

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Elementi inorganici di interesse tossicologico:
quantificazione in matrici ambientali,
biologiche e alimentari**

A cura di
Francesco Petrucci e Oreste Senofonte

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

06/18

Istituto Superiore di Sanità

Elementi inorganici di interesse tossicologico: quantificazione in matrici ambientali, biologiche e alimentari.

A cura di Francesco Petrucci e Oreste Senofonte

2006, v, 86 p. Rapporti ISTISAN 06/18

Questo rapporto offre una visione, la più ampia possibile, su vari aspetti relativi alla determinazione di elementi inorganici in matrici ambientali come aria, acqua e suolo, nonché in tessuti e fluidi biologici e alimenti. L'intera procedura analitica è esaminata partendo dal campionamento fino alla trattazione statistica del dato, prendendo in considerazione le più recenti applicazioni analitiche nel campo della spettrometria di assorbimento atomico, della spettrometria di emissione atomica a plasma e della spettrometria di massa. Particolare attenzione è riservata 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 rilevatore di massa, Aria, Suolo, Acque, Alimenti, Fluidi biologici, Tessuti

Istituto Superiore di Sanità

Inorganic elements of toxicological interest: quantification in environmental and biological matrices, and food.

Edited by Francesco Petrucci and Oreste Senofonte

2006, v, 86 p. Rapporti ISTISAN 06/18 (in Italian)

This report gives an overall view of various aspects of the determination of inorganic elements in environmental matrices as air, water and soil, biological matrices like tissues, fluids and some food. The whole procedure is examined from the sampling to the statistical treatment of the data. The most recent analytical application of the atomic absorption spectroscopy, atomic emission plasma spectrometry and mass spectrometry are described. 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, Air, Soil, Water, Food, Biological fluids, Tissues

Per informazioni su questo documento scrivere a: oreste.senofonte@iss.it.

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

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, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2006

INDICE

Premessa	v
Catalizzatori per autotrazione: contaminazione dell'aria da elementi del gruppo del platino	1
Introduzione	1
Strategie di campionamento	2
Valutazione del traffico	3
Preparazione dei campioni	4
Analisi	5
Livelli di Pt e Rh nel particolato delle città europee selezionate	7
Correlazione tra densità di traffico e livelli di Pt e Rh	10
Distribuzione di EPG nel particolato	11
Conclusioni	11
Bibliografia	11
Tecniche di campionamento, trattamento e analisi di matrici ambientali solide	14
Attività di campionamento	14
Aspetti generali	14
Ubicazione dei punti di campionamento	14
Specifiche tecniche dell'attrezzatura	15
Tecniche operative tra le varie metodologie di campionamento	16
Rintracciabilità dei campioni	17
Trasporto e stoccaggio dei campioni	17
Analisi in laboratorio dei campioni	18
Pre-trattamento del campione ai fini della quantificazione di microinquinanti inorganici	18
Determinazione strumentale	18
Tecniche spettroscopiche	19
Interferenze Strumentali	20
Strumenti operativi per il controllo della qualità del dato	20
Materiale di Riferimento RM (<i>Reference Material</i>)	21
Materiale di Riferimento Certificato CRM (<i>Certified Reference Material</i>)	21
Analisi statistica del dato	21
Analisi critica del dato	22
Bibliografia	22
Considerazioni metodologiche sulla produzione di valori di riferimento per gli elementi	23
Introduzione	23
Definizioni	24
Fattori di variabilità	25
Scelta della popolazione	25
Fattori preanalitici	26
Campionamento	26
Conservazione	27
Trattamento	28
Fattori analitici	29
Analisi statistica dei dati e numerosità del campione	30

Metanalisi: approccio alternativo per la produzione dei VR.....	31
Significato dei VR.....	31
Igiene delle acque destinate al consumo umano: criteri normativi e metodologici.....	33
Allegato I	
Determinazione di As, Sb, Se. Metodo spettroscopico di emissione con sorgente a plasma induttivo mediante sviluppo di idruri (ICP-AES).....	39
Allegato II	
Determinazione di Al, B, Cd, Cr, Cu, Ba, Fe, Mn, Na, Ni, Pb, V). Metodo spettroscopico di emissione con sorgente a plasma induttivo (ICP-AES).....	40
Allegato III	
Determinazione di Hg. Metodo per spettrometria di assorbimento atomico dei vapori freddi (CVAAS)	40
Bibliografia.....	41
Trattamento e qualità del dato analitico.....	42
Introduzione.....	42
Accuratezza e precisione.....	43
Ripetibilità ristretta	44
Determinazione del numero di misure da eseguire (misure eseguite ad un livello)	45
Test di normalità.....	45
Test di anomalia	46
Trattamento statistico ad un livello.....	50
Analisi statistica a più livelli	53
La precisione intermedia.....	53
Test di Cochran.....	53
Test della varianza minima.....	54
Test di Hartley	54
Anova ad una via.....	55
Test delle medie.....	56
Normativa comunitaria per la determinazione di metalli pesanti nei prodotti alimentari: campionamento e analisi	57
Campionamento	57
Analisi.....	59
Valutazione dell'incertezza di misura e conclusioni.	61
Bibliografia.....	62
Quantificazione nei tessuti e nei fluidi biologici: campionamento, pretrattamento e analisi.....	63
Introduzione.....	63
Criteri da seguire nelle operazioni di campionamento.....	64
Grandezza, tipo e omogeneità del campione solido.....	65
Conservazione.....	65
Trattamento	69
Analisi.....	71
Esempio 1 - Determinazione del Fe in biopsie epatiche per la diagnosi dell'emocromatosi	73
Esempio 2 - Determinazione di As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Se e Zn in un campione di muscolo	74
Conclusioni	76
Bibliografia.....	75

Capelli come matrice per il controllo dell'esposizione	76
Introduzione	76
Analisi dei capelli	76
Capelli come matrice per il controllo dell'esposizione a metalli tossici.....	81
Materiali e metodi	82
Risultati e discussione.....	84

PREMESSA

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.

Le monografie contenute in questo rapporto si riferiscono ad un corso per gli operatori dei laboratori periferici del Servizio Sanitario Nazionale, tenuto nell'ottobre 2003 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 produzione dei valori di riferimento (VR), di elementi in traccia, nei fluidi e tessuti biologici. Idonei VR permettono di valutare i risultati della sorveglianza biologica di individui o gruppi al fine di valutare l'esposizione ed il rischio connesso.

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.

Francesco Petrucci, Oreste Senofonte
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

CATALIZZATORI PER AUTOTRAZIONE: CONTAMINAZIONE DELL'ARIA DA ELEMENTI DEL GRUPPO DEL PLATINO

Francesco Petrucci e Beatrice Bocca

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Dal 1993 in tutti i paesi dell'Unione Europea è diventato obbligatorio l'uso delle marmitte catalitiche per le nuove autovetture. Nei catalizzatori di nuova generazione, detti "a tre vie", uno strato sottile di Pd, Pt e Rh (Elementi del Gruppo del Platino, EGP) viene depositato su un substrato di γ -allumina, dispersa a sua volta su una struttura a nido d'ape di cordierite (silicati di alluminio-magnesio e/o alluminio-calcio). Tali elementi rappresentano i componenti attivi nella idrogenazione degli idrocarburi, nella ossidazione del CO e nella riduzione dei composti NO_x (1). Il catalizzatore "a tre vie" necessita di una temperatura di oltre 250 °C per entrare in funzione, con una efficienza che aumenta fino al raggiungimento dei 400 °C e poi resta costante. Oltre gli 800 °C la perdita dei metalli è significativa e l'efficienza del catalizzatore viene notevolmente ridotta. La disattivazione chimica e il deterioramento termico e meccanico modificano la struttura del catalizzatore favorendo il rilascio di EGP dalla superficie del catalizzatore all'ambiente. In questi ultimi anni si è osservato un incremento della contaminazione ambientale da parte di questi elementi proporzionale all'aumento del numero di nuove autovetture equipaggiate con tali catalizzatori. In ambiente urbano le marmitte catalitiche sono ormai considerate la fonte primaria di emissione di EGP. Tali metalli sono emessi in forma microcristallina su particelle di allumina aventi un diametro di 5-10 μ m e l'emissione stimata ad una velocità di 50-100 km/h è compresa nell'intervallo che va dai ng/km ai μ g/km. Gli EGP sono stati ritrovati in vari compartimenti ambientali quali particolato atmosferico, polvere stradale, suoli, vegetali nati in prossimità di strade e sedimenti fluviali (2-8). La contaminazione ambientale e i conseguenti problemi di sanità pubblica associati all'uso prolungato di EGP sono ancora oggi oggetto di studi. Sono del resto ben conosciuti sia gli effetti allergici come rinite, dermatite e asma riscontrati in lavoratori esposti a sali di platino che gli effetti cancerogeni e mutageni legati all'uso di cis-platino e carbo-platino nella chemioterapia (9, 10). Anche per il Pd e il Rh sono stati osservati alcuni effetti mutageni e citotossici, seppur di minore entità rispetto a quelli osservati per il Pt (11). D'altra parte, dato il recente utilizzo delle marmitte catalitiche esistono relativamente pochi dati sul contenuto di questi elementi nei fluidi biologici di popolazione urbana (12-15). Il livello di riferimento per il Pt in urine di popolazione urbana è 0,5-8,13 ng/L, mentre per il Pd 0,71-17,0 ng/L. Sino a qualche anno fa erano disponibili solo limitate informazioni circa la contaminazione dell'aria urbana da tali metalli, e per questo motivo l'Unione Europea ha promosso nel 1998 uno studio della durata di due anni sul rischio connesso a queste emissioni coinvolgendo molti paesi europei tra cui l'Italia (16). L'attività di ricerca ha riguardato: a) analisi di EGP totali (somma delle frazioni particolato e solubile) nei fumi di emissione di diversi tipi di catalizzatori; b) analisi di EGP nel particolato atmosferico e nella polvere stradale delle maggiori città europee; c) determinazione di EGP in urine di popolazione urbana; d) studi di bioaccumulo in organismi acquatici; e) valutazione del rischio. Per quanto riguarda l'analisi di EGP nell'aria sono stati coinvolti vari laboratori di ricerca in sei

città Europee: Göteborg (Svezia), Madrid (Spagna), Roma (Italia), Monaco (Germania), Sheffield e Londra (UK). Sono stati raccolti circa 200 campioni di particolato atmosferico per un periodo che andava dal settembre del 1998 al settembre del 2000, con una media di 7 siti per città e otto campagne di raccolta. In generale i punti di raccolta sono stati localizzati in aree con densità di traffico medio-alto, aree centrali e aree relativamente non inquinate. In questa relazione vengono presentate le strategie di campionamento, le modalità di preparazione dei campioni e le tecniche analitiche adottate dai laboratori coinvolti. Sono presentati inoltre i dati relativi al contenuto dei metalli nell'aria delle cinque città Europee. L'attività svolta dall'ISS nell'analisi di EGP nell'aria di Roma è stata trattata in maniera più approfondita.

Strategie di campionamento

Diversi tipi di campionatori sono stati utilizzati per la raccolta del particolato atmosferico con particelle aventi diametro $<10 \mu\text{m}$ (PM_{10}) o con dimensioni diverse. Il più usato per la raccolta di PM_{10} è stato il campionatore a medio volume (Partisol 2000) con filtri in esteri di cellulosa con pori di dimensione pari a 0,45 o 0,8 μm . Per valutare la distribuzione di particelle con diverso diametro sono stati utilizzati impattori virtuali con la possibilità di campionare PM_{10} e $\text{PM}_{2,5}$ (particelle con diametro $<2,5 \mu\text{m}$) su filtri di cellulosa, campionatori WRAC (*Wide Range Airborne Collector*) con filtri in fibra di vetro o di quarzo che permettevano un taglio ai diametri 10,0, 22,2, 40,6, 65,3 μm o totale, e impattori a cascata PM_{10} con filtri di fibra di vetro (taglio ai seguenti diametri: 9,0-10,0; 4,2-9,0; 2,1-4,2; 1,3-2,1; 0,69-1,3, 0,39-0,69, $<0,39 \mu\text{m}$). Nelle città di Roma, Göteborg, Madrid e Monaco sono state adottate strategie di campionamento che prevedevano di dislocare i campionatori a circa 1 m dal margine stradale, in zone con differenti topografia, densità di traffico (da 10.000 a 100.000 autovetture/giorno) e velocità di guida. Nelle città di Sheffield e Londra è stata adottata una diversa strategia di campionamento che prevedeva l'utilizzo della corteccia di alberi come substrato per la raccolta di particolato atmosferico (17). In particolare, sezioni di corteccia estratte ad una altezza di circa un metro venivano prelevate da alberi di sicomoro, faggio, pioppo e ippocastano, in siti ad alta densità di traffico e in aree rurali.

Per quanto riguarda i campionamenti effettuati a Roma, è stato utilizzato un campionatore a medio volume (17 L/min) dotato di una testa di misura PM_{10} . Sono stati utilizzati filtri in estere di cellulosa con diametro di 47 mm e porosità di 0,8 μm . I campioni di particolato sono stati raccolti in due giorni lavorativi consecutivi (tre per il sito remoto) dalle 7 di mattina alle 19 di sera, nel periodo caratterizzato da traffico medio-alto, evitando le giornate ventose e piovose. Il volume di aria campionato variava da 19 a 25 m^3 nei siti urbani e da 35 a 45 m^3 nel sito remoto. Dopo ogni raccolta i filtri venivano conservati in capsule Petri sino all'esecuzione dell'analisi. I campionamenti sono stati effettuati in una zona rurale (Sito A), tre zone centrali (Siti B, C ed E), due grandi strade di accesso alla città (Siti D ed F) e lungo il raccordo autostradale esterno (Sito G). Qui di seguito riportiamo una descrizione più dettagliata dei sette siti di prelievo selezionati a Roma.

- *Sito A (area remota)*
rappresentato da un piccolo paese a 40 km a nord di Roma, a ridosso di una strada di campagna, livello di traffico molto basso stimato intorno ai 100 veicoli per giorno.
- *Sito B (area centrale)*
rappresentato da una via al centro di Roma, a due corsie con scarsa vegetazione e caratterizzata dalla presenza di università e di ospedali, traffico regolato da semafori e velocità regolamentata a 50 km/h. Numero di veicoli stimato intorno ai 30.000-40.000 al giorno.

- *Sito C (area centrale)*
situato in una via del centro storico, stretta e circondata da alti edifici, senza alberi con un basso flusso veicolare ma situata a circa 20 metri da una strada principale con un volume di traffico pari a circa 30.000 veicoli al giorno.
- *Sito D*
individuato in una via di accesso alla città, in una strada principale con quattro corsie, due per senso di marcia. Il traffico è sostenuto con circa 40.000-50.000 veicoli al giorno (10% di veicoli commerciali) con frequenti rallentamenti e code, limitazione della velocità di guida a 80 km/h.
- *Sito E (area centrale)*
situato in una zona del centro di Roma, vicino ad un grande parco. Densità di traffico, essenzialmente residenziale, di circa 20.000 veicoli al giorno e velocità limitata a 50 km/h.
- *Sito F*
posizionato in prossimità di una strada a scorrimento veloce a quattro corsie, due per senso di marcia, che collega la zona urbana con il raccordo autostradale esterno. Densità di traffico pari a circa 40.000-50.000 veicoli al giorno e velocità media di 80 km/h.
- *Sito G (raccordo anulare)*
individuato sul raccordo autostradale esterno. Il flusso di traffico è molto elevato, circa 100.000 veicoli al giorno (15% di traffico commerciale). Velocità media di guida di circa 100-120 km/h.

Valutazione del traffico

Il laboratorio dell'ISS ha sviluppato un metodo di conteggio del traffico veicolare in prossimità dei sette siti di campionamento sopra descritti. La densità di traffico (sia autovetture che veicoli commerciali) è stata misurata in ciascun sito di prelievo esattamente nei periodi in cui venivano effettuati i prelievi di aria. A tal fine, è stato sviluppato il seguente schema: *i*) suddivisione del giorno in periodi di tempo caratterizzati da differente densità di traffico (B: bassa, M: media, A: alta) come mostrato in Figura 1; *ii*) conteggio dei veicoli transitati in 10 minuti esclusivamente nei periodi ad alta e media densità di traffico. Lo stesso conteggio è stato ripetuto in differenti giorni e orari e alla fine mediato; *iii*) calcolo del traffico medio (TM) su 12 h tramite la seguente formula:

$$TM = 6 \times 6M + 6 \times 6A = 36 (M + A)$$

dove $6 \times 6M$ e $6 \times 6A$ sono la stima del numero di veicoli transitati in 6 ore basati su quelli effettivamente contati in 10 min. Come esempio, sono mostrati in Figura 2 i valori del TM relativi alle campagne di prelievo di giugno 1999 e ad aprile 2000.



Figura 1. Schema delle variazioni della densità di traffico

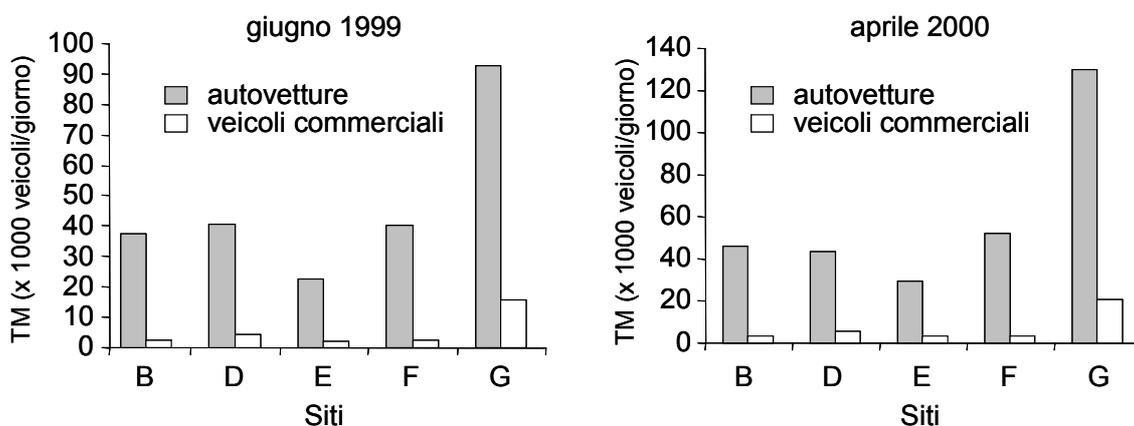


Figura 2. Traffico medio giornaliero in giugno 1999 e aprile 2000

Preparazione dei campioni

Sono state seguite differenti procedure di mineralizzazione dei filtri contenenti particelle di EGP principalmente usando miscele di acidi minerali concentrati e inceneritori ad alta pressione o forni a microonde. Miscele di *acqua regia*/HF, *acqua regia*/HClO₄, *acqua regia*/HF/HClO₄ sono state usate per la digestione sia di filtri in esteri di cellulosa che di filtri in fibra di vetro o quarzo. Le soluzioni risultanti sono state diluite con HCl 0,24 N e conservate in frigo in contenitori di polietilene ad elevata densità fino al momento dell'analisi.

Prima della mineralizzazione, i filtri di vetro o quarzo venivano tenuti in stufa a 450 °C al fine di rimuovere la maggior parte del materiale carbonioso. Per minimizzare il rischio di contaminazione, tutti i laboratori hanno utilizzato reagenti ad elevato grado di purezza per preparare campioni e soluzioni standard.

In particolare, i filtri di cellulosa relativi ai campionamenti dell'aria di Roma sono stati mineralizzati con 6 mL di HCl, 2 mL di HNO₃ e 1 mL di HF in contenitori di Teflon[®] ad alta pressione in forno a microonde tramite impulsi a potenza crescente secondo il seguente programma: 5 min. a 250 W, 5 min. a 400 W, 5 min. a 600 W. Dopo la digestione i campioni sono stati evaporati completamente e, al fine di assicurare la completa dissoluzione degli elementi di interesse analitico, il residuo è stato disciolto in 2 mL di HCl, nuovamente evaporato e portato ad un volume finale di 20 mL con la soluzione di HCl 0.24 N.

I dettagli della procedura di mineralizzazione sono riportati nel lavoro di Petrucci *et al.* (4). Per ridurre al minimo qualsiasi rischio di contaminazione esogena, tutta la fase preparativa è stata condotta in camera pulita di Classe 100 e sono stati utilizzati HCl di grado Ultrapuro e HNO₃ e HF di grado Suprapuro e acqua deionizzata. Le soluzioni analitiche e gli standard di calibrazione sono stati preparati giornalmente in provette di polietilene previamente decontaminate.

Analisi

Per la determinazione degli EGP nelle soluzioni di digestione a livello di pg/L sono necessarie tecniche analitiche estremamente sensibili. In questo studio sono state utilizzate la spettrometria di massa a plasma induttivo con quadrupolo (Q-ICP-MS) (strumenti: PQ3 VG Elemental, HP4500 Hewlett Packard, Elan 6000 Perkin-Elmer), la spettrometria di massa a plasma induttivo con settore magnetico (SF-ICP-MS) (Strumenti: Element, Finnigan MAT) e la voltammetria catodica differenziale (DP CSV, Metrohm 646 con VA Stand 647). Tali tecniche sono praticamente le uniche che possono essere applicate con sufficiente versatilità per misure ambientali di routine degli EGP. In particolare, l'ICP-MS è risultata essere la tecnica analitica più adeguata alla quantificazione degli EGP nel particolato atmosferico con il vantaggio ulteriore sulla CSV di poter determinare simultaneamente tutti gli EGP. Ciò nonostante, la formazione di interferenze spettroscopiche e non spettroscopiche che prendono origine da altri costituenti della matrice hanno reso difficile la determinazione degli EGP tramite ICP-MS. Infatti, il contributo di elementi interferenti come Y (interferenza di YO^+ su Pd), Pb (Pb^{2+} su Rh), Hf (HfO^+ su Pt), Cu e Zn ($ArCu^+$ e $ZnCl^+$ su Rh e Pd) sul segnale degli EGP risultava notevolmente alto dato che tali elementi erano presenti nel particolato atmosferico a concentrazioni che andavano dai ng/m^3 ai $\mu g/m^3$ contro una concentrazione degli EGP pari a pochi pg/m^3 . Per tale motivo, da tutti i laboratori coinvolti sono stati eseguiti studi al fine di trovare condizioni strumentali di compromesso tali da tenere basso il livello degli interferenti pur mantenendo contemporaneamente alta la sensibilità analitica. È ben noto infatti che il contributo dell'interferente è altamente dipendente dalle condizioni dello strumento e dal metodo di introduzione del campione.

Nella maggior parte dei casi, è stato necessario sia far uso di correzioni matematiche (ovvero quantificare il segnale interferente e sottrarlo attraverso equazioni matematiche al segnale dell'analita per ottenere un valore corretto) che operare sul sistema di introduzione del campione o su parametri strumentali quali radiofrequenza e flussi dei gas al fine di limitare la formazione di ossidi e di ioni a doppia carica.

La separazione degli elementi interferenti tramite saggi a fuoco Ni-S, precipitazione con Te, chelazione su resine anioniche o cationiche sono state anche applicate alla determinazione di Rh e Pd in campioni ambientali ma queste metodologie coinvolgevano una manipolazione più estesa del campione e un maggior rischio di contaminazione e/o perdita di analiti nonché un notevole dispendio di tempo (poco applicabili ad analisi di routine). Nella quantificazione degli EGP, per tenere sotto controllo sia l'effetto matrice che le eventuali variazioni di segnale, la maggior parte dei laboratori coinvolti hanno utilizzato il metodo di calibrazione delle aggiunte standard (aggiunta di quantità crescenti degli elementi da analizzare alle soluzioni di mineralizzazione) e la standardizzazione interna con In o Ir.

Le prestazioni strumentali sono state valutate determinando i seguenti parametri analitici: *i*) la più piccola concentrazione degli elementi valutabile detto anche limite di determinazione (LD); *ii*) la precisione analitica; e *iii*) l'accuratezza delle misure. Per quest'ultimo parametro, non essendo disponibile in commercio un materiale di riferimento contenente gli EGP a livello utile, i laboratori coinvolti nello studio hanno partecipato ad un circuito di qualità interlaboratoriale (PACEPAC, 1988) sulla determinazione degli EGP in campioni di polvere stradale (CW7 e CW8) prelevati da un tunnel autostradale in Austria. Per quanto riguarda le analisi effettuate nel laboratorio dell'ISS, i livelli di EGP nel particolato atmosferico sono stati misurati tramite SF-ICP-MS. I dettagli strumentali e le condizioni operative sono riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Caratteristiche della tecnica SF-ICP-MS condizioni operative dello Strumento ELEMENT

Caratteristiche	Condizioni operative
Geometria	Nier-Johnson a doppia focalizzazione
Risoluzione (m/Δm)	300
Potenza RF	1,30 kW
Nebulizzatore	Concentrico in vetro di tipo Meinhard
Coni	Nickel
Flussi di gas Argon (L/min)	plasma, 13,0; ausiliario, 0,90; nebulizzazione, 0,85
Masse analitiche	^{103}Rh , ^{105}Pd , ^{106}Pd , ^{195}Pt
Ioni interferenti	^{103}Rh : $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}$, $^{206}\text{Pb}^{2+}$, $^{87}\text{Rb}^{16}\text{O}$, $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}$, $^{68}\text{Zn}^{35}\text{Cl}$, $^{66}\text{Zn}^{37}\text{Cl}$ ^{105}Pd : $^{40}\text{Ar}^{65}\text{Cu}$, $^{89}\text{Y}^{16}\text{O}$, $^{88}\text{Sr}^{16}\text{OH}$, $^{68}\text{Zn}^{37}\text{Cl}$ ^{195}Pt : $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}$
Massa dello standard Interno	^{115}In

Sono state considerate in modo esaustivo le seguenti possibili interferenze: a) $^{206}\text{Pb}^{2+}$, $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+$, $^{87}\text{Rb}^{16}\text{O}^+$, $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}^+$, $^{68}\text{Zn}^{35}\text{Cl}^+$ and $^{66}\text{Zn}^{37}\text{Cl}^+$ sulla massa del $^{103}\text{Rh}^+$; b) $^{40}\text{Ar}^{65}\text{Cu}^+$, $^{89}\text{Y}^{16}\text{O}^+$, $^{68}\text{Zn}^{37}\text{Cl}^+$ and $^{70}\text{Zn}^{35}\text{Cl}^+$ sul $^{105}\text{Pd}^+$; c) $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+$ sul $^{195}\text{Pt}^+$ al fine di determinare l'eventuale fattore di correzione da utilizzare giornalmente. A tale scopo, concentrazioni crescenti di ogni elemento sono state aggiunte singolarmente alla matrice di particolato e le soluzioni così ottenute sono state analizzate allo spettrometro di massa verificando il segnale prodotto dall'eventuale interferenza sul segnale degli analiti di interesse. Da tale studio è emerso che le interferenze generate dagli ioni $^{68}\text{Zn}^{35}\text{Cl}^+$, $^{66}\text{Zn}^{37}\text{Cl}^+$, $^{87}\text{Rb}^{16}\text{O}^+$ e $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}^+$ sul segnale di $^{103}\text{Rh}^+$ sono di scarsa rilevanza, mentre quelle generate dagli effetti combinati di $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+$ e $^{206}\text{Pb}^{2+}$ contribuivano per circa il 20 % del segnale totale e potevano essere eliminate per mezzo delle equazioni matematiche di correzione riportate in Tabella 2. Lo ione molecolare $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+$ è risultato contribuire per circa il 5 % del segnale totale del $^{195}\text{Pt}^+$ ed è stato eliminato tramite opportune equazioni di correzione.

Tabella 2. Equazioni di correzione per la risoluzione delle principali interferenze

Massa interferita	Specie interferente	Equazione di correzione
$^{103}\text{Rh}^+$	$^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+$, Pb^{2+}	$I^{103}\text{Rh}^+ = I^{103} - [I^{65}\text{Cu}^+ \times FC] - [I^{103,5} \times R]$ dove: I = intensità (conteggi per secondo) R = rapporto isotopico $^{206}\text{Pb} / ^{207}\text{Pb}$ FC = fattore di correzione sperimentale giornaliero del rapporto $^{40}\text{Ar}^{63}\text{Cu}^+ / ^{65}\text{Cu}^+$
$^{195}\text{Pt}^+$	$^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+$	$I^{195}\text{Pt}^+ = I^{195} - [I^{176}\text{Hf}^+ \times FC]$ dove: I = intensità (conteggi per secondo) FC = fattore di correzione sperimentale giornaliero del rapporto $^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}^+ / ^{176}\text{Hf}^+$

Per quanto riguarda il Pd, non è stato possibile eliminare completamente tutte le interferenze potenziali; in particolare, l'enorme contributo (circa il 30%) di ArCu^+ e di YO^+ sul segnale del ^{105}Pd ha reso impossibile l'utilizzo di qualunque equazione matematica di correzione. Per tale motivo i dati prodotti per questo elemento sono stati considerati poco attendibili e non sono stati qui riportati. Per quanto riguarda le prestazioni della tecnica utilizzata, il limite di

determinazione, calcolato come 3 volte il segnale analitico (media di 20 misure) della soluzione di digestione di un bianco filtro, è stato di 0,5 pg/m³ per il Pt e 0,2 pg/m³ per il Rh. La precisione analitica, calcolata su 20 misure consecutive di un campione reale digerito, è stata pari a 2,0 % per il Pt e 1,8 % per il Rh. Per la verifica dell'accuratezza, sono stati usati i campioni di polvere stradale di tunnel facenti parte del circuito di controllo di qualità (CW7, CW8) e i risultati hanno dato recuperi pari al 96 % per il Pt e 102 % per il Rh.

Livelli di Pt e Rh nel particolato delle città europee selezionate

Nella caratterizzazione del rischio per la popolazione generale esposta ad EGP presenti nell'ambiente devono essere considerati due fattori:

- i) l'esposizione stimata causata sia dall'inhalazione di particolato contenente i metalli in questione che dall'assunzione di alimenti contaminati;
- ii) il profilo tossicologico degli EGP immessi nell'ambiente o trasformati chimicamente.

Le tabelle seguenti mostrano un quadro riassuntivo dei livelli di EPG nel particolato atmosferico di diverse città europee, e in particolare i rilevamenti puntuali effettuati nella città di Roma durante i due anni di studio. Nella Tabella 3 sono riportati i livelli riscontrati nell'aria di sei diverse città europee.

Tabella 3. Contenuto medio di Pt e Rh (pg/m³) rilevato nei siti urbani ed extraurbani di sei città europee durante otto campagne di prelievo

Città	Particolato atmosferico (PM ₁₀)				
	Pt		Rh		Pt/Rh
	Siti urbani	Sito remoto	Siti urbani	Sito remoto	Siti urbani
Madrid	15,6	<0,1	4,2	<0,2	3,7
Göteborg	12,3	0,1	3,0	0,1	4,1
Sheffield*	3,9	<0,1	-	<0,1	-
Londra*	5,6	<0,1	-	<0,1	-
Roma	17,8	<0,5	4,0	<0,2	4,5
Monaco	4,1	<0,1	0,3	<0,1	13,7

* dati espressi come ng g⁻¹ di corteccia.

I risultati ottenuti nelle varie città indicano che i livelli di EGP sono significativamente più alti nei siti ad alta densità di traffico rispetto al sito remoto individuato generalmente in un'area rurale o in teoria non-inquinata. Tale fatto indica che le concentrazioni rilevate sono antropogeniche. Inoltre, considerato che le attività industriali come attività minerarie, produzione di ammoniaca, processi petroliferi e presenza di inceneritori sono molto limitate nelle aree urbane selezionate, la principale fonte degli EGP rimane il traffico veicolare. In tutte le città monitorate, anche in considerazione di differenti condizioni climatiche, i risultati globali sono piuttosto simili. In particolare i dati di Roma, Madrid e Göteborg sono omogenei. Monaco presenta invece un dato più basso sia per il Pt che per il Rh. Gli unici dati disponibili per il Pd si riferiscono all'aria di Roma (51,4 pg/m³) e all'aria di Göteborg (4,1 pg/m³) ma tali valori non sono confrontabili e, almeno per il caso di Roma, risultano affetti da un'elevata incertezza analitica. Nella Tabella 4 sono riportate le concentrazioni puntuali rilevate a Roma nelle sei zone urbane (B-G) e in quella extraurbana (A) durante gli otto campionamenti. Ogni

dato è corredato anche delle incertezze analitiche (20 replicati per ogni misura). Nella Tabella 5 sono riportati la concentrazione e il rapporto Pt/Rh mediato sulle otto campagne di prelievo e sono state anche evidenziate: la media di tutti i siti urbani (B-G), la media dei siti del centro città (B, C ed E) e la media dei siti non centrali (D, F e G). Nella Tabella 4 i dati sono stati invece raggruppati in funzione del periodo di campionamento.

Tabella 4. Concentrazione di Pt e Rh (pg/m³) nell'aria di Roma nei sette siti e negli otto periodi di campionamento

Periodi di campionamento	Siti						
	A	B	C	D	E	F	G
settembre 1998							
Pt	<0,5	11,6 ± 0,6	nd	9,0 ± 0,5	19,2 ± 1,6	16,0 ± 1,2	7,8 ± 0,6
Rh	<0,2	1,8 ± 0,1	nd	3,8 ± 0,4	6,2 ± 0,4	4,4 ± 0,2	1,8 ± 0,1
novembre 1998							
Pt	<0,5	24,4 ± 1,8	25,2 ± 2,0	60,1 ± 3,0	14,6 ± 1,3	18,4 ± 0,6	20,2 ± 1,2
Rh	<0,2	4,8 ± 0,4	5,8 ± 0,1	8,2 ± 0,6	5,8 ± 0,5	4,4 ± 0,2	3,4 ± 0,1
gennaio 1998							
Pt	<0,5	40,4 ± 2,0	12,4 ± 0,4	26,6 ± 0,8	14,2 ± 0,6	35,8 ± 1,0	52,0 ± 2,0
Rh	<0,2	9,4 ± 1,2	3,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1	6,8 ± 0,6	8,8 ± 0,7	8,4 ± 0,9
giugno 1999							
Pt	<0,5	2,8 ± 0,1	28,6 ± 1,8	15,4 ± 0,4	2,4 ± 0,1	3,4 ± 0,2	25,2 ± 1,2
Rh	<0,2	2,4 ± 0,1	5,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1	1,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	6,2 ± 0,3
novembre 1999							
Pt	<0,5	5,6 ± 0,2	10,0 ± 0,4	21,2 ± 1,2	7,8 ± 0,5	30,6 ± 1,4	9,2 ± 0,4
Rh	<0,2	1,6 ± 0,1	5,4 ± 0,2	2,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1	5,2 ± 0,2	2,0 ± 0,1
aprile 2000							
Pt	<0,5	9,2 ± 0,6	15,8 ± 1,2	11,2 ± 0,5	5,0 ± 0,3	10,6 ± 0,8	21,0 ± 0,9
Rh	<0,2	2,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,05	0,8 ± 0,02	1,6 ± 0,1	3,2 ± 0,2
giugno 2000							
Pt	<0,5	32,8 ± 2,0	14,0 ± 0,4	14,0 ± 0,7	18,8 ± 1,6	14,2 ± 0,8	26,4 ± 0,9
Rh	<0,2	2,0 ± 0,04	3,0 ± 0,1	1,2 ± 0,04	1,4 ± 0,05	1,6 ± 0,1	6,3 ± 0,4
settembre 2000							
Pt	<0,5	8,6 ± 0,8	10,4 ± 0,8	12,8 ± 1,0	8,8 ± 0,7	19,0 ± 0,9	15,6 ± 0,8
Rh	<0,2	3,5 ± 0,2	3,8 ± 0,6	4,7 ± 0,3	3,6 ± 0,2	5,3 ± 0,4	8,5 ± 0,7

nd = non disponibile

Tabella 5. Concentrazioni di Pt e Rh (pg/m³) nell'aria di Roma; media degli otto campionamenti nei sette siti

Siti	Media		Rapporto Pt / Rh	Intervallo	
	Pt	Rh		Pt	Rh
A	<0,5	<0,2		<0,5	<0,2
B	16,9 ± 13,9	3,4 ± 2,6	4,9	2,8-40,4	1,6-9,4
C	16,6 ± 7,4	4,2 ± 1,3	4	10,0-28,6	2,4-5,8
D	21,3 ± 16,7	3,6 ± 2,1	5,9	9,0-60,1	1,2-8,2
E	11,4 ± 6,3	3,4 ± 2,5	3,3	2,4-18,8	0,8-6,8
F	18,5 ± 10,4	4,1 ± 2,5	4,5	3,4-35,8	1,6-8,8
G	22,2 ± 13,8	5,0 ± 2,7	4,5	7,8-52,0	1,8-8,5
Media dei siti urbani	17,8	4,0	4,5	2,4-60,1	0,8-9,4
Medie dei siti centrali (B,C e E)	15,0	3,7			
Media dei siti non centrali (D, F e G)	20,7	4,2			

Tabella 6. Concentrazioni di Pt e Rh (pg/m³) nell'aria di Roma negli otto periodi di campionamento

Periodo	Concentrazione		Rapporto	Intervallo (pg m ⁻³)	
	Pt	Rh	Pt / Rh	Pt	Rh
settembre 1998	12,7 ± 4,8	3,6 ± 1,9	3,5	7,8-19,2	1,8-6,2
novembre 1998	27,2 ± 16,6	5,4 ± 1,6	5,0	14,6-60,1	3,4-8,2
gennaio 1998	30,2 ± 15,5	6,7 ± 2,7	4,5	12,4-52,0	3,2-9,4
giugno 1999	13,0 ± 11,9	3,3 ± 2,0	3,9	2,4-28,6	1,2-6,2
novembre 1999	14,1 ± 9,8	3,1 ± 1,8	4,5	5,6-30,6	1,6-5,4
aprile 2000	12,1 ± 5,6	2,1 ± 0,8	5,8	5,0-21,0	0,8-3,2
giugno 2000	20,1 ± 7,9	2,6 ± 1,9	7,7	14,0-32,8	1,2-6,3
settembre 2000	12,5 ± 4,1	4,9 ± 1,9	2,6	8,6-19,0	3,6-8,5
Concentrazioni medie invernali (aprile, novembre e gennaio)	23,8	5,1			
Concentrazioni medie estive (giugno e settembre)	14,1	3,3			

Il contenuto di Pt e Rh in tutti i campioni raccolti nel sito non urbano (A) è molto più basso dei limiti di determinazione strumentali, e quindi nelle tabelle viene riportato come riferimento tale dato. Le differenze notevoli riscontrate tra il sito remoto e i siti urbani prova in modo inconfutabile che la fonte principale dell'emissione atmosferica di questi elementi è rappresentata dal traffico autoveicolare. Considerando tutti i campionamenti effettuati (sei siti per otto campionamenti, circa 48) le concentrazioni riscontrate nell'atmosfera di Roma variano da un minimo di 2,4 ad un massimo 60 pg/m³ (media di 17,8 pg/m³) per il Pt; e da un minimo di 0,8 ad un massimo di 9,4 pg/m³ (media di 4,0 pg/m³) per il Rh. Per quanto riguarda le concentrazioni di Pt mediate sui due anni, i siti G ed E rappresentano rispettivamente quello a concentrazione più alta (22,2 pg/m³) e quello a concentrazione più bassa (11,4 pg/m³). I risultati ottenuti sono approssimativamente dieci volte più alti di quelli trovati nella città di Dortmund nel 1992 (18). Invece, confrontando i livelli di Pt nell'aria di Roma con quelli delle altre città europee coinvolte nello studio risultano essere nello stesso ordine di grandezza. Infatti il contenuto medio di Pt nel particolato atmosferico delle città di Madrid e Göteborg è rispettivamente di 12,8 pg/m³ (intervallo <0,1-57,1 pg/m³) e 12,3 pg/m³ (intervallo <0,2-130,5 pg/m³) in dipendenza dei siti di campionamento; nella città di Monaco, invece, il contenuto è risultato essere leggermente più basso (media: 4,1 pg/m³, intervallo: <1-9,7 pg/m³) (5, 7). Anche per il Rh il sito G è risultato essere quello caratterizzato dall'emissione più alta e pari a 5 pg/m³, mentre i siti B ed E sono caratterizzati dalla più bassa emissione pari a 3,4 pg/m³. Anche per questo elemento i risultati ottenuti nelle altre città europee sono comparabili con quelli di Roma. Infatti, a Madrid e Göteborg sono state riscontrate concentrazioni medie di 3,3 pg/m³ (<0,2-12,2 pg/m³) e 3,0 pg/m³ (<0,2-18,4 pg/m³). Confrontando tra loro aree omogenee (simili per densità di traffico e topografia), ovvero le zone centrali (siti B, C e E) con le aree meno centrali e di accesso alla città (siti D, F, e G), nelle prime il livello medio di Pt e Rh è di 15,0 e 3,7 pg/m³, rispettivamente, e nelle seconde di 20,7 pg/m³ per il Pt e 4,2 pg/m³ per il Rh. Questi ultimi siti sono stati individuati su strade a scorrimento veloce dove sia il livello di traffico che la velocità media risultavano più alte. Un ulteriore aspetto interessante, emerso dall'analisi dei risultati, è la similitudine tra il rapporto Pt/Rh trovato nel particolato (3,3-5,9) e quello presente nelle marmitte catalitiche (4,5), ulteriore prova che la principale sorgente di emissione di questi due elementi è la marmitta catalitica. Infine sono state osservate variazioni stagionali tra il livello di Pt e Rh invernale (Pt, 23,8 pg/m³; Rh, 5,1 pg/m³) e quello estivo (Pt, 14,1 pg/m³; Rh, 3,3 pg/m³) in relazione con la ben nota variazione di traffico tra mesi estivi e invernali nella città di Roma.

Correlazione tra densità di traffico e livelli di Pt e Rh

I dati raccolti nelle campagne di prelievo svolte a Roma inducono a ipotizzare una certa corrispondenza tra i livelli di Pt e Rh nell'atmosfera e il numero di autovetture in circolazione. Al fine di confermare tale ipotesi, la densità di traffico relativa ai vari siti di prelievo, calcolata come previamente riportato nel testo, sono stati correlati con il livello dei metalli riscontrato su tali siti. La Figura 3 mostra tali correlazioni per il Pt e il Rh in due diversi periodi di tempo, giugno 1999 e aprile 2000. Nel caso del Pt i coefficienti di correlazione sono pari a $r = 0,79$ per giugno 1999 e $r = 0,98$ per aprile 2000. Per il Rh sono stati ottenuti $r = 0,96$ e $r = 0,61$ per gli stessi periodi di tempo.

Gli andamenti indicano che il livello più alto di Pt è stato ottenuto al sito G che risulta posizionato su una autostrada urbana con la più alta densità di traffico (100.000 veicoli/giorno), un'alta percentuale di veicoli commerciali e una alta velocità media di guida (100-120 km/h). Altri livelli sono stati riscontrati anche dove il traffico è spesso caratterizzato dal cosiddetto *stop and go*. Al contrario, il livello più basso di Pt è stato individuato nel sito E (sia in giugno che in aprile), sito con la più bassa densità di traffico (circa 20.000 veicoli/giorno). Anche la velocità di guida sembrerebbe influenzare il livello di Pt, infatti, passando da una velocità cittadina di 50 km/h a quella autostradale di 120 km/h, la concentrazione dell'elemento aumenta di circa 10 volte in giugno (da 2,8 a 25 pg/m^3) e di circa 4 volte in aprile (da 5,0 a 21 pg/m^3). Alle stesse conclusioni sono giunti altri ricercatori che hanno trovato un aumento di Pt nel particolato di dieci volte quando la velocità di guida raddoppiava (19,20).

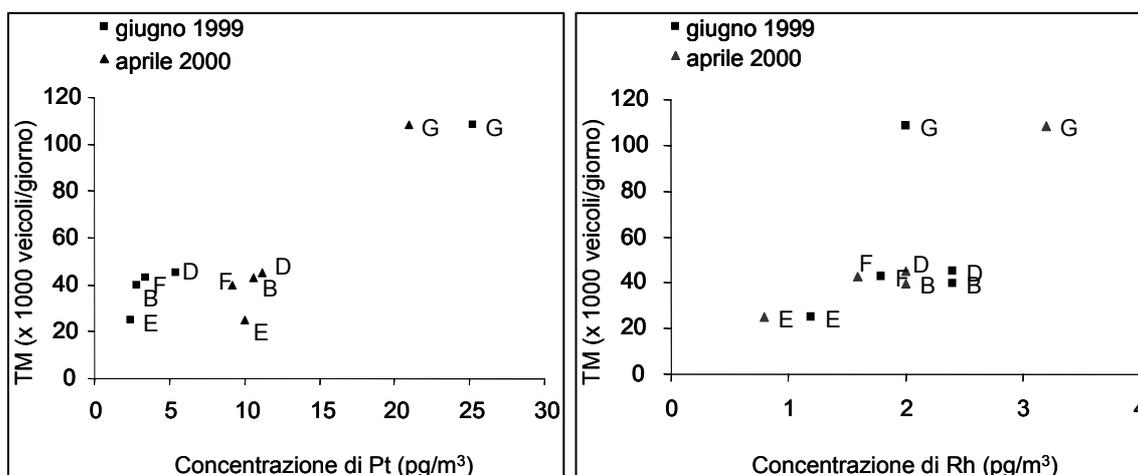


Figura 3. Correlazione tra contenuto di Pt e Rh e densità di traffico in giugno 1999 e aprile 2000

Per quanto riguarda la correlazione tra livelli di Rh e traffico, la più alta concentrazione (6,2 pg/m^3 in giugno 1999 e 3,2 pg/m^3 in aprile 2000) è stata riscontrata nuovamente nel sito G, mentre la più bassa (1,2 pg/m^3 in giugno 1999 e 0,8 pg/m^3 in aprile 2000) è stata misurata nel sito E. I siti B, D ed F mostrano valori simili corrispondenti a livelli di traffico medio di 30.000-50.000 veicoli/giorno e una velocità media di 70-80 km/h.

Distribuzione di EPG nel particolato

Per la valutazione del rischio per la salute umana connesso con la presenza di EGP nel particolato, due importanti fattori devono essere considerati. Il primo è la quantità di forme solubili di EGP. Il secondo è la dimensione delle particelle di particolato nelle quali sono presenti tali metalli. Sfortunatamente, dato il basso livello di EGP presenti nei filtri, non è stato possibile mettere a punto tecniche di estrazione idonee per rilevare la frazione solubile. Per quanto riguarda la distribuzione di EPG nel particolato i risultati ottenuti con il WRAC o con l'impattore PM₁₀ hanno evidenziato, ad esempio, che il Pt è associato con particelle di diametro variabile. Il gruppo di lavoro che ha utilizzato i campioni raccolti a Madrid ha ottenuto i seguenti risultati: la frazione di particelle con diametro > 10 µm (particelle inalabili che si depositano nel tratto superiore dell'apparato respiratorio) ha un contenuto medio di Pt di 7 pg/m³, la frazione tracheobronchiale (2,1-10,0 µm) contiene circa 1,5 pg/m³ mentre la frazione alveolare (2,1-<0,39 µm) contiene circa 1,2 pg/m³. Considerando che il contenuto medio di Pt sui filtri raccolti nella città di Madrid era di circa 15 pg/m³ le due frazioni tracheobronchiale e alveolare rappresentano rispettivamente il 10 e l'8 % del totale delle particelle sospese nell'aria. Questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti da uno studio sulla distribuzione di Pt associato a particelle emesse direttamente dalle marmitte catalitiche (21). Circa il 66 % di Pt è associato a particelle >10,2 µm, il 21 % a quelle con dimensioni 3,14-10,2 µm circa il 14% a particelle < 3,14 µm.

Conclusioni

La concentrazione trovata di Pt nel particolato atmosferico è circa tre ordini di grandezza più bassa della cosiddetta "concentrazione sicura" per la quale nessun effetto tossico è stato riscontrato (15-150 ng/m³), come riportato da Rosner e Merget (22). Comunque, considerando il sempre più elevato numero di autoveicoli circolanti dotati di marmitte catalitiche, e anche in considerazione del fatto che negli ultimi 15 anni il livello di EGP nell'atmosfera è aumentato di due ordini di grandezza, bisogna porre sempre maggiore attenzione al controllo delle loro emissioni nell'ambiente. Inoltre non è da trascurare ne il problema della biodistribuzione ne quello del bioaccumulo di questi elementi essendo noto da molti anni il fenomeno della magnificazione dei rischi connessi al rilascio continuo nell'ambiente di piccole quantità di metalli potenzialmente tossici. Infine, una particolare attenzione dovrebbe essere posta allo sviluppo di procedure analitiche per poter determinare con sufficiente accuratezza il Pd. Questo elemento, infatti, nei prossimi anni rimpiazzerà completamente il Pt nei substrati catalitici delle marmitte.

Bibliografia

1. Koltsakis GC, Stamatelos AM. Catalytic automotive exhaust after treatment. *Prog Energy Combust Sci* 1997;23:1.
2. Rauch S. *On the Environmental Relevance of Platinum Group Elements*. Göteborg, Sweden: Chalmers University of Technology; 2001.
3. Alt F and Zereini F. (Ed.). *Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions and Their Impact on Man and Environment*. Berlin: Springer-Verlag; 2000.

4. Petrucci F, Bocca B, Alimonti A, Caroli S. Determination of Pd, Pt and Rh in airborne particulate and road dust by high-resolution ICP-MS: a preliminary investigation of the emission from automotive catalyts in the urban area of Rome. *J Anal Atom Spectrom* 2000;15:525.
5. Gómez B, Gómez M, Sánchez JL, Fernández R, Palacios MA. Platinum and rhodium distribution in airborne particulate matter and road dust. *Sci Total Environ* 2001;269:131.
6. Rauch S, Ming L, Morrison GM. Heterogeneity of platinum group metals in airborne particles. *Environ Sci Technol* 2001;35:595.
7. Gómez B, Palacios MA, Gomez M, Sánchez JL, Morrison G, Rauch S, McLeod C, Ma R, Caroli S, Petrucci F, Bocca B, Schramel P, Zischka M, Petterson C, Wass U. Levels and risk assessment for humans and ecosystems of platinum-group elements in the airborne particles and road dust of some European cities. *Sci Total Environ* 2002;299:1.
8. Schäfer J, Hannker D. Uptake of traffic-related heavy metals and platinum group elements PGE by plants. *Sci Total Environ* 1998;215:59.
9. Lindell B. *Platinum. DECOS and NEG basis for an occupational standard* Solna: Arbetslivsinstitutet & Författarna; 1997.
10. Merget R. Occupational platinum salt allergy. Diagnosis, prognosis, prevention and therapy In: Alt F, Zereini F. (Ed.). *Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions and Their Impact on Man and Environment*, Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 257.
11. Bunger J, Stork J, Stalder K. Cyto- and genotoxic effects of coordination complexes of platinum, palladium and rhodium in vitro. *Int Arch Occup Environ Health* 1996;69:33.
12. Krachler M, Alimonti A, Petrucci F, Irgolić KJ, Forastiere F, Caroli S. Analytical problems in the determination of platinum-group metals in urine by quadrupole and magnetic sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 1998;363:1.
13. Begerow J, Dunemann L. Internal platinum and palladium exposure of the general population with emphasis on the exposure from automobile exhaust and dental restorative alloys. In: Alt F, Zereini F. (Ed.). *Anthropogenic Platinum-Group Element Emissions and Their Impact on Man and Environment*. Berlin: Springer-Verlag; 2000. p. 227.
14. Caroli S, Alimonti A, Petrucci F, Bocca B, Krachler M, Forastiere F, Sacerdote MT, Mallone S. Assessment of exposure to platinum-group metals in urban children. *Spectrochim Acta B* 2001;56:1241.
15. Senofonte O, Alimonti A, Carelli G, Catino M, Di Gregorio M, Iavicoli I, Petrucci F, Tosti B, Violante N, Caroli S. *Esposizione di addetti della polizia municipale di Roma a metalli nobili emessi da marmite catalitiche*. In: Atti del XVI Congresso Nazionale di Chimica Analitica, Portonovo, Italia, 24-28 settembre, 2001.
16. CEPLACA. *Assessment of environmental contamination risk by platinum, rhodium and palladium from automobile catalyts* (ENV4-CT97-0518). Final report, 2001. Disponibile all'indirizzo: www.ucm.es/info/ceplaca; ultima consultazione 18/5/2006.
17. Becker JS, Bellis D, Staton I, McLeod CW, Dombovari J. Determination of trace elements including platinum in tree bark by ICP mas spectrometry. *Fresenius J Anal Chem* 2000;368:490.
18. Alt F, Bambauer A, Hoppstock K, Mergler B, Tolg G. Platinum traces in airborne particulate matter. Determination of whole content, particle size distribution and soluble platinum. *Fresenius J Anal Chem* 1993;346:693.
19. König HP, Hertel RF, Koch W, Rosner G. Determination of platinum emissions from a three-way catalyst-equipped gasoline engine. *Atm Environ* 1992;26A(5):741.
20. Helmers E. Platinum emission rate of automobiles with catalytic converters. Comparison and assessment of results from various approaches. *Environ Sci Pollut Res* 1997;4:100.

21. Artelt S, Levsen K, König HP and Rosner G. Engine tests bench experiments to determine platinum emissions from three-way catalytic converters. In: Zereini F. and Alt F. (Eds.) *Anthropogenic Platinum Group Element Emissions and their impact on man and environment*. Berlin:Springer-Verlag;2000. p. 33.
22. Bocca B, Petrucci F, Alimonti A, Caroli S. Traffic-related platinum and rhodium concentrations in the atmosphere of Rome. *J Environ Monit* 2003;5:563.

TECNICHE DI CAMPIONAMENTO, TRATTAMENTO E ANALISI DI MATRICI AMBIENTALI SOLIDE

Edoardo Stacul, Eleonora Beccaloni

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Attività di campionamento

Aspetti generali

Per potere ottenere campioni che rappresentino correttamente la situazione esistente in un sito oggetto di indagini, le attività di campionamento devono rispettare alcune condizioni di base. In particolare:

- la composizione chimica o biologica del materiale prelevato non deve essere alterata a causa di surriscaldamento, di dilavamento o di contaminazione da parte di sostanze e/o attrezzature durante il campionamento;
- la profondità del prelievo nel suolo deve essere determinata con la massima accuratezza possibile;
- il campione prelevato deve essere conservato con tutti gli accorgimenti necessari affinché non subisca alterazioni; in particolari casi è prevista l'additivazione con sostanze conservanti non interferenti.

Ubicazione dei punti di campionamento

Per l'attività di campionamento è indispensabile localizzare i punti di campionamento sulla carta topografica e verificare con un sopralluogo l'effettiva possibilità di svolgere il campionamento, marcando sul posto in modo univoco il punto (georeferenziazione).

Nel caso di presenza di materiali di riporto (scorie di fonderia, ceneri, materiali di demolizione, materiali terrosi), l'ubicazione dei campionamenti dovrà permettere di caratterizzare ogni porzione di territorio occupata da tali materiali.

L'individuazione del numero di campioni è fondamentale poiché, la determinazione del numero di campioni per ogni punto di campionamento consente di programmare in dettaglio le attività di campo e le successive analisi chimiche.

Il numero di punti di campionamento risulta essere funzione dello scenario normativo entro cui si opera nonché della necessità di avere informazioni sufficienti a caratterizzare con precisione l'area indagata.

A tale scopo si può indagare l'area con la tecnica a maglie piuttosto rade, infittendole campionando con criteri di tipo soggettivo.

Deve essere inoltre redatto un Protocollo per l'attività di perforazione, che consiste nel:

- georeferenziare e quotare ogni punto di perforazione;
- eseguire battute di dimensioni omogenee;
- al fine di evitare l'immissione di contaminanti di superficie a profondità maggiori, procedere nella perforazione sostenendo le pareti del foro mediante camicia di acciaio;
- nel corso delle operazioni non si dovrà in alcun caso utilizzare acqua, procedendo a velocità tale da evitare eccessivi riscaldamenti;

- eseguire la perforazione garantendo l’innesto nel substrato impermeabile non alterato nel corso della perforazione;
 - segnalare e registrare ogni venuta d’acqua dal foro, specificando la profondità e stimando l’entità del flusso;
 - eseguire misure del livello piezometrico in corrispondenza delle più significative variazioni litologiche;
 - nel caso di perforazioni di durata superiore alla giornata, eseguire la misura del livello piezometrico a fine giornata e proteggere il foro da eventuali contaminazioni esterne.
- Nella Tabella 1 è riportato un breve elenco di attrezzature necessarie per il campionamento.

Tabella 1. Attrezzature adoperate nel campionamento

Modello	Campo di applicazione	Vantaggi-svantaggi
Carotatore manuale	Suolo soffice Strati superficiali	Facile da usare, preserva il campione / profondità limitate; non facile da pulire e decontaminare
Carotatore a tubo sottile	Suolo soffice Profondità 0-3m	Facile da usare e da decontaminare anche insieme con il “bucket auger” / Difficile rimuovere le parti interne dal campionatore
Cucchiaio campionario	Profondità dal piano campagna fino al substrato roccioso	Eccellente intervallo di profondità; preserva il campione (guaine) / Costo abbastanza elevato
Campionatore Shelby	Profondità dal piano campagna fino al substrato roccioso	Eccellente intervallo di profondità; preserva il campione; adatto per prove di permeabilità / Non adatto a suoli rocciosi
Bucket auger	Suolo soffice Profondità 0,1-3 m	Buon intervallo di profondità; diametro e volume uniformi; può miscelare orizzonti di suolo a spessore maggiore di 10 cm
Trivella meccanica	Suolo medio Profondità 0,1-4,5 m	Buon intervallo di profondità; utilizzabile con il “bucket auger” /Lavora a distruzione di nucleo; potenziale Cross Contamination

Specifiche tecniche dell’attrezzatura

Gli strumenti impiegati devono essere costruiti in base a requisiti tali che il loro impiego non modifichi le caratteristiche delle matrici ambientali e delle sostanze contaminanti.

Le operazioni di prelievo dei campioni devono essere compiute evitando la diffusione della contaminazione (*cross contamination*). Nel caso di perdite di oli lubrificanti e altre sostanze dalle attrezzature utilizzate, verificare che queste non producano contaminazione del terreno prelevato.

Alla fine di ogni perforazione è opportuno decontaminare tutti gli attrezzi e gli utensili che operano in superficie, mentre gli attrezzi e gli utensili che operano in profondità devono essere puliti ad ogni “battuta”. Per la decontaminazione delle attrezzature deve essere predisposta un’area delimitata e impermeabilizzata con teli posta ad una opportuna distanza dall’area di campionamento

Prima, durante e dopo le attività di campionamento va eseguita una decontaminazione dell’attrezzatura, in particolare:

- prima di operare il prelievo, garantire la pulizia di tutta la strumentazione, rimuovendo completamente i materiali potenzialmente inquinanti che potrebbero aderire alle pareti degli strumenti; tali operazioni sono compiute con getti di acqua e vapore;

- per garantire che l'umidità presente sulle pareti delle apparecchiature evapori naturalmente, ricorrere all'uso alternato di due carotieri, altrimenti procedere all'asciugatura con carta da filtro esente da contaminazione;
- in caso di pioggia durante il campionamento è necessario garantire che il campione non sia modificato dal contatto con le acque meteoriche;
- qualora alcuni utensili non possano essere decontaminati per la presenza di superfici non facilmente pulibili (funi, guanti), questi dovranno essere eliminati al termine di ogni trivellazione;
- al termine delle operazioni, le apparecchiature decontaminate devono essere conservati in condizioni tali da evitare la contaminazione.

Tecniche operative tra le varie metodologie di campionamento

Il *campionamento a profondità prestabilite*, permette di ricostruire l'andamento della concentrazione degli inquinanti lungo tutto il profilo verticale.

Nel caso di *campioni relativi a medie di determinati intervalli di profondità o areali*, si ottengono indicazioni sul contenuto medio di inquinanti nella massa, riducendo i costi di analisi ma con il rischio di perdere eventuali informazioni sui picchi positivi e/o negativi.

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

In situazioni particolari ove siano presenti materiali eterogenei e interrati (ad esempio discariche), qualora si necessiti la loro rimozione e/o smaltimento, risulta corretto prelevare un campione medio di tutto il materiale estratto da ogni posizione di sondaggio. Un apposito campione dovrà essere inoltre prelevato nel caso in cui si debba provvedere alla *classificazione granulometrica* del terreno.

Un campionamento risulta essere rappresentativo se garantisce un'accurata fotografia dello stato di eventuale contaminazione del sito in esame in un determinato momento.

Le variabili che influenzano la rappresentatività dei campioni sono:

- la variabilità geologica (strutturale, tessiturale, ecc.)
- la variabilità della concentrazione degli inquinanti
- la variabilità imputabile alle modalità di raccolta e preparazione dei campioni da sottoporre ad analisi
- la variabilità analitica

Si definisce *bianco di riferimento* un campione prelevato in prossimità, ma al di fuori, dell'area interessata, il quale serve a verificare se la concentrazione di un contaminante differisce rispetto a quelle naturalmente presenti nel sito. Nel caso di campionamento di suoli, la profondità e il tipo di terreno da campionare dovrebbe corrispondere a quelli degli altri campioni raccolti.

Al fine di determinare il valore del bianco, il numero di campioni prelevati dovrebbe essere tale da permettere una trattazione statistica dei dati ottenuti.

Il prelievo di un Bianco di riferimento va comunque sempre programmato all'interno di una campagna di campionamento. Nella formazione del campione da inviare alle analisi occorre infine tenere presente alcuni accorgimenti:

- identificare e scartare materiali estranei che possono alterare i risultati finali, indicandoli opportunamente nel rapporto di campionamento;
- suddividere il campione in più parti omogenee, adottando metodi di quartatura riportati nella normativa (Figura 1).

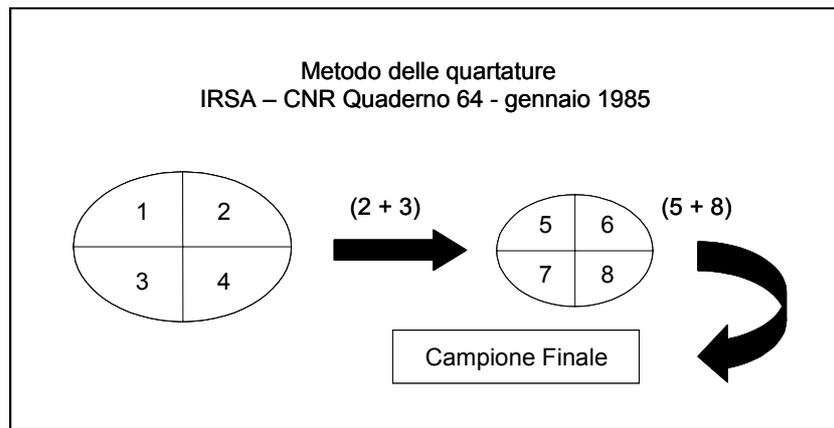


Figura 1. Schema di preparazione del campione

Rintracciabilità dei campioni

È opportuno predisporre un'accurata documentazione finalizzata al recupero dei dati anche da parte di soggetti terzi. Tale operazione si sviluppa attraverso l'utilizzo di:

- registri per la raccolta organizzata delle informazioni di campo
- misure di sicurezza per gli operatori ed equipaggiamento di sicurezza necessario
- protocolli di campionamento e analisi
- decontaminazione dell'attrezzatura di campionamento
- quantità dei campioni da raccogliere commisurata al numero e alla tipologia dei parametri da determinare
- identificazione univoca dei campioni e dati relativi ai contenitori
- etichettatura dei campioni da riportare sul verbale di campionamento
- modalità di conservazione, trasporto e movimentazione dei campioni
- modalità di presentazione e archiviazione dei dati

Trasporto e stoccaggio dei campioni

- La scelta del contenitore in cui riporre il campione va effettuata in funzione delle caratteristiche dell'inquinante:
 - inquinanti organici-contenitori in vetro a chiusura ermetica
 - microinquinanti inorganici-contenitori in polietilene
- I contenitori devono essere completamente riempiti di campione, sigillati, etichettati e inoltrati al laboratorio di analisi.
- Nel caso in cui la consegna dei campioni ai laboratori di analisi non possa avvenire in tempi brevi, si dovrà procedere alla conservazione dei campioni stessi in ambiente refrigerato.
- In subordine è ammesso considerare l'aggiunta di sostanze conservanti di tipo conservativo, non in grado di interferire nelle analisi.

La Tabella 2 schematizza le modalità di conservazione utilizzate in funzione del parametro indagato.

Tabella 2. Scelta del contenitore e modalità di conservazione

Parametro	Contenitore	Trasporto	Conservazione	Tempo utile per l'analisi
Granulometria	Plastica/Vetro	4-6 °C	4-6 °C	-
Inquinanti organici	Vetro/Alluminio	4-6 °C	-18/-25 °C	40 gg
Microinquinanti inorganici	Polietilene	4-6 °C	-18/-25 °C	60 gg
Microbiologia	Polietilene	4-6 °C	4-6 °C	24-48 h
Ecotossicologia	Plastica/vetro	4-6 °C	4-6 °C	14 gg

Analisi in laboratorio dei campioni

Pre-trattamento del campione ai fini della quantificazione di microinquinanti inorganici

Asciugatura

La procedura di asciugatura viene eseguita per permettere una più facile vagliatura del campione. Ai fini della determinazione del contenuto di metalli pesanti e metalloidi il campione estratto andrà suddiviso mediante setacciatura nelle seguenti tre frazioni granulometriche: Ø particelle > 2 cm, 2 mm < Ø particelle < 2 cm, Ø particelle < 2 mm.

Gli analiti andranno ricercati, a seconda dei casi, nella sola frazione granulometrica più fine o in tutte e tre; le loro concentrazioni andranno comunque espresse in termini di peso secco a 105 °C e riferita al peso della frazione analizzata.

Omogeneizzazione

La macinazione e l'omogeneizzazione del campione migliora la riproducibilità delle risultanze analitiche soprattutto in matrici molto eterogenee. L'uso di mortai in agata o in titanio garantiscono, durante il trattamento, l'assenza di inquinamento dovuto al rilascio di sostanze indesiderate da parte dello strumento utilizzato

Mineralizzazione dei campioni mediante forno a microonde ad alta pressione

- Un'apposita aliquota di campione (non più di 500mg) vengono trasferiti in apposito contenitore in Teflon[®] a cui viene aggiunto un opportuno quantitativo di miscela Aqua Regia (HNO₃ + HCl 1:3).
- Il contenitore, una volta chiuso, viene inserito nel forno e vengono impostati opportuni cicli termici.
- Al termine, il campione viene ripreso e trasferito in matracci tarati di classe A e portati a volume finale con acqua bidistillata.

Determinazione strumentale

La selezione del metodo di determinazione strumentale è legata al *limite di rivelabilità* del metodo stesso e alla concentrazione presente nel campione da analizzare. Le tecniche strumentali utilizzate per la determinazione dei microinquinanti inorganici sono tecniche di spettrofotometria in Assorbimento ed Emissione Atomica. La scelta della tecnica di determinazione più idonea viene effettuata sia a seconda delle concentrazioni di microinquinante inorganico presente nel campione e quindi della sensibilità dello strumento, sia della quantità di campione disponibile all'analisi.

Tecniche spettroscopiche

- Assorbimento atomico in fiamma (FAAS)
- Assorbimento atomico con fornace di grafite (ETAAS)
- Assorbimento atomico con sviluppo di idruri (HAAS)
- Emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente con sistema ottico (ICP-AES)
- Emissione atomica con plasma accoppiato induttivamente con rivelatore a massa (ICP- MS)
- AAS dedicati alla determinazione di Hg
- Altre metodologie (Spettrofotometria UV/VIS)

AA in fiamma-Caratteristiche tecniche

- Tecnica monoelementale
- Sensibilità: mg/L
- Volume di soluzione per analisi: circa 1-2 mL
- Consumo gas: medio
- Riproducibilità: buona-ottima

AA in fornello di grafite-Caratteristiche tecniche

- Tecnica monoelementale
- Sensibilità: $\mu\text{g/L}$
- Volume di soluzione per analisi: 10-50 μL
- Consumo gas: basso
- Riproducibilità: buona-ottima

AA a sviluppo di idruri-Caratteristiche tecniche

- Tecnica monoelementale per la determinazione di:
 - Arsenico
 - Selenio
 - Antimonio
 - Mercurio
 - Stagno
- Sensibilità: $\mu\text{g/L}$
- Volume di soluzione per analisi: mL
- Riproducibilità: scarsa

AA dedicato al Hg-Caratteristiche tecniche

- Tecnica monoelementale specifica
- Sensibilità: ampio range (ppb-ppm)
- Quantità di campione: ampio range
- Possibilità di analizzare il campione sia in fase solida che in fase liquida
- Riproducibilità: ottima

ICP-AES-Caratteristiche tecniche

- Tecnica multielementare
- Volume di soluzione per analisi: mL
- Sensibilità: $\mu\text{g/L}$ -mg/L
- Consumo gas: alto
- Riproducibilità: buona-ottima

ICP-MS-Caratteristiche tecniche

- Tecnica multielementale
- Sensibilità: ng /L-µg/L
- Volume di soluzione per analisi: mL
- Consumo gas: alto
- Riproducibilità: buona-ottima
- Alta possibilità di inquinamento

Spettrofotometria UV/VIS-Caratteristiche tecniche

È una tecnica di determinazione colorimetrica utilizzata esempio per l'analisi del Cromo Esavalente (Cr^{VI}). Tale procedura di analisi è riportata tra i metodi EPA (1).

La retta di calibrazione deve risultare molto vicina ai valori di concentrazione presenti nel campione poiché il range di linearità risulta essere molto ristretto.

Interferenze Strumentali

Durante la determinazione strumentale si possono presentare interferenze inaccettabili che falsano il risultato corretto. Esse differiscono a seconda della tecnica analitica strumentale utilizzata.

Le più comuni sono:

- interferenze di matrice o di autoassorbimento per le analisi eseguite mediante AA;
- interferenze spettrali per le analisi eseguite in ICP-AES.

Di seguito vengono descritte alcune tra le tecniche di eliminazione più comunemente utilizzate.

Interferenze in AAS

- uso del *correttore di fondo* (lampada al deuterio o correttore Zeeman);
- uso del *modificatore di matrice* (nitrato di magnesio, fosfato d'ammonio, palladio, ecc.);
- uso della *piattaforma* del l'vov;
- messa a punto di idonei *programmi termici*;
- tecnica delle *iniezioni multiple* e metodo delle *aggiunte standard*;
- costruzione della *curva di calibrazione* con i bianchi di mineralizzazione.

Interferenze in ICP-AES

- scelta del nebulizzatore;
- utilizzo di differenti camere di espansione;
- diverso posizionamento e tipologia della torcia (assiale/longitudinale);
- scelta della lunghezza d'onda idonea in funzione degli alti interferenti.

Strumenti operativi per il controllo della qualità del dato

Tra gli strumenti operativi più efficaci per controllare la rappresentatività del dato prodotto si può annoverare l'utilizzo di:

- materiali di riferimento (certificato)
- analisi statistica del dato (attraverso metodologie standardizzate)

- analisi critica del dato (da parte dell'operatore)

Materiale di Riferimento RM (*Reference Material*)

Secondo la definizione della norma ISO 5725 (4) viene definito come Materiale di Riferimento una sostanza (o materiale) per cui una o più proprietà sono sufficientemente omogenee e ben stabilite ai fini della calibrazione di un apparato strumentale o di un metodo di misurazione o per l'assegnazione di valori a materiali.

Materiale di Riferimento Certificato CRM (*Certified Reference Material*)

Secondo la definizione della norma ISO 5725 (4), viene definito come Materiale di Riferimento Certificato una sostanza (o materiale), accompagnato da un certificato, per cui uno o più valori delle proprietà sono certificati da una procedura che ne stabilisce la riferibilità ad una accurata realizzazione delle unità in cui i valori delle proprietà sono espressi e per il quale ogni valore certificato è accompagnato da un'incertezza ad uno stabilito livello di confidenza.

Le principali matrici ambientali solide disponibili come CRM risultano essere le seguenti:

- **suolo**
 - naturale (calcareo, limoso)
 - inquinato
- **sedimenti**
 - naturali (marini, fluviali, lacustri)
 - inquinati (marini)
- **licheni e compost**
- **rifiuti industriali** (*fly ash*)

Per ognuna delle matrici sopra citate è possibile analizzare una o più sostanze certificate tra cui:

- microinquinanti inorganici;
- inquinanti organici (IPA, PCB, diossine e furani);
- parametri chimico-fisici.

Analisi statistica del dato

Per poter quantificare o stimare l'entità degli errori, si utilizzano dei parametri che forniscono chiare indicazioni sul grado e tipo di incertezza a cui si va in contro in sede di modellizzazione di un generico processo. I più importanti sono:

- **Esattezza** (*Trueness/Justesse*): scostamento tra il valore vero e il valore medio misurato a seguito di un numero consistente di prove eseguite con lo stesso metodo sperimentale.
- **Precisione** (*Precision/Fidèlité*): concordanza tra i risultati di prove ottenuti applicando varie volte lo stesso metodo sperimentale sotto le stesse condizioni.
- **Accuratezza** (*Accuracy/Exactitude*): somma dei termini Esattezza e Precisione.
- **Varianza di Ripetibilità**: concordanza tra i valori di prove successive ottenuti con la stessa procedura metodologica e nelle stesse condizioni all'interno di uno stesso laboratorio (intra-laboratorio).
- **Varianza di Riproducibilità**: concordanza tra i valori di prove successive ottenuti con la stessa procedura metodologica e nelle stesse condizioni all'interno di un circuito di laboratori (2, 3).

I parametri individuati permettono di quantificare l'entità dell'apporto delle due componenti fondamentali dell'errore; in particolare, valori alti di precisione e di ripetibilità evidenziano errori casuali bassi mentre una bassa esattezza indica la presenza di errori sistematici.

È da sottolineare comunque che maggiore è il numero di ripetizioni di una prova, minore sarà l'apporto degli errori casuali e più facile sarà individuare quelli sistematici e apportare le opportune modifiche.

Tale approccio risulta estremamente utile quando si mettono a punto procedure di intercalibrazione, ovvero quando le analisi devono essere svolte in laboratori pubblici o privati che garantiscono di corrispondere ai requisiti necessari di qualità. Ci si riferisce in questo caso a protocolli internazionali standardizzati, quali ad esempio la Norma ISO 5725-Part 2, che prevede come strumenti statistici l'utilizzo dei Test di Cochran e di Grubb (*one/two side*) per eliminare eventuali outlier presenti (5).

Analisi critica del dato

Schematicamente si potrebbe rappresentare l'iter decisionale dell'operatore come somma di due condizioni:

- Utilizzo di RM e/o CRM e di *Good Laboratory Practice* (GLP) come condizione necessaria;
- Necessità di una validazione statistica e critica del dato da parte dell'operatore come condizione necessaria e (spesso) sufficiente.

Infatti, risulta essere questo ultimo lo step fondamentale di tutto l'insieme delle procedure fin qui menzionate, in quanto è compito dell'operatore, in base ai dati ottenuti e alla propria esperienza, decidere se il dato uscente è rappresentativo dello scenario indagato o se necessita di un ulteriore livello di validazione.

Bibliografia

1. IRSA-CNR. Metodi analitici per i fanghi. Quaderni Istituto di Ricerca sulle Acque, 64, 1985. Disponibile all'indirizzo: http://www.cnr.it/sitocnr/Iservizi/Pubblicazioni/Catalogopubblicazioni/Chimica/Parametri_chimico-fisici_Metodi_analitici_per_i_fanghi/Presentazione.html; ultima consultazione 10/7/2006.
2. ISO/IEC Guide 43-1. *Proficiency testing by interlaboratory comparison - Part 1: development and operation of proficiency testing schemes*. Geneva: International Standard Organization; 1996.
3. ISO/IEC Guide 43-2. *Proficiency testing by interlaboratory comparison - Part 2: selection and uses of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies*. Geneva: International Standard Organization; 1996.
4. ISO 5725-1. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 1: general principles and definitions*. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.
5. ISO 5725-2. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results-Part 2: basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*. Geneva: International Organization for Standardization; 1994.

CONSIDERAZIONI METODOLOGICHE SULLA PRODUZIONE DI VALORI DI RIFERIMENTO PER GLI ELEMENTI

Giovanni Forte, Alessandro Alimonti

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Il concetto di valore o intervallo di riferimento è stato sviluppato alcuni decenni or sono in base all'esigenza di superare il termine di "valore normale", fino ad allora utilizzato nel monitoraggio dei parametri chimico-clinici. "Normale" poteva, infatti, dar adito a significati od interpretazioni differenti, potendo indicare sia la condizione di concentrazione abituale dell'analita sia la condizione di mancanza di malattia, cioè concentrazione alla quale non si manifestano effetti dannosi per la salute. In entrambi i casi si è in uno "stato normale", ma le concentrazioni dell'analita di interesse possono essere anche molto differenti tra loro. La nozione di Valore di Riferimento (VR) ha raggiunto la sua completezza quando l'*International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC) ha standardizzato le basi teoriche del loro significato biologico e i principi applicativi della loro produzione, attraverso norme ormai internazionalmente riconosciute. L'ottenimento dei VR rimane comunque un processo complesso che richiede molta attenzione per la sua attuazione. Fattori socio-economici, fisiologici e di esposizione relativi al gruppo di popolazione sotto indagine, così come parametri pre-analitici e analitici legati alle attività sperimentali vere e proprie e, infine, la inesatta applicazione dei test statistici di valutazione possono influenzare pesantemente i risultati e invalidare l'intero ciclo di produzione dei VR.

D'altra parte, nel corso degli ultimi anni la comunità scientifica ha evidenziato l'esigenza di poter disporre di una "mappatura" dei vari fluidi e tessuti dell'organismo-in termini di VR degli elementi in gruppi ben caratterizzati della popolazione-come strumento basilare per dare un significato ad eventuali deviazioni. Ad idonei VR ci si riferisce per valutare, infatti, i risultati della sorveglianza biologica di individui o gruppi ad esposizione e assorbimento noti o sospetti e per consentire, quindi, una migliore comprensione dell'entità dell'esposizione e della definizione del rischio. L'obiettivo primario in questo tipo di studi è valutare il grado di esposizione dell'individuo o della popolazione in esame, attraverso il confronto di due termini entrambi noti nel loro valore misurato: quello che deve essere "interpretato" e quello a cui ci si riferisce – di riferimento, appunto – per dare un significato clinico e/o tossicologico al primo. Per cui, e fatte salve le raccomandazioni circa i parametri confondenti prima riportati, la definizione di VR per le concentrazioni di sostanze chimiche nei fluidi biologici rappresenta una premessa necessaria per la giusta valutazione dei rischi derivanti da esposizione generale e occupazionale. I VR, infatti, danno informazioni su come il risultato del biomonitoraggio si colloca rispetto: 1) ad una popolazione per la quale è esclusa una specifica e significativa esposizione ad uno xenobiotico (orientamento su una possibile maggiore esposizione) e, 2) a valori ai quali è stato attribuito, scientificamente e/o amministrativamente, un determinato significato sanitario (orientamento sulla probabilità di comparsa di effetti nocivi). L'elevato numero di studi carenti nei criteri utilizzati per la selezione dei soggetti, nella validazione dei dati analitici e nel trattamento statistico ha indotto alcune istituzioni internazionali (IUPAC,

IFCC) ad intraprendere la stesura di protocolli per la standardizzazione delle procedure al fine di ottenere VR confrontabili e correttamente utilizzabili per le autorità responsabili di azioni normative.

Definizioni

Secondo le indicazioni dell'IFCC, gli *individui di riferimento* costituiscono una *popolazione di riferimento*, da cui è selezionato un *gruppo campione di riferimento*, su cui sono determinati i *valori di riferimento*, sui quali è osservata una *distribuzione di riferimento*, su cui sono calcolati i *limiti di riferimento*, che, da ultimo, definiscono un *intervallo di riferimento*. Di seguito viene descritto il significato dei termini sopra citati e di altri ad essi correlati:

- *Individuo di riferimento*
soggetto selezionato secondo criteri definiti.
- *Popolazione di riferimento*
insieme di tutti i possibili individui di riferimento; è costituita da soggetti non esposti in modo abnorme all'elemento/sostanza in esame per ragioni professionali, ambientali, alimentari o per abitudini di vita.
- *Gruppo campione di riferimento*
adeguato numero di individui selezionati in modo da essere rappresentativo della popolazione di riferimento.
- *Valori di riferimento*
valori di parametri biochimici ottenuti con le stesse tecniche analitiche su un individuo o su un campione di individui omogeneo con il singolo soggetto in esame. Tali dati servono ad interpretare il valore osservato nel soggetto o nel gruppo in esame alla luce della variabilità biologica della grandezza interessata, in condizioni di salute e di malattia. Il VR si può anche definire come il valore di un determinato indicatore ottenuto dalla elaborazione statistica dei risultati del suo dosaggio in campioni biologici prelevati da una popolazione o da un gruppo di riferimento.
- *Distribuzione di riferimento*
distribuzione della misura di quantità di analita nella popolazione di riferimento. È caratterizzata da una forma geometrica (normale e non-normale) e dai corrispondenti parametri.
- *Limiti di riferimento*
sono i valori estremi della distribuzione di riferimento che definiscono l'intervallo di riferimento a scopo descrittivo. Il modo più comune è l'utilizzo dei percentili. È pratica comune considerare di riferimento l'intervallo che include il 95 % dei valori della popolazione di riferimento, questo comporta che l'intervallo di riferimento ha come limiti il 2,5° e il 97,5° percentile.
- *Intervallo di riferimento*
è l'intervallo di valori compreso tra due valori di riferimento e che li include.
- *Valore biologico limite*
valore di un determinato dosaggio biologico di un elemento o sostanza che individua livelli di esposizione ambientale e/o occupazionale ai quali non si verificano danni per la salute dei soggetti. È fissato sulla base della sua relazione col valore biologico o di studi dose/effetto.

- *Livello biologico di azione*
valore al di sotto del quale non si ritiene necessario alcun controllo periodico, biologico e/o ambientale.

Fattori di variabilità

I fattori di variabilità rappresentano tutti quei parametri che possono influenzare il reale contenuto delle sostanze in esame in una certa matrice biologica. Nel processo di produzione dei VR, possiamo identificarli nei fattori associati alla variabilità biologica e in quelli relativi alla fase pre-analitica e analitica. Nel primo caso la concentrazione basale potrebbe risultare influenzata da apporti alimentari, dal metabolismo, dal sesso, dalla razza, dall'area di residenza, dall'esposizione a xenobiotici, ecc. Nel secondo gruppo rientrano tutti quei fattori che sono strettamente legati al momento stesso della produzione del VR, cioè tutte le variabili che entrano in gioco dal momento del prelievo del campione fino alla sua quantificazione finale.

Scelta della popolazione

La selezione di gruppi di popolazione *ad hoc* per la determinazione dei valori di riferimento è tanto essenziale quanto difficoltosa. I soggetti possono venir selezionati prima delle analisi (*a priori*) o tra gli individui già sottoposti ad analisi o presenti in particolari elenchi (*a posteriori*). La scelta *a priori* risulta essere più conveniente, tenendo presente, però, di applicare criteri di esclusione e stratificazione ben definiti ma non eccessivamente rigidi da creare una iper-selezione, ottenendo così una popolazione “ideale” e non più una popolazione di riferimento. Questa metodica di selezione, normalmente applicata, permette di scegliere e graduare i criteri di selezione/esclusione effettivamente rilevanti per l'analisi in studio e per l'utilizzo successivo dei VR che si stanno definendo. Il secondo metodo di selezione, quello *a posteriori*, sebbene sia più idoneo per identificare i migliori criteri di esclusione, è applicato raramente a causa dei costi troppo elevati, dei tempi lunghi di rielaborazione e, soprattutto, per il rischio di introdurre errori involontari nella valutazione.

Una volta stabilito il gruppo di persone, è necessario ridurre la inevitabile variabilità inter-individuale. Molti sono i parametri interindividuali che possono influenzare i VR finali. Un criterio fondamentale nella produzione di VR per uso generale è che questi provengano da persone con un ben definito *stato di salute*. Si definisce anche uno *stato di riferimento*: quello di una persona adulta di 20-30 anni, con corretta massa corporea, a digiuno da 10 ore, che non assume farmaci, che consuma meno di 45 g di alcool/dì, fuma meno di 12 sigarette/dì e non presenta evidenti sintomi di malattia. Sebbene si tratti di una definizione ideale, rappresenta comunque un tentativo di minimizzare le variabili biologiche interindividuali. Lo stato di salute può essere anche controllato attraverso gli usuali parametri della chimica clinica. Lo *stato fisiologico* (es. donne in gravidanza, persone sottoposte a cariche sportivi massivi) in cui si trova l'individuo sano è ugualmente importante per l'influenza che può avere sui VR dei metalli e deve quindi essere attentamente considerato. Altro fattore da non trascurare nella scelta dei soggetti è la loro possibile esposizione dovuta al luogo di residenza, all'attività lavorativa, al traffico o altri tipi di esposizione di tipo ambientale più difficili da individuare. Questi parametri risultano molto critici e possono essere tenuti sotto controllo classificando le persone, ad esempio, in non esposte, potenzialmente esposte, esposte, ecc. all'analisi sotto studio.

Una volta stabilito il gruppo di popolazione generale per i VR è possibile una successiva stratificazione interna in base a variabili quali sesso, età, dieta, stili di vita (fumo o alcool, ecc.), zona di residenza o condizioni socio-economiche. I parametri di stratificazione servono per contraddistinguere la condizione di quel gruppo in un preciso contesto ambientale e comportamentale. Tutte le informazioni necessarie devono essere raccolte attraverso la preparazione di un *questionario*, da sottoporre agli individui eleggibili, che risulti *semplice* (applicabile effettivamente e con facilità), *specifico* (solo per gli analiti che interessano) e *completo* (tutti i criteri di esclusione e stratificazione necessari).

Fattori preanalitici

Tutte le attività analitiche di un laboratorio dovrebbero essere programmate, 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. Il conseguimento di risultati comparabili tra laboratori e il contenimento degli errori sistematici sono, infatti, tra gli obiettivi irrinunciabili di ogni sistema che tenda a garantire la qualità delle proprie determinazioni analitiche. Tutto ciò riveste ancora maggior importanza nel caso della produzione di VR. 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 a minimizzarle se non eliminarle del tutto. In generale, nelle procedure preanalitiche di fluidi biologici e campioni tissutali risultano importanti le fasi di campionamento, conservazione e trattamento degli stessi. Tutte queste fasi dovrebbero essere effettuate tenendo conto che:

- il rischio di alterazione dell'informazione sugli analiti 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

L'analisi finale, per quanto eseguita con metodi strumentali di dosaggio altamente accurati e precisi, non potrà avere qualità migliore di quella del corrispondente prelievo. È, invece, esperienza ancora frequente sottoporre ad analisi campioni biologici già alterati al momento del campionamento. 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 e oggetti in esso presenti. 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. Inoltre bisogna ricordare che anche il *personale* addetto al prelievo/campionamento deve essere considerata "una possibile sorgente inquinante". 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. 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 (ago, forbice, bisturi, ecc.) di acciaio quando utilizzato per campionare tessuti o per aspirazione può cedere, ad esempio, elementi come Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni e V. Per questo motivo, utensili costruiti o ricoperti con particolari materiali, quali il nitrato di titanio o carburo di tungsteno, possono essere convenientemente utilizzati in questi casi. Precauzioni particolari devono essere prese nella raccolta di campioni di sangue. 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.). Un'ideale alternativa 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. Altra buona norma per limitare la contaminazione nel momento del prelievo è quella di non utilizzare per l'analisi degli elementi in traccia le prime aliquote di sangue prelevato in quanto queste servono per "lavare" il materiale degli utensili da eventuali impurezze presenti. 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.

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 deriva, in genere, dalla lontananza del luogo di prelievo dal laboratorio di trattamento e analisi e, quindi, dall'intervallo di tempo sufficientemente lungo che può intercorrere tra prelievo e analisi. 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 e o-ring). I materiali maggiormente utilizzati sono: vetro e quarzo, polietilene ad alta o bassa densità, polipropilene, policarbonato, polistirene, politetrafluoroetilene e polivinilcloruro. Ogni materiale sopra riportato ha i suoi pro e contro chiaramente legati alle caratteristiche chimico-fisiche che devono essere necessariamente prese in considerazione.

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

+ 4 °C, equivalente alla temperatura di frigorifero, per periodi più brevi di una settimana. Si conservano in queste condizioni sangue, siero, plasma, liquor e tessuti;

l'intervallo tra -5 e -25 °C (temperatura di un freezer) per periodi di tempo più lunghi. È utilizzato per l'urina che deve essere raffreddata a -20 °C prima possibile, previa eventuale acidificazione a $pH < 2$ con HNO_3 . Queste temperature più basse riducono anche i fenomeni di adsorbimento/rilascio dei contenitori e permettono conservazioni più dilatate nel tempo.

Per ridurre, invece, il contenuto d'acqua in campioni biologici si può utilizzare la liofilizzazione, anche se è una procedura complessa che prevede tempi lunghi. Tale procedura permette la conservazione anche a temperatura ambiente (in essiccatore) per lunghi periodi di tempo, la riduzione della reattività chimica, una distruzione batterica quasi completa, la concentrazione del campione per riduzione del suo volume e la facilità di ricostituzione del campione stesso.

Trattamento

Il trattamento del campione è l'insieme delle operazioni minime e 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 campioni (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, attenzione particolare deve esser posta all'ambiente di lavoro, cioè al laboratorio dove si effettuano le varie operazioni, possibilmente attrezzato per il 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 μm) 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. 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 (puntali di pipette). Particolare attenzione deve essere riposta nella scelta dei reagenti, prima fra tutti l'acqua. Utilizzare acqua 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 (es. acidi di grado suprapuro o ultrapuro). Infine, 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. Il sangue, invece, richiede in genere una vera seppur blanda digestione con acidi, ricorrendo, per esempio, ad un trattamento in forno a microonde.

Fattori analitici

La determinazione di elementi chimici-sia fisiologici che tossici-presenti nell'organismo anche a concentrazioni molto basse ha reso indispensabile la necessità di avere tecniche strumentali sempre più affinate. Non è un caso, infatti, che i valori di riferimento per gli elementi in traccia siano andati diminuendo in valore nel tempo, di pari passo con il miglioramento delle strumentazioni analitiche e con l'aumentare della sensibilità degli operatori al problema della contaminazione. Oggigiorno esistono molte tecniche analitiche, come la spettrometria atomica (assorbimento ed emissione), la spettrometria di massa, l'attivazione neutronica e la voltammetria, che permettono la determinazione di elementi chimici, sia di quelli a livelli maggiori sia quelli a livello di traccia od ultratraccia. Risulta chiaro che il metodo analitico dovrà essere il più idoneo possibile in relazione agli analiti da determinare e alle loro concentrazioni in quello specifico fluido biologico. Questa idoneità deve tener conto di precisi requisiti di qualità quali:

- *accuratezza*
che rappresenta il grado di concordanza tra il risultato dell'analisi e il valore "vero" del campione oggetto di studio. È un parametro che permette di controllare e verificare la validità del metodo analitico dall'inizio alla fine. Questo può essere ottenuto tramite l'utilizzo di materiali di riferimento certificati (MRC), cioè materiali a concentrazione dell'analita certificata del tutto simili per matrice al tessuto/fluido su cui si stanno determinando i VR. Tutte le caratteristiche chimico-fisiche del MRC sono certificate dall'ente produttore. In mancanza dell'adatto MRC si può ovviare tramite prove di recupero, cioè aggiunte note dell'analita su uno o più campioni in esame;
- *specificità*
ovvero la possibilità del metodo di discriminare tra i vari analiti e riconoscere in modo univoco quello che vogliamo quantificare evitando quindi la produzione di falsi positivi;
- *sensibilità*
cioè la capacità di misurare la più bassa concentrazione di un metallo, ovvero essere in grado di distinguere tale segnale da quello inteso come rumore di fondo strumentale. Viene indicata tramite il limite di rivelabilità (espresso come 3,3 volte la deviazione standard del bianco, con una probabilità del 5 % o dell'11 % di errore di assumere come significativo un risultato in funzione della distribuzione normale dell'analita nel primo caso e non-normale nel secondo) e con il limite di quantificazione (espressa come 10 volte la deviazione standard del bianco);
- *ripetibilità*
definita come concordanza tra misure ripetute (aliquote diverse dello stesso campione analizzate lo stesso giorno, con lo stesso strumento, dallo stesso operatore con gli stessi calibranti);
- *precisione*
rappresenta il grado di concordanza dei valori analitici di misure ripetute nella serie e tra serie diverse. Risulta chiaro che maggiore è la dispersione dei risultati minore è la bontà del metodo che li ha generati nella produzione di VR;
- *praticabilità*
è data dal compromesso che si stabilisce tra la complessità del metodo (facile utilizzo da parte dell'operatore, alto numero di campioni per unità di tempo, velocità di analisi, ecc.) e i costi di gestione della strumentazione stessa (manutenzione, reagenti, ecc.).

Un modo per verificare nel tempo la validità del metodo analitico, il rispetto dei requisiti sopra citati e delle prestazioni in generale è quello di partecipare a circuiti interlaboratoriali in cui più laboratori analizzano differenti aliquote dello stesso campione. Lo scopo è quello di valutare la qualità delle prestazioni dei laboratori partecipanti confrontandoli fra loro, aiutare individualmente i laboratori nello studio del metodo analitico e incoraggiarli al miglioramento delle loro prestazioni analitiche correggendo la metodica applicata fino a quel momento.

Analisi statistica dei dati e numerosità del campione

Un altro fattore importante nella produzione dei VR è la numerosità del gruppo di popolazione selezionato. Maggiore è il numero dei soggetti maggiori risulteranno, ovviamente, le spese che devono essere sostenute e i tempi per l'effettuazione delle analisi. D'altra parte è anche vero che un'elevata numerosità del gruppo è sinonimo di maggior controllo della variabilità biologica: l'analisi in esame si avvicina alla vera sua distribuzione tanto quanto più è elevato il numero di campioni, rendendo meno influenti gli effetti delle variabili legate al parametro in questione. Per la numerosità del campione è importante trovare un punto di compromesso tra la dispendio economico/organizzativo e validità dei risultati ottenibili. In pratica, il gruppo di riferimento comprenderà il numero di soggetti minimo, ma sufficiente, per dare valide informazioni di tipo statistico. A questo scopo l'IFCC raccomanda che la popolazione sia formata da almeno 120 individui. Questo perché un intervallo di riferimento del 95 % consiste del 3° e del 118° ordine statistico con un intervallo di confidenza del 90 % sui valori estremi dell'intervallo di riferimento stesso. Questo permette di eliminare, eventualmente, i dati estremi o aberranti cosa che invece non sarebbe possibile con popolazioni meno numerose. I dati, una volta ottenuti, sono esaminati per verificare la forma della distribuzione e identificare i dati aberranti. La verifica del tipo di distribuzione normale o gaussiana può essere fatto con diversi metodi statistici come, ad esempio, il test di Kolmogorov-Smirnov. I dati aberranti possono essere conseguenza di errata inclusione di un soggetto o di un'analisi sbagliata o di uno errore successivo all'analisi. Per questo motivo, prima di eliminare a priori un dato, diventa necessario verificarlo sia dal punto di vista biologico che dal punto di vista analitico. In assenza di motivazioni certe, è discutibile arrivare ad una sua eliminazione. Infatti, i dati aberranti potrebbero essere anche valori anomali normali, cioè non inficiati di errore, ma essere solo la risultante delle condizioni del soggetto al momento della raccolta della matrice. A questo punto, si può procedere all'identificazione dei valori aberranti dal punto di vista statistico tramite, per esempio, la rappresentazione grafica dei Box e Whiskers Plots (escludendo sia i dati anomali che estremi). Un test alternativo, preferibile però per campioni di minore numerosità, è quello di Dixon, che considera anomalo un valore se il rapporto D/R è maggiore di $1/3$, dove D è la differenza tra il valore più estremo, grande o piccolo che sia, e quello vicino ed R è la differenza, in valore numerico, tra il minimo e il massimo. In altre parole, secondo Dixon, un dato è anomalo se la sua distanza del valore più vicino supera di un terzo la differenza totale dei valori.

Verificato il tipo di distribuzione ed eliminati i dati aberranti si determinano i parametri statistici (media, media geometrica, mediana, deviazione standard, ecc.) in grado di identificare l'intervallo di riferimento. Se i dati sono normalmente distribuiti allora l'intervallo può essere definito in modo parametrico, ovvero tramite l'uso della media più o meno 2 volte la deviazione standard che esprime un intervallo di riferimento pari al 2,5° e 97,5° percentile. Nel caso in cui i dati non siano distribuiti normalmente si possono trasformare in versione logaritmica, verificare se in questo modo si ottiene una distribuzione normale e, in caso positivo, applicare i metodi parametrici. In questo caso l'intervallo di riferimento è identificato dalla media geometrica e dalla sua deviazione. Nel caso in cui la distribuzione continuasse ad essere non normale si

utilizzano metodi non parametrici con la mediana quale indicatore del valore centrale dell'intervallo di riferimento. La IFCC, comunque, dopo uno studio approfondito sui due approcci (parametrico e non parametrico), considerando le distribuzioni usualmente ottenute in chimica-clinica e in tossicologia, ha stabilito che entrambi i metodi sopra citati danno prestazioni e stime molto simili.

Metanalisi: approccio alternativo per la produzione dei VR

La metanalisi potrebbe essere definita come un'analisi statistica che si pone l'obiettivo, attraverso la combinazione di dati derivanti da più studi sullo stesso argomento, di ottenere un aumento della qualità e un rafforzamento delle informazioni di partenza. In pratica vengono estrapolate da lavori presenti nella letteratura e svolti su matrici e analiti uguali-tutte le informazioni (dati sulla popolazione, sulle variabili biologiche, sugli stili di vita, metodiche analitiche, ecc.) per realizzare una visione d'insieme più ampia. I limiti della metanalisi sono rappresentati dal fatto che non garantisce il controllo dell'accuratezza del VR così ottenuto, soprattutto quando gli studi presi in considerazione non sono stati inizialmente pianificati per produrre VR. In conclusione, se da una parte la metanalisi aiuta perché può mettere in evidenza i fattori di variabilità che si incontrano nella produzione dei VR, dall'altra manca di uniformità nella scelta dei criteri di standardizzazione e, quindi, risente dell'influenza del punto di vista di chi esamina i lavori.

Significato dei VR

I metalli di interesse biologico possono essere raggruppati in: 1) essenziali, suddivisi a loro volta in macroelementi (Ca, Mg, Na, ecc.), elementi in traccia (Cu, Fe, Mn e Zn), ultratraccia (As, B, Co, Cr, Mo, Ni, ecc.); 2) microinquinanti ambientali di origine naturale e/o antropica (Al, Ba, Cd, Hg, Pb, Ti, Tl e W) e 3) elementi essenziali e tossici contemporaneamente in base a concentrazione e specie chimica sotto cui si presentano (Al, As, Cr, Cu, Fe, V, ecc.). Tenendo conto dei diversi ruoli che un metallo può svolgere è importante conoscerne le vie di assorbimento, la quantità assorbita, la cinetica di distribuzione nell'organismo ed escrezione. Queste conoscenze permettono di individuare la matrice biologica di elezione dove dosare il metallo per ottenere un VR maggiormente significativo (es. Cd e Pb nel sangue piuttosto che nel siero). Nella produzione dei VR la differenza tra quelli usati nella chimica clinica rispetto a quelli usati in tossicologia e medicina occupazionale è dovuta alla natura degli analiti. Nel primo caso vi rientrano metalli sia essenziali che tossici, i loro prodotti metabolici non specifici e gli indicatori non specifici di effetto, cioè indicatori dosabili anche in assenza di esposizioni al metallo e riconducibili alla sola linea di base fisiologica oppure alla risultante di questo valore basale più la quota dovuta ad esposizione. Nel secondo caso, invece, rientrano gli analiti di esclusivo interesse tossicologico, cioè quegli elementi che non dovrebbero essere presenti nelle matrici biologiche e quindi non dovrebbero essere misurabili, anche se oggi le sempre più sofisticate tecniche analitiche ne hanno permesso la loro quantificazione seppur a concentrazioni molto basse.

Come già stato detto i VR servono per essere comparati con dati ottenuti sul campo, cioè con valori ottenuti da un singolo individuo o da un gruppo di individui. Questo confronto serve ad orientare l'informazione su un possibile rischio di maggiore esposizione e/o danno effettivo per

la salute. I VR, infatti, insieme ai cosiddetti livelli di azione e ai valori limite, fanno parte di un sistema in cui quanto maggiore sarà l'integrazione dei tre dati tanto migliore sarà l'identificazione e il significato sanitario dell'informazione che un risultato sperimentale porta con sé. In questo sistema valutativo:

- i *VR* considerano l'esposizione ambientale complessiva che include una zona di certezza di non effetto e un'altra zona nella quale si sospettano effetti verso i quali non si interviene;
- i *livelli di azione* comprendono parte della precedente zona degli effetti verso i quali non si interviene e una zona specifica di effetti iniziali meritori di attenzione. In quest'ultima zona i VR potrebbero essere di grande utilità (si pensi all'interpretazione di evidenze epidemiologiche);
- i *valori limite*, infine, prendono in considerazione l'area degli effetti da evitare-contenere di prevalente competenza della medicina del lavoro e dell'igiene ambientale.

Oggi l'utilizzo dei VR determinati sulla popolazione sana per eseguire corretti programmi di sorveglianza biologica è generalmente accettato. Questo tipo di dati permette, infatti, alle autorità sanitarie di dare un significato clinico-tossicologico ai valori determinati in soggetti esposti e di mettere a punto adeguate contromisure per minimizzare l'esposizione della popolazione generale o di specifiche tipologie di lavoratori.

IGIENE DELLE ACQUE DESTINATE AL CONSUMO UMANO: CRITERI NORMATIVI E METODOLOGICI

Emanuele Ferretti, Enrico Veschetti, Massimo Ottaviani

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

L'orientamento comunitario in materia di qualità e di controllo delle acque destinate al consumo umano è indirizzato principalmente a rafforzare i criteri di valutazione e i controlli dell'inquinamento e ad accelerare l'armonizzazione di tali criteri a livello europeo.

La necessità di aggiornare la Direttiva 80/778/CEE (1) (recepita in Italia con il DPR 236/88) (2) al progresso scientifico e tecnologico e di renderla attuale alle mutate esigenze e condizioni ambientali degli Stati membri, ha indotto il Consiglio Europeo nel dicembre 1993 ad impegnare la Commissione per avviare una radicale revisione della suddetta Direttiva.

L'attività congiunta degli Stati membri ha portato all'emanazione della Direttiva n. 83 del 3.11.1998 (3) relativa "alla qualità delle acque destinate al consumo umano". Il criterio ispiratore della Direttiva consiste nell'individuazione di una serie di parametri essenziali per garantire la qualità delle acque destinate al consumo umano, al fine di proteggere la salute umana dagli effetti negativi derivanti dalla contaminazione delle acque, lasciando ai singoli Stati membri la definizione di ulteriori parametri secondari qualora ne fosse riscontrata la necessità.

Il DL.vo 31/2001 (4), recepimento della suddetta dir. 98/83/CE, disciplina la qualità delle "acque destinate al consumo umano" (art. 1), cioè tutte "le acque trattate o non trattate, destinate ad uso potabile, per la preparazione dei cibi e bevande, o per altri usi domestici, a prescindere dalla loro origine, siano esse fornite tramite una rete di distribuzione, mediante cisterne, in bottiglie o in contenitori", nonché "le acque utilizzate in un'impresa alimentare per la fabbricazione, il trattamento, la conservazione o l'immissione sul mercato di prodotti o di sostanze destinate al consumo umano, escluse quelle la cui qualità non può avere conseguenze sulla salubrità del prodotto alimentare finale" (art. 2). Sono invece escluse dalla operatività del decreto le "acque minerali naturali e medicinali riconosciute", e "le acque destinate esclusivamente a quegli usi per i quali la qualità delle stesse non ha ripercussioni, dirette od indirette, sulla salute dei consumatori interessati, individuate con decreto ministeriale" (art. 3). Con l'obiettivo di garantire un elevato standard qualitativo delle acque fornite al consumatore il DL.vo 31/2001 non si limita a definire le modalità e frequenze di campionamento per il controllo qualitativo delle acque (allegato I) ma individua alcuni punti critici, di controllo, in cui i valori parametrici previsti nel decreto (art. 4) devono essere "rispettati". Tra questi per la prima volta viene identificato il "rubinetto" dell'utente quale punto di controllo fondamentale per stabilire la conformità dell'acqua ai valori di parametro (art. 5, comma a).

Altri "punti di rispetto" specificati nel decreto sono le acque fornite da una cisterna, "nel punto in cui fuoriescono dalla cisterna" (art. 5, comma b), le acque confezionate in bottiglie o contenitori, rese disponibili per il consumo umano, nel punto in cui sono imbottigliate o introdotte nei contenitori e nelle confezioni in fase di commercializzazione o comunque di messa a disposizione per il consumo (art. 5, comma c) e le acque utilizzate nelle imprese alimentari (art. 5, comma d).

Per quanto concerne i punti in cui devono essere effettuati i controlli, il DL.vo 31/2001 (art. 6), riprendendo alcuni punti precedentemente individuati nel DPR 236/88, ne indica 7:

- a. i punti di prelievo delle acque superficiali e sotterranee da destinare al consumo umano;

- b. gli impianti di adduzione, di accumulo e di potabilizzazione;
- c. le reti di distribuzione;
- d. gli impianti di confezionamento di acqua in bottiglia o in contenitori;
- e. le acque confezionate;
- f. le acque utilizzate nelle imprese alimentari;
- g. le acque fornite mediante cisterna, fissa o mobile.

Una delle principali novità del DL.vo 31/2001, consiste anche nella ridefinizione della tipologia dei controlli e attribuzione di responsabilità specifiche. Si passa infatti dai 4 tipi di controllo previsti nel DPR 236/88 ovvero il controllo minimo, normale, periodico e occasionale, ad una suddivisione che tiene in maggior conto le finalità e le responsabilità associate all'attività di controllo. Sono in particolare previsti ai sensi del nuovo decreto, quattro nuovi tipi di controllo, quali i controlli interni ed esterni, di routine e di verifica: i primi due suddivisi in base alle competenze e gli ultimi in base allo scopo.

I controlli interni (art. 7) sono effettuati dal gestore del servizio idrico integrato mediante laboratori di analisi interni oppure di pertinenza di altri gestori di servizi idrici in seguito a stipula di apposita convenzione. Il gestore può concordare con l'Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) i punti di prelievo e la frequenza. I controlli esterni (art. 8) sono svolti dall'azienda unità sanitaria locale territorialmente competente sulla base di programmi elaborati secondo i criteri generali dettati dalle regioni in ordine all'ispezione degli impianti, alla fissazione dei punti di prelievo dei campioni da analizzare, anche con riferimento agli impianti di distribuzione domestici e alle frequenze dei campionamenti. L'azienda unità sanitaria locale assicura anche una ricerca supplementare, caso per caso, delle sostanze e dei microrganismi per i quali non sono stati fissati valori di parametro, qualora vi sia motivo di sospettare la presenza in quantità o concentrazioni tali di rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana. La ricerca dei parametri supplementari è effettuata con metodiche predisposte dall'Istituto Superiore di Sanità. Per le attività di laboratorio le aziende Usl si avvalgono delle agenzie regionali per la protezione dell'ambiente (Arpa) o di propri laboratori.

I controlli di routine (allegato II) sono finalizzati a fornire ad intervalli regolari informazioni sulla qualità organolettica e microbiologica delle acque destinate al consumo umano nonché informazioni sull'efficacia degli eventuali trattamenti dell'acqua potabile (in particolare di disinfezione), per accertare il rispetto dei valori di parametro fissati. Tra i parametri che necessariamente devono essere sottoposti a tale tipologia di controllo sono indicati alcuni elementi, quali il Ferro e l'Alluminio.

I controlli di verifica (allegato II) mirano a fornire le informazioni necessarie per accertare se tutti i valori di parametro contenuti nel decreto sono rispettati. Tutti i parametri fissati sono soggetti al controllo di verifica, a meno che l'AUSL competente al controllo emetta una valutazione motivata in base alla quale sia stabilito che per un periodo determinato e relativamente ad un circostanziato approvvigionamento non sussista la possibilità che un certo parametro sia riscontrato a valori superiori alla soglia di sicurezza. Le frequenze minime di campionamento per i controlli previsti dal DL.vo 31/01 sono riportate in 2 tabelle (allegato II):

- nella tabella B 1 è riportata la frequenza minima di campionamento e analisi per le acque destinate al consumo umano fornite da una rete di distribuzione, da cisterne, o utilizzate nelle imprese alimentari;
- nella tabella B 2 è riportata la frequenza minima di campionamento e analisi per le acque confezionate in bottiglie o contenitori e messe a disposizione per il consumo umano.

Sono infine previsti controlli interni ed esterni "nei casi in cui la disinfezione rientra nel processo di preparazione o distribuzione delle acque destinate al consumo umano" al fine di verificare l'efficacia della disinfezione e accertare che la presenza di sottoprodotti di

disinfezione sia mantenuta “al livello più basso possibile senza compromettere la disinfezione stessa” (art. 6, comma 3).

Importanti novità introdotte dal DL.vo 31/2001, e integrazioni con DL.vo 27/2002 (5), riguardano anche i parametri di tipo chimico. Sebbene, in continuità con la preesistente normativa, il rispetto di determinati valori di parametro riportati in allegato I resta l'elemento portante nella valutazione della salubrità delle acque destinate al consumo umano, dal punto di vista generale, l'attenzione alla qualità dell'acqua come misura di prevenzione primaria per la salute umana ha ispirato la ridefinizione dei diversi parametri critici. Così la precedente classificazione operata dal DPR 236/88 in parametri organolettici, parametri chimico-fisici, parametri concernenti sostanze indesiderabili, parametri concernenti sostanze tossiche e parametri microbiologici viene rivisitata nel DL.vo 31/2001 al fine di semplificare la suddivisione dei parametri tenendo conto della loro diretta ricaduta sulla salute pubblica; a tal fine vengono individuate 3 fondamentali classi: A) parametri microbiologici, B) parametri chimici, C) parametri indicatori, parametri accessori e radioattività.

I parametri microbiologici e i parametri chimici riportati nella parte A e parte B dell'allegato I, hanno una relazione diretta con la protezione della salute umana, mentre i parametri della parte C si riferiscono a sostanze che, di per sé e per i valori indicati, non presentano un rischio diretto per la salute umana sebbene siano efficaci indici delle variazioni della qualità dell'acqua e dell'eventuale necessità di adottare azioni correttive.

I valori parametrici fissati nei tre gruppi dell'allegato I, hanno quindi una distinta importanza: infatti le parti A e B contengono i cosiddetti “requisiti minimi” di qualità delle acque potabili mentre la parte C contiene i parametri indicatori. I requisiti minimi devono essere sempre rispettati e qualora non lo fossero, mediante deroghe a tempo limitato (art. 13 del DL.vo 31/2001), è possibile adottare tutte quelle azioni correttive utili ad assicurare la conformità tra i valori di parametro ottenuti e quelli fissati nell'allegato I. Questo è possibile solo nel caso in cui le deroghe stesse non presentino un potenziale pericolo per la salute umana e l'approvvigionamento d'acqua destinata al consumo umano nella zona interessata non possa essere effettuato in nessun altro modo congruo. I valori dei parametri fissati nelle tabelle dell'allegato I sono stati stabiliti sulla base dei dati scientifici disponibili, oppure, nel caso di valori parametrici inferiori a quelli raggiungibili con le attuali tecniche analitiche, sul limite analitico del metodo adottato. Nei casi in cui i dati scientifici esistenti siano stati ritenuti insufficienti o poco attendibili, è stato adottato un principio precauzionale nella determinazione dei valori di parametro, tenendo conto tra l'altro degli orientamenti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e del Comitato Scientifico della Commissione delle Comunità Europee per l'esame della “Tossicità e dell'ecotossicità dei composti chimici” (SCTE).

Sulla base delle attuali conoscenze scientifiche nel quadro normativo sopra menzionato viene ribadito il controllo, con modalità analoghe a quanto stabilito dalle norme preesistenti, per il Boro, il Cadmio, il Cromo, il Rame, il Mercurio, il Selenio e il Vanadio mentre per altri elementi, quali l'Antimonio, l'Arsenico, il Piombo, il Nichel, vengono fissati limiti più restrittivi poiché si tratta di elementi ritenuti di maggiore tossicità (Tabella 1).

In particolare l'arsenico inorganico, cancerogeno umano classificato dalla IARC nel gruppo 1, è associato ad un elevato rischio di tumori della pelle e ad altri diversi effetti tossici. La tossicità acuta si manifesta ad elevate dosi (70-180 mg) causando la morte o la perdita di sensibilità nel sistema nervoso periferico, mentre la tossicità cronica implica effetti neurotossici, danni al fegato, malattie della pelle ed effetti neoplastici. Il valore di parametro fissato nel DL.vo 31/2001 (10 µg/L) previene il rischio dell'arsenico per la salute umana e può essere modificato alla luce di nuovi dati tossicologici.

L'antimonio è un metallo pesante tossico la cui forma trivalente è generalmente più tossica di quella pentavalente. In generale l'organo bersaglio principale dell'azione tossica nell'uomo è

il cuore, con danno al miocardio. Altri effetti tossici sono stati evidenziati sul fegato, sul rene e a basse dosi sono state evidenziate modifiche sulla composizione ematica con aumento della colesterolemia e riduzione della glicemia. Il livello adottato di 5,0 µg/L è stato valutato sulla base del principio di precauzione e in considerazione delle metodiche di controllo disponibili.

Per il piombo la riduzione del valore parametrico da 50 a 10 µg/L è stata introdotta innanzitutto per proteggere alcune categorie a rischio, in particolare soggetti in età prepuberale, contro gli effetti tossici sul sistema nervoso; questi ultimi possono determinare alterazioni del quoziente intellettivo e insorgenza di problemi comportamentali e di apprendimento. La tossicità del piombo è ascrivibile principalmente all'affinità dimostrata nei confronti dei gruppi sulfidrilici delle proteine e gli effetti tossici prevalenti consistono in alterazioni della biosintesi dell'eme e della eritropoiesi, tossicità a livello del sistema nervoso centrale e periferico, effetti sui reni, alterazioni del metabolismo della vitamina D e di oligoelementi quali Fe, Ca e Zn.

Sulla base dei dati disponibili è stato quindi ritenuto, che la riduzione del limite del piombo nelle acque destinate al consumo umano comporti benefici di gran lunga maggiore dei costi di adempimento previsti. Tenendo conto di questi ultimi, sulla base di alcune stime preliminari effettuate dalla Commissione Europea è stato previsto un periodo di 15 anni per conformarsi a questo parametro e stabilito un limite provvisorio di 25 µg/L fino al 25 dicembre 2013.

La riduzione del valore del Nichel da 50 a 20 µg/L si fonda su alcuni dati scientifici che hanno indicato il nichel come promotore di effetti sistemici nell'uomo quali patologie gastrointestinali, epatiche e renali unitamente ad allergie cutanee. La riduzione dei livelli di nichel nell'acqua potabile ha inoltre l'obiettivo di fornire una protezione supplementare alle persone ipersensibili a tale elemento. La presenza di nichel nelle acque potabili, specie in quelle prelevate al rubinetto dopo prolungata stasi nelle tubazioni, è prevalentemente dovuta alla cessione da parte dell'accessoristica dell'impianto di distribuzione interno soggetta a processi di corrosione.

Tabella 1. Alcuni valori di parametro nelle acque destinate al consumo umano.

Parametro chimico	Unità di misura	DL.vo 31/01	DPR 236/88	OMS (valore guida)
Antimonio	µg/L	5,0	10	5
Arsenico	µg/L	10	50	10
Boro	mg/L	1	1	0,3
Cadmio	µg/L	5,0	5	3
Cromo	µg/L	50	50	50
Rame	mg/L	1,0	1	2
Piombo	µg/L	25 *	50	10
Mercurio	µg/L	1,0	1	1
Nichel	µg/L	20	50	20
Selenio	µg/L	10	10	1
Vanadio	µg/L	50	50	-

* (10 µg/L dal 2013)

Come accennato precedentemente, il DL.vo 31/2001 ha inserito alcuni parametri nuovi rispetto al precedente DPR 236/88, come l'acrilamide, il benzene, il bromato, l'1,2 dicloroetano, l'epicloridrina, il tetracloroetilene, il tricloroetilene, il cloruro di vinile e il clorito.

Il controllo di tali sostanze, presenti sia in acque trattate che non trattate, tiene conto di valutazioni del rischio che ne hanno evidenziato effetti cancerogeni e/o fortemente tossici.

I valori parametrici adottati per tali parametri sono molto cautelativi, anche rispetto ai valori consigliati dall'OMS; in particolare nel DL.vo 31/2001, laddove possibile, è stato fissato un livello massimo statisticamente accettabile di aumento di rischio di cancro, dovuto

all'esposizione alla singola sostanza cancerogena per l'intera vita, di un caso per milione di abitanti.

Ai sensi del DL.vo 31/2001 eventuali deroghe ai valori di parametro possono essere concesse dalla Regione o dalla Provincia autonoma entro i valori massimi ammissibili stabiliti dal Ministero della Sanità su istanza della Regione (o Provincia autonoma), purché non siano evidenziati potenziali rischi per la salute umana e solo nel caso "in cui l'approvvigionamento di acque destinate al consumo umano conformi ai valori di parametro non possa essere assicurato con nessun altro mezzo congruo" (art. 13, comma 1).

La concessione del regime di deroga è pertanto fondato su criteri scientifici e su una valutazione oggettiva dello stato delle risorse idriche; le deroghe devono avere la durata più breve possibile, comunque non superiore ad un periodo di tre anni, ad ogni modo prorogabile.

Una volta definiti i valori di parametro il successo dell'azione di controllo è determinato dallo sviluppo e adozione di metodi analitici di riferimento affidabili che garantiscano la produzione di risultati affidabili e comparabili per i parametri di interesse e assicurino ai consumatori un livello elevato di tutela della salute.

A tal fine il DL.vo 31/2001 ha definito in particolare alcune caratteristiche di prestazione delle metodiche analitiche da applicare per il controllo dei differenti parametri nelle acque destinate al consumo umano, quali in particolare (allegato III):

- l'esattezza, espressa in percentuale del valore di parametro;
- la precisione, espressa in percentuale del valore di parametro;
- il limite di rilevabilità, espresso in percentuale del valore di parametro.

L'azione normativa è finalizzata pertanto a garantire che il metodo di analisi utilizzato sia "in grado, al minimo, di misurare concentrazioni uguali al valore di parametro con un'esattezza, una precisione e un limite di rivelabilità specificati". Alcuni esempi sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche di prestazione delle metodiche analitiche per alcuni parametri

Parametro chimico	Unità di misura	Valore di parametro (ex CMA)	Esattezza (% del valore di parametro)	Precisione (% del valore di parametro)	Limite di rivelabilità (% del valore di parametro)
Antimonio	µg/L	5,0	25	25	25
Arsenico	µg/L	10	10	10	10
Boro	mg/L	1	10	10	10
Cadmio	µg/L	5,0	10	10	10
Cromo	µg/L	50	10	10	10
Rame	mg/L	1,0	10	10	10
Piombo	µg/L	25*	10	10	10
Mercurio	µg/L	1,0	20	10	20
Nichel	µg/L	20	10	10	10
Selenio	µg/L	10	10	10	10
Vanadio	µg/L	50	-	-	-

* (10 µg/L dal 2013)

Un aspetto da considerare per quanto riguarda le azioni e le metodiche di controllo riguarda l'attribuzione delle competenze agli organismi incaricati del controllo. In questo contesto l'Istituto Superiore di Sanità predispone i metodi analitici di riferimento da utilizzare per i parametri elencati nell'allegato III, nel rispetto dei requisiti di cui allo stesso allegato e nel caso di adozione di metodi analitici diversi dai metodi analitici di riferimento, verifica, che i risultati ottenuti siano affidabili almeno quanto quelli ottenuti con i metodi specificati (art. 11).

Al fine di elaborare in modo omogeneo i metodi analitici stabiliti dalla legislazione, è stata istituita una 2^a Sottocommissione di Studio presso il Ministero della Sanità nell'ambito del Comitato Permanente di Studio (CPS) sulle acque (ex art. 9, DM 26 marzo 1991). Tale Sottocommissione ha coinvolto sia esperti del Ministero e dell'Istituto Superiore di Sanità sia esperti e tecnici appartenenti a differenti istituzioni nazionali (Università, CNR, PMP, ARPA, Aziende Acquedottistiche) (Figura 1).

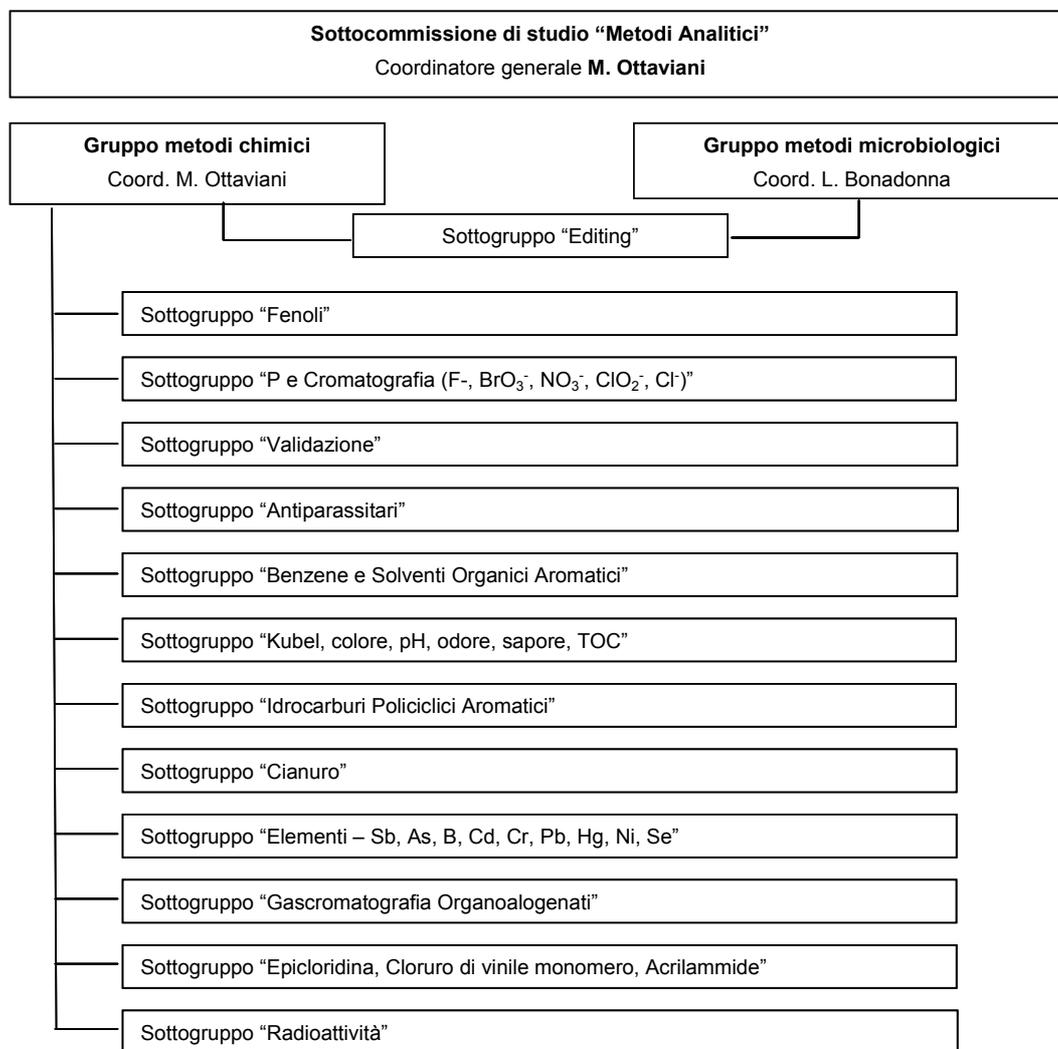


Figura 1. Sottocommissione di studio "Metodi analitici" e relativi sottogruppi di lavoro

Già nel 1997 la 2^a Sottocommissione di Studio ha prodotto una raccolta di metodi (Rapporto ISTISAN 97/8) per la determinazione dei parametri inseriti nel "controllo minimo C1", nel "controllo normale C2" e nel "controllo periodico C3", così come prescritto nell'allegato I del DPR 236/88.

In un secondo elaborato suddiviso in una prima parte sui metodi chimici e una seconda sui metodi microbiologici (Rapporto ISTISAN 00/14_1, Rapporto ISTISAN 00/14_2) sono stati raccolti i metodi analitici dei restanti parametri appartenenti al "controllo occasionale C4".

Inoltre sono stati revisionati e/o aggiunti metodi analitici alternativi per alcuni parametri chimici del “controllo normale C2” e del “controllo periodico C3”.

Nell’ottobre del 1999 il Comitato Permanente di Studio ha riconfermato il mandato alla 2^a Sottocommissione di Studio per cui i lavori della stessa sono proseguiti sia per aggiornare che per integrare i metodi con quanto previsto dalla nuova Direttiva europea sulle acque destinate al consumo umano e dal relativo recepimento.

Il lavoro dei vari sottogruppi (Figura 2) ha portato alla ridefinizione dei metodi analitici di riferimento per i parametri organolettici, fisici, chimico-fisici, chimici e microbiologici ai sensi del DL.vo 31/2001.

I metodi sono attualmente in fase di progressiva diffusione all’interno della sezione documentazione del sito www.acqua.iss.it. La raccolta definitiva dei metodi sarà diffusa nella forma cartacea alle strutture di controllo in forma di Rapporti ISTISAN:

04/xx pt 1. Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001-Parte I: metodi chimici.

04/xx pt 2. Metodi analitici per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001-Parte II: metodi microbiologici.

Di seguito in Allegato sono riportati i principi di alcuni metodi di riferimento sviluppati dal sottogruppo “Elementi” per la loro determinazione nelle acque destinate al consumo umano mediante spettrometri di assorbimento ed emissione atomica.

Allegato I

Determinazione di As, Sb, Se. Metodo spettroscopico di emissione con sorgente a plasma induttivo mediante sviluppo di idruri (ICP-AES)

Il metodo consente la determinazione di arsenico, antimonio e selenio disciolti o cedibili a pH <2 presenti nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano mediante la tecnica ICP-AES accoppiata alla generazione di idruri (in flusso continuo).

La procedura analitica può essere suddivisa schematicamente in due fasi:

- a) reazione di riduzione, ottenuta facendo reagire in ambiente acido il campione con sodio boroidruro, per cui si formano e si separano dalla fase liquida gli idruri di As, Sb e Se;
- b) misura della quantità di analita presente in fase di vapore eseguita mediante spettrometria di emissione a plasma (ICP-AES).

In aggiunta ai vantaggi offerti dai sistemi ICP-AES come il campo di linearità esteso a diversi ordini di grandezza, anche se la concentrazione più elevata analizzabile è determinata più dalla chimica di generazione degli idruri che dal sistema spettrofotometrico, tale tecnica consente, convogliando direttamente in torcia i vapori generati nella reazione di riduzione, di eliminare o quantomeno ridurre notevolmente le interferenze.

In conseguenza del fatto che solo alcune specie a stato d’ossidazione ridotto sono in grado di formare i corrispondenti idruri è necessario effettuare, prima dell’analisi strumentale vera e propria, una preriduzione degli analiti.

Questo metodo quindi è applicabile per la determinazione di As, Sb e Se inorganici totali e consiste nel sottoporre il campione a opportuna preriduzione e successiva miscelazione in continuo con sodio boroidruro; i prodotti di reazione sono quindi miscelati con argon e inviati al separatore gas-liquido da cui gli idruri formati vengono convogliati in torcia dove l’idruro è decomposto termicamente in idrogeno ed elemento. Quindi, in seguito a fenomeni di eccitazione, si genera uno spettro di emissione composto dalle righe caratteristiche degli

elementi presenti. Tali righe, dopo essere state separate mediante un sistema di dispersione, vengono rivelate simultaneamente o sequenzialmente da un fotomoltiplicatore o da un rivelatore a stato solido che produce un segnale elettrico di intensità proporzionale all'intensità delle righe di emissione. La concentrazione di analita presente nel campione viene determinata per confronto con una soluzione di riferimento a concentrazione nota.

Arsenico inorganico totale: a temperatura ambiente e a $\text{pH} \leq 1$ l'As (V) è convertito abbastanza velocemente dal sodio boroidruro ad As (III) il quale istantaneamente è convertito ad arsina (AsH_3); per rendere quantitativa la determinazione dell'arsenico inorganico totale è comunque necessario procedere a un trattamento di preriduzione.

Antimonio inorganico totale: il pH controlla la trasformazione di Sb (V) e Sb (III) a stibina (SbH_3).

Sb (III) è facilmente riducibile a stibina con sodio boroidruro mentre la riduzione da Sb (V) è incompleta e non avviene a pH prossimo alla neutralità.

Per permettere la determinazione quantitativa dell'Sb inorganico totale è necessario procedere con una preriduzione finalizzata a trasformare in Sb (III) tutto l'antimonio inorganico presente che mediante sodio boroidruro è facilmente trasformato in stibina.

Selenio inorganico totale: il selenio può esistere in due stati di ossidazione stabili, Se (IV) e Se (VI). Per determinare il selenio inorganico totale è quindi necessario effettuare una preriduzione dell'analita prima della lettura spettrometrica mediante digestione acida con acido cloridrico. L'efficienza della preriduzione dipende dalla temperatura, dal tempo e dalla concentrazione dell'acido cloridrico.

Allegato II

Determinazione di Al, B, Cd, Cr, Cu, Ba, Fe, Mn, Na, Ni, Pb, V. Metodo spettroscopico di emissione con sorgente a plasma induttivo (ICP-AES)

Il metodo consente la determinazione di metalli disciolti o cedibili a $\text{pH} < 2$ presenti nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano.

Il campione e le soluzioni di taratura vengono opportunamente nebulizzate e l'aerosol viene trasportato nel plasma, dove, in seguito a fenomeni di eccitazione, si genera uno spettro di emissione composto dalle righe caratteristiche degli elementi presenti. Tali righe, dopo essere state separate mediante un sistema di dispersione, vengono rivelate simultaneamente o sequenzialmente da un fotomoltiplicatore o da un rivelatore a stato solido che produce un segnale elettrico di intensità proporzionale all'intensità delle righe di emissione. La concentrazione di analita presente nel campione viene determinata per confronto con una soluzione di riferimento a concentrazione nota.

Allegato III

Determinazione di Hg. Metodo per spettrometria di assorbimento atomico dei vapori freddi (CVAAS)

Il metodo consente la determinazione di Hg disciolto o cedibile a $\text{pH} < 2$ presente nelle acque sorgive, sotterranee e superficiali, destinate o da destinare al consumo umano.

La procedura analitica può essere suddivisa schematicamente in due fasi:

- a) digestione assistita a microonde con HNO₃ del campione;
- b) ossidazione chimica di Hg (KMnO₄) e riduzione con sodio boro idruro per consentire la determinazione quantitativa di Hg.

I vapori di Hg sono quindi trasportati da un flusso di gas inerte in una cuvetta alloggiata nel banco ottico dello spettrometro. Dalla misura del segnale di assorbanza a 253,7 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di calibrazione ottenuta con soluzioni a concentrazioni note comprese nel campo di indagine analitica.

Bibliografia

1. Comunità Europea. *Direttiva del Consiglio concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano*. 80/778/CEE del 15-07-1980. Pubblicata nella G.U.C.E. 30 agosto 1980, n. L 229. Entrata in vigore il 17 luglio 1980.
2. Italia. DPR 24 maggio 1988, n. 236. Attuazione della Direttiva CEE numero 80/778 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, ai sensi dell'art. 15 della L. 16 aprile 1987, n. 183. *Gazzetta Ufficiale - Serie Ordinaria* n. 152, 30 giugno 1988.
3. Comunità Europea. *Direttiva del Consiglio concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano*. 98/83/CE del 03-11-1998. Pubblicata nella G.U.C.E. 5 dicembre 1998, n. L 330. Entrata in vigore il 25 dicembre 1998.
4. Italia. DL.vo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Ordinaria* n. 52 del 3 marzo 2001.
5. Italia. DL.vo 2 febbraio 2002, n. 27.. Modifiche e integrazioni al DL.vo. 2 febbraio 2001, n. 31, recante attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Serie Ordinaria* n. 58 del 9 marzo 2002

TRATTAMENTO E QUALITÀ DEL DATO ANALITICO

Elisa Robotti, Emilio Marengo, Maria Carla Gennaro
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Avanzate, Università del Piemonte Orientale, Alessandria

Introduzione

I risultati ottenuti dall'applicazione di procedure e metodi analitici costituiscono spesso la base per giungere a decisioni in merito a problematiche di rilevanza industriale, commerciale, legale e di salute pubblica. Si possono citare numerosi esempi al riguardo: l'eliminazione dal mercato di un prodotto nel quale siano stati riscontrati componenti ad un livello maggiore di quello ammissibile per legge, oppure inquinanti in dosi tali da causare possibili danni alla salute. Analoghe considerazioni si possono fare riguardo ad analisi chimiche eseguite su reflui di impianti industriali, il cui esito può portare alla sospensione di una linea produttiva oppure alla chiusura di uno stabilimento qualora fossero rilevati inquinanti a livelli superiore al limite ammissibile per legge. Le decisioni che il chimico è chiamato a prendere possono portare a conseguenze molto importanti dal punto di vista commerciale (eliminazione o meno dal mercato di determinati prodotti), industriale (la non accettazione di un prodotto da parte di un cliente perché questo non soddisfa certe specifiche), legale (spesso i risultati ottenuti da un esperto scientifico nominato da un tribunale possono decidere della colpevolezza o innocenza di un individuo o di una società) e di salute pubblica (risultati ottenuti da analisi eseguite su campioni biologici possono portare alla diagnosi di una patologia) ed è quindi necessario che siano basate su un dato attendibile, proveniente dall'applicazione di metodi adeguati. In tutti i casi appena menzionati è necessario dimostrare l'adeguatezza dei metodi di analisi utilizzati al problema in esame e l'attendibilità dei risultati ottenuti attraverso metodi statistici in grado di attestare la qualità dei risultati ottenuti.

La verifica dell'adeguatezza dei metodi e dell'attendibilità dei risultati è una procedura che prende il nome di validazione: questo termine è definito nella norma UNI EN ISO/IEC 17025 (2000) come:

"...la conferma, attraverso l'esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista (di un metodo analitico) siano soddisfatti". L'obiettivo della validazione è quindi lo studio e la valutazione delle caratteristiche di un metodo analitico.

È importante sottolineare che la procedura di validazione riguarda l'intera procedura analitica e comprende quindi anche i passaggi di campionamento, manipolazione del campione, trasporto, eventuale pre-trattamento prima dell'analisi strumentale, analisi strumentale vera e propria, trattamento statistico dei risultati finali.

La procedura di validazione prevede la stima di diversi parametri che definiscono nel loro insieme la qualità di un metodo analitico e dei suoi risultati; il numero di parametri da determinare è ovviamente maggiore per i metodi quantitativi che per quelli qualitativi. Nel caso di metodi quantitativi, la procedura si può distinguere in:

- validazione primaria: prevede la determinazione di accuratezza, precisione, range dinamico e lineare, selettività e specificità, limite di rivelazione, limite di quantificazione, incertezza di misurazione e recupero;
- validazione secondaria, in cui viene determinata la robustezza del metodo.

Per quanto riguarda la definizione della qualità del dato analitico ottenuto utilizzando una certa procedura di analisi, è importante l'approfondimento dei primi due parametri menzionati: accuratezza e precisione.

Accuratezza e precisione

L'accuratezza (Figura 1) è definita come il grado di accordo tra il risultato di un procedimento analitico e un VR accettato. L'accuratezza è data da due contributi: l'esattezza (trueness) è il grado di accordo tra il valor medio di una serie di risultati e un VR; la precisione è il grado di accordo tra risultati indipendenti e il loro valor medio.

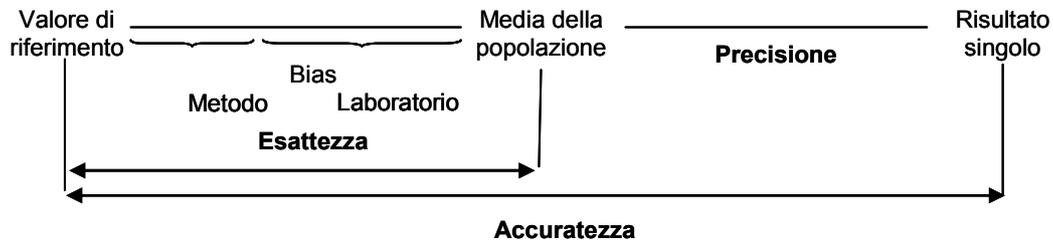


Figura 1. Relazione schematica tra accuratezza, esattezza e precisione

La differenza tra accuratezza e precisione è di fondamentale importanza; risultati precisi possono non essere accurati e viceversa: ad esempio, si possono avere repliche della stessa analisi molto simili tra loro ma con un valore molto diverso dal VR accettato (risultati precisi ma non accurati) oppure repliche con risultati molto diversi tra loro ma il cui valor medio è molto vicino al VR accettato (risultati accurati ma non precisi).

L'esattezza viene misurata attraverso una quantità detta **bias** o errore sistematico, il quale a sua volta si compone di due contributi: uno dovuto al metodo stesso di analisi, che ovviamente introduce un certo errore sistematico nelle misure, e uno dovuto al laboratorio, cioè a fattori ambientali come le condizioni climatiche, i reagenti utilizzati ecc... L'esattezza può essere verificata ad esempio attraverso l'analisi di materiali di riferimento con composizione il più simile possibile a quella dei campioni reali oppure attraverso il confronto dei risultati ottenuti per campioni reali con il metodo di esame e con un metodo di riferimento, ad esempio un metodo normato.

Per quanto riguarda la precisione, questa può essere influenzata da diversi fattori: fattori ambientali (temperatura, umidità...), operatori con manualità ed esperienza differente, strumenti con caratteristiche diverse, variazioni della qualità dei materiali (reagenti di purezza differente), strumentazioni e materiali di diversa età, errori casuali. Si possono definire tre livelli diversi di precisione:

- *Ripetibilità ristretta*
è valutata quando le misure vengono eseguite nello stesso laboratorio, sullo stesso strumento, dallo stesso operatore, a brevi intervalli di tempo, senza eseguire tarature tra le misure;
- *Precisione intermedia*
è valutata quando le misure vengono eseguite nello stesso laboratorio, su strumenti diversi, da diversi operatori, su scale di tempo anche lunghe, eseguendo tarature tra le misure;
- *Ripetibilità*
è valutata quando le misure vengono eseguite in laboratori diversi, su strumenti diversi, da diversi operatori.

Questi tre livelli diversi corrispondono a livelli crescenti di complessità dello studio che viene eseguito: nel primo caso si è di fronte alle condizioni più restrittive possibili, mentre si procede verso variabilità sempre maggiori procedendo attraverso i successivi due. La stessa precisione intermedia presenta livelli diversi, a seconda che si faccia variare uno solo dei parametri (operatore, apparecchiatura...) oppure alcuni o tutti contemporaneamente.

Ripetibilità ristretta

La valutazione della ripetibilità ristretta consente di ottenere alcune informazioni importanti sia sul metodo utilizzato che sul laboratorio in cui le misure sono state eseguite, infatti, attraverso la sua valutazione è possibile stimare l'affidabilità e la rispondenza di un metodo analitico alle esigenze del laboratorio ed è possibile anche verificare la ripetibilità di un operatore, permettendo quindi di selezionare l'operatore più adatto ad eseguire un certo tipo di misura.

La ripetibilità ristretta permette inoltre di associare un **intervallo di confidenza** al valore del misurando. Per intervallo di confidenza si intende un intervallo di variazione all'interno del quale, con una probabilità prefissata (di solito il 95%), cade il valore del misurando.

È possibile inoltre confrontare i risultati ottenuti all'interno di un laboratorio in tempi successivi, infatti la differenza in valore assoluto tra le misure eseguite in doppio deve risultare minore della ripetibilità valutata precedentemente.

Il valore della ripetibilità viene indicato generalmente con r e corrisponde al valore limite al di sotto del quale è compresa, con un livello di probabilità generalmente del 95%, la differenza tra due singoli risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità. Al valore di ripetibilità è possibile associare uno scarto tipo di ripetibilità S_r , definito come lo scarto tipo dei risultati di prove ottenuti in condizioni di ripetibilità; questo parametro caratterizza la dispersione dei risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità. Una seconda misura della dispersione è il coefficiente di variazione percentuale della ripetibilità $CV_r\%$, definito come lo scarto tipo percentuale relativo alla media dei risultati di prove ottenute in condizioni di ripetibilità.

La valutazione della ripetibilità ristretta viene eseguita attraverso uno schema procedurale strutturato in passaggi successivi, che sono presentati in dettaglio di seguito e di cui viene data una rappresentazione schematica in Figura 2.

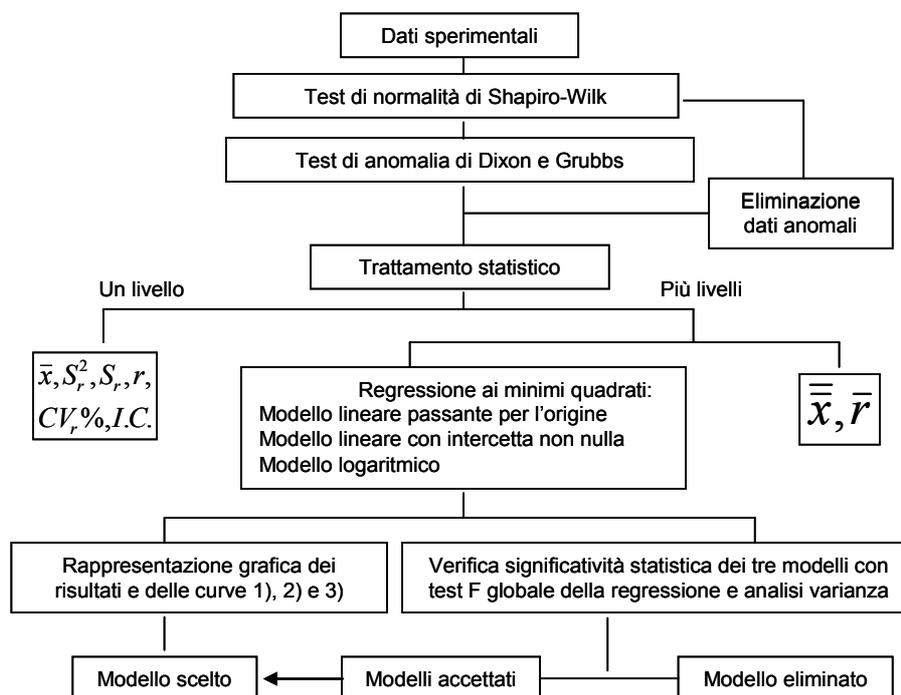


Figura 2. Schema procedurale per il calcolo della ripetibilità ristretta

Determinazione del numero di misure da eseguire (misure eseguite ad un livello)

Il primo passaggio è la determinazione del numero di misure necessario per una valutazione adeguata della ripetibilità. La relazione (1) lega lo scarto tipo $S_{\bar{x}}$ della media di n misure allo scarto tipo S di una singola determinazione: i due termini sono proporzionali attraverso un fattore di proporzionalità che rende conto del numero di misure eseguito.

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (1)$$

Per ogni valore S dello scarto tipo di una singola misura, riportando in grafico il valore di $S_{\bar{x}}$ in funzione del numero n di misure, si ha un andamento come quello riportato in Figura 3. La dispersione dei dati diminuisce notevolmente passando dalla misura singola a due o tre repliche, tuttavia questo andamento tende a stabilizzarsi all'aumentare del numero di misure eseguite: dopo 12 repliche di una misura, lo scarto tipo tende a stabilizzarsi e l'esecuzione di misure aggiuntive non è quindi giustificata. Normalmente il numero di repliche eseguite per determinare la ripetibilità ristretta varia tra 5 e 12.

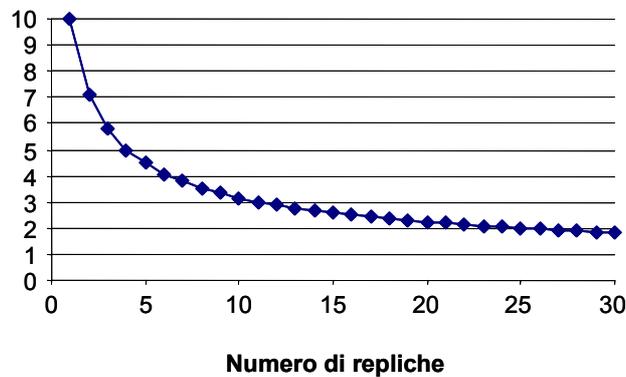


Figura 3. Andamento dello scarto tipo della media di n misure rispetto al numero di misure eseguite; il valore dello scarto tipo della singola misura è stato posto pari a 10

Test di normalità

Il passo successivo consiste nell'esecuzione di un test di normalità. I test statistici che vengono adottati per giungere alla valutazione della ripetibilità ristretta (test non parametrici) si basano sull'assunzione che il set di misure eseguito rappresenti un campione casuale estratto dalla popolazione concettuale contenente le infinite possibili misure. L'ipotesi di campionamento casuale implica che il campione estratto casualmente dalla popolazione concettuale sia distribuito secondo una popolazione normale o gaussiana: questa distribuzione è caratterizzata da una misura di localizzazione dei dati (la media) e da una misura della loro dispersione (la varianza). Dal momento che i test statistici applicati si basano su quest'assunzione, è necessario verificare che la popolazione dei dati effettivamente corrisponda ad una distribuzione gaussiana: a questo scopo viene eseguito il test di normalità di Shapiro-Wilk.

Questo test si applica a campioni di numerosità compresa tra 3 e 20. Il suo scopo è quello di verificare o confutare l'ipotesi denominata H_0 , cioè l'ipotesi di distribuzione normale dei dati.

La procedura di esecuzione del test può essere schematizzata in step successivi:

1) *Disposizione dei risultati in ordine crescente:*

$$x_1 \leq x_2 \leq x_3 \leq \dots \leq x_n \quad (n = \text{numero delle misure})$$

2) *Calcolo della somma dei quadrati dei residui SQ:*

$$SQ = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 = \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}{n} \right) \quad (n = \text{numero delle misure}; \bar{x} = \text{media delle } n \text{ misure})$$

3) *Definizione del parametro b:*

$$b = \sum_{i=1}^k a_{n-i+1} (x_{n-i+1} - x_i) \quad (n = \text{numero delle misure. Se } n \text{ pari: } k=n/2; \text{ se } n \text{ dispari: } k=(n-1)/2).$$

Esplicitando la sommatoria, si ottiene:

$$b = a_n (x_n - x_1) + a_{n-1} (x_{n-1} - x_2) + \dots + a_{n-k+1} (x_{n-k+1} - x_k)$$

I coefficienti a sono tabulati in funzione di n .

In Figura 4 è rappresentato un esempio di calcolo eseguito su 6 misure.

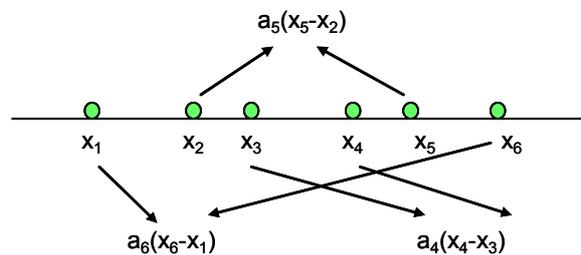


Figura 4. Esempio di calcolo dei tre termini che determinano il parametro b nel caso di 6 misure

4) *Calcolo del parametro*

$$W = b^2 / SQ$$

5) *Calcolo del parametro z:*

$$z = \gamma + \eta \ln \left(\frac{W - \varepsilon}{1 - W} \right)$$

I parametri γ , η ed ε sono tabulati in funzione di n .

Il valore di z ottenuto, preso come valore assoluto, è confrontato con il valore della distribuzione normale standard $z_{\alpha/2}$ tabulato al livello di significatività α . Di solito si utilizza un livello di probabilità del 95%, che corrisponde ad un livello di significatività $\alpha=0,05$. Si possono verificare due ipotesi: se $|z| < z_{\alpha/2}$, l'ipotesi di normalità è accettata; se invece $|z| \geq z_{\alpha/2}$, l'ipotesi di normalità è respinta.

Test di anomalia

Una volta verificata l'ipotesi di normalità dei dati è necessario valutare l'esistenza di eventuali dati anomali, mediante i due test di anomalia di Dixon e Grubbs. Questi test vengono eseguiti anche se il test di Shapiro-Wilk ha confutato l'ipotesi di normalità, perché la causa di non normalità dei dati potrebbe essere proprio la presenza di dati anomali. I test di anomalia permettono di distribuire i dati in tre regioni di significatività, a seconda del valore dell'indicatore statistico calcolato per i dati stessi:

- se il valore calcolato per l'indicatore statistico è minore del valore tabulato al livello di significatività $\alpha=0,05$, i dati sono considerati corretti;
- se il valore calcolato per l'indicatore statistico è maggiore del valore tabulato al livello di significatività $\alpha=0,01$, i dati sono considerati anomali;
- se il valore calcolato per l'indicatore statistico è compreso tra i valori tabulati per i livelli di significatività $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$, i dati sono considerati significativi, cioè appartenenti ad una regione di "attenzione", pur essendo trattati come valori corretti.

I test di Dixon e Grubbs non sono alternativi ma complementari, in quanto permettono di mettere in evidenza situazioni anomale diverse. Il test di Dixon permette di individuare nella serie di dati un valore anomalo ad uno dei due estremi della distribuzione, ma non consente di valutare l'esistenza di situazioni di mascheramento. Queste ultime sono rappresentate dall'esistenza di gruppi di dati anomali agli estremi della distribuzione, che non potrebbero essere valutati attraverso il test di Dixon.

Test di anomalia di Dixon

Il test di Dixon può essere utilizzato per campioni con numerosità fino a 40. Il test di Dixon viene applicato qualora sia presente un valore sospetto minimo o massimo (Figura 5).

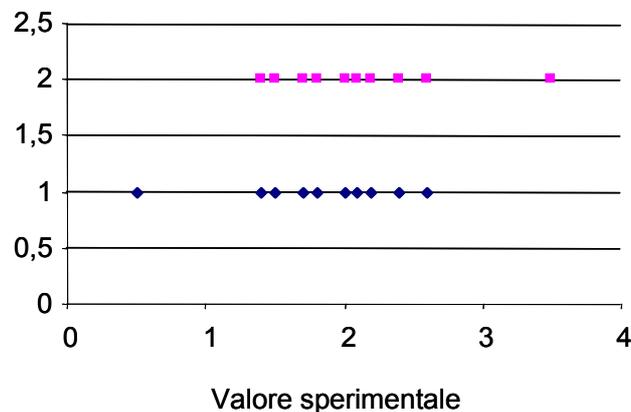


Figura 5. Situazioni in cui il test di Dixon risulta efficace

Il primo passaggio è la disposizione dei risultati in ordine crescente: $x_1 \leq x_2 \leq x_3 \leq \dots \leq x_n$ (n = numero delle misure). Si calcolano poi i termini R per i valori sospetti minimi e i valori sospetti massimi (Tabella 1):

Tabella 1. Calcolo dei valori di R per i sospetti minimi e i sospetti massimi

Se	Sospetti minimi	Sospetti massimi
$3 \leq n \leq 7$	$R_{10} = (x_2 - x_1) / (x_n - x_1)$	$R_{10} = (x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_1)$
$8 \leq n \leq 12$	$R_{11} = (x_2 - x_1) / (x_{n-1} - x_1)$	$R_{11} = (x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_2)$
$3 \leq n \leq 40$	$R_{22} = (x_3 - x_1) / (x_{n-2} - x_1)$	$R_{22} = (x_n - x_{n-2}) / (x_n - x_3)$

Il rapporto R maggiore viene confrontato con i valori tabulati per $\alpha=0,05$ e $\alpha=0,01$; se il valore di R calcolato è maggiore di quello tabulato per $\alpha=0,01$, il dato viene considerato anomalo e viene quindi eliminato.

Test di anomalia di Grubbs

Come già accennato, il test di Grubbs consente di identificare i valori anomali anche in presenza di effetti di mascheramento. Il primo passaggio, analogo a quello per il test di Dixon, consiste nell'ordinare i dati in ordine crescente: $x_1 \leq x_2 \leq x_3 \leq \dots \leq x_n$ (n = numero delle misure). Si definiscono quindi i termini Q_x (quantili), come: $Q_x(f_i) = x_i$, dove $i = 1, 2, \dots, n$. Si calcolano poi i termini Q_{NS} (quantili normalizzati standardizzati), definiti come:

$$Q_{NS}(f_i) = 4.91 * (f_i^{0.14} - (1 - f_i)^{0.14}), \text{ dove } f_i = \frac{\left(i - \frac{3}{8}\right)}{\left(n + \frac{1}{4}\right)}$$

Si riportano quindi in grafico i quantili vs. i quantili normalizzati standardizzati: si possono ottenere le tre situazioni discusse in dettaglio di seguito.

k valori sospetti massimi

Se il grafico riporta una situazione come quella rappresentata in Figura 6, sono presenti k valori anomali nella parte superiore del grafico, cioè k valori sospetti massimi. Applicando il test di Dixon, la presenza del secondo dato estremo agisce mascherando il primo. In questo caso si calcola il termine L_K (L = largest):

$$L_K = \frac{\sum_{i=1}^{n-k} (x_i - \bar{x}_L)^2}{SQ_{xx}} ; \bar{x}_L = \frac{\sum_{i=1}^{n-k} x_i}{n-k} ; SQ_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Al denominatore è presente la somma dei quadrati dei residui di tutti i dati, mentre al numeratore è presente la somma dei quadrati dei residui calcolata sulla base dei soli dati considerati non anomali.

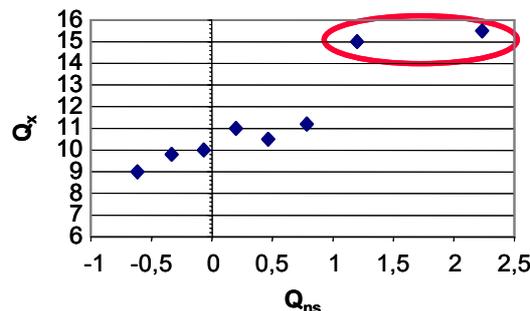


Figura 6. Test di Grubbs: k valori sospetti massimi

k valori sospetti minimi

Se il grafico riporta una situazione come quella rappresentata in Figura 7, sono invece presenti k valori anomali nella parte inferiore del grafico, cioè k valori sospetti minimi. In questo caso si calcola il termine S_K (S = smallest):

$$S_K = \frac{\sum_{i=k+1}^n (x_i - \bar{x}_S)^2}{SQ_{xx}} ; \bar{x}_S = \frac{\sum_{i=k+1}^n x_i}{n-k} ; SQ_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Si tratta di un'espressione analoga alla precedente, dove al denominatore è presente la somma dei quadrati dei residui di tutti i dati, mentre al numeratore è presente la somma dei quadrati dei residui calcolata sulla base dei soli dati considerati non anomali.

In questi due casi, i valori di L e S calcolati sono confrontati con i valori critici tabulati per numerosità n e per il livello di significatività $\alpha=0,05$: se i valori calcolati sono minori di quelli tabulati, i k valori sono considerati anomali e sono eliminati.

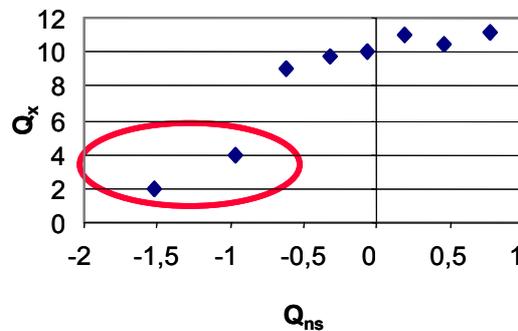


Figura 7. Test di Grubbs: k valori sospetti minimi

k+ valori sospetti massimi e k- valori sospetti minimi

Il terzo caso si verifica quando sono presenti sia k^+ valori nella parte superiore del grafico, che k^- valori nella parte inferiore (Figura 8); in questo caso si è di fronte alla presenza contemporanea di sospetti massimi e sospetti minimi. In questo caso si calcola il termine E_K , definito come:

$$E_K = \frac{\sum_{i=1+k^-}^{n-k^+} (z_i - \bar{z}_E)^2}{SQ_{zz}} ; z_i = |x_i - \bar{x}| ; \bar{z}_E = \frac{\sum_{i=1+k^-}^{n-k^+} z_i}{n - (k^+ + k^-)} ; SQ_{zz} = \sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2$$

L'espressione è analoga alle precedenti ma in questo caso le somme dei quadrati dei residui non sono calcolate sulla base dei valori di partenza x_i , ma sulla base dei termini z_i , definiti come i residui in valore assoluto dei dati originali. Se il valore di E_K calcolato è minore di quello tabulato per numerosità n e ad un livello di significatività $\alpha=0,05$, i k^+ e k^- dati sono anomali e devono essere eliminati.

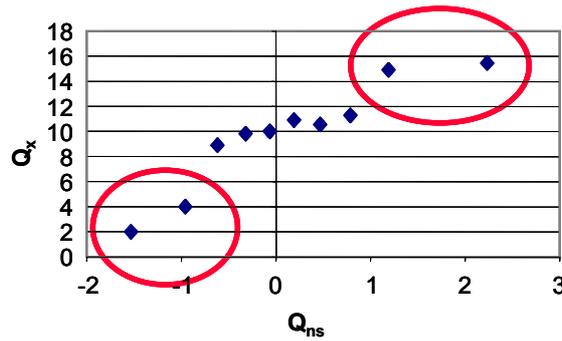


Figura 8. Test di Grubbs: k⁺ sospetti massimi e k⁻ sospetti minimi

Trattamento statistico ad un livello

Una volta eseguiti i test appena citati, si è in possesso di un set di dati omogeneo, che può essere utilizzato per calcolare i parametri di ripetibilità del metodo. Gli indicatori statistici per un set di n misure eseguite ad un singolo livello (un solo livello di concentrazione) comprendono un indicatore di localizzazione dei dati, generalmente la media degli stessi, e un indicatore della dispersione, generalmente la varianza o lo scarto tipo. Questi ultimi due indicatori prendono il nome di varianza e scarto tipo di ripetibilità qualora le misure siano eseguite in condizioni di ripetibilità. Questi indicatori sono definiti come:

Media:
$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Varianza di ripetibilità:
$$S_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

Scarto tipo di ripetibilità:
$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

La ripetibilità r , a sua volta è definita dall'espressione:

$$r = t * S_r * \sqrt{2}$$

dove S_r è lo scarto tipo di ripetibilità e t è il valore di t-Student tabulato per $\nu = n-1$ gradi di libertà e ad un livello di confidenza α che di solito è posto pari a 0,05.

Si possono definire altri due parametri importanti:

Coefficiente di variazione percentuale di ripetibilità: $CV_r \% = \frac{r}{\bar{x}} * 100$

Coefficiente di variazione percentuale dello scarto tipo della ripetibilità: $CV \% = \frac{S_r}{\bar{x}} * 100$

Infine, la grandezza più importante che viene fornita dallo studio di ripetibilità, cioè l'intervallo di confidenza, è data da:

$$IC = \bar{x} \pm t \frac{S_r}{\sqrt{n}}$$

L'intervallo di confidenza è definito come l'intervallo che contiene, ad un fissato livello di probabilità (di solito 95%), il valore del misurando. L'ampiezza dell'intervallo di confidenza è funzione sia del numero di misure eseguite, sia del livello di probabilità scelto.

L'intervallo di confidenza è funzione del numero di misure

Il valore dello scarto tipo di ripetibilità S_r calcolato sulla base di n misure eseguite in condizioni di ripetibilità può essere utilizzato per definire l'intervallo di confidenza nel caso di un numero m di misure, dove $m < n$.

$$IC = \bar{x} \pm t * \frac{S_r}{\sqrt{m}} \quad (\bar{x} = \text{media di } m \text{ misure eseguite sul campione incognito; } t = \text{t-Student}$$

calcolato per $\nu=n-1$ gradi di libertà e $\alpha=0,05$; S_r = scarto tipo di n misure; m = numero ridotto di misure).

Ad esempio, per 50 misure eseguite in condizioni di ripetibilità si è ottenuto:

$$\bar{x} = 38.65 \text{ mg / L}$$

$$S_r = 0.12 \text{ mg / L}$$

$$IC = 38.65 \pm 2.009 * \frac{0.12}{\sqrt{50}} = 38.65 \pm 0.03 \text{ mg / L}$$

Nel caso in cui siano state eseguite tre repliche con un valor medio vicino a quello fornito dalle 50 repliche iniziali, si ottiene:

$$IC = 39.10 \pm 2.009 * \frac{0.12}{\sqrt{3}} = 39.10 \pm 0.14 \text{ mg / L}$$

Per due repliche: $IC = 39.10 \pm 2.009 * \frac{0.12}{\sqrt{2}} = 39.10 \pm 0.17 \text{ mg / L}$

Per una singola misura: $IC = 39.10 \pm 2.009 * \frac{0.12}{\sqrt{1}} = 39.10 \pm 0.24 \text{ mg / L}$

Si nota come l'intervallo di confidenza si allarghi al diminuire del numero di misure eseguite, fornendo una misura che è sempre più imprecisa. Questo concetto è chiarito dalla Figura 9, in cui è rappresentato l'andamento dell'intervallo di confidenza all'aumentare del numero di misure eseguite.

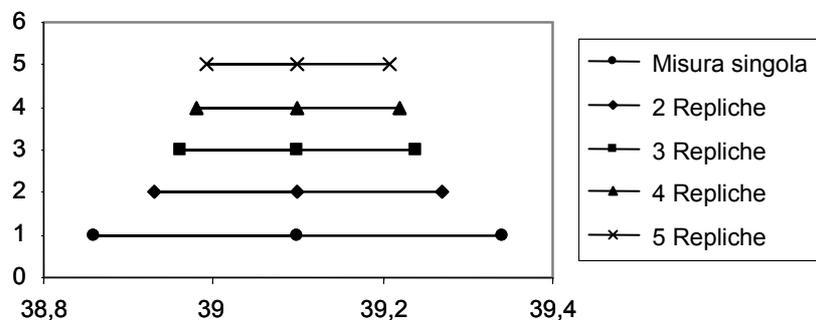


Figura 9. Andamento dell'intervallo di confidenza all'aumentare del numero di misure eseguite

L'intervallo di confidenza è funzione del livello di significatività α

Si è detto che l'intervallo di confidenza è anche funzione del livello di confidenza α . L'intervallo di confidenza, come già spiegato, è dato da:

$$\bar{x} - \frac{t^* s}{\sqrt{n}} \leq \mu \leq \bar{x} + \frac{t^* s}{\sqrt{n}}$$

In questa forma, del tutto analoga a quella vista in precedenza, viene espresso l'intervallo nel quale è contenuto ad un certo livello di probabilità il valore μ del misurando. Se si considera, ad esempio per 10 misure, un livello di significatività $\alpha=0,05$, il valore t-Student (tabulato per $\alpha=0,05$ e $\nu=10$) è pari a 2.262. L'espressione dell'intervallo di confidenza diventa quindi:

$$\bar{x} - \frac{2.262 * s}{\sqrt{10}} \leq \mu \leq \bar{x} + \frac{2.262 * s}{\sqrt{10}}$$

$$\bar{x} - 0.715 * s \leq \mu \leq \bar{x} + 0.715 * s$$

Se si considera invece un livello di significatività $\alpha=0,01$, il valore di t-Student tabulato diventa pari a 3.249 e l'intervallo di confidenza diventa:

$$\bar{x} - \frac{3.249 * s}{\sqrt{10}} \leq \mu \leq \bar{x} + \frac{3.249 * s}{\sqrt{10}}$$

$$\bar{x} - 1.03 * s \leq \mu \leq \bar{x} + 1.03 * s$$

Come si può notare, l'intervallo di confidenza aumenta al diminuire del livello di significatività α , dal momento che l'intervallo stesso deve contenere con una percentuale maggiore di sicurezza il valore del misurando.

Il concetto è chiarito in Figura 10, dove viene rappresentato l'intervallo di confidenza per diversi valori del livello di significatività.

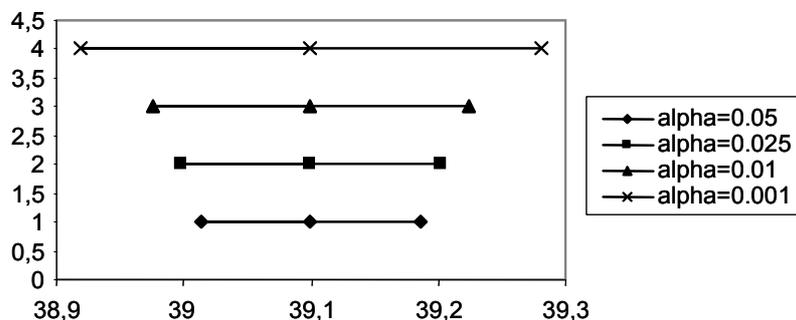


Figura 10. Andamento dell'intervallo di confidenza all'aumentare del livello di significatività

Analisi statistica a più livelli

Qualora siano state eseguite misure a più livelli del misurando (q livelli diversi), è necessario valutare se la ripetibilità r è costante per ciascun livello in esame. Se questo accade, si può calcolare la ripetibilità media, che potrà essere utilizzata per tutti i livelli compresi tra il massimo e il minimo presi in esame, anche se non sono stati direttamente introdotti nello studio.

Se viceversa la ripetibilità varia al variare del livello in esame, è necessario valutare quale relazione legghi la ripetibilità al livello del misurando. Di solito questo può essere valutato per via grafica, riportando la ripetibilità in funzione del livello del misurando e valutando quale curva interpola meglio i dati. Si utilizzano normalmente tre curve:

Retta passante per l'origine: $r_i = b * \bar{x}_i$ (i = livello di concentrazione i -esimo)

Retta non passante per l'origine: $r_i = a + b * \bar{x}_i$ (i = livello di concentrazione i -esimo)

Curva logaritmica: $\log r_i = c + d * \log \bar{x}_i$ (i = livello di concentrazione i -esimo)

Una volta scelta la curva migliore e determinati i parametri a , b , c , d , l'equazione è utilizzata per estrapolare il valore della ripetibilità per livelli del misurando intermedi a quelli studiati, purché compresi tra i livelli minimo e massimo inclusi nello studio.

Precisione intermedia

La precisione intermedia, come già sottolineato, può essere valutata a diversi livelli, a seconda che si intenda valutare diversi operatori, diversi strumenti o entrambi. Si prenderà in considerazione in questa sede la presenza di diversi operatori nello stesso laboratorio, tenuto presente che analoghe considerazioni possono essere fatte considerando diversi strumenti.

La valutazione della precisione intermedia, prevede un primo passaggio che consiste nella valutazione della ripetibilità ristretta separatamente per ciascun operatore. Le misure in condizioni di ripetibilità vengono eseguite da tutti gli operatori che si vogliono inserire nello studio, quindi i risultati ottenuti da ciascuno di essi devono essere sottoposti ai test appena visti: valutazione della normalità attraverso il test di Shapiro-Wilk e valutazione della presenza di dati anomali attraverso i test di Dixon e Grubbs. Dopo l'esecuzione dei test sui singoli operatori, si può passare al confronto tra gli operatori stessi. Questo confronto si compone di due fasi successive. Innanzitutto è necessario valutare l'omogeneità degli operatori per quanto riguarda la dispersione dei risultati ottenuti da ciascuno (test di omogeneità delle varianze); successivamente si valuta l'omogeneità degli operatori riguardo alla misura di localizzazione dei dati (test di omogeneità delle medie).

L'omogeneità delle varianze viene valutata attraverso due gruppi di test differenti. Se, dopo aver eliminato i dati anomali per ciascun operatore, gli operatori presentano tutti la stessa numerosità n , si utilizzano i test di Cochran e della varianza minima; se invece gli operatori presentano numerosità diverse, si utilizzano i test di Hartley e Bartlett. Quest'ultimo test non verrà preso in considerazione in dettaglio, vista l'elevata complessità e la possibilità di essere sostituito dal test di Hartley.

Test di Cochran

Questo test si applica quando gli operatori presentano tutti la stessa numerosità. Viene calcolato il parametro C che rappresenta il rapporto tra la massima varianza registrata tra gli operatori e la sommatoria delle varianze di tutti gli operatori.

$$C = \frac{S_{\max}^2}{\sum_{j=1}^p S_j^2} \text{ dove } p = \text{numero operatori}; S_{\max}^2 = \text{varianza massima tra gli operatori}; S_j^2 =$$

varianza dell'operatore j -esimo.

Si tratta di un test che valuta la disomogeneità della varianza massima rispetto a tutte le varianze registrate. Se il valore di C calcolato è maggiore del valore di C tabulato, la varianza massima è considerata non omogenea con le altre. Il valore di C critico è tabulato rispetto al numero p degli operatori e a $\nu=n-1$ gradi di libertà (n = numero delle misure eseguite).

Test della varianza minima

Il test della varianza presenta una forma analoga a quella del test di Cochran, ma in questo caso è la varianza minima che viene confrontata con le altre varianze registrate. In questo caso si calcola il termine S :

$$S = \frac{S_{\min}^2}{\sum_{j=1}^p S_j^2} \text{ dove } p = \text{numero operatori}; S_{\min}^2 = \text{varianza minima tra gli operatori}; S_j^2 =$$

varianza dell'operatore j -esimo.

Se il valore di S calcolato è minore di quello tabulato, la varianza minima è giudicata non omogenea con le altre. Anche in questo caso il valore di S critico è tabulato per p operatori e $\nu=n-1$ gradi di libertà (n = numero delle misure eseguite).

Test di Hartley

Il test di Hartley si applica quando le numerosità degli operatori sono diverse e confronta direttamente la varianza minima e quella massima. Si tratta di un test F :

$$F = \frac{S_{\max}^2}{S_{\min}^2} \text{ dove } S_{\max}^2 = \text{varianza massima tra gli operatori}; S_{\min}^2 = \text{varianza minima tra gli}$$

operatori.

Il valore di F calcolato è confrontato con quello tabulato: se F calcolato è maggiore di quello tabulato le varianze non sono omogenee. Il valore di F critico è tabulato per il livello di significatività α , per il numero p degli operatori e per il numero ν di gradi di libertà. Quest'ultimo parametro è calcolato attraverso l'espressione:

$\nu = \bar{n}_h - 1$; dove \bar{n}_h è la media armonica della numerosità campionaria, a sua volta data da:

$$\bar{n}_h = \frac{1}{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \dots + \frac{1}{n_p}} = \frac{1}{\sum_{j=1}^p \frac{1}{n_j}} = \frac{p}{\sum_{j=1}^p \frac{1}{n_j}}$$

Se \bar{n}_h è un numero decimale, non viene approssimato ma ne viene considerata la sola parte intera senza approssimazioni; in questo modo, il numero di gradi di libertà risultante è l'intero vicino più piccolo e corrisponde a porsi nella situazione più sfavorevole.

Anova ad una via

Una volta stabilita l'omogeneità delle varianze ed eventualmente avendo scartato gli operatori che portavano ad una disomogeneità tra esse, si può passare alla valutazione dell'omogeneità tra le medie degli operatori attraverso la cosiddetta ANOVA (ANalysis Of VAriance). L'ipotesi H_0 che si vuole confutare in questo caso è l'appartenenza dei risultati provenienti dai singoli operatori alla stessa popolazione. La valutazione prevede l'esecuzione di un test F che confronta la variabilità tra i gruppi di misure (gli operatori) e la variabilità interna. Se la variabilità tra i gruppi è minore di quella interna, allora i gruppi risultano omogenei e i risultati provenienti dai diversi operatori possono essere considerati come appartenenti alla stessa popolazione.

Il primo passaggio consiste nella valutazione della somma dei quadrati dei residui, che si compone di due contributi:

$$SQS_{tot} = SQS_{entro} + SQS_{tra}; \quad SQS_{tot} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{\bar{x}})^2; \quad k = n^\circ \text{ operatori}, \quad n_j = \text{numerosità}$$

operatore j -esimo, $\bar{\bar{x}}$ = grande media degli operatori.

La somma dei quadrati dei residui totale confronta ogni misura eseguita da ciascun operatore con la media delle medie degli operatori. Il termine "entro" si riferisce alla somma dei quadrati dei residui interna e ha la forma:

$$SQS_{entro} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ji} - \bar{x}_j)^2; \quad k = n^\circ \text{ operatori}, \quad n_j = \text{numerosità operatore } j\text{-esimo}, \quad \bar{x}_j =$$

media operatore j -esimo.

Questo termine confronta ciascun gruppo di misure con la rispettiva media. Il termine "tra" si riferisce alla somma dei quadrati dei residui tra gli operatori ed è definita come:

$$SQS_{tra} = \sum_{j=1}^k n_j (\bar{x}_j - \bar{\bar{x}})^2; \quad k = n^\circ \text{ operatori}, \quad n_j = \text{numerosità operatore } j\text{-esimo}, \quad \bar{x}_j = \text{media}$$

operatore j -esimo, $\bar{\bar{x}}$ = grande media degli operatori.

Questo termine confronta la media ottenuta da ciascun operatore con la grande media, pesando ciascun residuo per la numerosità campionaria dell'operatore corrispondente.

Le due somme dei quadrati dei residui parziali SQS_{entro} e SQS_{tra} , divise per il rispettivo numero di gradi di libertà, permettono di calcolare rispettivamente la varianza interna e la varianza tra gli operatori:

$$S^2_{entro} = \frac{SQS_{entro}}{N - k}; \quad N = \text{numero totale di misure eseguite}, \quad k = \text{numero di operatori.}$$

$$S^2_{tra} = \frac{SQS_{tra}}{k - 1}; \quad k = \text{numero di operatori.}$$

Il test F viene applicato confrontando la varianza tra gli operatori e la varianza interna:

$$F = \frac{S^2_{tra}}{S^2_{entro}}$$

Se il valore di F calcolato è maggiore di quello tabulato, l'ipotesi H_0 è respinta, quindi i gruppi non fanno parte della stessa popolazione. Il valore di F è tabulato al livello di significatività α , per $\nu_1 = k-1$ e $\nu_2 = N-k$ gradi di libertà.

Test delle medie

Se l'ipotesi di omogeneità tra i gruppi è respinta, si ha l'evidenza dell'esistenza di uno o più gruppi anomali ma non si è ancora a conoscenza di quale o quali gruppi siano da scartare. Questa informazione può essere ottenuta eseguendo un test t-Student su tutte le coppie possibili di valori medi. Il numero di confronti da eseguire è dato dal calcolo combinatorio:

$$n^{\circ} \text{confronti} = \frac{k(k-1)}{2}; k = \text{numero degli operatori.}$$

Si calcola per ciascun confronto il termine t_B :

$$t_B = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_j}{s_{res} \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}}}; \bar{x}_i = \text{media operatore } i\text{-esimo}, \bar{x}_j = \text{media operatore } j\text{-esimo}, n_i =$$

numerosità operatore i -esimo, $n_j =$ numerosità operatore j -esimo, $s_{res} =$ scarto tipo calcolato sulla base di tutti gli operatori.

Quest'ultimo corrisponde allo scarto tipo pooled degli operatori ed è dato da:

$$s_{res} = \sqrt{\frac{v_1 * s_1 + v_2 * s_2 + \dots + v_k * s_k}{v_1 + v_2 + \dots + v_k}}, \text{ dove } v_i = n_i - 1 = \text{gradi di libertà dell'operatore } i\text{-}$$

esimo; $s_i =$ scarto tipo operatore i -esimo.

Se t_B calcolato è maggiore di quello tabulato (per $\alpha = 0,05$ e $\nu = N-k$) la media i differisce significativamente dalla media j . Dall'esame di tutti i confronti è possibile ricavare gli operatori che hanno fornito delle medie non omogenee e quindi scartarli.

Una volta scartati gli operatori non omogenei rispetto alla dispersione e alla localizzazione, è possibile determinare la precisione intermedia in modo analogo a quanto visto per la ripetibilità ristretta.

NORMATIVA COMUNITARIA PER LA DETERMINAZIONE DI METALLI PESANTI NEI PRODOTTI ALIMENTARI: CAMPIONAMENTO E ANALISI

Paolo Stacchini, Augusto Pastorelli
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per la Sicurezza Alimentare,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Campionamento

Nell'ambito del controllo ufficiale dei prodotti alimentari i problemi relativi al campionamento costituiscono uno degli elementi di maggiore delicatezza di tutto il sistema di sorveglianza.

La selezione di porzioni che siano rappresentative della derrata alimentare da sottoporre ad analisi risente, infatti, di numerose variabili che condizionano decisamente la scelta sulle modalità operative da attuare.

L'alimento, per le sue caratteristiche reologiche e strutturali, non sempre garantisce l'omogenea dispersione dell'analisita che si intende analizzare; inoltre le caratteristiche chimico-fisiche della sostanza oggetto di indagine indirizzano la distribuzione della stessa spesso in parti specifiche dell'alimento. L'attuale attenzione posta sulla validità del processo analitico che si sostanzia con il percorso di validazione in conformità alle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17025 e la stima dell'incertezza di misura non può, in ogni caso, prescindere da un corretto approccio nella fase di campionamento per evitare che vizi procedurali inficino la qualità del dato analitico.

In questo contesto si pone l'odierno orientamento comunitario che, attraverso i propri strumenti regolatori, attribuisce fondamentale importanza a questo primo momento del controllo di conformità di un prodotto alimentare.

I Regolamenti che definiscono limiti massimi tollerabili di contaminanti negli alimenti-nitrati, micotossine, metalli pesanti, ecc., sono infatti accompagnati da Direttive Comunitarie che stabiliscono criteri relativi al campionamento e ai metodi di analisi che possono essere utilizzati. È importante sottolineare che la Direttiva Comunitaria, diversamente dal Regolamento, necessita del recepimento nell'ordinamento nazionale per tener conto dei diversi assetti dei sistemi di sorveglianza dei paesi membri. Ai problemi generali propri dei prodotti alimentari si aggiungono, nel caso dei metalli pesanti, le difficoltà specifiche di questi elementi che richiedono, per una corretta esecuzione dell'analisi, attenzioni e cautele particolari per le possibili contaminazioni involontarie apportate sia nella fase di prelievo che di analisi.

Il Regolamento Comunitario 466/2001 stabilisce i limiti massimi di piombo, cadmio e mercurio nelle diverse derrate alimentari; viene così armonizzata, a livello europeo, la normativa sui metalli pesanti con l'estensione a tutti gli alimenti fondamentali dei limiti per cadmio e piombo e la conferma dei limiti di mercurio per i prodotti ittici.

La Direttiva 2001/22/CE, recepita nel nostro ordinamento con il Decreto 5 marzo 2003 (Gazzetta Ufficiale 3 aprile 2003 n 78), indica criteri per il campionamento, prelievo e metodi di analisi.

Un risultato potrà essere considerato valido solo se saranno rispettate le condizioni stabilite. È opportuno sottolineare che l'elemento fondamentale del campionamento è il legame di

rappresentatività che intercorre tra alimento campionato e quantità di derrata alimentare. La Direttiva contiene una serie di definizioni che aiutano ad individuare questa relazione.

Viene definita partita il quantitativo di alimento identificabile per il quale è accertata la presenza di caratteristiche comuni-origini, varietà imballaggio, ecc. Per sottopartita si intende una porzione di partita designata per la applicazione delle modalità di prelievo e fisicamente separata e identificabile. Si rende in questo modo possibile il collegamento tra campione e partita e la conseguente valutazione di conformità.

Anche per quanto riguarda i campioni vengono definiti i diversi momenti che dalla fase di prelievo portano alla determinazione analitica.

Il campione elementare è il quantitativo di materiale prelevato in un solo punto della partita o sottopartita. I campioni elementari vengono uniti al fine di formare il campione globale. Il campione di laboratorio viene infine suddiviso in aliquote per permettere la esecuzione delle analisi rispettando i diversi ordinamenti. Da un punto di vista operativo i campioni elementari devono essere prelevati in vari punti distribuiti nella partita o sottopartita; il campione globale costituitosi deve avere un peso di almeno 1 kg ad eccezione dei prodotti confezionati. Le aliquote devono essere di dimensioni tali da consentire l'effettuazione di analisi in duplicato.

Ogni aliquota deve essere collocata in recipiente pulito, di materiale inerte, che lo protegga adeguatamente da contaminazioni, perdita di analiti per assorbimento nella parte interna del recipiente e dai danni eventuali causati dal trasporto.

Il numero di campioni elementari che deve essere prelevato è direttamente collegato alle dimensioni della partita. Nel caso degli alimenti liquidi, in cui la distribuzione dell'analita è omogenea, è sufficiente prelevare un campione elementare per partita.

Nelle Tabelle 1 e 2 sono indicati i numeri di campioni elementari da prelevare.

Tabella 1. Numero minimo di campioni elementari (Direttiva 2001/22); alimenti solidi

Peso della partita (kg)	Numero minimo di campioni elementari
<50	3
Da 50 a 500	5
>500	10

Tabella 2. Numero minimo di campioni elementari (Direttiva 2001/22); alimenti solidi in confezione

Numero di confezioni per partita	Numero minimo di campioni elementari
Da 1 a 25	1
Da 26 a 100	Circa il 5% (minimo 2)
>100	Circa il 5% (massimo 10)

La costituzione del campione globale e la successiva suddivisione in aliquote da inviare ai laboratori competenti deve essere effettuata selezionando esclusivamente la parte commestibile.

Per quanto riguarda molluschi, crostacei e pesci di piccole dimensioni consumati interi le viscere devono essere comprese nel materiale da analizzare. La conservazione del campione prima della analisi è un altro momento importante della fase di controllo. La matrice alimentare, per la sua complessità, è infatti soggetta a rapidi processi di deterioramento che possono comportare sostanziali modifiche dei livelli di concentrazione degli analiti considerati. In particolare gli alimenti di origine animale e vegetale freschi, non adeguatamente conservati, modificano rapidamente il proprio contenuto in acqua alterando irrimediabilmente l'intero percorso analitico. I prodotti alimentari che invece hanno subito trattamenti di trasformazione a fini stabilizzanti richiedono minori cautele nella fase di conservazione. Per conservare idoneamente l'aliquota di

alimento fresco non processato da sottoporre ad analisi devono essere utilizzati sistemi di stoccaggio refrigerato o surgelato scelti in funzione del tempo che intercorre dal momento del prelievo a quello dell'analisi. Fino a 3 giorni è possibile utilizzare frigoriferi, oltre è indispensabile ricorrere a congelamento del campione. Gli alimenti inscatolati possono essere conservati a temperatura ambiente adeguatamente protetti da possibili contaminazioni ambientali involontarie.

Analisi

Da alcuni anni l'orientamento comunitario in materia di metodi di analisi destinati al controllo dei prodotti alimentari è di definire criteri generali di prestazione e rendimento senza vincolare i laboratori all'utilizzo di un unico metodo ufficiale di riferimento.

Questa impostazione origina dalla continua evoluzione delle tecniche di analisi strumentale e dalla conseguente disomogenea possibilità di applicazione metodologica in un territorio vasto come quello dei paesi della Unione Europea.

A questo si aggiunge che con le Direttiva comunitaria in materia di laboratori ufficiali recepita nel nostro ordinamento con il DL.vo 156/1997 i metodi di analisi utilizzati nell'attività di Controllo Ufficiale devono essere accreditati attraverso la verifica di conformità alle norme UNI CEI EN ISO/IEC 17025.

Premesso questo si intuisce perché sia oggi preferito stabilire dei parametri da osservare che garantiscono contemporaneamente qualità e flessibilità.

La determinazione dei metalli pesanti nei prodotti alimentari è effettuata attraverso l'impiego di tecniche di spettroscopia in assorbimento o emissione atomica come:

- Assorbimento Atomico in fiamma (FAAS)
- Assorbimento Atomico con fornace di Grafite (GF-AAS)
- Emissione atomica con plasma induttivamente accoppiato con sistema ottico (ICP-AES)
- Emissione atomica con plasma induttivamente accoppiato con sistema a massa (ICP-MS)
- Assorbimento Atomico in modalità Flow Injection Mercury System (FIMS)

Queste tecniche sono caratterizzate da prestazioni analitiche molto diverse. La sensibilità, ad esempio, rende la scelta limitata essenzialmente alle tecniche GF-AAS e ICP-MS.

I limiti massimi di piombo e cadmio nei diversi prodotti alimentari sono, infatti, definiti alla luce della massima cautela e risultano molto bassi. Questo rende indispensabile il ricorso alle tecniche più sensibili utilizzate da personale qualificato, continuamente aggiornato e in condizioni ambientali e strutturali tali da impedire fenomeni di contaminazione dei campioni da sottoporre ad analisi. I parametri di prestazione analitica riportati nella Direttiva 2001/22 sono elencati nella Tabella 3.

Tabella 3. Prestazioni del metodo utilizzate per la determinazione dei metalli negli alimenti che devono essere rispettate (Direttiva 2001/22)

Parametro	Valore/commento
Applicabilità	Prodotti alimentari
Limite di rilevazione	<1/10 del limite massimo
Limite di quantificazione	<1/5 del limite massimo
Precisione	Valori di Horrat inferiori a 1,5 nella prova di validazione
Recupero	80-120%
Specificità	Senza interferenze di matrice e di di spettro

Questi parametri rappresentano le prestazioni che il laboratorio deve garantire per procedere alla fase di validazione del metodo di analisi.

In altre parole, un metodo per la determinazione di metalli pesanti nei prodotti alimentari che non rispetti quanto esplicitamente definito nella Direttiva sopraccitata anche se validato, internamente o attraverso circuiti interlaboratorio, non può essere utilizzato per le analisi del controllo ufficiale.

La documentazione del metodo, così come previsto dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17025, deve quindi indicare nel rapporto di validazione i parametri, le prestazioni ottenute e quelle attese.

Vengono riportate le definizioni redatte nella Direttiva 2001/22.

- R = Riproducibilità, valore al di sotto del quale è lecito presumere che la differenza assoluta fra i risultati delle singole prove ottenute in condizioni di riproducibilità (cioè su materiali identici ottenuti da operatori in diversi laboratori mediante metodo di prova standardizzato) rientri in una specifica probabilità-generalmente il 95%.
- S_R = Deviazione standard calcolata in condizioni di riproducibilità.
- r = Ripetibilità, valore al di sotto del quale è lecito presumere che la differenza assoluta tra due risultati di singole prove ottenute in condizioni di ripetibilità (stesso campione, stesso operatore, breve intervallo di tempo) rientri in una specifica probabilità-generalmente il 95%.
- s_r = Deviazione standard calcolata dai risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità.
- RSD_R = Deviazione standard relativa calcolata da risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità ($S_R/X \times 100$).
- RSD_r = Deviazione standard relativa calcolata da risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità ($s_r/X \times 100$).
- $Horrat_R$ = La RSD_R osservata divisa per il valore stimato RSD_R della equazione di Horwitz.
- $Horrat_r$ = La RSD_r osservata divisa per il valore stimato RSD_r della equazione di Horwitz.

La determinazione dei metalli nei prodotti alimentari richiede, come detto precedentemente, grande attenzione in tutte le fasi. La preparazione del campione deve avvenire in locali adeguati, preferibilmente in condizioni controllate, utilizzando attrezzature, materiali e prodotti che garantiscano la non contaminazione del campione di alimento.

I campioni devono subire una lunga serie di manipolazioni-omogeneizzazione, sottocampionamento, mineralizzazioni, diluizioni-che determinano continui rischi di apporti indesiderati di contaminanti. Le maggiori cause di contaminazione sono:

- reagenti non puri
- materiali e vetreria
- operatori
- condizioni ambientali dei locali

Questo elenco evidenzia come la scelta dei reagenti (acidi ultrapuri), la decontaminazione della vetreria e la selezione di materiali che non cedano metalli e siano in continua manutenzione, la formazione degli operatori con particolare attenzione ai tecnici addetti alle fasi di pretrattamento e preparazione del campione, il controllo delle condizioni ambientali attraverso l'uso di adeguati sistemi di filtrazione e climatizzazione siano elementi fondamentali per la qualità della misurazione. La digestione del campione può essere eseguita mediante:

- incenerimento in stufa e muffola
- digestione ad umido in contenitori aperti con aggiunta di acidi quali: acido cloridrico, acido nitrico, acido solforico, acido perclorico, acido fluoridrico
- digestione in forno a microonde

Quest'ultimo è, ormai, il metodo maggiormente utilizzato grazie alla sua rapidità, l'utilizzo di piccole quantità di acidi, la riduzione delle contaminazioni ambientali.

Aspetti negativi sono rappresentati dalla piccola quantità di campione utilizzabile e dai costi elevati di gestione. Sempre nella Direttiva si segnala che il metodo deve essere validato includendo il ricorso ad un materiale cercato di riferimento.

Nel caso dei metalli pesanti esiste, fortunatamente, una grande disponibilità di materiali certificati di riferimento sia per quanto concerne gli alimenti di origine animale che quelli di origine vegetale.

Nonostante questo si possono presentare situazioni nelle quali non sia disponibile un materiale certificato di riferimento con matrice identica al materiale da saggio. In questo caso la scelta deve cadere su quello che abbia una matrice quanto più simile possibile al campione di alimento ricordando che, sempre, le concentrazioni degli analiti certificati siano prossime a quelle degli analiti nel campione oggetto di analisi. È suggerito di inserire in ogni ciclo di analisi un controllo con un bianco e possibilmente un materiale certificato di riferimento.

Senza entrare nel merito delle diverse tecniche strumentali menzionate precedentemente è opportuno ricordare che il metodo scelto, validato e utilizzato richiede l'applicazione di un controllo di qualità della misura. L'uso dei MCR è, in questo contesto, il sistema più idoneo contestualmente alla introduzione delle carte di controllo, a garantire, nel tempo, la tenuta e l'affidabilità dell'approccio metodologico selezionato.

Valutazione dell'incertezza di misura e conclusioni.

Qualsiasi determinazione analitica necessita della correlata stima dell'incertezza di misura. Secondo l'*International Vocabulary of Basic and General Terms of Metrology* (VIM) la grandezza incertezza di misura è definita come "il parametro associato al risultato di una misurazione che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibile al misurando".

La pratica più comunemente seguita per stabilire la dispersione dei risultati e definire la confrontabilità delle misurazioni chimiche si fonda sullo studio e valutazione dei parametri caratterizzanti la qualità e tipologia di un metodo, in particolare la ripetibilità e la riproducibilità, che sono parametri di norma ricavati durante i processi di validazione di una determinata metodica. Questo approccio metrologico definito come *top-down* tuttavia non è sufficiente per fornire una stima ragionevole dell'incertezza di misura e questo nonostante la ripetibilità e riproducibilità di misura possono essere allargate nei confronti di determinazioni intra-laboratori e inter-laboratori fino ad individuare quali possono essere le cause di variabilità nella misura. È poi difficile disporre di studi collaborativi interlaboratorio atti a valutare la qualità del risultato di un determinato metodo. Un secondo approccio metrologico chiamato *bottom-up approach* (dal basso verso il basso) viene descritto nella norma UNI CEI ENV 13005 nella ISO corrispondente adattata alla disciplina della chimica analitica.

Questo approccio tratta il dato chimico come qualsiasi dato di altri campi di misurazione. Una delle differenze principali è rappresentato dal fatto che l'approccio tradizionale *top-down* non considera alcun modello matematico esplicito come base per il calcolo della stima dell'incertezza, mentre quello proposto dalla UNI CEI ENV 13005 è basato sulla legge della propagazione delle incertezze.

Il metodo tradizionale è anche detto "olistico" il secondo, invece, è anche detto "decostruttivo". È intuitivo come il secondo approccio sia molto meno intuitivo e complesso di quello tradizionale, questo perché in un modello matematico-statistico può essere complesso disaggregare le varie sorgenti di incertezza e spesso molte sorgenti possono sfuggire all'indagine o difficilmente essere quantificate. Per questo motivo sorgenti di incertezza di contributo minore sono spesso sottostimate o sovrastimate (è il caso in cui si considera lo stesso contributo in diversi

punti del modello). La costruzione di un modello statistico matematico risente poi di contributi meno prevedibili derivanti dalla contemporanea presenza di specie interferenti o della matrice stessa.

Per questo motivo la valutazione esatta e l'individuazione di tutti i contributi all'incertezza di un risultato non compresi nella ripetibilità resta davvero problematica ed è comune ricorrere ad approssimazioni e compromessi al fine di fornire una stima rappresentativa e raramente la metodologia UNI CEI ENV 13005 raramente viene seguita nella sua integrità.

In conclusione un compromesso accettabile può dunque essere quello di seguire contemporaneamente gli approcci, aggiungendo alla valutazione dell'incertezza ottenuta dalla ripetibilità di misura, l'effetto della variazione di grandezze e parametri indipendenti e definiti con sicurezza.

Bibliografia

1. Unione Europea. Regolamento Comunitario n. 466/2001 dell'8 marzo 2001, che definisce i tenori massimi di taluni contaminanti presenti nelle derrate alimentari. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* n. L77 del 16 marzo 2001, pag. 1-13.
2. Unione 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* n. L77 del 16 marzo 2001, pag. 14-21.
3. Italia. Decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 156. Attuazione della direttiva 93/99/CEE concernente misure supplementari in merito al controllo dei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 136, 13 giugno 1997.
4. Italia. Decreto Ministero della Salute 5 marzo 2003. Recepimento della Direttiva 2001/22/CE della Commissione 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* n. 78, 3 aprile 2003.
5. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
6. BIPM, IEF, IFCC, ISO, IUPAC, OIMLO. *International Vocabulary of Basic and General Terms of Metrology* VIM, ISO 1993.
7. EURACHEM/CITAC GUIDE CG4: QUAM: 2000.1. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2a edizione)*. Londra: Ellison SLR, Rosslein M, Williams A (Ed.); 2000.
8. ISO 5725:2004. *Accuracy, trueness and precision of measurement methods and results*. Ginevra, Svizzera: International Standard Organization; 2004.
9. SINAL DT-0002. *Guida per la valutazione e la espressione dell'incertezza nelle misurazioni*. Documento tecnico, 2000, pag. 1-16. Disponibile all'indirizzo: http://www.sinal.it/docs/DT0002_2rev1.pdf; ultima consultazione 10/7/2006.
10. SINAL DT-0002/3. *Avvertenze per la valutazione dell'incertezza nel campo dell'analisi chimica*. Documento tecnico, 2000, pag. 1-5. Disponibile all'indirizzo: http://www.sinal.it/docs/DT0002_3rev0.PDF; ultima consultazione 10/7/2006.
11. SINAL DT-0002/4. *Esempi applicativi di valutazione dell'incertezza nelle misurazioni chimiche*. Documento tecnico, 2000, pag. 1-10. Disponibile all'indirizzo: http://www.sinal.it/docs/DT0002_4rev0.PDF; ultima consultazione 10/7/2006.
12. UNI CEI ENV 13005:2000. *Guida all'espressione dell'incertezza di misura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.

QUANTIFICAZIONE NEI TESSUTI E NEI FLUIDI BIOLOGICI: CAMPIONAMENTO, PRETRATTAMENTO E ANALISI

Nicola Violante, Stefano Caimi, Marco Di Gregorio

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Introduzione

Le attività di campionamento, pretrattamento e analisi di campioni biologici devono essere predisposte, organizzate e condotte conformemente ad una serie di misure atte a rendere valide e credibili le informazioni sperimentali ottenute e che la comunità scientifica è andata sviluppando e affinando nel corso degli anni (1). Tutto ciò si estrinseca in protocolli di procedure che dovrebbero essere incorporate nel lavoro quotidiano, evitando inutili dispendi di tempo, energie e risorse. Il conseguimento di risultati comparabili tra laboratori e 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 iniziale, considerare le possibili cause di errore lungo tutta la catena e sviluppare procedure idonee e specifiche per le informazioni che si vogliono ottenere. In questa relazione ci occuperemo di procedure complete che riguardano il campionamento, la conservazione, il trattamento e l'analisi di fluidi e tessuti biologici.

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 sostanza-come 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.

Le fasi di una procedura completa sono le seguenti:

- pianificazione del campionamento;
- campionamento;
- trasporto e conservazione;
- trattamento;
- analisi;
- valutazione dei risultati.

Criteri da seguire nelle operazioni di campionamento

La procedura di campionamento è di fondamentale importanza per i risultati finali: è evidente, infatti, che la singola analisi, per quanto la si esegua 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, giocano un ruolo fondamentale l'*ambiente* in cui si effettua il prelievo, l'*operatore-prelevatore* e gli *utensili* utilizzati per il campionamento.

È sicuramente molto elevato il rischio di contaminazione da parte dell'**ambiente** in cui si svolge il campionamento a causa della possibile presenza di polvere, sporcizia, vernici, disinfettanti, e/o suppellettili e oggetti in esso contenuti. 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 non direttamente in contatto con l'atmosfera esterna, non polverosi, dotati di rivestimenti plastici e accuratamente puliti. Differente è il caso dei campionamenti di tessuti, sia autoptici che biotici i quali, essendo realizzati in sale operatorie costruite con caratteristiche simili a quelle per i laboratori puliti, offrono in genere maggiori garanzie.

La **persona addetta al campionamento** può essere considerata "inquinante". Capelli, cute e indumenti 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, sia a difesa dell'operatore, sia per limitare l'influenza dell'operatore stesso sul campione (2, 3). Ad esempio, basti ricordare che i livelli di concentrazione di Cr e Ni nel sudore (del prelevatore ma anche del soggetto in esame) sono, rispettivamente, 10 e 20 volte superiori a quelli 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. Una normale forbice di acciaio se utilizzata per campionare capelli o unghie può cedere Cr, Mn, Ni e V (4). La contaminazione è particolarmente alta nel caso di biopsie con ago, soprattutto nella prima serie di prelievi, a causa anche del basso rapporto volume del campione/superficie interna dell'ago. Se rapportata con le concentrazioni attese nell'organo, la contaminazione diventa ovviamente più o meno importante ed è quantificabile a livelli del 5-10% per il Fe, del 25-40% per Mn, Cu e Zn o anche maggiore del 100% per Co, Cr e Ni. Nel caso, invece, di biopsie epatiche di pazienti affetti da patologie che prevedono un livello epatico di Cu enormemente elevato (come il Morbo di Wilson) l'eventuale contaminazione dovuta all'ago del prelievo può diventare trascurabile. Utensili (forbici, bisturi, aghi, ecc.) costruiti o ricoperti con particolari materiali, quali nitrato di titanio o carburo di tungsteno, possono essere convenientemente utilizzati in questi casi.

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 la determinazione degli elementi con cui l'ago è costruito-essi hanno però lo svantaggio di essere estremamente costosi. Gli aghi in acciaio inox comunemente utilizzati, così come le lancette per i prelievi capillari nello 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 in acciaio può risultare di uno o due ordini di grandezza superiore alle concentrazioni attese nel sangue di questo elemento, che rientrano normalmente nell'intervallo tra 0,1 e 0,5 mg L⁻¹. I livelli di rilascio nel sangue di Co, Cr, Mn e Ni da parte di normali aghi in acciaio-anche dopo 4 prelievi, ciascuno di 20 mL di sangue-sono ancora consistenti soprattutto per Cr e Ni (4). Tali inconvenienti sono riscontrati anche per gli aghi in 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 in plastica del tipo a perdere, il cui impiego può rappresentare un'ulteriore aggiunta al campione di analiti quali Al e Zn o 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. Una 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.

Per limitare la contaminazione al momento del prelievo è opportuno 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 impurità presenti (3, 6). 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 dove avverrà il trattamento. È consigliabile, inoltre, utilizzare il siero piuttosto che il plasma, se non espressamente richiesto dal significato fisio-tossicologico dello studio (7-9). Per la separazione del siero normalmente si procede lasciando formare il coagulo (circa 1 ora) a temperatura ambiente e si centrifuga a 800 g min⁻¹ per circa 20 minuti. 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.

Grandezza, tipo e omogeneità del campione solido

In caso di organi (polmoni, reni, fegato, ecc.) o parti di essi, si deve tener conto delle differenti concentrazioni degli analiti nelle diverse zone dell'organo stesso e quindi prelevare porzioni di massa inferiori a 0,5 g, secondo una mappatura statisticamente significativa. Nelle biopsie, avendo una massa di alcuni mg non c'è alcun problema.

Conservazione

La conservazione è l'insieme delle procedure e delle tecniche atte a garantire la stabilità del campione contribuendo così fortemente 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 e analisi; 2) lontananza del luogo di prelievo dal laboratorio di trattamento e 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 anche 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);
- intervallo di tempo 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). 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 (pH 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, 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 quarzo e soprattutto in PTFE, resina con elevatissima inerzia chimica agli acidi e ai solventi e con eccezionali caratteristiche autolubrificanti e antiurto, sono senza dubbio le migliori soluzioni per la conservazione di campioni destinati all'analisi degli elementi. Hanno però lo svantaggio di essere costosi e di poter essere riutilizzati solo previa accurata decontaminazione (10). In conclusione, è preferibile impiegare contenitori in PTFE, quarzo, PS e PP per conservazioni a lungo termine (anche fino a due mesi), mentre per periodi più brevi è possibile utilizzare PC o anche PVC, stante la minore resistenza chimica che questi ultimi materiali presentano (11). Scelto il tipo di 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 0,03 M in acqua deionizzata ad alta purezza) o, meglio, materiali di riferimento certificati dopo essere stati conservati nel contenitore per 5 giorni a +4 °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 stesse soluzioni analizzate ad

intervalli di tempo prestabiliti (ad esempio, dopo 0, 1, 4, 8, 16, 32 giorni, ecc.) allo scopo di evidenziare l'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 (HNO₃, HCl, H₂SO₄, HClO₄) 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 HNO₃. Sono riportati anche altri metodi più aggressivi che impiegano soluzioni acide in HNO₃ 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. L'abbassamento della temperatura del campione riduce proporzionalmente la velocità di tali trasformazioni. All'interno dell'intervallo di temperatura tecnicamente utilizzabile (da + 4 °C a -190 °C), le temperature usualmente impiegate sono:

- +4 °C, equivalente alla temperatura di frigorifero, per periodi più brevi di una settimana. Si conservano in queste condizioni *sangue, siero, plasma, liquor e tessuti*;
- l'intervallo tra -5 e -25 °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. Si conserva alle temperature più basse l'*urina*.

La Tabella 1 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 conservare un campione di siero prima di effettuare l'analisi con un adeguato margine di accuratezza.

Tabella 1. Possibili modalità di raccolta e conservazione del siero per l'analisi di elementi in traccia

Elemento	Materiale della siringa / dell'ago di prelievo	Materiale della provetta di raccolta	Temperatura di conservazione (°C)	Tempo massimo di conservazione (giorni)
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	Policarbonato, PS	- 20	60
Ni	catetere endovenoso	PS	- 20	30
Pb	catetere endovenoso	Quarzo, PS	+5	10
V	catetere endovenoso	Quarzo, PS	- 20	45

(Modificata da C. Minoia, 1995) (7)

Nel caso del pretrattamento di campioni di urina, questa deve essere prima possibile congelata a -20 °C, previa acidificazione a pH < 2 con HNO₃ (Tabella 2). Infatti, ad una temperatura di refrigerazione (4 °C) 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 e 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.

Tabella 2. 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

NI: non indispensabile (Modificata da C. Minoia, 1995) (7)

Quando si utilizza la bassa temperatura come metodo di conservazione occorre seguire alcune regole:

- non riempire completamente il contenitore per evitare perdite durante il congelamento per effetto dell'aumento di volume della soluzione campione;
- lasciar scongelare a temperatura ambiente;
- agitare energicamente prima di effettuare il prelievo analitico, per eliminare il gradiente di concentrazione formatosi durante il congelamento.

Nel caso vi sia la necessità di trasportare i campioni dal luogo di prelievo a quello di trattamento e analisi, è consigliabile utilizzare:

- per tragitti brevi: borsa termica o frigorifero portatile,
- per tragitti lunghi: contenitori con ghiaccio secco.

Trattamento

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

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

Se i campioni sono stati conservati a basse temperature la prima cosa da fare è scongelarli. Questa operazione consiste semplicemente nel lasciare scongelare a temperatura ambiente.

Durante le operazioni di trattamento valgono le medesime considerazioni fatte precedentemente concernenti *l'idoneità dell'ambiente, l'operatore e 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 consiste nel dotarsi di laboratori di Classe 100 che garantiscono 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.

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. Si deve 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 e 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 pre-trattamento dei campioni è opportuno effettuare soltanto quelle manipolazioni che si ritengono effettivamente indispensabili. La semplice diluizione di fluidi come siero od urina può essere 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, 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 abbondante 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 H₂O₂ e HNO₃. Anche per il *siero* ci si può limitare ad una semplice diluizione con una soluzione acidula per HNO₃ (0,14 M). Il *sangue*, invece, richiede in genere una vera digestione, ricorrendo per esempio ad un trattamento in forno a microonde. L'aggiunta di H₂O₂ deve essere evitata per l'analisi di quegli elementi per i quali questo reagente può apportare un contributo di contaminazione non trascurabile.

Per campioni solidi la mineralizzazione viene effettuata in contenitori di Teflon[®], chiusi ermeticamente, posti in forno MW e sottoposti ad un appropriato programma. Questa operazione è preceduta dalla determinazione del peso secco. Il procedimento consiste in:

1. pesare inizialmente il campione umido in un contenitore che non ceda elementi (es. quarzo), quindi porre il contenitore in una stufa per il tempo stabilito e alla temperatura stabilita (es. 2 ore a 105 °C);
2. effettuare la pesata.

È opportuno utilizzare per la pesata contenitori il cui peso non ecceda 1000 volte il peso del campione. Questo criterio può essere trascurato nel caso delle biopsie a causa dell'incertezza dovuta alla massa ridotta delle stesse.

Per campioni di biopsie del peso di alcuni mg è sufficiente una digestione nitrica in capsule o boccette di quarzo con leggero riscaldamento sotto cappa.

L'H₂O utilizzata per le diluizioni o per la preparazione di soluzioni standard deve essere il più possibile esente da contaminanti. Può essere acquistata o prodotta in laboratorio tramite piccoli impianti di deionizzazione o bidistillazione.

Sarebbe opportuno, avendone la possibilità, di lasciar predigerire il materiale nei contenitori assieme ai reagenti per qualche ora. Si eviterà così l'eventuale produzione di un'eccessiva quantità di gas durante la mineralizzazione. Questo gas creando molta pressione potrebbe uscire in modo violento dalle valvole di sfiato dei contenitori trascinando fuori del materiale che andrebbe perso. Nella Tabella 3 sono messi a confronto i trattamenti di mineralizzazione a microonde per sangue e altri tessuti.

Tabella 3. 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 ₂ O 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
Organi, tessuti (circa 200-300 mg)	HNO ₃ (2 mL) ^c , quindi HNO ₃ (1 mL) e H ₂ O 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

Dopo il trattamento il campione va opportunamente diluito. La diluizione deve tener conto della concentrazione degli analiti da determinare e fa effettuata con H₂O il più possibile esente da contaminanti. Può essere acquistata o prodotta in laboratorio tramite piccoli impianti di deionizzazione o bidistillazione.

Questa infatti influenzerà la scelta sia della tecnica analitica da utilizzare per l'analisi sia del tipo di curva di calibrazione.

Analisi

Per verificare l'attendibilità dell'analisi e del trattamento sarebbe opportuno, avendone la possibilità, inserire in un ciclo completo di mineralizzazione di campioni di tessuto o di organi anche un campione di materiale di riferimento (RM). Questo dovrebbe essere costituito da una matrice uguale o simile ai campioni e deve essere certificato per gli elementi da determinare.

Inoltre, ogni volta che si mineralizza, si deve sottoporre allo stesso procedimento anche un contenitore che contenga solo i reagenti usati per la digestione (acidi, acqua ossigenata, ecc.). Si ottiene in tal modo un bianco di procedura che rappresenta l'eventuale contaminazione in analiti da parte dei reagenti e dei contenitori durante la digestione. Ovviamente i risultati di tale bianco dovranno essere sottratti a quelli dei campioni.

La prima cosa da pianificare è la scelta della tecnica analitica che è funzione della specie da analizzare, della concentrazione degli elementi da determinare e del tipo di strumentazione a disposizione.

Per la determinazione sia qualitativa che quantitativa degli elementi le tecniche analitiche maggiormente utilizzate sono:

- *spettrofotometria di assorbimento atomico*:
 - Spettrofotometria di Assorbimento Atomico in Fiamma: F-AAS-Limite di rivelabilità alto (a livello di mg L^{-1}), consumo di soluzione elevato;
 - Spettrofotometria di Assorbimento Atomico con Fornetto di Grafite: ETA-AAS-Limite di rivelabilità molto basso (a livello di $\mu\text{g L}^{-1}$), consumo di soluzione dell'ordine dei μL ;
- *spettrometria di emissione atomica*:
 - Spettrometria di emissione atomica a plasma accoppiato induttivamente: ICP-AES;
- *spettrometria di plasma-massa*:
 - Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente con quadrupolo: Q-ICP-MS;
 - Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente con settore magnetico (alta risoluzione): SF-ICP-MS o HR-ICP-MS;
 - Spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente con cella dinamica di reazione: DRC-ICP-MS.

Queste ultime, inclusa ICP-AES, sono tecniche multielementari, cioè adatte all'analisi contemporanea di più elementi, sono caratterizzate da limiti di rivelabilità molto bassi e rapidità di analisi.

Con lo sviluppo negli ultimi anni delle tecniche ad alta risoluzione e a cella dinamica di reazione, si dispone di strumenti più raffinati per ovviare agli inconvenienti tipici della spettrometria di massa: le interferenze isobariche e poliatomiche.

Con quest'ultima tecnica, è possibile ridurre notevolmente o addirittura abbattere le interferenze per diversi elementi tramite reazioni con opportuni gas quali CH_4 , NH_3 ed O_2 (principalmente di trasferimento di carica, di protoni o di atomi di idrogeno delle specie interferenti).

La Tabella 4 riassume gli aspetti positivi e negativi delle tecniche descritte.

Le analisi strumentali vengono condotte per mezzo di curve di calibrazione che generalmente sono di due tipi:

- *calibrazione esterna*: costruita tramite punti di concentrazioni tali che le concentrazioni degli analiti cada nell'intervallo della curva;
- *metodo delle aggiunte standard*: dove 2 o più quantità crescenti note degli analiti vengono addizionate alla soluzione da analizzare (base) in modo da estrapolare la concentrazione incognita.

Tabella 4. Confronto tra le tecniche analitiche

Tecniche	Vantaggi	Svantaggi
ICP-AES	Tecnica multielementare. Intervallo di linearità ampio. Costi contenuti.	Interferenze di tipo spettrale. Limiti di rivelabilità variabili tra $\mu\text{g L}^{-1}$ e mg L^{-1} .
Q-ICP-MS	Tecnica multielementare. Limiti di rivelabilità variabili da frazioni di $\mu\text{g L}^{-1}$ e frazioni di mg L^{-1} . Intervallo di linearità ampio. Costi non troppo elevati.	Interferenze di tipo isotopico e isobarico dovute alla formazione di specie poliatomiche cariche. Possibilità di impiego di equazioni di correzione in certi casi.
HR(SF)-ICP-MS	Tecnica multielementare. Limiti di rivelabilità variabili tra ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. Intervallo di linearità ampio.	Interferenze di tipo isotopico e isobarico separabili in media e alta risoluzione. Costi elevati.
DRC-ICP-MS	Tecnica multielementare. Limiti di rivelabilità variabili tra ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$. Intervallo di linearità ampio.	Interferenze di tipo isotopico e isobarico che possono essere ridotte per la presenza di una camera di reazione prima del quadrupolo. Costi elevati.

La curva di calibrazione esterna viene utilizzata in presenza di soluzioni molto diluite dove la viscosità è bassa e l'influenza della matrice trascurabile. Il metodo delle aggiunte standard è impiegato per l'analisi delle soluzioni da analizzare dove la matrice complessa influenza sia la viscosità che la risposta strumentale.

Per compensare le variazioni strumentali è opportuno aggiungere sia alle soluzioni dei campioni da analizzare che a quelle degli standards della curva di calibrazione un piccola concentrazione di un elemento scelto al di fuori degli analiti che agisca da standard interno (SI). La concentrazione dello SI deve essere la stessa sia per le soluzioni da analizzare che per quelle della curva di calibrazione. La scelta di uno SI deve essere effettuata tenendo presente che per l'ICP-AES le righe analitiche dello SI non devono sovrapporsi a quelle degli analiti, mentre per l'ICP-MS lo SI deve essere preferibilmente monoisotopico e avere una massa il più possibile vicina a quella degli elementi da determinare. Nel caso che gli elementi da determinare abbiano masse molto diverse si possono utilizzare anche più SI contemporaneamente.

Per quanto riguarda il trattamento statistico dei risultati analitici, questi possono essere trattati e considerati a seconda della necessità. In certi casi è sufficiente considerare la media delle misure accompagnata dalla relativa deviazione standard che da l'incertezza della determinazione. In altri casi, in presenza di un numero di campioni abbastanza elevato, si può ricorrere a metodi di trattazione statistica più approfonditi che considerino anche parametri quali distribuzioni, correlazioni, stime del rischio, ecc.

Di seguito vengono descritte, come esempio applicativo, due esperienze analitiche reali su campioni biologici realizzate mediante ICP-AES e ICP-MS.

Esempio 1 - Determinazione del Fe in biopsie epatiche per la diagnosi dell'emocromatosi

- Una boccetta di quarzo preventivamente decontaminata con HNO₃ diluito viene sciacquata, asciugata e pesata.
- Dopo eventuale scongelamento il campione di biopsia viene trasferito nella boccetta e pesato.
- Si pone in stufa per 2 ore a 105 °C e dopo raffreddamento in essiccatore per ca. 30 min viene pesato di nuovo per la determinazione del peso secco.
- Si aggiunge 1 mL di HNO₃ suprapur concentrato. E si lascia digerire a temperatura ambiente per una notte.
- Si scalda poi a ca. 60 °C su piastra riscaldante e si porta a volume di 10 mL con acqua deionizzata aggiungendo 50 µL di uno standard di Y a 100 µg L⁻¹ come standard interno.
- Contemporaneamente si sottopone alla stessa procedura (escluse le pesate) una boccetta vuota per avere una soluzione di controllo della procedura (bianco).
- Si preparano le soluzioni con le concentrazioni note per la curva di calibrazione a concentrazione crescente di Fe (0-0,5-1,0-5,0 µL⁻¹) utilizzando uno standard a 1000 µL⁻¹ dell'elemento e aggiungendo lo standard di Y.
- Si avvia l'analisi mediante ICP-AES per la determinazione del Fe (le condizioni operative sono riportate nella Tabella 5).

Tabella 5. Caratteristiche e condizioni operative dello Spettrometro OPTIMA 3100 XL

Caratteristiche	Condizioni operative
Generatore RF	Frequenza 40 MHz
Potenza di uscita	1,4 kW
Nebulizzatore	Cross-flow con camera di condensazione Ryton Scott
Flusso di argon (L min ⁻¹)	Plasma, 17; flusso ausiliario, 0,7; aerosol, 0,8
Sistema ottico	Policromatore a reticolo piano tipo <i>échelle</i> (densità di righe 79 linee/mm); rivelatore allo stato solido tipo SCD; intervallo di lunghezza d'onda 165-403 nm
Linee spettrali (nm)	Fe: 238,2; 239,6; 259,9 Y:371,0 (standard interno)

Esempio 2 - Determinazione di As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Se e Zn in un campione di muscolo

La digestione acida è stata realizzata pesando circa 0,3 g del muscolo in contenitori pressurizzati in Teflon[®] addizionati con una miscela 4:1 di HNO₃ concentrato Suprapur e H₂O₂ Suprapur e posti in forno a microonde. Il ciclo di mineralizzazione (Tabella 6) è stato ripetuto due volte allo scopo di ottenere soluzioni perfettamente limpide.

Tabella 6. Programma di mineralizzazione

Tempo (min)	Potenza (W)
10	600
6	0
10	300

Le analisi sono state effettuate mediante spettrometria di massa sia quadrupolare che ad alta risoluzione (Tabella 7).

Tabella 7. Condizioni strumentali

Caratteristiche	Condizioni strumentali
Strumentazione Q-ICP-MS	
Spettrometro	Elan 5000 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)
Nebulizzatore	U-5000 AT ⁺ ad ultrasuoni (CETAC Technologies Inc., Omaha, NB, USA)
Interfaccia	Coni in Ni
Generatore RF	1,0 kW
Flusso di Argon (L min ⁻¹)	Plasma, 15; ausiliario, 0,9; aerosol, 0,9
Masse analitiche (amu)	⁷⁵ As, ⁶⁵ Cu, ⁶⁰ Ni, ²⁰⁴⁺²⁰⁶⁺²⁰⁷⁺²⁰⁸ Pb, ⁶⁶ Zn
Masse di riferimento (amu)	²⁴ Mg, ¹⁰³ Rh, ²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb
Condizioni di scansione	Tempo di replica, 200 ms; tempo di permanenza, 100 ms; passaggi per lettura, 4; letture per replicato, 4; numero di replicati, 3
Standard interno	¹⁰³ Rh
Strumentazione SF(HR)-ICP-MS	
Spettrometro	ELEMENT (Finnigan MAT, Brema, Germania)
Geometria	Doppia focalizzazione inversa Nier-Johnson
Risoluzione	m / Δm = 300, 3000, 7500
Generatore RF	1,2 kW
Nebulizzatore	U-5000 AT ⁺ ad ultrasuoni (CETAC Technologies Inc., Omaha, NB, USA)
Interfaccia	Coni in Pt
Acquisizione dati	Scansione di campo elettrico, 3 letture, 10 passaggi (m / Δm = 300, 3000)
Flussi di argon (L min ⁻¹)	Plasma, 13; ausiliario, 1,0; aerosol, 1,0
Masse analitiche (amu)	¹¹⁴ Cd, ²⁰⁸ Pb (bassa risoluzione);
Masse analitiche (amu)	⁷⁵ As, ⁵² Cr, ⁶⁵ Cu, ⁵⁶ Fe, ⁶⁰ Ni, ⁸² Se, ⁶⁶ Zn (media risoluzione)
Standard interno	¹¹⁵ In

Conclusioni

Da quanto sopra esposto emerge che per assicurare la qualità dei risultati delle determinazioni è indispensabile definire, per ogni metodo analitico, un preciso e accurato protocollo che contempra ogni aspetto di tutta la catena analitica: prelievo, conservazione, pre-trattamento e analisi 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 per 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.

In conclusione, l'intera procedura per la quantificazione degli elementi nelle varie matrici biologiche è condotta in funzione della specie degli elementi da determinare, della concentrazione degli stessi nelle matrici, dello scopo della loro determinazione e, ovviamente, anche delle attrezzature disponibili.

Di tutte le operazioni sia di campionamento che di trattamento pre-analitico si deve tener conto nella valutazione del loro contributo nel calcolo dell'incertezza composta che accompagnerà poi il risultato analitico finale.

Bibliografia

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* 120;1992:39-62.
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. In: Caroli S, Morisi G, Santaroni G. (Ed). *Elementi in traccia: salute e ambiente. 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 nitrite 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. *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. In: Caroli S, Morisi G, Santaroni G. *Elementi in traccia: salute e ambiente. 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. pp. 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.

CAPELLI COME MATRICE PER IL CONTROLLO DELL'ESPOSIZIONE

Oreste Senofonte, Sonia D'Ilio

Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di sanità, Roma

Introduzione

Uno dei compiti fondamentali di un laboratorio tossicologico è la produzione di un dato analitico che accerti, con ragionevole sicurezza, la presenza di sostanze nocive, la loro identificazione e quantità in un campione biologico. I risultati analitici non hanno solo ricaduta nelle diagnosi e nelle eventuali terapie da intraprendere ma anche in altri settori:

- controllo nei luoghi di lavoro;
- accertamento di doping in ambito sportivo;
- uso e abuso di farmaci e droghe;
- intossicazioni da contaminanti ambientali;
- medicina legale, ecc.

Nel passato, le indagini tossicologiche erano condotte da pochi laboratori specialistici, soprattutto in casi *post mortem*, per accertamenti di sospetti avvelenamenti o per incidenti sul lavoro. Pertanto le sostanze ricercate nei materiali biologici, erano relativamente poche e i loro livelli di concentrazione dovevano essere necessariamente elevati per le tecniche analitiche allora disponibili.

Oggi, la richiesta di risposte analitiche in ambito tossicologico è enormemente aumentata. Le determinazioni analitiche di sostanze, a livello di traccia e ultra-traccia su campioni biologici prelevati da esseri viventi, se da un lato sono enormemente aumentate, dall'altro necessitano sempre più di affidabilità del dato sia in termini di accuratezza che di precisione con il conseguente sviluppo di procedure e tecniche strumentali.

Generalmente sangue, siero e urina sono considerati materiali di elezione nelle indagini clinico-tossicologiche ed epidemiologiche pur se da diversi anni l'attenzione si è spostata sulla possibilità di analisi di matrici biologiche cosiddette non convenzionali, come: saliva, sudore, capelli, peli pubici, peli ascellari e unghie. Tra queste, i capelli è stata la matrice biologica su cui si è focalizzato l'interesse della ricerca internazionale.

Analisi dei capelli

Il motivo che ha portato ad utilizzare matrici non convenzionali nelle analisi tossicologiche risiede, oltre alla non invasività del prelievo, soprattutto nella possibilità di incrementare la finestra di tempo in cui la sostanza indagata è rilevabile in tale matrice. Infatti, se questa finestra di tempo è solo di alcune ore nel caso del sangue, diventa di alcuni giorni nel caso dell'urina e di mesi nel caso dei capelli. Nella Figura 1 è riportato uno schema dell'apparato pilo-sebaceo.

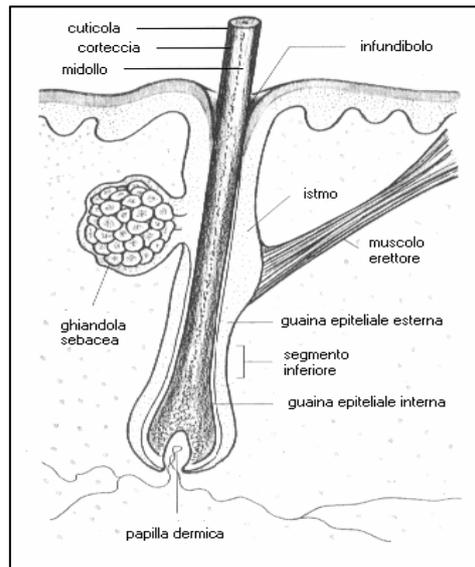


Figura 1. Apparato pilo-sebaceo

La deposizione di xenobiotici (sostanze organiche, metalli, ecc.) in questo tessuto può avvenire sia attraverso meccanismi endogeni che esogeni. La deposizione esogena è determinata in particolar modo dalle ghiandole sudoripare e dal contatto diretto di contaminanti ambientali con la superficie esterna del capello. Quella endogena, invece, è dovuta al circolo ematico e alle ghiandole sebacee.

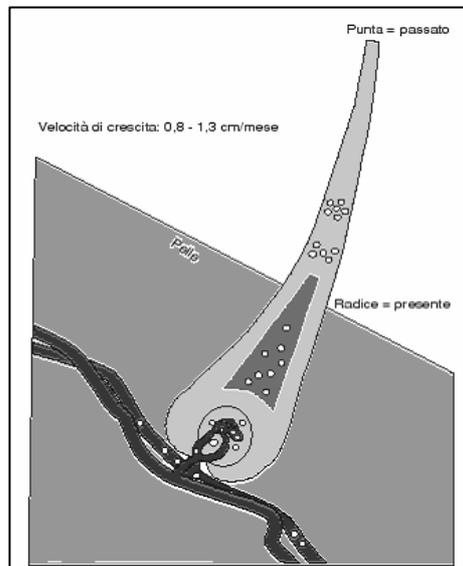


Figura 2. Elementi inorganici sequestrati dalla cheratina

Le varie sostanze trasportate dal flusso sanguigno all'interno della matrice del capello attraverso la papilla con un meccanismo che non è stato ancora ben chiarito. In particolare, gli elementi inorganici come i metalli, vengono sequestrati dai gruppi Sulfidrilici della cheratina. Questa unione avviene in modo continuo durante la crescita del capello. Eventuali variazioni del loro contenuto nei fluidi vengono così regolarmente registrate nel verso della lunghezza.

Lo studio di questi fenomeni può fornire informazioni sia sotto il profilo diagnostico e tossicologico che nella valutazione di stati nutrizionali e/o patologici.

I capelli riflettono meglio dei fluidi biologici l'accumulo corporeo totale degli elementi, infatti la concentrazione di questi risulta più elevata, anche di un ordine di grandezza, rispetto a quella riscontrabile nel sangue, siero e urina. Per contro i capelli, oltre ad essere notevolmente sensibili alla contaminazione esogena (polveri, detergenti, trattamenti cosmetici, ecc.), si caratterizzano dalla notevole variabilità biologica (sesso, età, colore dei capelli, origine etnica, abitudini alimentari) che non permettono un'agevole individuazione dei valori "normali di riferimento".

Emerge, quindi con chiarezza che l'adozione di principi e norme specifiche 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 e alimentari).

Tra gli obiettivi principali di un sistema di assicurazione di qualità che garantisca la conservazione e l'affidabilità dell'informazione od il contenimento degli errori sistematici lungo tutta la catena analitica (campionamento, conservazione, trattamento e tecnica analitica).

L'influenza degli errori di campionamento può essere di fondamentale importanza per i risultati finali di uno studio, infatti, l'obiettivo primario di un valido campionamento è quello della raccolta di campioni rappresentativi, in dimensioni contenute, della matrice da analizzare essendo consapevoli che la qualità della singola analisi non può essere migliore della qualità del singolo prelievo.

La conservazione del campione è, a sua volta, una fase molto delicata della procedura analitica e deve essere appropriata dal momento della campionatura al momento dell'analisi. Il mantenimento dell'integrità dell'informazione deve essere assicurato, ovvero il contatto tra il campione e il materiale del suo contenitore non deve provocare il rilascio di elementi dalla superficie né tanto meno l'adsorbimento sulle pareti di analiti provenienti dal campione stesso.

Per le loro caratteristiche, i capelli, possono essere campionati e conservati facilmente. Il prelievo viene effettuato in prossimità della cute, nella zona occipitale, utilizzando delle forbici di acciaio ricoperte di carburo di tungsteno o titanio. Il campione, così prelevato, è conservato a temperatura ambiente, in essiccatore all'interno di bustine di polietilene sino al momento dell'analisi.

Ulteriori fonti di contaminazioni possono scaturire sia dalla manipolazione del campione che dal trattamento chimico. La presenza di elementi inorganici di origine esogena può essere una importante fonte di errore. Per la rimozione delle particelle esogene è necessario eseguire opportuni lavaggi attraverso l'utilizzo, di miscele di solventi (etere, acetone) per rimuovere la parte sebacea e di trattamenti con complessanti, come l'EDTA, per eliminare gli elementi presenti sulla superficie. I campioni una volta essiccati, per essere analizzati devono subire mineralizzazione acida in modo tale che si ottenga una soluzione limpida e omogenea.

La disgregazione della matrice cheratinica del capello è necessaria una digestione acida con acidi forti. La procedura di mineralizzazione che risulta più efficace, tra i metodi generalmente in uso, è quella che utilizza contenitori in Teflon[®] chiusi in cui vengono messi a digerire il campione di capelli, acido nitrico (HNO₃) e acqua ossigenata (H₂O₂).

I contenitori così riempiti vengono sottoposti in seguito ad un campo di microonde generato da un forno a microonde. Alla fine del trattamento la soluzione viene trasferita in tubi di polipropilene e diluita con acqua demineralizzata.

Alla luce delle concentrazioni riscontrabili, a livello di traccia ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e ultratraccia ($\mu\text{g L}^{-1}$), l'identificazione e la quantificazione di elementi inorganici in matrici ambientali, biologiche e alimentari è un compito assai impegnativo ed è quindi necessario disporre di strumentazioni analitiche idonee. In generale, le tecniche analitiche devono possedere due requisiti fondamentali: un adeguato potere di rivelabilità e un utilizzo su base corrente dalla maggior parte dei laboratori.

Attualmente, le tecniche che posseggono i requisiti necessari per tali determinazioni sono: la spettrometria di emissione atomica a plasma induttivo (ICP-AES, *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*) la spettrometria a plasma induttivo-massa (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) la spettrometria di assorbimento atomico in fiamma (FAAS, *Flame Atomic Absorption Spectroscopy*), la spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA AAS, *Electro-Thermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry*) 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 e 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.

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 3 riporta in modo schematico una sorgente a plasma induttivo.

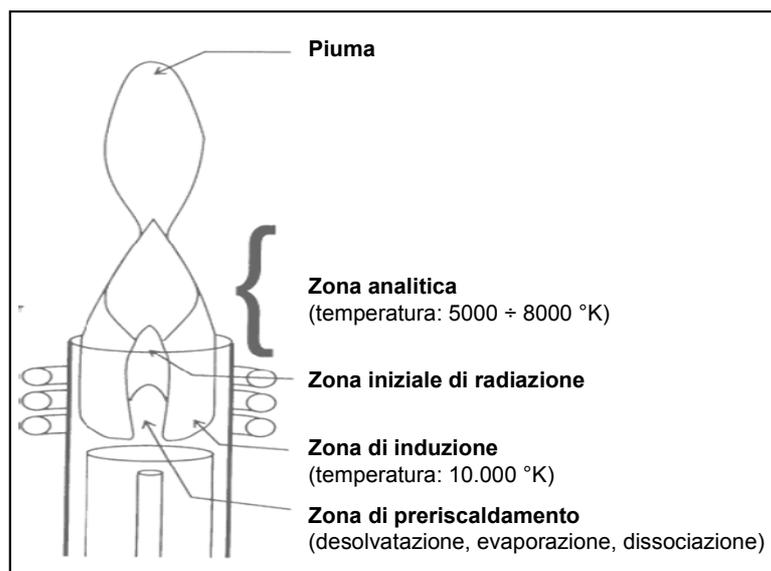


Figura 3. Sorgente di emissione a plasma induttivo

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. 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 flessibilità e le potenzialità della spettrometria ad ICP sono tali che può essere accoppiata con altre tecniche strumentali come la cromatografia liquida (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) o l'analisi ad iniezione di flusso (*Flow Injection Analysis*, FIA) e plasma (FIA-ICP-AES) 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 (Cr_{+3}/Cr_{+6}) o di determinazioni analitiche su matrici solide.

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. In questo caso la torcia ICP funge da sorgente di ioni a pressione atmosferica, che poi vengono introdotti attraverso opportuni orifizi in un 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.

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 1 sono riportati i LOD di alcune tecniche spettroscopiche e della voltammetria di ridissoluzione anodica.

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

Elemento	ICP- AES	ICP- MS	FAAS	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 e l'ICP-MS, a differenza di FAAS, ETA-AAS e ASV, sono delle tecniche multielementare e sono, inoltre, applicabili in un ampio intervallo dinamico di concentrazione per le più svariate matrici ambientali o biologiche.

Di seguito viene descritta un'applicazione delle tecniche spettroscopiche a plasma induttivo su campioni biologici reali, come i capelli, nella valutazione dell'esposizione di elementi potenzialmente tossici.

Capelli come matrice per il controllo dell'esposizione a metalli tossici

Nell'ambito del Programma di Ricerche PROArt "a sostegno della produzione e del commercio dell'Artigianato Orafo", è stata condotta un'indagine volta all'accertamento

dell'eventuale esposizione ad elementi potenzialmente tossici degli artigiani del settore orafa italiano tramite l'analisi dei capelli.

Il Programma PROArt coordinato e promosso dal Consiglio Nazionale delle Ricerche in cooperazione con il Ministero dell'Industria, del Commercio e dell'Artigianato (MICA) e concordato con le maggiori associazioni nazionali di categoria come la Confartigianato e CNA, nasce dall'esigenza di tutelare la posizione della produzione orafa italiana, sia sul mercato nazionale che internazionale, insidiata dall'avvento di nuovi competitori che si avvalgono di manodopera dai costi spesso molto contenuti con una capacità di migliorare, in tempi anche brevi, la qualità del prodotto disponendo di materie prime nazionali a prezzi vantaggiosi. Si è resa necessaria, quindi, un'azione di ricerca e sperimentazione sui temi del saggio di metalli preziosi, della sicurezza nelle aziende, dell'impatto ambientale degli effluenti (solidi, liquidi e gassosi) e soprattutto dell'innovazione nei processi produttivi e dei prodotti. Il progetto esecutivo del programma prevedeva tre linee di intervento:

- *Linea 1.* Saggio dei metalli preziosi e delle loro leghe. Controllo di qualità;
- *Linea 2.* Sicurezza del lavoro e tutela dell'ambiente;
- *Linea 3.* Sperimentazione e innovazione tecnologica dei processi produttivi.

In questo contesto la presente ricerca si inserisce come parte della Linea 2. In particolare, è stata studiata l'attività svolta dai lavoratori, coinvolti nella produzione di gioielli di alcune piccole e medie imprese, facenti parte del polo orafa delle aree di Arezzo, Valenza (Alessandria), Vicenza e della zona urbana di Roma. Questi quattro siti di interesse sono caratterizzati da funzioni nel settore fortemente diversificate, la zona di Arezzo, infatti, produce in prevalenza oreficeria con una lavorazione di serie fortemente automatizzata, mentre, l'area di Valenza si occupa di gioielleria con pezzi unici o di piccolissima serie con impiego di lavoro manuale e artistico altamente qualificato, Vicenza, invece, è un polo a produzione mista, infine, nella zona urbana di Roma si produce essenzialmente oreficeria. Gli operatori del settore potrebbero essere significativamente esposti ai fumi e alle polveri di sostanze chimiche potenzialmente dannose per la salute, liberate e inalate durante il trattamento dei materiali preziosi nelle operazioni di cesello, fusione, laminatura, trafilatura, incisione, traforo, incassatura, lavorazione delle cere, saldatura, montaggio, lucidatura e smaltatura; il rischio associato a questi procedimenti non deve essere, quindi, sottovalutato.

In questo studio, l'analisi dei capelli si propone come un mezzo alternativo, anche se molto discusso, di controllo dell'esposizione del personale appartenente al settore dell'artigianato orafa, attraverso il confronto del contenuto di un certo numero di elementi nei campioni di quei soggetti che sono strettamente a contatto con i materiali preziosi e i livelli del personale addetto ad attività meramente organizzative e di amministrazione. Gli elementi analizzati sono stati scelti in base alla presenza nelle leghe di lavorazione e alla rilevanza in termini di tossicità, questi sono: Ag, Au, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, In, Ni, Pb, Pt e Zn.

Materiali e metodi

Per le aree di investigazione sono stati campionati in totale i capelli di 106 soggetti considerati esposti (E) in virtù delle loro mansioni e 33 soggetti di controllo (C) prelevati fra gli impiegati, i rappresentanti e i dirigenti. Il numero di individui esaminati per ogni singola area erano rispettivamente 19 E e 7 C per Arezzo, 39 E e 11 C per Valenza, 15 E e 4 C per Vicenza e infine 33 E e 11 C per Roma. Ad ognuno dei quali è stato chiesto di riempire un foglio informativo nel quale sono riportate le informazioni considerate utili alla comprensione

dei dati finali ottenuti, tra le quali la mansione specifica del lavoratore, il suo stato generale di salute, le abitudini alimentari come l'uso di alcool e caffè, l'eventuale uso di prodotti farmaceutici e della medicina non tradizionale, il fumo e il trattamento subito dai capelli, ossia il tipo di shampoo usato, la frequenza dei lavaggi e i cosmetici. I campioni di capelli sono stati prelevati, conservati e pretrattati prima dell'analisi secondo un protocollo standardizzato in uso nel nostro laboratorio.

Il campionamento dei capelli è stato effettuato prelevando una quantità di tessuto, compresa fra 0,1 e 0,3 g, dalla regione occipitale della testa a circa 1 cm dal cuoio capelluto utilizzando delle forbici chirurgiche speciali aventi le estremità ricoperte di carburo di tungsteno (WC), questa caratteristica le rende uno strumento essenziale per evitare il rilascio di elementi durante la fase del taglio.

Per minimizzare, inoltre, ogni rischio di contaminazione i campioni sono stati introdotti in bustine di polietilene, sigillati ed etichettati con il nome del soggetto, la data di prelievo e un numero identificativo progressivo, successivamente sono stati posti in essiccatore al buio per la conservazione fino al momento dell'analisi.

Il pretrattamento del campione è una fase cruciale che si rende indispensabile per garantire che il contenuto degli elementi quantificati rifletta esattamente quello endogeno e non esogeno dovuto solo alla normale contaminazione ambientale. Il lavaggio consiste nel porre il materiale biologico in *beakers* (precedentemente decontaminati con HNO₃ al 10% ad elevata purezza) sotto agitazione con una miscela di acetone/etere 1:3 per 10 minuti, questo viene ripetuto per tre volte scaricando e rinnovando ogni volta la miscela, il residuo di solvente organico viene eliminato seccando i capelli in stufa a 50°C per 15 minuti. Successivamente, ai campioni essiccati viene addizionata una soluzione di EDTA al 5%, sempre in agitazione continua, per 1 ora, alla quale seguono tre lavaggi della durata di 10 minuti l'uno con acqua deionizzata ultrapura, infine, i campioni privi di acqua sono posti in stufa a 85°C per la determinazione del peso secco.

Per disgregare la matrice cheratinosa del capello è stata scelta la procedura di mineralizzazione acida in forno a microonde (MW, Milestone mls 1200 Mega, FKV, questa è risultata la più efficace tra i metodi generalmente in uso. I campioni pesati sono poi trasferiti nei contenitori di Teflon[®] e addizionati preliminarmente con 2 mL di HNO₃ per la fase di predigestione (fino al giorno seguente), quest'ultima si rende necessaria per evitare reazioni violente con sviluppi di gas da parte della matrice durante la fase di digestione in forno a microonde. Per la mineralizzazione finale sono stati aggiunti 1 mL di HNO₃ suprapur al 65% (oppure 2 mL in relazione alla quantità di materiale pesato) e 1 mL di H₂O₂ suprapur al 40% seguendo il seguente programma di digestione: 3 min ad una potenza di 205 W; 6 min di raffreddamento; 5 min a 205 W; 5 min di raffreddamento; 5 min a 450 W; 5 min a 500 W; 10 min di raffreddamento. La soluzione limpida ottenuta, viene trasferita quantitativamente dai contenitori del forno in tubi Falcon da 50 mL con acqua demineralizzata ultrapura a 18,2 MΩ cm⁻¹ fino ad un volume di 20 mL e conservata in frigorifero a +2° C fino al momento dell'analisi.

Tutti i calibranti sono stati preparati, per appropriate diluizioni successive con acqua deionizzata ultrapura, a partire da soluzioni standard certificate a concentrazioni di 1000 µg mL⁻¹.

Le tecniche analitiche impiegate per la quantificazione degli elementi di interesse sono state scelte in base alla presenza nella matrice e alla specificità della tecnica medesima, in particolare, per l'analisi di livelli molto bassi di alcuni elementi come l'Ag, Au, Cd, Co, Cr, In, Ni, Pb e Pt (il Rh è stato usato come standard interno, SI) è richiesto l'ausilio di tecniche spettrometriche con sorgenti al plasma quali la Spettrometria di Massa al Plasma Accoppiato Induttivamente (Q-ICP-MS, Elan 5000, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) con un alto potere

di rivelabilità, mentre il Cu e lo Zn (Y come SI), che si trovano generalmente a valori di concentrazione più alti, sono stati determinati con la Spettrometria di Emissione Atomica al Plasma Accoppiato Induttivamente (ICP-AES, OPTIMA 3100 axial view, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), per il Hg sono state utilizzate due apparecchiature dedicate, il sistema ad idruri *Flow Injection Mercury System* (FIAS 400, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) e il sistema ad amalgama d'oro, Automatic Solid/Liquid Hg Analyzer (AMA 254, FKV).

Allo scopo di garantire la qualità del dato analitico prodotto e di controllare l'accuratezza dell'intera procedura analitica, si è fatto ricorso all'uso di materiali certificati di riferimento (MCR), in particolare, in ogni ciclo di mineralizzazione è stato inserito il materiale di riferimento BCR CRM 397 Human Hair, certificato per Cd, Hg, Pb, Se e Zn, i dati prodotti sono mostrati in Tabella 2.

Tabella 2. Risultati delle analisi del materiale di riferimento certificato (CRM BCR n. 397 Human hair)

Elemento	Valori trovati ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valori certificati ($\mu\text{g g}^{-1}$)
Cd	0,525 \pm 0,029	0,525 \pm 0,024
Hg	12,7 \pm 1,1	12,3 \pm 0,5
Pb	33,3 \pm 1,2	33,0 \pm 1,2
Zn	203 \pm 11	199 \pm 5

I risultati delle determinazioni analitiche sono stati trattati con una serie di test statistici per stabilire il tipo di distribuzione dei dati e l'attribuzione di un significato tossicologico. I possibili valori *outliers* sono stati individuati mediante l'approccio del Box and Wisker Plot, questo test considera i dati da eliminare come tutti quei punti che si trovano: fuori da tre volte l'intervallo interquartile, sotto il primo quartile oppure sopra il terzo quartile. Una volta identificati, gli *outliers* vengono eliminati dalle successive trattazioni statistiche. L'applicazione del test di Kolmogorov-Smirnov ha rivelato, come peraltro prevedibile, che la maggior parte degli elementi erano caratterizzati da distribuzioni numeriche non normali, conseguentemente, per l'elaborazione finale dei risultati è stato scelto di un test non parametrico per dati non appaiati come il Kruskal-Wallis test. Il test non parametrico applicato possiede una capacità discriminativa delle effettive differenze fra i gruppi di popolazione di dati (parametro p), nel nostro caso ci fornisce una panoramica dell'esistenza o meno di una esposizione significativa, agli elementi presi in considerazione, a cui sono sottoposti gli artigiani del settore orafa.

Risultati e discussione

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati delle determinazioni sperimentali ottenuti per tutte le zone del territorio italiano prese in considerazione in questo studio.

In particolare, per ogni area dei poli orafi e per ogni elemento sono state calcolate le medie geometriche delle concentrazioni, in quanto valutate più rappresentative delle medie aritmetiche per questo tipo di distribuzione di valori, e il corrispondente coefficiente di significatività del test di Kruskal-Wallis (P) per entrambe le classi di individui classificati come esposti e controlli.

Tabella 3. Valori di concentrazione degli elementi nei capelli

Elemento	Media geometrica ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Kruskal-Wallis test p*
	Soggetti esposti	Soggetti di controllo	
Arezzo			
Ag	3,26	1,34	0,060
Au	0,51	0,39	0,583
Cd	0,04	0,03	1,000
Co	0,03	0,04	0,703
Cr	0,41	0,17	0,794
Cu	12,5	10,9	0,112
Hg	0,49	0,82	0,260
In	0,001	0,001	0,816
Ni	0,56	1,17	0,185
Pb	0,92	0,87	0,817
Pt	0,01	0,01	0,724
Zn	167	142	0,260
Vicenza			
Ag	0,98	0,05	0,003
Au	2,16	0,29	0,003
Cd	0,06	0,10	1,000
Co	0,01	0,01	0,938
Cr	0,22	0,03	0,073
Cu	17,7	8,9	0,004
Hg	2,30	1,94	0,424
In	0,003	0,001	0,028
Ni	0,07	0,10	0,920
Pb	0,60	0,45	0,317
Pt	0,002	0,003	0,394
Zn	177	191	0,617
Valenza			
Ag	0,92	0,39	0,015
Au	2,05	1,28	0,228
Cd	0,03	0,02	0,297
Co	0,02	0,03	0,247
Cr	0,35	0,49	0,637
Cu	12,2	12,2	0,699
Hg	2,23	1,65	0,320
In	0,001	0,001	0,140
Ni	0,38	0,52	1,000
Pb	0,59	0,52	0,475
Pt	0,005	0,005	0,805
Zn	173	181	0,861
Roma			
Ag	2,24	1,17	0,189
Au	2,03	0,93	0,031
Co	0,03	0,03	0,904
Cr	0,26	0,34	0,293
Cu	16,8	11,1	0,227
Hg	2,06	2,33	0,323
Ni	0,42	0,26	0,195
Pb	1,26	0,49	0,106
Zn	187	193	0,456

* Livello di significatività statistica Tabella

Fra gli elementi presi in considerazione in questa ricerca solo per l'area di Roma non è stato possibile quantificare il cadmio, l'indio e il platino nei campioni prelevati, in quanto erano presenti in concentrazioni minori dei limiti di rivelabilità della tecnica utilizzata, ossia, nell'ordine $<0,100$, $<0,0005$, $<0,002 \mu\text{g L}^{-1}$. Dall'analisi dei livelli di significatività ottenuti (p), si evidenzia un chiaro accumulo di Ag per i soggetti esposti delle aree di Vicenza ($p<0,01$) e Valenza ($p<0,05$), questo risultato potrebbe essere attribuito alla tendenza di questo metallo a depositarsi in granuli microscopici attorno al follicolo del capello. I lavoratori orafi delle zone di Vicenza e Roma presentano un'esposizione all'elemento Au rispettivamente con $p<0,01$ e $p<0,05$, mentre esclusivamente per il polo di Vicenza esistono differenze significative fra gli individui esposti e i controlli, sia per il Cu con $p<0,01$ che per l'In con $p<0,05$. In particolare, il dati emersi nel caso dell'Indio potrebbero essere la diretta conseguenza dell'adozione di nuove procedure di lavorazione, raccomandate dalle autorità sanitarie locali, nelle quali il cadmio è stato sostituito dall'indio nelle leghe in uso nei laboratori artigiani. Infine, l'assenza di un'esposizione significativa a tutti gli elementi analizzati ($p>0,05$), unicamente per i soggetti appartenenti al polo orafo di Arezzo, sembrerebbe confermare che l'elevata automatizzazione presente nei reparti.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, giugno 2006 (n. 2) 5° Suppl.