viene ad avere dimensioni $(p \times p)$;
- *modo Q*: le colonne rappresentano i campioni e le righe rappresentano le variabili. In questo caso la matrice di correlazione viene ad avere dimensioni $(n \times n)$.

Si vedranno più in dettaglio nei prossimi paragrafi, i tipi di variabili, gli oggetti e le classi che si possono avere.

Le variabili possono essere di natura diversa:

- *Variabili di intervallo*

Sono variabili di tipo continuo rappresentate da numeri interi o decimali. Con questo tipo di variabile è possibile quantificare la differenza tra due valori e ordinare gli oggetti in una scala crescente o decrescente.

- *Variabili nominali*

Si tratta di variabili rappresentate da etichette, espresse come valore numerico. Per queste variabili non è possibile ottenere un ordinamento dei dati perché i valori numerici non hanno valore quantitativo ma definiscono semplicemente l'appartenenza di un oggetto ad una classe o l'appartenenza di una certa proprietà ad un oggetto.

- *Variabili ordinali*

Queste variabili sono rappresentate da un valore numerico come le precedenti ma permettono di ordinare gli oggetti, tuttavia non permettono di effettuare confronti tra gli oggetti perché le differenze non sono quantificabili.

Gli oggetti sono rappresentati dai campioni o dagli esperimenti effettuati per studiare il fenomeno di interesse. Ogni campione può essere descritto da una sola o più misure sperimentali. L'oggetto può essere descritto in modo completo se per esso sono disponibili i valori di tutte le variabili che lo definiscono, ma potrebbe anche essere descritto in modo incompleto se alcuni valori per le variabili non sono disponibili; in questo caso la matrice dei dati presenterà degli elementi mancanti, detti *missing value*.

Spesso i campioni analizzati non sono omogenei, appartengono cioè a classi o raggruppamenti diversi e in molti problemi è importante tenerne conto attraverso l'inserimento di una variabile nominale che permetta di etichettare ogni campione con un numero corrispondente alla classe di appartenenza; questa operazione consente di verificare se oggetti appartenenti alla stessa classe mostrano comportamento o caratteristiche simili.

Il pretrattamento del dato

Prima di effettuare qualsiasi trattamento statistico del dataset è sempre necessaria un'analisi preliminare dei dati, che consiste nel valutare la presenza di eventuali dati mancanti, nell'effettuare, qualora sia necessario, la trasformazione delle variabili e nell'eseguirne la scalatura. Tra gli altri aspetti da controllare è importante verificare la presenza di *variabili costanti*: in questo caso è opportuno eliminare la variabile che porterebbe complicazioni nella trattazione successiva. Non tutti i metodi di trattamento dei dati consentono, inoltre, di trattare variabili ordinali, binarie o altamente degeneri (che assumono pochi valori discreti all'interno di un intervallo).

Capita in molti casi che la matrice dei dati sia incompleta, che presenti cioè dei dati mancanti, o *missing value*, corrispondenti a valori assunti per alcuni campioni da alcune variabili, che non sono disponibili. I più comuni metodi matematici di trattamento dei dati non possono gestire situazioni in cui la matrice dei dati è incompleta, quindi è necessario trattare i *missing value* in modo particolare, secondo una delle procedure descritte di seguito.

- *L'eliminazione dei campioni*

È possibile eliminare i campioni per i quali sono presenti dati mancanti. Questa soluzione è applicabile solo quando il numero di campioni è notevole, altrimenti si avrebbe una perdita di informazione troppo consistente. Nonostante questo svantaggio è un metodo abbastanza utilizzato.

– *La sostituzione del missing value col valore medio*

Il valore mancante può essere sostituito col valore medio dei dati relativi alla variabile per cui è presente il dato mancante

Questo metodo è molto utilizzato perché non contribuisce ad alterare la struttura dei dati, ma si attenua semplicemente la quantità di informazione utile presente nella variabile interessata. La caratteristica di questo metodo è di portare ad una sottostima delle varianze e ad una sovrastima delle covarianze.

– *La sostituzione attraverso la regressione*

I valori mancanti sono sostituiti dal valore calcolato mediante un modello di regressione

Il modello è costruito utilizzando i dati rimanenti, tutte le variabili che non contengono *missing value* come predittori e la variabile che presenta il *missing value* come risposta. L'utilizzo di questo metodo è ovviamente vincolato all'ottenimento di un modello accettabile.

– *La sostituzione attraverso la similarità locale*

Viene calcolata la distanza di ciascun oggetto dal dato mancante utilizzando tutte le variabili che non presentano *missing value*. Viene poi scelto un numero k intero e si considerano i k oggetti più vicini al dato mancante; il valore dell' i -esimo dato mancante per la j -esima variabile è calcolato considerando i valori per la j -esima variabile dei k oggetti selezionati, in questo modo:

$$\hat{x}_{ij} = \frac{\sum_{r=1}^k x_{i_r j} / d_{i_r}}{\sum_{r=1}^k 1 / d_{i_r}} .$$

Il vantaggio rispetto al metodo precedente è che il valore mancante non viene estrapolato; tuttavia presenta uno svantaggio: se il dato mancante è molto diverso dai k campioni più vicini, si ha un valore stimato molto approssimato e la conseguente introduzione di errore nel dataset.

– *La sostituzione mediante l'analisi delle componenti principali.*

Il dato mancante è sostituito dal valore calcolato mediante l'analisi delle componenti principali, sfruttando l'algoritmo NIPALS che consente di lavorare anche su matrici incomplete. Si definiscono le componenti principali significative e si calcolano i dati mancanti mediante il prodotto della matrice degli *score* per quella dei *loading*.

Le trasformazioni delle variabili

Le variabili presentano spesso dei comportamenti che rendono difficoltoso il successivo trattamento dei dati, infatti molti metodi statistici richiedono al dataset di rispettare alcune regole precise. Le variabili possono avere una distribuzione non normale dei dati, possono presentare relazioni non lineari rispetto ad altre variabili o ancora, possono essere caratterizzate da eteroscedasticità, cioè presentare una varianza non uniforme.

È possibile applicare delle trasformazioni alle variabili, generalmente di tipo non lineare, per stabilizzare la varianza, linearizzare le relazioni tra le variabili e normalizzare la distribuzione dei dati; queste trasformazioni dipendono dai dati originali e dal tipo di forma matematica utilizzata.

Le trasformazioni più utilizzate sono:

– *La trasformazione logaritmica*

La trasformazione può avere due forme:

$$x'_{ij} = \log(x_{ij}) \quad \text{oppure} \quad x'_{ij} = \log(1 + x_{ij}).$$

La seconda è utilizzata quando siano presenti valori nulli nel dataset. È utilizzata per linearizzare variabili con effetto moltiplicativo, per eliminare l'eteroscedasticità o per risolvere le situazioni in cui le deviazioni standard sono proporzionali alle medie.

– *La trasformazioni di potenza*

Si tratta di una famiglia di trasformazioni nella forma:

$$x'_{ij}(\lambda) = x_{ij}^{\lambda}.$$

Il parametro λ può variare tra $-\infty$ e $+\infty$.

Questa famiglia racchiude di casi particolari tra cui:

- la trasformazione inversa, per $\lambda = -1$.

È utilizzata soprattutto per normalizzare distribuzioni che presentano una deviazione standard proporzionale al quadrato della media;

- la trasformazione radice quadrata, per $\lambda = 0,5$.

Questa trasformazione si utilizza per normalizzare dati relativi a distribuzioni poissoniane, in cui le varianze sono proporzionali alle medie. Questa situazione è tipica per variabili di tipo biologico, che esprimono conteggi.

– *Le trasformazioni di Box-Cox*

Anche in questo caso si tratta di una famiglia di trasformazioni che vengono applicate per lo più alle risposte, per migliorare la loro relazione con i predittori. Questa trasformazione è nella forma:

$$\begin{cases} y'_i(\lambda) = \frac{y_j^{\lambda} - 1}{\lambda} & \text{Se } \lambda \neq 0 \\ y'_i(\lambda) = \ln(y_j) & \text{Se } \lambda = 0 \end{cases}$$

Le trasformazioni sono convesse per $\lambda > 1$ e concave per $\lambda < 1$. In questa famiglia rientrano numerosi casi particolari:

- trasformazione logaritmica, per $\lambda=0$;
- trasformazione inversa, per $\lambda=-1$;
- trasformazione radice quadrata, per $\lambda=0,5$;
- trasformazione radice quadrata inversa, per $\lambda=-0,5$.

Queste trasformazioni sono utilizzate per cercare la migliore trasformazione di una risposta o per l'ottimizzazione di un modello di regressione.

La scalatura dei dati

La scalatura dei dati rappresenta un passo fondamentale nel pretrattamento dei dati, al fine di eliminare fattori di scala esistenti nelle variabili che potrebbero influenzare l'analisi successiva. I metodi più utilizzati sono proposti nel seguente elenco.

– *Centratura (Centering)*

Con questo metodo i dati vengono centrati rispetto al valor medio della variabile:

$$x'_{ij} = x_{ij} - \bar{x}_j.$$

Utilizzando questo tipo di scalatura, il valor medio dei dati viene ad essere zero: $\bar{x}'_j = 0$.

– *Scalatura di intervallo (Range scaling)*

I dati vengono ridotti all'intervallo [0;1] attraverso la formula:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - L_j}{U_j - L_j},$$

dove $U_j = \max_i (x_{ij})$ e $L_j = \min_i (x_{ij})$. Una variante di questo metodo prevede la scalatura dei dati riducendoli all'intervallo [-1; +1], in modo da avere una distribuzione simmetrica centrata sullo zero. La forma matematica di quest'ultima è data da:

$$x'_{ij} = 2 \left(\frac{x_{ij} - L_j}{U_j - L_j} - 0.5 \right).$$

Questo procedimento è molto utilizzato nell'ottimizzazione di processo.

– *Autoscalatura (Autoscaling)*

È sicuramente la scalatura più utilizzata nei metodi chemiometrici ed è obbligatoria se si intende applicare l'analisi delle componenti principali. I dati così scalati hanno media pari a zero e varianza unitaria:

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{S_j},$$

dove S_j è la varianza della j-esima variabile.

L'analisi monovariata

L'analisi dei dati si compone di due fasi successive: l'analisi monovariata e l'analisi multivariata. Prima di affrontare lo studio di tutte le variabili contemporaneamente, è necessario compiere alcune indagini sulle singole variabili al fine di evidenziare l'esistenza di andamenti particolari. In questa fase possono anche essere fatte delle ipotesi sulle variabili che verranno poi convalidate o respinte affrontando la fase successiva di analisi multivariata.

L'analisi monovariata può essere condotta seguendo due approcci diversi: da una parte si può condurre un'analisi grafica di tipo qualitativo che permette di visualizzare i dati in modo immediato e di evidenziare andamenti particolari o la presenza di dati anomali; dall'altra parte si può condurre un'analisi matriciale parallela di tipo quantitativo, al fine di valutare quantitativamente gli andamenti riscontrati durante l'analisi grafica.

Analisi grafica

Gli strumenti grafici utilizzati per condurre questa analisi sono diversi: istogrammi, grafici di dispersione, grafici a matrice, grafici a icone.

Istogrammi

L'istogramma riporta l'andamento della frequenza dei valori assunti da ogni variabile (Figura 7). Viene così visualizzata la distribuzione caratteristica di ogni variabile ed è possibile

verificare graficamente se l'andamento segue la distribuzione gaussiana oppure se sono presenti forti scostamenti. In quest'ultimo caso si rende necessaria una trasformazione che normalizzi l'andamento dei dati.

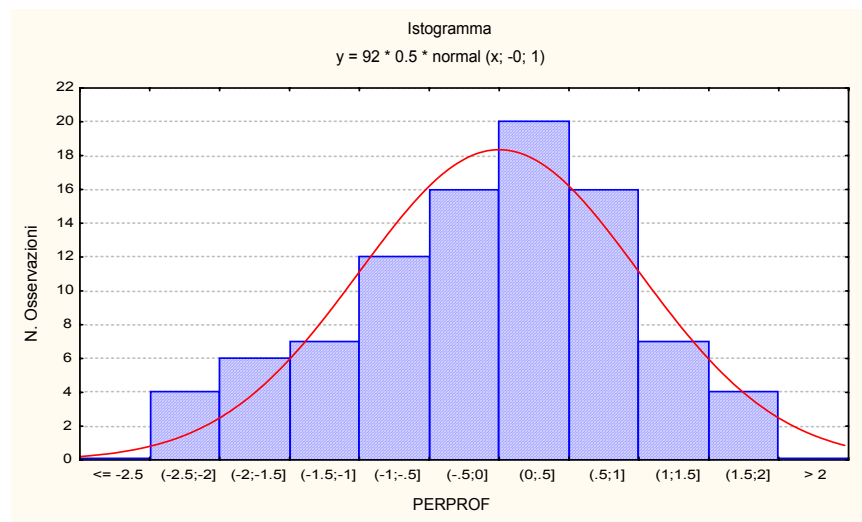


Figura 7. Istogramma

Grafici di dispersione e grafici a matrice

Questo tipo di rappresentazione grafica è anche detto “scatter plot”; si tratta di un grafico che rappresenta l'andamento degli oggetti considerando due variabili alla volta: una variabile viene posta sull'asse delle ascisse, l'altra invece sull'asse delle ordinate. Un esempio di questa rappresentazione viene dato in Figura 8.

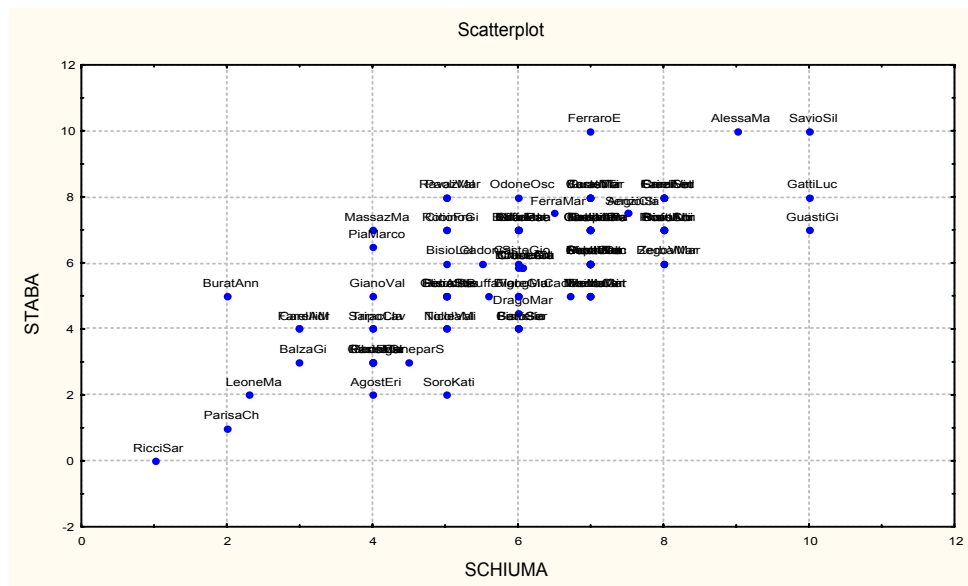


Figura 8. Scatter Plot

Dagli scatter plot si possono evidenziare eventuali trend, per esempio relazioni lineari, iperboliche, logaritmiche, esponenziali, ecc. Le variabili possono anche non presentare alcun andamento particolare, in questo caso le variabili non sono correlate tra loro. L'analisi degli scatter plot è molto utile per formulare alcune ipotesi sulle relazioni esistenti tra le variabili. Gli scatter plot vengono rappresentati considerando due variabili alla volta, quindi sono necessari molti diagrammi per prendere in considerazione tutte le variabili; inoltre si devono spesso affrontare problemi in cui il numero delle variabili studiate è elevato, il numero di grafici diventa perciò molto alto. Per affrontare situazioni di questo tipo si può ricorrere ad un grafico a matrice (o matrix plot) nel quale vengono riportati tutti i possibili scatter plot insieme (Figura 9). Nel matrix plot, le variabili rappresentano le righe e le colonne della matrice, mentre i grafici rappresentano gli elementi della matrice: l'elemento ij della matrice rappresenta quindi lo scatter plot delle variabili i -esima e j -esima. La rappresentazione risulta molto immediata ed è possibile riportare più grafici contemporaneamente, con la possibilità di scegliere i diagrammi più significativi per rappresentazioni singole.

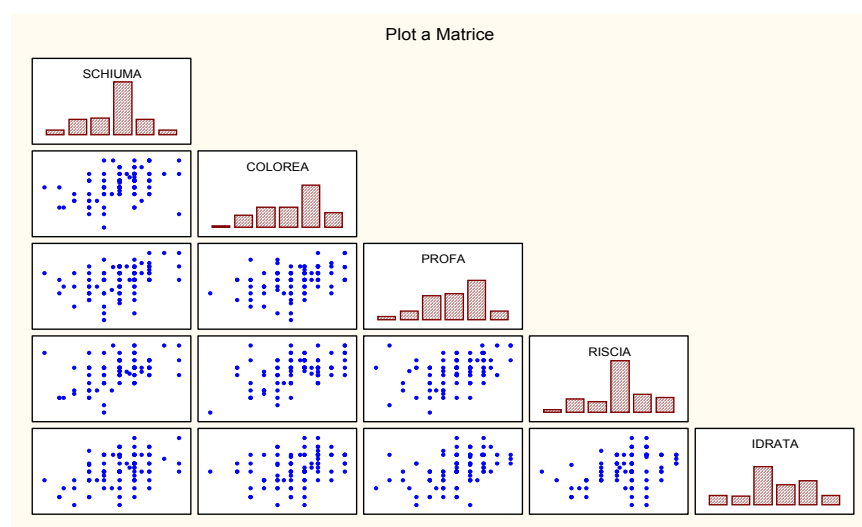


Figura 9. Plot a Matrice

Grafici ad icone

L'ultimo tipo di diagramma utile alla comprensione della struttura monovariata dei dati è rappresentato dai plot a icone; tra questi il più utilizzato è senz'altro rappresentato dalle "Facce di Chernoff", di cui viene fornito un esempio nella Figura 10. Questo tipo di grafico è molto intuitivo e sfrutta la naturale capacità umana di distinguere caratteristiche fisionomiche diverse. Ogni variabile è associata ad una caratteristica facciale precisa (la grandezza degli occhi, la larghezza della faccia, la lunghezza del naso, ecc.), in modo che ogni oggetto venga rappresentato da un viso la cui forma è data dall'insieme delle variabili che definiscono l'oggetto. Oggetti con valori simili delle stesse variabili saranno quindi rappresentati da facce con caratteristiche fisionomiche simili.

Le “Facce di Chernoff” sono quindi molto utili per visualizzare raggruppamenti nei dati (visi molto diversi tra loro appartengono a gruppi diversi) e verificare la presenza di eventuali dati anomali (visi con caratteristiche differenti dagli altri).

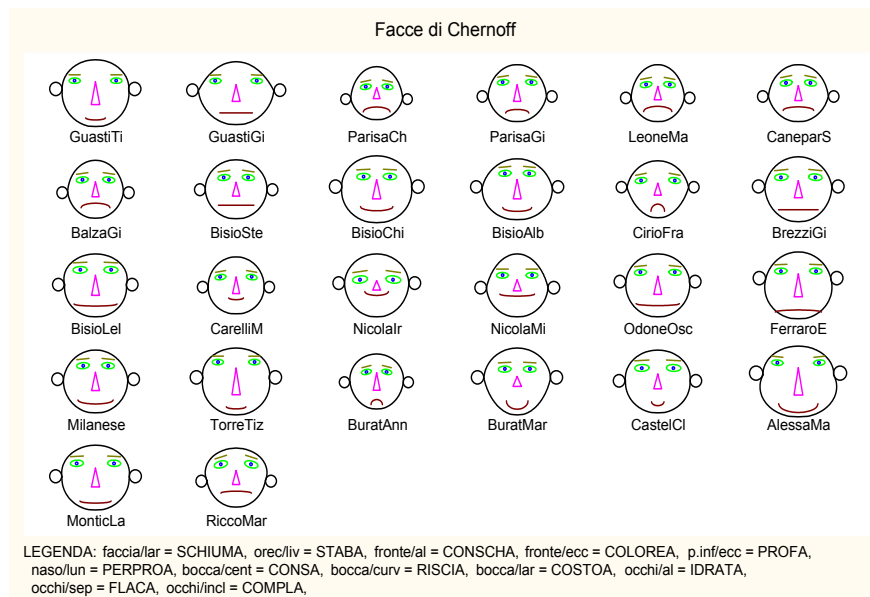


Figura 10. Grafico di Chernoff

Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa si basa sullo studio delle matrici di varianza-covarianza e di correlazione che esprimono la dipendenza tra le diverse variabili in modo numerico.

Matrice delle varianze-covarianze

La matrice di varianza-covarianza è una matrice quadrata di dimensioni $(p \times p)$. Il singolo elemento della matrice è dato dall'espressione:

$$s_{ij} = \frac{\sum_{h=1}^n (x_{hi} - \bar{x}_i)(x_{hj} - \bar{x}_j)}{n-1} = \frac{1}{n-1} \left[\sum_{h=1}^n x_{hi}x_{hj} - n\bar{x}_i\bar{x}_j \right]$$

Gli elementi diagonali della matrice sono calcolati attraverso la stessa espressione ma in questo caso si ha $x_i = x_j$. È possibile passare alla notazione matriciale introducendo la matrice $\langle \mathbf{X} \rangle$, avente come colonne il valor medio della colonna corrispondente nella matrice dei dati $\mathbf{X}$. La matrice di covarianza viene quindi ad essere definita come:

$$\mathbf{S} = \frac{1}{n-1} (\mathbf{X} - \langle \mathbf{X} \rangle)^T (\mathbf{X} - \langle \mathbf{X} \rangle) = \frac{1}{n-1} \mathbf{Y}^T \mathbf{Y}; \text{ dove } \mathbf{Y} = \mathbf{X} - \langle \mathbf{X} \rangle.$$

Nella matrice $\mathbf{S}$, lungo la diagonale si trovano le varianze, cioè l'indicazione della correlazione di una variabile con se stessa; i valori extra – diagonali invece esprimono la

correlazione tra le due variabili corrispondenti. Si hanno lungo la diagonale valori elevati, mentre fuori dalla diagonale termini elevati se la correlazione tra le variabili è importante e termini bassi se la correlazione tra le variabili non è apprezzabile. È importante sottolineare che non è possibile utilizzare i valori numerici per confrontare le covarianze tra variabili diverse, cioè non è possibile dire quali variabili mostrino la dipendenza più spiccata; questo perché si tratta di una matrice calcolata sulla base di dati non autoscalati, quindi se una variabile presenta un fattore di scala più importante delle altre, questa variabile presenterà covarianze più elevate.

La matrice di correlazione

Si può ottenere la matrice di correlazione per via matriciale, definendo una matrice S_d diagonale la cui forma è data dall'espressione:

$$S_d = \begin{bmatrix} (x_1 - \bar{x}_1)^T (x_1 - \bar{x}_1) & 0 & \dots & 0 \\ 0 & (x_2 - \bar{x}_2)^T (x_2 - \bar{x}_2) & \dots & 0 \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & \dots & (x_p - \bar{x}_p)^T (x_p - \bar{x}_p) \end{bmatrix}$$

Da questa matrice si può definire una matrice Z delle variabili autoscalate, di dimensioni $(n \times p)$, a sua volta data dall'espressione:

$$Z = (X - \bar{X})S_d^{-1/2}.$$

In questa matrice, ogni colonna ha media nulla e varianza pari ad uno. La matrice di correlazione diventa perciò:

$$S'_d = S_d^{-1/2} (X - \bar{X})^T (X - \bar{X}) S_d^{-1/2} = S_d^{-1/2} Y^T Y S_d^{-1/2} = Z^T Z$$

La matrice di correlazione viene calcolata sulla base dei dati autoscalati perciò presenta molti vantaggi rispetto alla matrice di covarianza. In questa matrice i termini diagonali sono pari ad 1 perché la correlazione di una variabile con se stessa è massima; i termini extradiagonali hanno invece valori compresi nell'intervallo $[-1; +1]$: a valore maggiore corrisponde una correlazione maggiore. Se la covarianza ha un valore grande negativo, le due variabili sono fortemente correlate secondo una dipendenza inversa; viceversa, se la covarianza assume un valore grande positivo, le variabili sono fortemente correlate secondo una dipendenza diretta; nel caso in cui la covarianza sia prossima allo zero, invece, le due variabili mostrano una debole correlazione.

“Data una matrice dei dati X di dimensioni $(n \times p)$, la matrice simmetrica S di dimensioni $(p \times p)$ il cui elemento s_{ij} esprime il grado di associazione tra le variabili i -esima e j -esima, è detta matrice di associazione”.

Da questa definizione si deduce che le matrici di covarianza e di correlazione sono matrici di associazione di cui la prima è calcolata sulla base di dati non autoscalati, mentre la seconda è calcolata a partire da un dataset autoscalato.

Questa differenza determina le proprietà delle due matrici: la matrice di covarianza presenta le varianze delle variabili non standardizzate, mentre la matrice di correlazione presenta le varianze delle variabili unitarie. Si nota facilmente come l'analisi della matrice di correlazione e del matrix plot siano complementari: la prima fornisce l'indicazione numerica che viene visualizzata qualitativamente dalla seconda. Valori elevati nella matrice corrispondono a scatter plot in cui si evidenziano trend particolari nei dati o loro raggruppamenti lungo una direzione preferenziale. Lo scatter plot, tuttavia contiene una quantità di informazione maggiore; una situazione come quella presentata in Figura 11 mostra una bassa correlazione tra le due variabili.

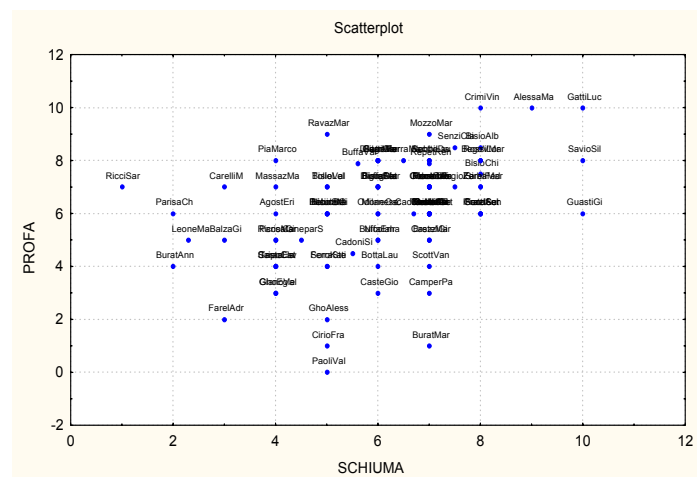


Figura 11. Scatter plot

In Figura 12 sono invece rappresentate due situazioni in cui la correlazione tra le variabili è pressoché la stessa ma lo scatter plot è in grado di fornire informazioni dettagliate circa il motivo di questa forte correlazione:

- nello scatter plot di sinistra sono presentati i dati allineati lungo una particolare direzione ma distribuiti omogeneamente lungo la stessa;
- a destra due gruppi di dati allineati lungo una direzione: questo comportamento evidenzia una *clusterizzazione* nei dati.

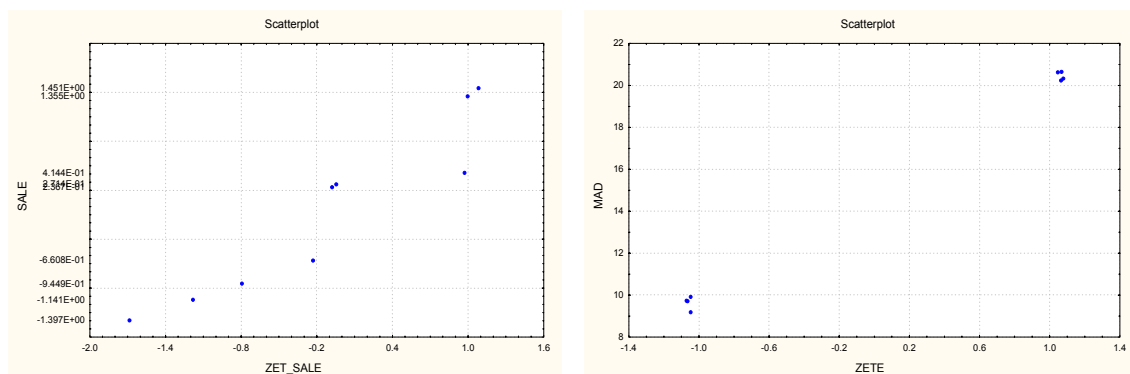


Figura 12. A sinistra: rappresentazione di punti allineati lungo una direzione; a destra rappresentazione di due gruppi di punti allineati

L'analisi delle componenti principali

La tecnica di analisi multivariata sicuramente più utilizzata è l'Analisi delle Componenti Principali (PCA), messa a punto da Karl Pearson nel 1901. La tecnica era applicata a problemi riguardanti non più di tre variabili, dal momento che i calcoli matematici dovevano essere svolti

interamente a mano. Il metodo è stato sviluppato successivamente da Harold Hotelling nel 1933, applicandolo allo studio di problemi più complessi, grazie soprattutto all'avvento dei primi calcolatori elettronici che hanno permesso di trattare matrici di dimensioni maggiori.

Il principio su cui si basa l'Analisi delle Componenti Principali consiste nel trasformare le variabili originali che descrivono il dataset, in un nuovo set di variabili dette Componenti Principali ed espresse come combinazione lineare delle variabili originali. La caratteristica fondamentale delle componenti principali è quella di formare un set di variabili ortogonali tra loro, in modo da consentire l'applicazione di diversi metodi di calcolo.

Principi del metodo

L'Analisi delle Componenti Principali è una tecnica molto potente che permette di svolgere diverse funzioni:

- evidenziare le correlazioni tra le variabili,
- operare la decorrelazione delle variabili,
- evidenziare le variabili rilevanti per la descrizione del problema,
- visualizzare gli oggetti sfruttando tutte le variabili contemporaneamente,
- sintetizzare l'informazione contenuta nei dati eliminando quella spuria ed il rumore,
- ridurre la dimensionalità del problema,
- mettere in evidenza le macroproprietà che descrivono il problema,
- rappresentare i dati in uno spazio ortogonale.

Il metodo consiste nella rotazione del sistema di riferimento costituito dalle variabili originali in modo che il primo nuovo asse sia orientato nella direzione di massima varianza dei dati e che il secondo sia perpendicolare al primo e orientato nella direzione di massima varianza residua dei dati. Per un problema bidimensionale il procedimento può essere rappresentato come in Figura 13. Nella figura, le variabili originali sono rappresentate da *Var1* e *Var2* mentre le componenti principali sono rappresentate da *PC1* e *PC2*. Si nota come *PC1* sia orientata lungo la direzione di massima varianza, mentre *PC2* sia orientata lungo la direzione di massima varianza residua e perpendicolarmente a *PC1*. Nei problemi rappresentati da due sole variabili, le due componenti principali ottenute come combinazione lineare delle variabili originali spiegano interamente il set di dati. Per rappresentare problemi di dimensionalità superiore è necessario servirsi dell'algebra matriciale utilizzando la matrice dei dati di dimensioni ($n \times p$), vista in precedenza.

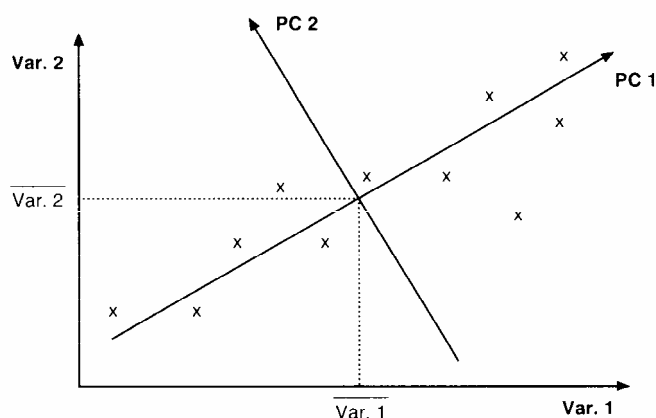


Figura 13. Rappresentazione grafica delle componenti principali

Principi matematici

È interessante soffermarsi sui procedimenti matematici alla base del metodo al fine di comprendere in modo più approfondito il suo funzionamento e le sue potenzialità. Il metodo si basa sulla matrice di correlazione, già definita in precedenza come:

$$\mathbf{S}_d \equiv \frac{\mathbf{Z}^T \mathbf{Z}}{n-1}.$$

Considerando ogni riga della matrice di correlazione come un vettore in uno spazio a p dimensioni, si può considerare ogni vettore riga come uno degli assi di un ellissoide. La struttura di covarianza dei dati può quindi essere rappresentata graficamente come un iperellissoide a p dimensioni. Attraverso l'Analisi delle Componenti Principali, la matrice $\mathbf{S}$ viene diagonalizzata e si passa quindi ad una nuova matrice definita come:

$$\mathbf{S}_d' \equiv \frac{\mathbf{Z}'^T \mathbf{Z}'}{n-1}.$$

La diagonalizzazione della matrice permette di ricavare gli assi principali dell'ellissoide che rappresentano le direzioni di massima varianza dei dati. Decomponendo la matrice $\mathbf{S}$ in autovalori ed autovettori si ottengono le direzioni degli assi (rappresentate dagli autovettori) e la lunghezza dei semiassi (rappresentate dagli autovalori). Si rappresentano quindi gli oggetti in un nuovo spazio definito dagli assi dell'ellissoide, in modo da eliminare le correlazioni tra le variabili passando ad un nuovo sistema di riferimento in cui le variabili nuove sono ortogonali ed indipendenti tra loro. I vantaggi nell'utilizzo delle componenti principali saranno analizzati nei paragrafi successivi; nel prossimo paragrafo, invece, sono approfonditi i concetti matematici alla base della diagonalizzazione di matrici.

Autovalori ed autovettori

È possibile effettuare la diagonalizzazione di una matrice quadrata definita positiva risolvendo il corrispondente problema agli autovalori posto nella forma:

$$|(\mathbf{X}^T \mathbf{X} - \lambda \mathbf{I})| = 0$$

La risoluzione dell'equazione fornisce i termini $\lambda \mathbf{I}$ e $\mathbf{L}$, cioè gli stimatori degli autovalori e della matrice degli autovettori. Gli autovalori possono essere ordinati in modo decrescente: $\lambda_1 > \lambda_2 > \dots > \lambda_p$. Una volta noti autovalori ed autovettori, l'espressione si può riscrivere come:

$$\mathbf{L}^T \mathbf{X}^T \mathbf{X} \mathbf{L} = \mathbf{\Lambda},$$

dove la matrice $\mathbf{\Lambda}$ ha forma riportata di seguito.

$$\mathbf{\Lambda} \equiv \begin{bmatrix} \lambda_1 & 0 & \dots & 0 \\ 0 & \lambda_2 & \dots & \dots \\ \dots & \dots & \dots & 0 \\ 0 & \dots & 0 & \lambda_p \end{bmatrix}$$

In questa matrice si trovano lungo la diagonale gli autovalori λ_i ordinati in modo decrescente. Le colonne della matrice $\mathbf{L}$, invece sono costituite dai p autovettori linearmente indipendenti. Il procedimento applicato viene anche chiamato "Trasformazione di similarità" in

quanto la matrice $\mathbf{\Lambda}$ ottenuta è simile alla matrice $\mathbf{X}$ originale. Le due matrici sono simili perché la nuova matrice diagonale conserva alcune proprietà della matrice originale, quali:

- $|\mathbf{X}| = |\mathbf{\Lambda}| = \lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$;
- $\text{tr}(\mathbf{X}) = \text{tr}(\mathbf{\Lambda}) = \lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_p$;
- se $\mathbf{X}$ è simile a $\mathbf{\Lambda}$, anche $\mathbf{X}^{-1}$ è simile a $\mathbf{\Lambda}^{-1}$;
- $\mathbf{X}$ e $\mathbf{X}^T$ possiedono gli stessi autovalori ma diversi autovettori.

Quando la matrice $\mathbf{X}$ è simmetrica si hanno alcune proprietà particolari:

- gli autovalori ed autovettori di $\mathbf{X}$ sono reali;
- ogni coppia di autovettori $\mathbf{L}_i$ e $\mathbf{L}_j$ è formata da autovettori ortogonali;
- il numero di autovalori ed autovettori di $\mathbf{X}$ non nulli è pari al rango di $\mathbf{X}$;
- gli autovalori λ_i sono positivi quando $\mathbf{X}$ è definita positiva;
- gli autovalori λ_i sono non negativi quando $\mathbf{X}$ è definita semipositiva.

Gli autovettori rappresentano i versori del nuovo spazio, i loro elementi sono i coseni direttori degli assi tra loro ortogonali, relativi alle direzioni di massima varianza dei dati in ordine decrescente. Le righe della matrice $\mathbf{X}$ possono essere interpretate come vettori che hanno origine nell'origine del sistema di riferimento stesso, o come punti distribuiti in un ellissoide; gli assi principali dell'ellissoide sono definiti dagli autovettori per quanto riguarda la direzione e dagli autovalori per quanto riguarda la lunghezza. Gli autovettori contengono quindi l'informazione relativa al grado di correlazione delle variabili originali, mentre gli autovalori indicano la quantità di varianza spiegata dagli assi principali dell'ellissoide.

Le proiezioni degli oggetti nel nuovo spazio sono dette *score* e sono costituite da p vettori ($n \times 1$): $T_1, T_2, \dots, T_p$; gli *score* sono calcolati attraverso la rotazione della matrice dei dati rispetto a quella dei *loading*: $\mathbf{T} \equiv \mathbf{X} \mathbf{L}$. Da questa espressione deriva: $\mathbf{T}^T \mathbf{T} = \mathbf{\Lambda}$. Le colonne della matrice degli *score* $\mathbf{T}$ rappresentano le PC non standardizzate, dal momento che la matrice di partenza era la matrice dei dati non standardizzati. Volendo standardizzare le componenti principali in modo da renderle di lunghezza unitaria, l'espressione diventa: $\mathbf{T}^* = \mathbf{T} \mathbf{\Lambda}^{-1/2} = \mathbf{X} \mathbf{L} \mathbf{\Lambda}^{-1/2}$, dove $\mathbf{T}^{*T} \mathbf{T}^* = \mathbf{I}$. La matrice dei dati può essere riscritta come: $\mathbf{X} = \mathbf{T} (\mathbf{L} \mathbf{\Lambda}^{-1/2})^{-1} = \mathbf{T} \mathbf{\Lambda}^{-1/2} \mathbf{L}^T = \mathbf{T} \mathbf{A}^T$, dove la matrice $\mathbf{A}$ ha dimensioni ($p \times p$) e contiene, sulle righe, i *loading* standardizzati; si ha quindi che:

$$x_{ij} = \sum_{h=1}^p t_{ih} a_{jh} = \sum_{h=1}^p t_{ih} \lambda^{1/2} l_{jh}$$

Quindi le nuove variabili (componenti principali) possono essere espresse come combinazione lineare delle variabili originali, ciascuna delle quali compare pesata dal rispettivo valore del *loading*:

$$\begin{cases} \text{PC}_1 = a_{11} x_1 + a_{12} x_2 + \dots + a_{1p} x_p \\ \text{PC}_2 = a_{21} x_1 + a_{22} x_2 + \dots + a_{2p} x_p \\ \dots \\ \text{PC}_p = a_{p1} x_1 + a_{p2} x_2 + \dots + a_{pp} x_p \end{cases}$$

dove i *loading* sono compresi nell'intervallo $[-1; +1]$ perché sono stati standardizzati. In forma matriciale la relazione può essere scritta come: $\mathbf{T} = \mathbf{X} \mathbf{A}$. Lo stesso risultato può essere raggiunto operando la trasformazione di similitudine sulla matrice dei dati già autoscalati. Gli autovalori λ rappresentano la varianza associata a ciascun autovettore cioè a ciascuna componente principale; di solito gli autovalori più piccoli, che spiegano una piccola parte della varianza totale, sono associati a informazione non rilevante o rumore: è possibile quindi separare il rumore dall'informazione sistematica considerando significative solamente le componenti principali aventi un autovalore elevato e scartando quelle associate ad autovalori

piccoli. Se il numero di componenti principali è uguale al numero p di variabili originali, l'operazione consiste in una semplice rotazione del set di dati originale, senza modificare l'informazione complessiva presente nella matrice dei dati $\mathbf{X}$; se invece si utilizza un numero di componenti inferiore al numero di variabili, la quantità di informazione contenuta nella matrice dei dati approssimata è minore di quella contenuta nella matrice originale: si ha una riduzione di dimensionalità nel problema ma, l'informazione eliminata riguarda solamente rumore sperimentale. Le proprietà delle componenti principali t_m possono essere riassunte così:

- il valore atteso E per la componente principale t_m è nullo se i dati sono almeno centrati;
- la varianza della componente principale t_m è espressa dall'autovalore corrispondente;
- la correlazione tra due componenti principali è nulla se queste sono diverse;
- le varianze delle componenti principali assumono valori decrescenti;
- la varianza totale spiegata dalle componenti principali è pari alla traccia della matrice $\mathbf{S}$;
- il prodotto delle varianze spiegate dalle singole componenti principali è pari al determinante della matrice $\mathbf{S}$.

Una volta calcolate le componenti principali, il processo matematico inverso consente di calcolare la matrice dei dati $\mathbf{X}$ come un nuovo prodotto di matrici:

$$\mathbf{X}' = \mathbf{T} \mathbf{A}^T$$

$$(n, p) = (n, M) (M, p)$$

Come già accennato, se il numero M di componenti principali considerate è pari al numero p di variabili originali, la matrice $\mathbf{X}'$ contiene la stessa quantità di informazione della matrice dei dati originale $\mathbf{X}$; se, invece, il numero di componenti principali considerate è minore del numero di variabili originali ($M < p$), la quantità di informazione contenuta nella matrice $\mathbf{X}'$ è minore di quella contenuta nella matrice dei dati originale $\mathbf{X}$: si può dire che la matrice $\mathbf{X}'$ sia un'approssimazione di $\mathbf{X}$ dalla quale siano stati eliminati la quantità di informazione spuria ed il rumore.

L'algoritmo NIPALS

Sono disponibili numerosi algoritmi per il calcolo delle componenti principali; alcuni, come l'algoritmo "Eigenj", permettono di calcolare tutte le componenti principali contemporaneamente ma presentano alcuni svantaggi importanti, come l'impossibilità di studiare matrici incomplete o situazioni indeterminate in cui il numero di variabili è superiore a quello degli oggetti presenti. In questo paragrafo viene considerato un altro tipo di algoritmo che permette di calcolare le componenti principali anche nelle situazioni difficili appena descritte. Questo strumento matematico è detto algoritmo "NIPALS" (*Nonlinear Iterative Partial Least Squares*) ed è stato sviluppato da Svante Wold. In linea di principio il metodo calcola iterativamente l'autovettore e la componente principale relativi all'autovalore massimo: quando il metodo giunge a convergenza, la componente principale calcolata viene sottratta alla matrice dei dati autoscalati. La stessa operazione viene condotta sulla nuova matrice $\mathbf{X}$, chiamata matrice dei residui, che non contiene più l'informazione portata dalla prima componente già calcolata: in questo modo le componenti principali vengono ad essere ortogonali tra loro dal momento che ciascuna spiega un tipo di informazione nuova.

Ad ogni iterazione viene calcolata la matrice $\mathbf{X}_t$ relativa alla componente t -esima, che contiene l'informazione di cui si fa carico la t -esima componente principale: in questa matrice hanno valori non nulli solo le variabili che concorrono alla definizione della componente t . La matrice $\mathbf{X}_{t+1}$, invece contiene l'informazione della matrice originale eccetto quella spiegata dalle prime t componenti principali, quindi le componenti successive non contengono l'informazione relativa a quelle precedenti. In questo modo le componenti risultano tutte ortogonali tra loro

perché l'informazione contenuta nelle componenti calcolate viene eliminata dall'informazione utilizzata per calcolare quelle successive. Un notevole vantaggio presentato da questo algoritmo è la possibilità di calcolare una componente alla volta, consentendo di arrestarsi al numero di componenti desiderato.

Gli autovalori

Come già sottolineato, gli autovalori ricavati dall'analisi delle componenti principali, rappresentano la lunghezza degli assi principali dell'ellissoide relativo alla matrice di covarianza: gli autovalori sono perciò proporzionali alla variazione dei dati lungo le direzioni individuate dai *loading* e sono inoltre proporzionali all'informazione portata da esse. La variazione contenuta dai dati, cioè l'informazione da essi portata, è quindi data dalla somma degli autovalori. Si possono introdurre diversi indicatori che permettono di valutare in modo quantitativo la varianza spiegata dalle componenti principali:

- *Varianza percentuale spiegata V%*

$$V_i \% = \frac{\lambda_i}{\sum_{m=1}^p \lambda_m} * 100$$

al numeratore è presente la varianza spiegata dall'*i*-esima componente; al denominatore è presente la varianza totale spiegata. L'espressione indica la percentuale di varianza spiegata dall'*i*-esima componente.

- *Varianza percentuale cumulativa Cum.V%*

$$Cum.V_M \% = \frac{\sum_{m=1}^M \lambda_m}{\sum_{m=1}^p \lambda_m} * 100$$

Esprime la percentuale di varianza spiegata dalle prime *M* componenti principali.

- *Varianza residua percentuale V.R.%*

$$R.V_M \% = \frac{\sum_{m=M+1}^p \lambda_m}{\sum_{m=1}^p \lambda_m} * 100 = 100 - Cum.V_M \%$$

Questa quantità rappresenta il complemento a 100 della varianza cumulativa percentuale, infatti definisce la percentuale di varianza non ancora spiegata, cioè residua, dopo aver scelto *M* componenti principali significative. È importante sottolineare che, se le variabili originali sono autoscalate o se, allo stesso modo, l'analisi è stata condotta sulla matrice di correlazione, si ha la relazione: $\text{tr}(\mathbf{S}) = \text{tr}(\mathbf{R}) = \lambda_1 + \lambda_2 + \dots + \lambda_p = p$.

Matrice dei *loading*

La matrice dei *loading* è rappresentata di solito con **L**; le colonne della matrice **L** rappresentano gli autovettori della matrice di correlazione, mentre le righe rappresentano le variabili originali. In ogni riga si trovano quindi i coefficienti che indicano l'importanza di ogni

variabile originale sull'autovettore corrispondente. Si possono definire i *loading* come coefficienti lineari standardizzati, per cui valgono le relazioni:

$$-1 \leq l_{jm} \leq +1$$

e

$$\sum_j l_{jm}^2 = 1.$$

Da queste relazioni emerge che gli autovettori hanno varianza unitaria. Se l_{jm} ha valore vicino ad uno in valore assoluto, significa che la variabile j -esima rappresenta in modo preponderante la componente m -esima; viceversa, se l_{jm} ha valore vicino a zero in valore assoluto, significa che la j -esima variabile originale non rappresenta in modo significativo la m -esima componente principale. La matrice dei *loading* fornisce dei valori numerici che consentono rappresentazioni grafiche molto efficaci, dette *loading plot* (Figura 14).

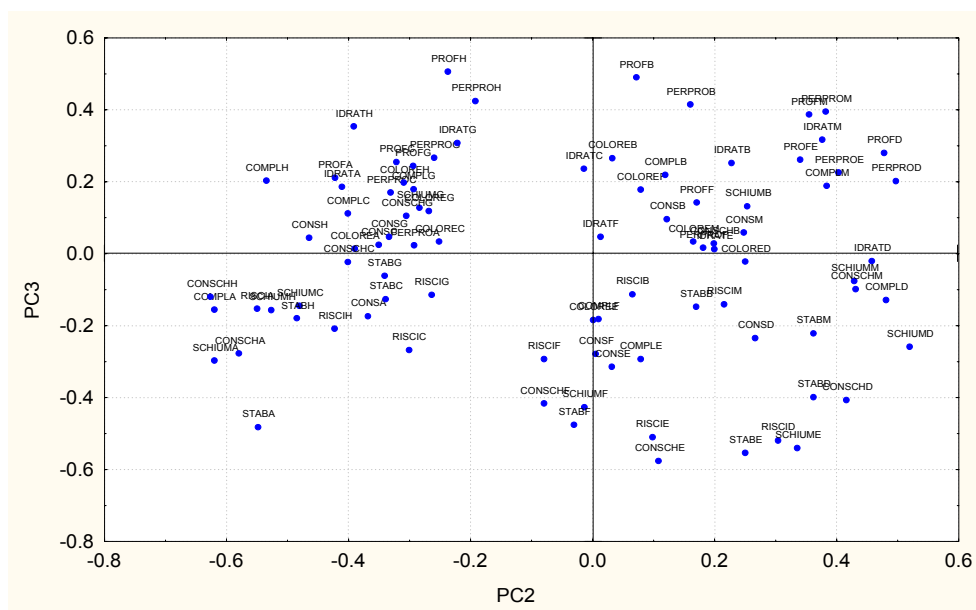


Figura 14. Loading plot

Questo grafico permette di valutare l'importanza di ogni variabile originale nelle nuove componenti principali e le relazioni di dipendenza diretta ed inversa tra le variabili originali. Di seguito è rappresentato un esempio di questo tipo di diagramma. Gli assi cartesiani sono costituiti da due componenti principali e i punti rappresentano le variabili originali individuate dalla coppia di *loading* che ciascuna variabile ha nelle due componenti considerate. Ogni variabile è così compresa in uno spazio definito dagli estremi $[-1; +1]$. Le variabili che si trovano vicino all'origine degli assi non sono significative per la determinazione delle due PC considerate; variabili che assumono valori elevati sull'asse PC_1 (sia positivi che negativi) contribuiscono in modo preponderante alla definizione della prima componente principale, viceversa, variabili che assumono valori elevati su PC_2 (sia positivi che negativi) contribuiscono maggiormente alla definizione della seconda componente principale. Alcune variabili possono trovarsi vicine nel grafico dei *loading*; in questo caso, le variabili portano informazione simile nella descrizione del problema e sono quindi correlate; se questa situazione si ripete per tutte le componenti considerate, è possibile eliminare l'informazione ridondante considerando una sola

di queste variabili. Variabili che si trovano in posizione opposta rispetto all'origine, mostrano anch'esse di contenere lo stesso tipo di informazione ma in questo caso sono correlate attraverso una dipendenza inversa.

Matrice degli score

Come già sottolineato, i valori degli score sono dati dalla relazione:

$$t_{im} = x_{i1}l_{1m} + x_{i2}l_{2m} + \dots + x_{ip}l_{pm} = \sum_j x_{ij}l_{jm}$$

Gli *score* sono esprimibili quindi attraverso una combinazione lineare delle variabili originali e i coefficienti della combinazione sono dati dai valori dei *loading* per quella specifica componente. Il valor medio per gli *score* è zero come per i *loading* ma, a differenza di ciò che accade per questi ultimi, gli *score* non sono limitati da relazioni di chiusura superiore o inferiore. Gli *score* rappresentano le nuove coordinate degli oggetti nel nuovo sistema di riferimento costituito dalle componenti principali. Anche gli *score* possono essere rappresentati graficamente mediante gli *score plot*, dei quali viene fornito un esempio in Figura 15.

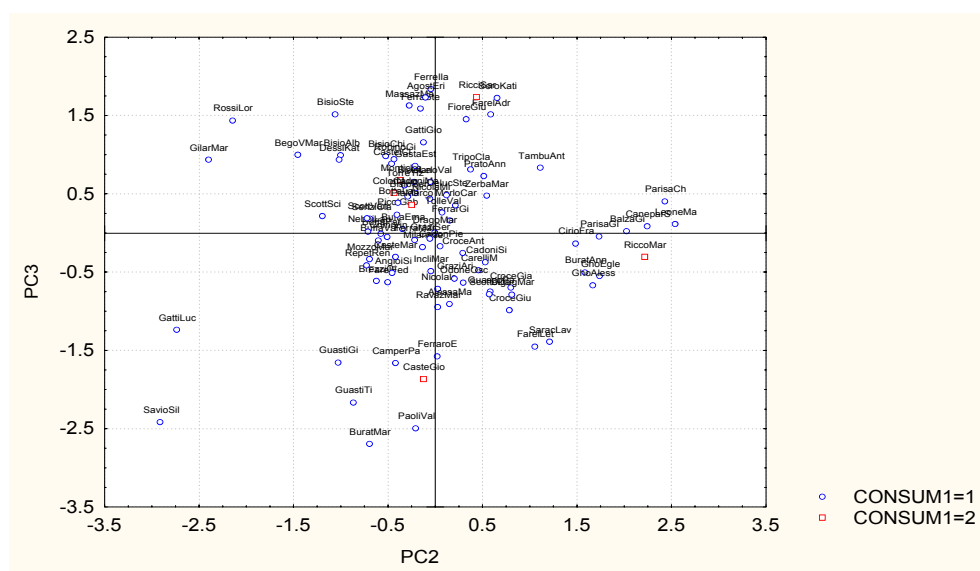


Figura 15. Score plot

L'analisi grafica che si può condurre studiando uno *score plot* è simile all'analisi sui *loading plot* appena vista. Il diagramma riporta i diversi punti nello spazio definito dalle due componenti principali scelte e consente di verificare il comportamento degli oggetti rispetto alle due componenti, gli eventuali raggruppamenti, la presenza di dati anomali o di distribuzioni particolari. Le coordinate di ogni oggetto sono date dalla coppia di *score* che ogni oggetto presenta per quelle componenti. L'analisi deve essere condotta parallelamente all'analisi dei *loading*, infatti, oggetti che si trovano nel grafico degli *score* nella stessa zona in cui sono confinate alcune variabili nel grafico dei *loading* presentano valori elevati per quelle variabili e valori bassi per variabili che si trovano dalla parte opposta. È quindi possibile interpretare il comportamento degli oggetti rispetto alle variabili originali studiando la loro rappresentazione

rispetto alle componenti principali. Quattro esempi di particolarità che si possono riscontrare negli *score plot*, sono riassunti in Figura 16.

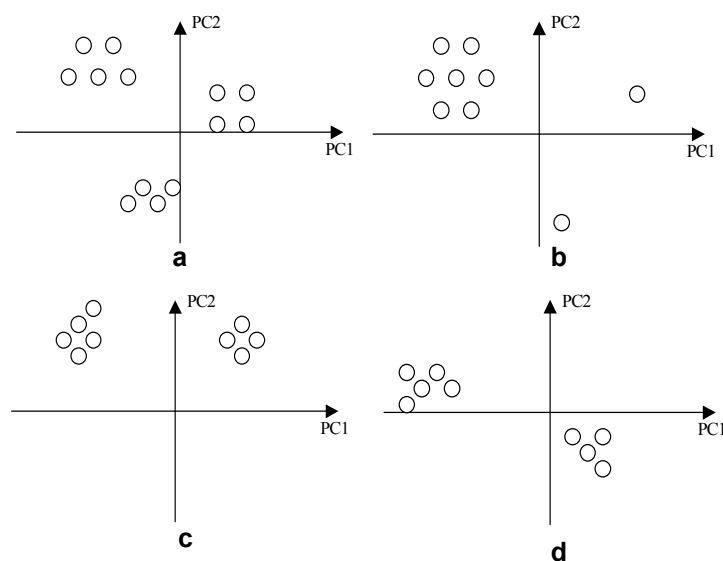


Figura 16: Particolarità riscontrate negli *score plot*

Nell'esempio a) si possono individuare chiaramente tre raggruppamenti ben separati; nell'esempio b) si ha un unico raggruppamento e due oggetti che sono molto lontani dagli altri e vengono definiti outliers, questi oggetti rappresentano quindi situazioni anomale; nel caso c) si hanno due gruppi simmetrici rispetto a PC2: questa situazione si verifica quando tra i due insiemi c'è ridondanza di informazione; la stessa situazione di ridondanza si ha nel caso d) per i due gruppi simmetrici rispetto all'origine, il gruppo che si trova a valori alti su PC1 e bassi su PC2 viene spiegato dalle variabili che contribuiscono alla prima PC ma non alla seconda, il gruppo che si trova vicino all'origine, infine, non viene spiegato né dalla prima né dalla seconda PC e probabilmente la quantità di informazione da esso apportata verrà spiegata da una PC successiva.

La matrice dei residui **R**

Dopo aver condotto un'analisi sulla quantità di informazione spiegata dalle componenti giudicate significative, è utile condurre un'analisi ulteriore sulla quantità di informazione che resta nella matrice dei residui **R**, definita come:

$$\mathbf{R} = \mathbf{X} - \hat{\mathbf{X}},$$

in cui gli elementi della matrice $\hat{\mathbf{X}}$ sono definiti come:

$$\hat{x}_{ij} = \sum_{k=1}^M t_{ik} l_{kj}.$$

La matrice $\hat{\mathbf{X}}$ contiene quindi le stime dei dati x_{ij} calcolate considerando le prime M componenti principali. Analizzando le righe della matrice **R** è possibile individuare gli oggetti che presentano un maggiore errore in predizione su tutte le variabili, cioè quelli che vengono

approssimati male rispetto agli altri a parità di PC_s utilizzate. È inoltre possibile valutare quali variabili caratterizzano maggiormente il singolo oggetto, perché sono quelle che presentano il minor valore dei residui. L'analisi delle colonne porta invece alla determinazione di quanto bene siano state descritte le variabili iniziali: residui elevati indicano che la variabile in questione non è stata utilizzata nelle PC_s considerate significative per la soluzione del problema.

Le componenti significative

È già stato sottolineato che le componenti principali spiegano una quantità di varianza via via decrescente, quindi le ultime componenti portano poca informazione, generalmente informazione spuria o errore; è utile separare questa parte dall'informazione utile necessaria al fine della comprensione e della risoluzione del problema affrontato e comunque dall'informazione di tipo sistematico. Per compiere questa operazione si rende necessario generalmente considerare un numero di componenti principali ridotto e minore del numero delle variabili originali. Di seguito vengono presi in considerazione alcuni metodi per la scelta delle PC_s significative.

Eliminazione delle PC

Come già visto, dopo la PCA i dati vengono rappresentati come:

$$x_{ij} = \sum_{k=1}^p t_{ik} l_{kj},$$

dove l'indice k scorre sulle p colonne della matrice degli *score* e le p righe della matrice dei *loading*. I *loading* sono ordinati in base all'importanza dell'informazione spiegata, perciò i primi apporteranno un contributo importante, mentre gli ultimi giustificano principalmente gli scostamenti dei valori dall'informazione principale. La riduzione del numero di PC avviene stimando i dati iniziali utilizzando non tutti i p assi ma sfruttandone un sottogruppo costituito da M assi con $M < p$. L'espressione si può perciò riscrivere come:

$$\hat{x}_{ij} = \sum_{k=1}^M t_{ik} l_{kj}, \text{ con } M < p.$$

Nel caso in cui non si abbia una misura dell'errore sperimentale commesso, si sono sviluppati metodi per l'approssimazione della dimensionalità dei dati e per la scelta del numero di PC significative.

Metodo della varianza cumulata

Questo metodo consiste in una misura della varianza riprodotta dai dati stimati utilizzando un numero $M < p$ di componenti in predizione. Le espressioni per la varianza cumulata sono riportate in Figura 17; il singolo dato $\hat{x}_{ij}$ è stimato sfruttando le prime M componenti.

$$\%VarCum = \left(\frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^p \hat{x}_{ij}^2}{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^p x_{ij}^2} \right) * 100 \quad \%VarCum = \left(\frac{\sum_{i=1}^M \lambda_i}{\sum_{i=1}^p \lambda_i} \right) * 100$$

Figura 17. Espressioni per il calcolo della varianza cumulata

Vengono considerate significative le M componenti per le quali la varianza raggiunge un valore prefissato. Rimane quindi il problema della scelta del valore di varianza da considerare; a tale scopo sono stati proposti valori di 90%, 95% e 99%, tuttavia la scelta dipende dal tipo di dati e dalla quantità di errore presente. Infatti, l'uso di questo metodo è di norma riservato a situazioni in cui si conosce almeno l'ordine di grandezza dell'errore commesso.

Cross-validazione

L'approccio al problema proposto dai metodi appena visti, mira principalmente all'individuazione del punto di separazione tra le M componenti che portano informazione utile alla risoluzione del problema e le $(p - M)$ che portano informazione principalmente legata all'errore; il metodo di cross-validazione, invece mira all'identificazione delle M componenti che hanno una capacità predittiva migliore. I dati sono suddivisi in g gruppi di dimensionalità inferiore a n e le prove omesse sono stimate sfruttando la PCA a partire da quelle rimanenti. Si indichi con x_{ij} un elemento della matrice dei dati $\mathbf{X}$ e siano $\mathbf{L}$ la matrice dei *loading* e $\mathbf{T}$ quella degli *score*; il valore predetto utilizzando M PC diventa:

$$\hat{x}_{ij} = \sum_{k=1}^M l_{jk} t_{ik}$$

Per ogni gruppo si fa variare il numero M di PC_s utilizzate e si calcola l'indice di bontà predittiva *PRESS* (*Predictive Error Sum of Squares*):

$$PRESS(M) = \frac{1}{np} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^p (x_{ij} - \hat{x}_{ij})^2$$

Viene calcolato anche un secondo indice definito come:

$$TPRESS = \sum_{k=1}^g PRESS_k(M)$$

La numerosità ottimale delle componenti viene stabilita sulla base di test condotti sul valore di *TPRESS*. Questo procedimento può presentare differenti approcci a seconda del metodo con cui vengono determinati i g gruppi e di quali test possono essere applicati ai valori *TPRESS*; di seguito sono presentati i metodi più comuni:

- *Cross-validazione “leave one sample out at a time”*

Con questo metodo si costituiscono n sottogruppi di numerosità $(n - 1)$, ognuno generato eliminando l' i -esima riga nella matrice dei dati $\mathbf{X}$. Considerando ogni sottogruppo, vengono determinati i *loading* attraverso la PCA e gli *score* a partire dalla matrice dei residui. L'operazione viene ripetuta eliminando ogni volta l'informazione spiegata dalle componenti già calcolate. Il numero M ottimale di componenti principali è individuato dal minimo valore di *TPRESS* _{α} che indica la miglior capacità predittiva delle PC considerate.

- *Cross-validazione “leave one group of elements out at a time”*

Il metodo appena descritto è utilizzato per piccoli set di dati a causa della grande quantità di calcoli richiesta. Quando la numerosità del campione diventa elevata è preferibile utilizzare questo secondo metodo proposto da Wold nel 1978 e che consiste nella suddivisione della matrice dei dati in n_g sottogruppi con n_g compreso tra 3 e 10; i sottogruppi sono costituiti da elementi diagonali e codiagonali. Il procedimento matematico è del tutto analogo al precedente; il criterio di scelta è dato dal confronto tra *TRESS* _{M} calcolato ed *RSS* _{$M-1$} calcolato sui dati iniziali considerando $M-1$ componenti. Viene quindi verificata l'ipotesi che l'aggiunta di una componente in fase predittiva migliori l'approssimazione nei dati.

Altri metodi, di carattere empirico, si basano principalmente su rappresentazioni grafiche; questi metodi sono molto sfruttati grazie all'immediatezza dell'analisi anche se il loro fondamento statistico non è rigoroso come nel caso dei metodi precedenti.

Grafico degli autovalori: *scree plot*

Il primo metodo proposto per la scelta del numero di componenti significative è un metodo grafico: vengono riportati i valori degli autovalori rispetto al numero di componenti principali. Il diagramma che risulta è del tipo riportato in Figura 18. L'andamento è iperbolico, infatti gli autovalori assumono valori decrescenti. Vengono considerate significative le componenti per le quali l'abbassamento della varianza spiegata è più marcato. È possibile anche riportare, anziché gli autovalori, la varianza cumulativa percentuale; in questo caso il grafico risultante assume un andamento crescente asintotico.

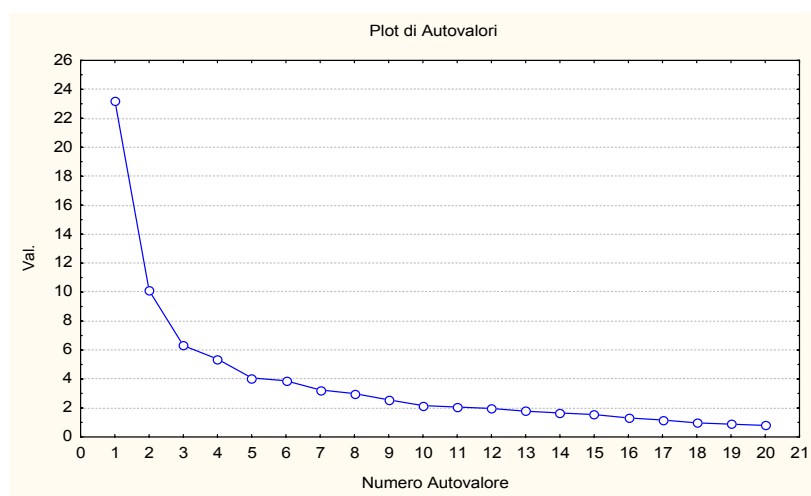


Figura 18. Scree plot

Vengono considerate significative le componenti che presentano un aumento della varianza cumulativa accentuato. Un'ulteriore versione del metodo consiste nell'esaminare i rapporti:

$$R_M = \frac{\lambda_M}{\lambda_{M+1}}$$

L'analisi dei rapporti tra autovalori successivi permette di individuare con maggior precisione la presenza di salti che corrispondono ad un'alterazione nella struttura dei dati. In questo caso vengono considerate significative le M componenti corrispondenti al massimo del rapporto.

Metodo dell'autovalore medio

Il metodo considera significative le componenti per le quali gli autovalori sono maggiori del valore medio degli autovalori. Nel caso in cui si lavori su matrici autoscalate, il valore medio degli autovalori è pari ad 1, per cui sono prese in considerazione le prime M componenti con autovalore maggiore o uguale ad uno. Lo svantaggio di questo metodo è il numero ridotto di

componenti che vengono considerate: è presente una variante che prevede di moltiplicare il valore medio per 0,7, in modo da considerare un numero di componenti superiore.

Funzione indicatrice di Malinowski (MIF)

La funzione è espressa come:

$$MIF = \frac{\left(\sum_{m=M+1}^p \frac{\lambda_m}{n(p-M)} \right)^{1/2}}{(p-M)^2}$$

Sono considerate significative le componenti per le quali si ha il minimo della funzione.

Validazione incrociata (Double-cross validation)

Viene calcolata la seguente espressione per ogni componente principale:

$$PRESS(M) = \sum_i \sum_j (\hat{x}_{ij}(M) - x_{ij})^2$$

Il termine *PRESS*, cioè la somma degli errori quadratici in predizione, è calcolato tra i dati originali e i dati predetti utilizzando le prime *M* componenti principali. Le componenti significative sono quelle che permettono di mantenere il rapporto *K* definito di seguito, inferiore all'unità.

$$K = \frac{PRESS(M)}{PRESS(M-1)}$$

Le proprietà principali

Il concetto di proprietà principale è di importanza fondamentale nell'analisi delle componenti principali. I versori del nuovo spazio che viene generato sono espressi, come già visto, come combinazioni lineari delle variabili originali. Si è anche visto che le variabili tra loro correlate portano lo stesso tipo di informazione e sono descritte dalla stessa componente principale, infatti variabili con informazione ridondante presentano *loading* elevati per la stessa componente principale. Componenti principali diverse sono quindi rappresentate da gruppi diversi di variabili: si può perciò affermare che le componenti principali rappresentano delle macroproprietà del sistema studiato. Ogni componente esprime una caratteristica del sistema e raggruppa le variabili originali legate a quella caratteristica. La definizione e la comprensione delle proprietà principali permettono quindi di dare nuove interpretazioni al sistema studiato e al set di dati.

Le macroproprietà emerse dall'analisi delle componenti principali sono molto utili in diversi campi di applicazione della chemiometria, soprattutto nei modelli di regressione. Alcuni metodi di regressione (*Principal component regression*, *Partial least squares regression*) sfruttano le proprietà principali per la costruzione del modello, anziché utilizzare le variabili originali: in questo modo si semplifica la struttura del modello attraverso la "condensazione" delle numerose variabili originali in poche macroproprietà con la caratteristica di contenere l'informazione presente nelle variabili originali. Altri campi che sfruttano le proprietà principali sono l'ottimizzazione, la classificazione (metodo SIMCA) e la pianificazione sperimentale.

CONTROLLO QUALITÀ NELL'ANALISI: MATERIALI DI RIFERIMENTO

Stefano Caimi, Sonia D'Ilio, Oreste Senofonte
Laboratorio di Tossicologia Applicata, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Uno dei principali obiettivi di un laboratorio analitico è quello di produrre risultati d'elevata qualità, ossia affidabili ed accettabili anche a livello internazionale. Questo può essere raggiunto, fra l'altro, attraverso l'utilizzo di metodi analitici affidabili e tecniche strumentali accurate, sia per quanto riguarda lo sviluppo di nuove metodologie analitiche che per le semplici analisi di routine (1).

L'insieme delle norme sulla qualità si basa su dei concetti fondamentali che riguardano essenzialmente alcuni punti, come:

- l'importanza della soddisfazione delle esigenze della committenza;
- l'identificazione e la definizione delle responsabilità funzionali;
- la valutazione dei rischi e dei vantaggi potenziali di ogni processo o attività prima della loro pianificazione.

La norma ISO 8402 (sostituita nel 2000 dalle ISO 9000 e 9004) definiva il sistema di qualità come: *la struttura organizzativa, le procedure, i processi e le risorse necessari ad attuare la gestione per la qualità* (2). Il modello scelto, ritenuto più idoneo, dalla gestione del laboratorio per la politica per la qualità deve essere definito, ma soprattutto documentato e riesaminato periodicamente, in modo tale da garantire la sua continua adeguatezza ed efficacia nel tempo in accordo con le linee guida e gli standard armonizzati esistenti. Per quanto riguarda le risorse umane, la gestione definisce le autorità, i compiti ed i rapporti reciproci del personale che dirige, esegue e verifica le attività di lavoro. Inoltre, per una corretta gestione di un sistema di qualità, una particolare importanza riveste la competenza, l'istruzione e l'esperienza del personale addetto all'utilizzo delle specifiche apparecchiature e delle strumentazioni; il suo addestramento e il continuo aggiornamento vanno valutati secondo le necessità che emergono durante le varie fasi dello studio o ricerca.

In particolare, una corretta gestione dei programmi di assicurazione di qualità dovrebbe includere, oltre ad una pianificazione ed aggiornamento continuo degli stessi, almeno le seguenti attività:

- la partecipazione ai circuiti interlaboratoriali quali esercizi di assicurazione qualità (con frequenze possibilmente regolari);
- l'uso di schemi di controllo di qualità interno attraverso tecniche statistiche;
- il conseguimento di certificazioni di conformità o accreditamento per una o più specifiche attività riguardanti il settore di azione del laboratorio operante;
- l'adozione di metodi validati (ove possibile);
- la ripetizione dei test o delle procedure di calibrazione usando gli stessi metodi oppure metodi differenti;
- l'impiego dei materiali di riferimento certificati e/o dei materiali di riferimento secondari (3).
- In questa relazione ci occuperemo in particolare dell'utilizzo dei materiali di riferimento nell'attività analitica.

Definizioni dei materiali di riferimento

Un laboratorio analitico operante in un sistema di qualità, dovrebbe utilizzare regolarmente i materiali di riferimento certificati per il controllo dell'accuratezza dell'intera procedura analitica. L'importanza dell'uso "regolare" di questi materiali, per l'ottenimento di risultati attendibili, è anche sottolineato nella ISO Guide 33 (4).

Esiste una distinzione fra un materiale di riferimento (*Reference Material*, RM) e un materiale di riferimento certificato (*Certified Reference Material*, CRM).

Il primo, infatti, può essere definito come: *un materiale o una sostanza che possiede una o più proprietà sufficientemente omogenee che sono ben definite per essere usate per la calibrazione di un apparato, la valutazione di un metodo di misura o l'assegnazione di valori ad un materiale.*

Per quanto riguarda un CRM, lo si può definire come: *un materiale di riferimento che possiede una o più proprietà che sono certificate attraverso una valida procedura tecnica e che è accompagnato da un certificato o altra documentazione pubblicata dall'istituto o dall'ente promotore del progetto di certificazione (5).*

Preparazione e certificazione

Un produttore di materiali di riferimento è un organismo tecnicamente competente (organizzazione pubblica o privata) che è pienamente responsabile dell'assegnazione dei valori certificati dei materiali di riferimento che produce e distribuisce - secondo le norme dettate dalle ISO Guide 31 e 35 – ed è accreditato alla certificazione di prodotto secondo la ISO/IEC Guide 65 (1, 6).

Per la preparazione e certificazione di un nuovo materiale di riferimento la Commissione Europea ha diffuso una serie di linee guida, sviluppate nell'ambito dello *Standards, Measurement and Testing Programme* sulla base delle procedure in uso all'ex BCR, oggi *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM) del Centro Comune di Ricerca di Geel in Belgio (7). Attualmente esistono numerosi centri nel mondo che producono materiali di riferimento, oltre al già citato IRMM, svolgono un ruolo primario lo statunitense *National Institute of Standards & Technologies* (NIST), il canadese *National Research Centre* (NRCC), il giapponese *National Institute for Environmental Studies* (NIES), l'inglese *Laboratory of the Government Chemist* (LGC), l'austriaca *International Atomic Energy Agency* (IAEA) e pochi altri. La IAEA ha creato un completo database (*IAEA Database of Natural Matrix Reference Materials*, liberamente consultabile dal sito internet www-naweb.iaea.org/nahu/external/e4/nmrm/) in cui vengono riuniti tutti i produttori esistenti, inclusi i minori (Allegato 1). Lo stesso Istituto Superiore di Sanità è citato in quell'elenco in quanto da alcuni anni è impegnato, in stretta collaborazione con l'IRMM, nella produzione e certificazione di nuovi materiali di riferimento in matrici ambientali ed alimentari (8-16).

Le fasi della preparazione e certificazione di nuovi materiali di riferimento sono codificate da rigidi protocolli e non è possibile, salvo casi particolari, escludere anche una sola parte della sequenza, che è così composta:

- progettazione;
- studio preliminare di fattibilità;
- campionamento della matrice;
- caratterizzazione della matrice (proprietà chimico-fisiche, granulometria, ed altro);
- effettuazione degli studi di omogeneità e stabilità a breve termine;
- confezionamento del materiale candidato alla certificazione;

- certificazione vera e propria per l'assegnazione dei valori;
- messa sul mercato del prodotto finale;
- studi di stabilità a lungo termine.

Taluni progetti possono essere riaperti anche dopo molto tempo per la necessità di inserire nuovi analiti o di ricertificare quelli già inclusi.

Per quanto attiene alla certificazione ed assegnazione dei valori (precedente punto 7), ogni valore certificato è ottenuto combinando i dati ottenuti mediante l'uso di almeno quattro metodi indipendenti di analisi forniti dai laboratori dei centri partecipanti. I risultati così ottenuti vengono discussi in una riunione generale conclusiva durante la quale vengono rigorosamente esaminati tutti gli aspetti riguardanti le analisi effettuate da ogni laboratorio. I dati anomali nella distribuzione, per i quali non vi sia totale accordo (quantunque giustificabili), vengono esclusi. La stessa regola di norma viene applicata anche per i dati sottoposti da laboratori non presenti alla riunione e che pertanto non possono essere difesi. I risultati vengono sottoposti ad una serie di trattamenti statistici in cui vengono determinati i seguenti parametri:

- omogeneità della varianza (test di *Cochran*);
- normalità della distribuzione dei valori medi (test di *Kolmogorov-Smirnov*);
- valori medi rigettati (test di *Nalimov*);
- media delle medie per ogni elemento;
- deviazione standard;
- deviazione standard intra- ed inter-laboratorio;
- intervallo di confidenza al 95% delle medie ($t(0.05, r-1) SD/\sqrt{r}$, in cui t = valore della distribuzione di *Student*, r = gradi di libertà).

Nel certificato allegato ad un CRM devono essere contenute, come da raccomandazioni dell'ISO Guide 31 (17), oltre ovviamente al nome e all'indirizzo dell'organizzazione che produce e certifica il prodotto, altre informazioni quali:

- data di certificazione,
- descrizione del materiale di riferimento,
- stabilità,
- istruzioni per il metodo di trasporto,
- istruzioni per una corretta conservazione,
- metodo di preparazione,
- dichiarazione di omogeneità,
- valori delle proprietà certificate con la relativa incertezza,
- valori delle proprietà secondarie date come sola informazione ma non certificate,
- tecniche analitiche usate per ottenere le misure per la certificazione,
- significato attribuito all'incertezza statistica (18).

Queste ultime quattro informazioni sono di grande importanza specialmente durante la fase d'acquisto o della scelta di un CRM ai fini di un suo corretto e ottimale utilizzo. Non è ovvio ricordare che un CRM appropriato all'analisi da effettuare dovrà avere un elevato grado di *somiglianza* con il campione in esame sia in termini di costituzione della matrice che di livello di concentrazione degli analiti.

Per quanto riguarda il concetto di **incertezza** associata ad un valore di una proprietà certificata di un CRM, questo ha subito negli ultimi anni alcune revisioni. In particolare, alcuni autori ritengono di dover tenere conto di un'incertezza come combinazione di una serie di fattori, fra i quali l'incertezza correlata alle possibili variazioni inter-contenitore del materiale, all'instabilità dovuta alla conservazione a lungo termine ed infine all'instabilità durante il trasporto (19).

Uso dei CRM

Un CRM è destinato principalmente a tre tipi di utilizzo in una procedura per la determinazione di un analista:

- per la *calibrazione* di strumenti o apparati.
La composizione o le proprietà note del materiale, solitamente con una bassa incertezza, aiutano ad individuare e correggere gli errori sistematici dovuti alla tecnica strumentale in uso.
- come *materiale di controllo*, analizzandolo simultaneamente ad altri campioni incogniti.
È ovviamente indispensabile che il CRM, proveniente da una matrice reale (naturale o complessa) o sintetica, abbia un comportamento chimico e fisico quanto più possibile simile ai campioni d'interesse (7).
- come *campione noto* nello sviluppo di una nuova metodologia (20).

L'uso dei CRM consente anche di verificare i recuperi reali di un trattamento preanalitico (preconcentrazione, estrazione, ecc.). Il limite di questa applicazione risiede nel fatto che la matrice certificata difficilmente è del tutto simile a quella campione in esame, soprattutto in termini di omogeneità e livello di concentrazione degli analiti.

Un'ulteriore applicazione dei CRM consiste nell'adoperarli come "riferimento" nella verifica dei *materiali di riferimento secondari*. Questi sono generalmente prodotti all'interno dei laboratori allo scopo di verificare l'accuratezza di analisi di routine e sono anche detti controlli interni o standard di lavoro.

Conclusione

Alla luce di quanto esposto finora, si può concludere affermando che il regolare e corretto uso dei CRM è lo strumento più semplice e sicuro (anche se non sempre il più economico) per verificare l'accuratezza di una misura, di cui possa disporre un laboratorio che operi in condizioni di qualità. Per quanto un'analisi possa essere effettuata in maniera rigorosa ed attenta, questa può risultare falsata se lo standard di riferimento non è affidabile. In un moderno laboratorio analitico, specie nel caso di determinazioni di analiti in traccia ed ultratraccia, l'analisi deve essere basata sul confronto tra la misura dei campioni e quella di un opportuno materiale di riferimento. Il ricorso, pertanto, all'uso costante di materiali di riferimento certificati deve sempre più essere promosso ed incoraggiato. Investire nella qualità di un'analisi è una strategia che certamente ripaga in termini di credibilità ed inoltre può consentire spesso un effettivo ritorno economico.

Bibliografia

1. ISO/IEC 65. General requirements for bodies operating product certification systems. Geneva: International Organization for Standardization; 1996.
2. ISO 8402. Quality management and quality assurance - Vocabulary. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.
3. ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: International Organization for Standardization; 1999.

4. ISO 33. Uses of certified reference materials. Geneva: International Organization for Standardization; 1989.
5. Vandecasteele C, Block CB. Modern methods for trace element determination, John Wiley & Sons Ltd.; 1993.
6. Zschunke A. The role of reference materials in analytical chemistry. *Accred Qual Assur* 2003;8:247-251.
7. Guidelines for the production and certification of BCR reference materials, Document BCR/48/93, European Commission, DG XII (SM&T Programme), 54 pp., 1994.
8. Caroli S. Certified reference materials: use, manufacture and certification. *Anal Chim Acta* 1993;283:573-582.
9. Caroli S, Senofonte O, Caimi S, Pauwels J, Kramer GN. Planning and Certification of New Multielemental Reference Materials for Research in Antarctica. *Mikrochim Acta* 1996;123:119-128.
10. Caroli S, Senofonte O, Caimi S, Pucci P, Pauwels J, Kramer GN. A Pilot Study for the Preparation of a New Reference Material Based on Antarctic Krill. *Fresenius' J Anal Chem* 1998;360:410-414.
11. Caroli S, Senofonte O, Caimi S, Pauwels J, Robouch P, Kramer GN. Certified Reference Material for Research in Antarctica: the Case of Marine Sediment. *Microchem J* 1998;59:136-143.
12. Caimi S, Senofonte O, Caroli S. Certified Reference Materials in Antarctic Matrices: Development and Use. In: *Environmental Contamination in Antarctica. A Challenge to Analytical Chemistry*, S Caroli, P Cescon, DWH Walton (Ed.), Elsevier Science; 2001. p. 275-292.
13. Caroli S, Senofonte O, Caimi S, Pauwels J, Kramer GN. Production of a New Certified Reference Material for Trace Elements in Antarctic Krill. *J Anal At Spectrom* 2001;16:1142-1146.
14. Caimi S, Senofonte O, Kramer GN, Robouch P, Caroli S. A Pilot Study on the Feasibility of the Preparation of a New Certified Reference Material Based on the Antarctic Scallop *Adamussium colbecki*. *Int J Environ Anal Chem* 2004; in stampa.
15. Caroli S, Forte G, Alessandrelli M, Cresti R, Spagnoli M, D'Ilio S, Pauwels J, Kramer GN. A Pilot Study for the Production of a Certified Reference Material for Trace Elements in Honey. *Microchem J* 2000;67:227-233.
16. Spagnoli M, Forte G, Alessandrelli M, Cresti R, D'Ilio S, Caroli S. Trace Elements in Bovine Muscle: an Ongoing Project for a New Certified Reference Material. *Microchem J* 2000;67:235-243.
17. ISO 31. Contents of certificates of reference materials. Geneva: International Organization for Standardization; 1981.
18. ISO 35. Certification of reference materials – General and statistical principles. Geneva: International Organization for Standardization; 1989.
19. Pauwels J, van der Veen AMH, Lamberty A, Schimmel H. Evaluation of uncertainty of reference materials. *Accred Qual Assur* 2000;5(4):95-99.
20. The use of matrix reference materials in environmental analytical processes, A Fajgelj and M Parkany Ed.; 1999.

Allegato 1

Produttori di materiali di riferimento

Sigla	Denominazione Produttore	Indirizzo
AMI	LGC Promochem AB	P.O. Box 1737 SE-50117 Boras Sweden
ANAL	Analytika Ltd.	U Elektry 650 CZ-198 00 Prague 9 Czech Republic
AS	Standards Australia Materials and Quality Standards	P.O. Box 5420 Sydney NSW 2001 Australia
BAM	Bundesanstalt f_r Materialforschung und Pr_fung (BAM) Reference Materials Division	Unter den Eichen 87 D-12200 Berlin Germany
BAS	Bureau of Analysed Samples Ltd	Newham Hall, Newby Middlesbrough TS8 9EA, Cleveland United Kingdom
BCR	Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) Management of Reference Materials (MRM) Unit	Retieseweg B-2440 Geel Belgium
BS	Brammer Standard Company Inc.	14603 Benfer Road Houston, TX 77069-2895 Usa
CANMET	Canada Centre for Mineral and Energy Technology Canadian Certified Reference Materials Project	555 Booth Street Ottawa, Ontario, K1A 0G1 Canada
CAS	Research Center for Eco-Environmental Sciences Chinese Academy of Sciences (CAS)	18 Shuangqing Road, Haidan District Beijing 100085 China
CENAM	National Center of Metrology Ceramics Division, Materials Metrology Department	km 4.5, Camino a Los Cues Queretaro 76241 Mexico
CRMP	National Research Council of Canada Institute for Marine Biosciences	1411 Oxford Street Halifax, Nova Scotia, B3H 3Z1 Canada
CTQ	Laboratoire de Toxicologie / INSPQ Trace metals and organic contaminants division, Human toxicology branch/INSPQ	945,avenue Wolfe, 4e estage Sainte-Foy, Quebec, G1V 5B3 Canada
DH	Dillinger H_ttenwerke AG	Postfach No 1580 D-66748 Dillingen-Saar Germany
DOMTAR	A.S.O. Design Inc	83. Beacon Rd., Kirkland, Que.H9J 2E9 Canada

segue

continua

Sigla	Denominazione Produttore	Indirizzo
ERA	Environmental Resource Associates	5540 Marshall Street Arvada, Colorado 80002 USA
GBW	National Research Centre for Certified Reference Materials Office of CRMs	18, Bei San Huan Dong Lu, Hepingjie 100013 Beijing China
GSJ	Institute of Geoscience Geological Survey of Japan	1-1-1 Higashi Tsukuba, Ibaraki, 305-8567 Japan
IAEA	International Atomic Energy Agency Analytical Quality Control Services	P.O Box: 100 Wagramerstrasse 5, A-1400 Wien Austria
ICHTJ	Institute of Nuclear Chemistry and Technology Department of Analytical Chemistry	ul. Dorodna 16 03-195 Warsaw Poland
IGI	Institute of Geochemistry Siberian Branch of Russian Academy of Sciences (SB RAS)	664033, P.O. Box 4019 Irkutsk Russia
IIS	Institute for Interlaboratory Studies	P.O. Box 8204 NL-3301 CE Dordrecht The Netherlands
INRA	Laboratoire d'Etudes Analyses et de Recherches Methodologiques in Analysis Vegetales et Environnementales (L.E.R.M.A.V.E)	BP 81 33882 F- Villenave D'Ornon France
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnologicas Nucleo de Materias de Referencia-Divisao de Quimica	Cidade Universitaria Armando de Salles Oliveira 05508-901 Sao Paulo-SP Brazil
IRANT	Institute of Radioecology and Applied Nuclear Techniques	Garbiarska 2, P. O. Box A-41 04061 Kosice Slovak Republic
ISS	Istituto Superiore di Sanità	Viale Regina Elena 299 I-00161 Rome Italy
JAC	The Japan Society for Analytical Chemistry Seishin Trading Co., LTD	2-1 Sannomiya-cho, 1-chome Chuo-ku, Kobe 650-0021 Japan
LGC	LGC Promochem Reference Material Production	Queens Road Teddington, Middlesex TW11 0LY United Kingdom
LNE	Laboratoire National D'Essais	1, Rue Gaston Boissier F-75015 Paris cedex 15 France
MINTEK	MINTEK	P/Bag X3015 Randburg 2125 Republic of South Africa

segue

continua

Sigla	Denominazione Produttore	Indirizzo
NAMI	LGC Promochem AB	P.O. Box 1737 SE-501 17 Boras Sweden
NARL	National Analytical Reference Laboratory (NARL)	P.O. Box 83 Cottesloe WA 6011 Australia
NIES	National Institute for Environmental Studies Division of Environmental Chemistry	16-2 Onagowa, Tsukuba Ibaraki 305 Japan
NIPH	National Institute of Public Health Department of Toxicological Analysis	Srobarova 48 CZ-100 42 Praha 10 Czech Republic
NIST	National Institute of Standards & Technology Standard Reference Materials Programme	100 Bureau Drive, stop 2322 Gaithersburg MD 20899-2322 USA
NPO	NPO Taiphyn	Lenin Street 82 249020 Obninsk Russia
NRC	National Research Council of Canada Institute for National Measurements Standards	M-12, 1500 Montreal Road Ottawa, Ontario, K1A 0R6 Canada
NRI	Nuclear Research Institute Rez Near Prague Central Analytical Laboratory	25068 Rez near Prague Czech Republic
NWRI	National Water Research Institute National Laboratory for Environmental Testing (NLET)	P.O. Box: 5050 Burlington, Ontario, L7R 4A6 Canada
NYS	Wadsworth Center New York State Department of Health	P.O. Box 509 Albany, NY 12201-0509 USA
OSI	Ocean Scientific International Ltd South down House	Station Road Petersfield, Hampshire, GU32 2EA United Kingdom
Pb-anal	Pb-anal Analysis of Industrial Waste and Environmental Samples	Garbiarska 2, 040 01 Kosice Slovak Republik
PM	Metimex Standard Reference Materials	Ul. Gomicza 10 PL-44120 Pyskowice Poland
RECIPE	RECIPE Chemicals + Instruments GmbH Labortechnik	Sandstrasse 37 - 39 D-80335 Munich Germany
RLL	Rocklabs limited	P.O.Box 18142 Auckland New Zealand

segue

continua

Sigla	Denominazione Produttore	Indirizzo
RTC	Resource Technology Corporation	P.O. Box 1346 Laramie, WY 82073 USA
SCP	SCP SCIENCE	21800 Clark Graham Baie d'Urfe, Quebec, H9X 4B6 Canada
SERO	Sero AS	P.O. Box 24 N-1375 Billingstad Norway
SIMR	The Swedish Institute for Metals Research Department of Chemistry	Drottning Kristinas vaeg 48 S-11428 Stockholm Sweden
SMU	Slovak Institute of Metrology Chemical Measurement Dept.	Karloveska 63 842 55 Bratislava Slovak Republic
SPS	LGC Promochem AB	P.O. Box 1737 SE-501 17 Boras Sweden
UMM	University of Mining and Metallurgy Faculty of Physics and Nuclear Techniques	Al. Mickiewicza 30 30-059 Krakow Poland
UNS	Institute of Mineral Raw Materials Analytical Laboratory	Vitizna 425 CZ-28403 Kutna Hora Czech Republic
USGS	U.S. Geological Survey	P.O. Box 25046, MS 973 Denver, CO 80225 USA
WAU	Wageningen University Department of Environmental Sciences (WEPAL)	Postbus 8005 NL-6700 EC Wageningen The Netherlands
WELL	Wellington Laboratories Inc.	398 Laird Road Guelph, Ontario N1G 3X7 Canada

Tratto dal sito internet della IAEA: <http://www-naweb.iaea.org/nahu/external/e4/nmrm/prod.htm>

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

Roma, dicembre 2003 (n. 4) 17° Suppl.