

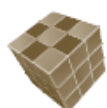


RAPPORTI ISTISAN 15|30

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Metodo di riferimento per la determinazione degli elementi chimici in matrici biologiche umane: prestazioni analitiche e incertezza del dato

A. Alimonti, B. Bocca, F. Ruggieri



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Metodo di riferimento per la determinazione
degli elementi chimici in matrici biologiche umane:
prestazioni analitiche e incertezza del dato**

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Flavia Ruggieri
Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
15/30

Istituto Superiore di Sanità

Metodo di riferimento per la determinazione degli elementi chimici in matrici biologiche umane: prestazioni analitiche e incertezza del dato.

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Flavia Ruggieri

2015, iii, 47 p. Rapporti ISTISAN 15/30

Il volume descrive un metodo per la determinazione degli elementi chimici in campioni biologici umani (siero, urina, sangue e fluidi simili) mediante spettrometria di massa con sorgente a plasma accoppiato induttivamente (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS). Il metodo sviluppato è stato validato internamente (*in-house*) stimando le caratteristiche prestazionali e l'incertezza estesa conformemente a quanto richiesto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, al fine di garantire qualità della procedura e tracciabilità del dato analitico. Il metodo è indispensabile per realizzare programmi di Biomonitoraggio Umano (BMU) per la determinazione degli elementi chimici, in un ambito di prevenzione e tutela della salute. In mancanza di procedure ufficiali, il metodo intende rappresentare un riferimento destinato ai laboratori del settore che eseguono attività di controllo e ricerca, in previsione di un approccio metodologico armonizzato a livello europeo.

Parole chiave: Validazione *in-house*; Incertezza di misura; ICP-MS; Metalli; Biomonitoraggio umano

Istituto Superiore di Sanità

Reference method for the determination of chemical elements in human biological matrices: analytical performances and uncertainty of data.

Alessandro Alimonti, Beatrice Bocca, Flavia Ruggieri

2015, iii, 47 p. Rapporti ISTISAN 15/30 (in Italian)

The volume describes a method for the determination of chemical elements in human biological samples (serum, urine, blood, and similar fluids) by *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry* (ICP-MS). The developed method was validated *in-house* by estimating the performances and the expanded uncertainty in accordance with regulation UNI CEI EN ISO/IEC 17025, in order to ensure quality of the procedure and traceability of the analytical data. The method is essential to realize Human Biomonitoring (HBM) programs for the determination of chemical elements, in a framework of health prevention and safety. In the absence of official procedures, the method aims to be a reference for laboratories involved in control and research activities, towards a harmonized methodological approach at European level.

Key words: In-house validation; Measurement uncertainty; ICP-MS; Metals; Human biomonitoring

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

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

Citare questo testo come segue:

Alimonti A, Bocca B, Ruggieri F. *Metodo di riferimento per la determinazione degli elementi chimici in matrici biologiche umane: prestazioni analitiche e incertezza del dato*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2015. (Rapporti ISTISAN 15/30).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro* e *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Premessa	iii
1. Scopo e applicazione	1
2. Principio del metodo	3
3. Definizioni	5
4. Interferenze in ICP-MS	11
5. Materiali e apparecchiature	15
6. Reagenti e soluzioni	16
7. Operazioni strumentali preliminari	18
8. Raccolta e conservazione dei campioni	20
9. Trattamento dei campioni	21
10. Validazione intra-laboratorio (<i>in-house</i>)	24
11. Stima dell'incertezza estesa	30
12. Programma di controllo della qualità	36
13. Determinazione analitica	41
14. Espressione dei risultati	44
15. Misure di sicurezza	45
Bibliografia e riferimenti normativi	46

PREMESSA

Le stime dell’impatto sulla salute dell’esposizione ambientale agli elementi chimici (quali arsenico, cadmio, cromo, manganese, nichel, piombo, tallio, ecc.) sono ancora insufficienti e presentano ampi margini di interpretazione. Parte dell’incertezza risiede nella difficoltà di classificare l’esposizione e la dose correlata al rischio individuale e/o collettivo. Una strategia valida è la determinazione del “carico corporeo” degli elementi ponendo quindi attenzione alla quantità dell’elemento effettivamente presente all’interno del corpo umano. Il carico corporeo di un elemento viene valutato attraverso il Biomonitoraggio Umano (BMU), che prevede un monitoraggio periodico dell’elemento in campioni di siero, urina, sangue, ecc. Il dato di BMU rappresenta l’esposizione complessiva all’elemento attraverso tutte le potenziali fonti (suolo, acqua, aria, cibo, materiali a contatto, prodotti di consumo) e può informare su stili di vita e abitudini del soggetto nonché sulla biodisponibilità, tossicocinetica e metabolismo dell’elemento stesso.

Il Reparto Bioelementi e Salute del Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria dell’Istituto Superiore di Sanità ha promosso, e tutt’ora sta promuovendo, programmi di BMU a livello nazionale (es. PROBE, SpoTT, ABC) ed europeo (HEALS, CROME-LIFE), dimostrando l’efficacia dei risultati in strategie di intervento su ambiente e salute, di sensibilizzazione dell’individuo e della collettività e a supporto dei *decision maker* a vari livelli.

Un programma di BMU necessita di un approccio armonizzato a livello internazionale tramite lo sviluppo di protocolli e strategie comuni, al fine di garantire dati affidabili e comparabili e un uso più efficace delle risorse. Ad oggi non esistono metodi ufficiali stabiliti in ambito di BMU degli elementi, pertanto è il singolo laboratorio coinvolto nel settore a sviluppare il proprio metodo. Spesso però le procedure operative intraprese nel programma di BMU e le modalità di espressione del dato di BMU non sono immediatamente visibili e trasferibili.

In questo ambito, il Reparto ha messo a punto e validato un metodo di prova interno per la determinazione degli elementi in siero, urina e sangue dando altresì evidenza della conformità ai requisiti prestazionali e di qualità (interna ed esterna) riportati dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura” garantendo imparzialità e integrità della procedura e dei risultati ad essa associati.

La validazione del metodo e la stima dell’incertezza di misura da associare al dato sono state effettuate in accordo a protocolli internazionalmente riconosciuti (es. norme ISO e protocolli dell’EURACHEM) e sulla base dell’esperienza pratica acquisita dal laboratorio negli anni. Il laboratorio e il Dipartimento hanno ottenuto l’accreditamento ACCREDIA (Ente Italiano di Accreditamento) dimostrando la competenza tecnica di eseguire il metodo e l’attuazione di un sistema gestionale per la qualità allineato ai principi della UNI EN ISO 9001:2008.

Il metodo intende rappresentare un metodo di riferimento per tutti i laboratori che eseguono attività di BMU in modo da poter disporre di dati affidabili, non più interpretabili soggettivamente e aggiornati da un punto di vista tecnico-scientifico. In mancanza di metodologie ufficiali, il metodo si propone anche come supporto a un quadro normativo, a livello europeo, attualmente in evoluzione anche attraverso la *European Human Biomonitoring Initiative* (EHBMI).

Loredana Musmeci, Alessandro Alimonti
 Dipartimento di Ambiente e Connessa
 Prevenzione Primaria

1. SCOPO E APPLICAZIONE

- 1.1 Il metodo descrive la procedura per la determinazione degli elementi in traccia in siero, urina e sangue mediante spettrometria di massa con sorgente a plasma accoppiato induttivamente (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS*).
- 1.2 Il metodo è applicabile agli elementi e matrici biologiche riportate in Tabella 1.

Tabella 1. Elementi e matrici biologiche per le quali il metodo è applicabile

Elemento	Matrice
Arsenico (As)	siero, urina
Cadmio (Cd)	siero, urina, sangue
Cobalto (Co)	siero, urina
Cromo (Cr)	siero, urina
Mercurio (Hg)	siero, urina, sangue
Iridio (Ir)	siero, urina
Manganese (Mn)	siero, urina, sangue
Molibdeno (Mo)	siero, urina
Nichel (Ni)	siero, urina
Piombo (Pb)	siero, urina, sangue
Palladio (Pd)	siero, urina
Platino (Pt)	siero, urina
Rodio (Rh)	siero, urina
Antimonio (Sb)	siero, urina
Stagno (Sn)	siero, urina
Tallio (Tl)	siero, urina
Vanadio (V)	siero, urina
Tungsteno (W)	siero, urina

- 1.3 Per lo scopo del metodo è stato usato uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (*High Resolution-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, HR-ICP-MS*); tuttavia la determinazione può essere effettuata anche con ICP-MS a bassa risoluzione purché il laboratorio soddisfi i requisiti minimi del programma di controllo della qualità riportati in Sezione 12.
- 1.4 Il metodo consente di determinare concentrazioni degli elementi fino al livello del limite di rilevabilità (*Limit of Detection, LoD*) e del limite di quantificazione (*Limit of Quantification, LoQ*) riportati in Sezione 10. Se la determinazione viene effettuata con altra strumentazione, il laboratorio deve individuare la minima concentrazione rilevabile degli elementi.
- 1.5 Il metodo è stato sottoposto a validazione intra-laboratorio (*in-house*) ottenendo i risultati riportati in Sezione 10.
- 1.6 L'incertezza estesa del metodo è stata stimata per ciascun elemento ottenendo i risultati riportati in Sezione 11.
- 1.7 La procedura proposta deriva da un metodo accreditato UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 da ACCREDIA (Ente Italiano di Accreditamento) parzialmente modificato

allo scopo di renderlo accessibile a differenti laboratori aventi diverse esigenze e apparecchiature. In mancanza di metodi ufficiali, il metodo intende rappresentare un riferimento destinato a tutti i laboratori che eseguono attività di biomonitoraggio.

- 1.8 Il metodo deve essere utilizzato da operatori con esperienza nell'uso dell'ICP-MS, nell'identificazione delle interferenze spettrali e non spettrali e delle relative procedure per la loro separazione, compensazione e/o correzione riportate in Sezione 4.
- 1.9 Il metodo, ove richiesto dallo specifico programma di biomonitoraggio, può essere esteso ad altri elementi e matrici simili (quali plasma, saliva, liquido cerebrospinale, ecc.) previa dimostrazione della validità e conformità alle specifiche per il nuovo misurando/materiale. Il livello di validazione o ri-validazione necessario dipende dalla natura delle modifiche ed estensioni.
- 1.10 La bibliografia e i riferimenti normativi necessari per lo sviluppo, validazione e stima dell'incertezza del metodo sono riportati in calce al rapporto.
- 1.11 Gli obiettivi e i requisiti per validare e standardizzare il metodo analitico sono riportati in Figura 1.

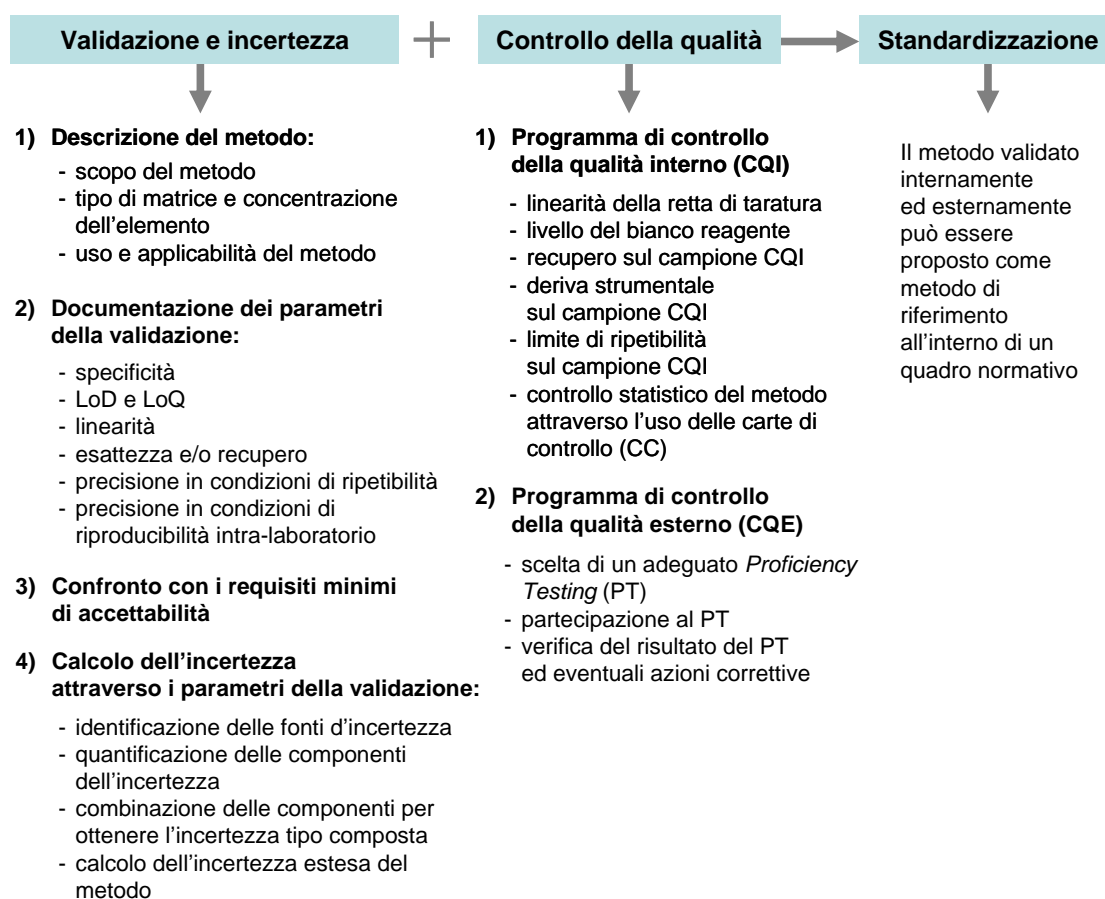


Figura 1. Obiettivi e requisiti per validare e standardizzare il metodo analitico

2. PRINCIPIO DEL METODO

- 2.1 Gli elementi vengono determinati tramite ICP-MS previo trattamento del campione di prova. Nel caso di siero e urina, un'aliquota del campione di prova viene diluita in rapporto 1:5 (v/v) con acqua deionizzata ultrapura all'1% in acido nitrico (HNO₃) concentrato ad elevata purezza. Nel caso del sangue, un'aliquota del campione di prova viene addizionata in rapporto 1:2 (v/v) con HNO₃ concentrato ad elevata purezza e mineralizzata su piastra riscaldante alla temperatura di 80±3°C. Il trattamento dei campioni e la procedura analitica sono riportate nelle Sezioni 9 e 13.
- 2.2 Il metodo consente la determinazione degli elementi tramite ICP-MS a concentrazioni nell'intervallo ng/L-µg/L. Il campione in soluzione, attraverso una pompa peristaltica viene nebulizzato e introdotto nel plasma dove subisce desolvatazione, vaporizzazione, atomizzazione e ionizzazione. Il flusso degli ioni generato nel plasma viene convogliato attraverso un sistema di coni (denominati *sampler* e *skimmer*) e un sistema di lenti ioniche all'interno della zona ad alto vuoto tipica di uno spettrometro di massa. Gli ioni vengono separati dal campo magnetico in base al loro rapporto massa su carica (m/z) e vengono rivelati da un fotomoltiplicatore (*Secondary Electron Multiplier, SEM*) che produce segnali elettrici proporzionali al flusso ionico.
- 2.3 Le interferenze spettrali rappresentano il vero limite dell'ICP-MS. È necessario, quindi, riconoscere le interferenze relative al metodo di analisi. L'utilizzo di uno spettrometro di massa ad alta risoluzione (HR-ICP-MS) permette di risolvere molte delle prevedibili interferenze spettrali separando in maniera univoca il segnale dell'elemento da determinare da quello dell'interferente. La separazione delle interferenze spettrali è dovuta sia alla geometria a doppia focalizzazione dello strumento, che prevede la separazione degli ioni attraverso un primo campo magnetico e successivamente attraverso un secondo campo elettrico, sia alla possibilità di variare la risoluzione (Ris) strumentale (definita come $Ris = m/\Delta m$ dove Δm è la differenza tra le due masse da separare) attraverso fenditure ad apertura variabile collocate all'entrata e all'uscita del magnete analizzatore. L'apertura delle fenditure è inversamente proporzionale alla Ris strumentale. Tale configurazione consente di poter lavorare in bassa risoluzione (*Low Resolution, LR*) con $Ris=300 m/\Delta m$, in media risoluzione (*Medium Resolution, MR*) con $Ris=4000 m/\Delta m$ e in alta risoluzione (*High Resolution, HR*) con $Ris=12000 m/\Delta m$. Questo approccio permette distinguere una specie interferente che differisca, nel peso molecolare, per la terza-quarta cifra decimale dall'elemento da determinare. Ad esempio, l'⁷⁵As con massa 74,93124 può essere separato dall'interferente ⁴⁰Ar³⁵Cl con massa 74,93384 (e quindi con un Δm di 0,0026) lavorando in HR. Lo studio e le strategie da adottare per un'adeguata risoluzione delle interferenze e una corretta esecuzione del metodo sono riportate in Sezione 4.
- 2.4 Il metodo può anche essere eseguito mediante strumenti con minore Ris e differente geometria, quali ad es. ICP-MS quadrupolari equipaggiati con celle di reazione e/o di collisione. Tali ICP-MS sono in grado di rimuovere le interferenze mediante l'impiego di celle collocate tra il sistema di lenti ioniche e l'analizzatore di massa. All'interno delle celle vengono flussati gas di reazione (es. idrogeno, ossigeno, metano, ecc.) o di collisione (es. elio) o loro miscele, che producono reazioni di trasferimento di carica, trasferimento di atomi o trasferimento energetico utili a rimuovere le interferenze. Per

esempio, nel caso della determinazione dell' ^{75}As utilizzando come gas di reazione l'ossigeno si verifica, in cella, una reazione chimica che forma la specie $^{75}\text{As}^{16}\text{O}$ con massa pari a 91 libera dall'interferente $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ e, quindi, idonea per la quantificazione analitica. La determinazione dell' ^{75}As può anche avvenire utilizzando come gas di collisione l'elio che, in cella, collide principalmente con l'interferente $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$ a maggiore sezione d'urto, causando una diminuzione della sua energia cinetica e favorendo il passaggio dell' ^{75}As verso l'analizzatore.

- 2.5 Il metodo prevede l'utilizzo di rette di taratura mediante aggiunte note e crescenti dell'elemento al campione di analisi e della standardizzazione interna per la compensazione delle interferenze non spettrali dovute alla matrice e della deriva strumentale del segnale, a breve e lungo termine. Le procedure per una corretta applicazione del metodo di taratura mediante aggiunte note e della standardizzazione interna sono riportate in Sezione 6.

3. DEFINIZIONI

Ai fini del presente metodo si applicano le seguenti definizioni:

- 3.1 **Campione di prova.** Campione di siero, urina o sangue pervenuto al laboratorio per la determinazione degli elementi.
- 3.2 **Campione di analisi.** Aliquota del campione di prova (o *pool* di aliquote di campioni di prova) che subisce l'intera procedura di trattamento e sulla quale vengono determinati gli elementi.
- 3.3 **Campione del bianco reagente.** Campione di reagenti esente da matrice biologica che subisce la stessa procedura di trattamento del campione di prova, necessario per la verifica del fondo strumentale e dell'eventuale contaminazione esogena (es. ambiente, apparecchiature, reagenti).
- 3.4 **Campione del Materiale di Riferimento Certificato (MRC).** Campione di matrice biologica contenente gli elementi a concentrazione e incertezza note e certificate da un ente nazionale o internazionale. Il campione MRC deve essere rappresentato da una matrice di natura il più possibile simile al campione di prova. Tale campione subisce l'intera procedura di trattamento e viene usato per verificare l'esattezza media percentuale ($\overline{Esatt\%}$) del metodo (3.19) in fase di validazione.
- 3.5 **Campione per il calcolo del recupero.** Qualora il campione MRC (3.4) non contenga concentrazioni note e certificate per alcuni elementi del metodo, deve essere preparato un campione fortificato mediante aggiunte note (*spike*) degli elementi non certificati. Tale campione subisce l'intera procedura di trattamento e viene usato per verificare il recupero medio percentuale ($\overline{Rec\%}$) del metodo (3.20) in fase di validazione.
- 3.6 **Campione per il calcolo della precisione.** Campione non fortificato e/o fortificato mediante aggiunte note (*spike*) di tutti gli elementi del metodo. Tale campione subisce l'intera procedura di trattamento e viene usato per verificare la precisione in condizioni di ripetibilità (3.23) e di riproducibilità intra-laboratorio del metodo (3.25) in fase di validazione.
- 3.7 **Campione di controllo della qualità.**
Si divide in:
 - *Campione di controllo della qualità interno (CQI)*
Campione a concentrazione nota di tutti gli elementi del metodo necessario per monitorare la validità dei risultati prodotti nell'applicazione periodica del metodo. Tale campione subisce l'intera procedura di trattamento e viene incluso nelle sequenze analitiche giornaliere. L'analisi del campione CQI viene usata per dimostrare che il recupero medio percentuale ($\overline{Rec\%}$) (3.20), la precisione in condizione di ripetibilità (3.23) e la deriva strumentale percentuale ($\overline{Deriva\%}$) (3.21) rientrano nei requisiti di accettabilità stabiliti dal laboratorio. Il campione CQI è anche usato per verificare il controllo statistico del metodo nel tempo tramite l'uso delle carte di controllo (CC) (3.22).

- *Campione di controllo della qualità esterno (CQE)*
Campione a concentrazione incognita di alcuni elementi del metodo fornito da organizzazioni responsabili per prove valutative inter-laboratorio o *Proficiency Testing (PT)* (3.33). Tale campione subisce l'intera procedura di trattamento e viene utilizzato per monitorare le prestazioni del laboratorio a fronte di criteri prestabiliti dalle stesse organizzazioni.
- 3.8 **Soluzioni di riferimento monoelementari.** Soluzioni contenenti un solo elemento a concentrazione e incertezza nota e certificata dal produttore.
- 3.9 **Soluzioni multielementari.** Soluzioni contenenti più elementi preparate diluendo le soluzioni di riferimento monoelementari (3.8). Tali soluzioni vengono usate per il metodo di taratura (3.12) e per i campioni fortificati 3.5, 3.6 e 3.7.
- 3.10 **Soluzione degli standard interni.** Soluzione multielementare usata per il metodo della standardizzazione interna (3.13). Gli standard interni devono essere elementi contenuti a livelli trascurabili nel campione di prova e devono avere proprietà chimico-fisiche (es. massa ed energia di ionizzazione) il più possibile simili a quelle dell'elemento da determinare.
- 3.11 **Soluzione di tuning.** Soluzione multielementare a concentrazione nota, preparata attraverso opportuna diluizione delle soluzioni di riferimento monoelementari (3.8), usata per ottimizzare lo strumento ed effettuare la calibrazione delle masse, prima dell'inizio della sequenza analitica giornaliera.
- 3.12 **Metodo di taratura.** Metodo per la preparazione della retta di taratura che prevede l'aggiunta di concentrazioni crescenti delle soluzioni multielementari (3.9) al campione di analisi (3.2). Tale metodo è utilizzato per ridurre le interferenze non spettrali dovute alla matrice.
- 3.13 **Metodo della standardizzazione interna.** Metodo che prevede l'aggiunta di una quantità nota della soluzione (3.10) a tutti i campioni (3.2-3.7) e a tutti i livelli di concentrazione della retta di taratura (3.12). Tale metodo è utilizzato per la compensazione della deriva strumentale (3.21).
- 3.14 **Specificità.** Capacità del metodo di differenziare inequivocabilmente il segnale dell'elemento da determinare da quello derivante dalle specie interferenti.
- 3.15 **Limite di rilevabilità (*Limit of Detection, LoD*).** La più bassa concentrazione dell'elemento che può essere misurata con un ragionevole livello di confidenza applicando il metodo. Rappresenta la concentrazione equivalente al segnale dell'elemento pari a tre volte lo scarto tipo (s) di misurazioni ripetute (≥ 10) del campione di analisi (3.2) alle masse analitiche selezionate.
- 3.16 **Limite di quantificazione (*Limit of Quantification, LoQ*).** La più bassa concentrazione dell'elemento che può essere misurata quantitativamente con un accettabile livello di precisione e accuratezza applicando il metodo. Rappresenta la concentrazione equivalente al segnale dell'elemento pari a dieci volte lo scarto tipo (s) di misurazioni ripetute (≥ 10) del campione di analisi (3.2) alle masse analitiche selezionate.
- 3.17 **Linearità.** Intervallo di concentrazione all'interno del quale esiste una correlazione lineare tra risposta strumentale e concentrazione dell'elemento. Il limite basso

dell'intervallo è determinato dal LoD o LoQ del metodo (3.15, 3.16), mentre il limite alto è definito dalla concentrazione alla quale si verificano anomalie significative nella risposta analitica (es. effetti di *plateau*). È espressa dal coefficiente di correlazione lineare (r).

- 3.18 **Accuratezza (esattezza/recupero e precisione).** Parametro descritto da due contributi, l'esattezza o recupero del metodo e la precisione del metodo.

L'esattezza o recupero indica quanto la media di un numero di risultati scosta dal valore accettato come riferimento (errore di tipo sistematico) e viene valutata quantitativamente in termini di *bias*. Il valore di riferimento può essere un valore certificato all'interno di un MRC (3.4) o un valore teorico aggiunto (*spike*) all'interno di un campione fortificato 3.5. La precisione del metodo è la misura di quanto i risultati sono vicini fra di loro (errore di tipo casuale) e viene valutata quantitativamente in termini di dispersione dei dati in condizioni di ripetibilità (3.23) e/o di riproducibilità intra-laboratorio (3.25).

Lo studio dell'accuratezza richiede l'analisi di campioni rappresentativi in termini di matrice e concentrazione degli elementi lungo l'intervallo di interesse.

- 3.19 **Esattezza.** Valore medio ottenuto dall'analisi di almeno 10 aliquote indipendenti (ovvero ogni aliquota subisce l'intero processo di trattamento) del campione MRC (3.4) ed è espressa secondo la formula:

$$\overline{Esatt}\% = \left(\frac{\overline{C}_{oss}}{C_{MRC}} \right) \times 100$$

\overline{C}_{oss} = concentrazione media dell'elemento misurato nel campione MRC;

C_{MRC} = concentrazione certificata dell'elemento nel campione MRC.

- 3.20 **Recupero.** Valore medio ottenuto dall'analisi di almeno 10 aliquote indipendenti del campione fortificato 3.5 espresso secondo la formula:

$$\overline{Rec}\% = \left(\frac{\overline{C}_{oss} - \overline{C}_{nativo}}{C_{spike}} \right) \times 100$$

\overline{C}_{oss} = concentrazione media dell'elemento misurata nel campione fortificato;

\overline{C}_{nativo} = concentrazione media dell'elemento misurata nello stesso campione non fortificato;

C_{spike} = concentrazione aggiunta (*spike*) dell'elemento.

- 3.21 **Deriva strumentale.** Deriva a breve e lungo termine del segnale strumentale dovuta agli effetti della variazione della temperatura e/o di anomalie (es. occlusione) in alcune parti sensibili del sistema (es. magnete, torcia, lenti, interfaccia) nonché a interferenze fisico-chimiche da matrice non adeguatamente corrette. La deriva strumentale viene tenuta sotto controllo tramite il metodo della standardizzazione interna (3.13) e l'analisi ripetuta del campione CQI (3.7) a intervalli regolari all'interno della sequenza analitica giornaliera. È espressa secondo la formula:

$$Deriva\% = \left(\frac{C_{successivo} - C_{precedente}}{C_{precedente}} \right) \times 100$$

$C_{precedente}$ = concentrazione dell'elemento misurata nel campione CQI;

$C_{successivo}$ = concentrazione dell'elemento misurata nel campione CQI riletto lungo la sequenza analitica.

- 3.22 **Carta di Controllo (CC).** Strumento che permette di verificare se, in fase di applicazione del metodo nel tempo, i risultati prodotti sono fuori controllo o sotto controllo statistico. Si basa sulla distribuzione statistica dei valori del campione CQI (3.7) nell'intorno di un valore centrale della CC (linea centrale) stimato dalla media dei valori di controllo ottenuti in un lungo periodo di tempo (carta di controllo delle medie). I limiti di controllo statistico della CC sono i limiti di allarme, stimati come $+2s$ e $-2s$ e i limiti di azione, stimati come $+3s$ e $-3s$ dove s (scarto tipo) viene calcolato dai valori di controllo ottenuti in un lungo periodo di tempo.
- 3.23 **Precisione in condizioni di ripetibilità.** Grado di concordanza tra i risultati ottenuti dall'analisi di aliquote indipendenti (tipicamente tra 6 e 15) del campione 3.6 e il loro valore medio, analizzate nelle seguenti condizioni: stesso laboratorio, stesso operatore, stessa strumentazione e a breve intervalli di tempo.

Si esprime come coefficiente di variazione medio percentuale di ripetibilità ($\overline{CV}_r\%$) della serie di risultati secondo la formula:

$$\overline{CV}_r\% = \left(\frac{s_r}{\bar{x}}\right) \times 100$$

\bar{x} = media dei risultati;

s_r = scarto tipo di ripetibilità dei risultati.

Una bassa ripetibilità è rispecchiata da un $\overline{CV}_r\%$ grande.

- 3.24 **Limite di ripetibilità (r).** Valore al di sotto o in corrispondenza del quale cade, con uno specifico livello di confidenza, la differenza fra due singoli risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità (3.23).

Si calcola a partire dallo scarto tipo di ripetibilità secondo la formula:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r$$

t = variabile di *Student* per $(n-1)$ gradi di libertà al livello di confidenza del 95%;

s_r = scarto tipo di ripetibilità dei risultati.

- 3.25 **Precisione in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio.** Grado di concordanza tra i risultati ottenuti da aliquote indipendenti (tipicamente tra 6 e 15) del campione 3.6 e il loro valore medio, analizzate nelle seguenti condizioni: stesso laboratorio, differenti operatori, differenti materiali e reagenti, differenti apparecchiature e a distanza temporale anche lunga.

Si esprime come coefficiente di variazione medio percentuale riproducibilità ($\overline{CV}_R\%$) della serie di risultati secondo la formula:

$$\overline{CV}_R\% = \left(\frac{s_R}{\bar{x}}\right) \times 100$$

\bar{x} = media dei risultati;

s_R = scarto tipo di riproducibilità intra-laboratorio dei risultati.

Una bassa riproducibilità intra-laboratorio è rispecchiata da un $\overline{CV}_R\%$ grande.

- 3.26 **Limite di riproducibilità intra-laboratorio (R).** Valore al di sotto o in corrispondenza del quale cade, con uno specifico livello di confidenza, la differenza fra due singoli risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio (3.25).
Si calcola a partire dallo scarto tipo di riproducibilità secondo la formula:

$$R = \sqrt{2} \times t \times s_R$$

t = variabile di *Student* per $(n-1)$ gradi di libertà al livello di confidenza del 95%;
 s_R = scarto tipo di riproducibilità intra-laboratorio dei risultati.

- 3.27 **Incetezza di misura.** Parametro associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando. L'incetezza di misura, se espressa con le dimensioni di uno scarto tipo, è chiamata incetezza tipo (u). I risultati di una misurazione devono essere sempre accompagnati dalla valutazione della loro incetezza che viene espressa con la stessa unità di misura del risultato. L'incetezza viene di solito riportata come incetezza estesa (U) (3.32) in modo che una più grande parte di valori vi siano compresi.
- 3.28 **Incetezza tipo dell'esattezza ($u_{\overline{Esatt}}$).** Incetezza tipo associata alla stima dell'esattezza del metodo (3.19) ed è espressa secondo la formula:

$$u_{\overline{Esatt}} = \overline{Esatt} \times \sqrt{\left(\frac{u_{MRC}}{\overline{C}_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{s_{Oss}}{\overline{C}_{Oss} \sqrt{n}}\right)^2}$$

\overline{Esatt} = esattezza media;

u_{MRC} = incetezza associata al valore certificato dell'elemento nel campione MRC (3.4);

\overline{C}_{MRC} = concentrazione certificata dell'elemento nel campione MRC;

s_{Oss} = scarto tipo dei risultati ottenuti da aliquote indipendenti del campione MRC;

\overline{C}_{Oss} = concentrazione media dell'elemento misurato nel campione MRC;

n = numero di misurazioni effettuate sul campione MRC.

- 3.29 **Incetezza tipo del recupero ($u_{\overline{Rec}}$).** Incetezza tipo associata alla stima del recupero del metodo (3.20) ed è espressa secondo la formula:

$$u_{\overline{Rec}} = \overline{Rec} \times \sqrt{\left(\frac{u_{spike}}{\overline{C}_{spike}}\right)^2 + \left(\frac{s_{Oss}}{(\overline{C}_{Oss} - \overline{C}_{nativo})\sqrt{n}}\right)^2}$$

\overline{Rec} = recupero medio;

u_{spike} = incetezza associata alle soluzioni di riferimento monoelementari (3.8) utilizzate per fortificare il campione 3.5;

\overline{C}_{spike} = concentrazione aggiunta (*spike*) dell'elemento;

s_{Oss} = scarto tipo dei risultati ottenuti da aliquote indipendenti del campione fortificato;

\overline{C}_{Oss} = concentrazione media dell'elemento misurato nel campione fortificato;

\overline{C}_{nativo} = concentrazione media dell'elemento misurata nello stesso campione non fortificato;

n = numero di misurazioni effettuate sul campione fortificato.

- 3.30 **Incertezza tipo di riproducibilità intra-laboratorio (u_R).** Incertezza tipo associata alla stima della riproducibilità intra-laboratorio del metodo (3.25) ed è espressa secondo la formula:

$$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

S_R = scarto tipo di riproducibilità intra-laboratorio;
 n = numero di misurazioni effettuate sul campione fortificato 3.6.

- 3.31 **Incertezza tipo composta (u_c).** Incertezza tipo del risultato di una misurazione x allorché il risultato è ottenuto mediante i valori di un certo numero di altre grandezze; essa è uguale alla radice quadrata di una somma di termini, che sono gli scarti tipo di quelle componenti dell'incertezza (es. 3.28, 3.29 e 3.30) identificate e pesate secondo la variazione del risultato della misurazione al variare delle grandezze. Viene espressa secondo la formula:

$$u_c = \sqrt{u_p^2 + u_q^2 + \dots}$$

u_p = incertezza tipo relativa al parametro p ;
 u_q = incertezza tipo relativa al parametro q .

- 3.32 **Incertezza estesa (U).** Parametro che definisce un intervallo intorno al risultato di una misurazione che si stima possa comprendere una frazione rilevante dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando. Si ottiene moltiplicando l'incertezza tipo composta (u_c) (3.31) per un fattore di copertura k , secondo la formula:

$$U = u_c \times k$$

k deriva dalla distribuzione di *Student* in corrispondenza del 95% di probabilità e dei gradi di libertà effettivi.

L'incertezza estesa deve essere associata al dato analitico prodotto applicando il metodo e deve essere espressa con la stessa unità di misura del misurando. Il risultato analitico della concentrazione degli elementi deve, perciò, essere espresso secondo la formula:

$$C \pm U$$

C = concentrazione finale dell'elemento in $\mu\text{g/L}$ o ng/L ;
 U = incertezza estesa associata all'elemento in $\mu\text{g/L}$ o ng/L .

- 3.33 **Prova valutativa inter-laboratorio o Proficiency Testing (PT).** Prova inerente al programma di controllo della qualità esterno (CQE). Permette la valutazione periodica, obiettiva ed indipendente, delle prestazioni del laboratorio a fronte di criteri prestabiliti utilizzando confronti inter-laboratorio (UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010). Tali prove consistono nell'analisi di un campione CQE (3.7) a concentrazione incognita degli (o di alcuni) elementi del metodo da parte del laboratorio partecipante al PT.

4. INTERFERENZE IN ICP-MS

Le interferenze spettrali (isobariche, poliatomiche e quelle dovute a ioni con doppia carica) e le interferenze non spettrali (fisico-chimiche e dovute all'effetto memoria) devono essere costantemente monitorate e, qualora risultino non trascurabili, risolte e/o corrette prima dell'esecuzione del metodo.

Le interferenze spettrali comprendono:

4.1 **Interferenze isobariche.** Sono causate da isotopi di differenti elementi che formano ioni singoli aventi lo stesso rapporto m/z dell'elemento da determinare (es. ^{58}Ni e ^{58}Fe). Tali interferenze non sono risolvibili neanche attraverso l'utilizzo di strumenti ad alta risoluzione (HR-ICP-MS), ma possono essere, comunque, evitate e/o corrette. A tal fine, è possibile:

- usare un altro isotopo dell'elemento da determinare libero dall'interferenza isobarica. Per esempio, il Ni è quantificato utilizzando l'isotopo ^{60}Ni essendo l'isotopo ^{58}Ni ostacolato dall'interferenza isobarica del ^{58}Fe ;
- applicare adeguate correzioni dei dati, nel caso in cui non sia possibile utilizzare un isotopo alternativo dell'elemento o l'isotopo alternativo abbia una scarsa abbondanza naturale. Per esempio, il Cd è quantificato utilizzando l'isotopo ^{114}Cd previa correzione del segnale analitico dall'interferenza dello ^{114}Sn misurato, a sua volta, usando l'isotopo ^{118}Sn e utilizzando il rapporto fra le abbondanze (a) naturali dello ^{118}Sn e dello ^{114}Sn , secondo l'equazione:

$$I(^{114}\text{Cd}) = I(^{114}\text{Cd}) - \left[I^{118}\text{Sn} \times \frac{a^{114}\text{Sn}}{a^{118}\text{Sn}} \right]$$

Si consiglia di applicare tale procedura solo se il segnale dell'interferente non è superiore al 10% del segnale dell'elemento da determinare.

4.2 **Interferenze poliatomiche.** Sono causate dalla presenza di ioni poliatomici (es. $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ su ^{52}Cr ; $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$ su ^{51}V) derivanti dalla combinazione di due o più specie atomiche che si formano nel plasma e/o derivano dai reagenti o dai componenti della matrice o dal gas plasmogeno (argon, Ar). Il peso delle interferenze poliatomiche dipende sia dalla matrice del campione sia dalle condizioni strumentali scelte, quali velocità del flusso del gas di trasporto del campione, potenza della radiofrequenza (RF), distanza torcia-interfaccia. Tali interferenze sono più difficili da prevedere rispetto a quelle isobariche, ma possono essere risolte e/o corrette. A tal fine, è possibile:

- ottimizzare alcuni parametri strumentali critici. Potenziale della RF relativamente alto e bassa velocità del flusso del gas di trasporto del campione permettono di minimizzare la formazione di ossidi poliatomici interferenti. Infatti, la riduzione della portata del campione nel plasma assicura un minor apporto di ossigeno presente nelle gocce di aerosol e nel vapore acqueo, un minor effetto di raffreddamento dovuto alla dissociazione delle molecole di solvente e un maggiore tempo di residenza del campione in torcia. Tutti questi fattori contribuiscono a una dissociazione esaustiva anche degli ossidi più refrattari. Inoltre l'utilizzo del gas Ar plasmogeno a elevato

grado di purezza (es. > 99,99%) contribuisce a ridurre la formazione di specie poliatomiche.

Per monitorare la formazione di ossidi si introduce nella soluzione di *tuning* (3.11) un elemento che forma legami forti con l'ossigeno (es. il bario, Ba) al fine di valutare il rapporto $^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}/^{137}\text{Ba}$. Un valore di $^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}/^{137}\text{Ba} \leq 0,01$ è indicativo di formazione di ossidi trascurabile (7.2);

- utilizzare una Ris strumentale più alta qualora si lavori con uno spettrometro HR-ICP-MS. Lavorare in media risoluzione (MR, $m/\Delta m = 4000$) o alta risoluzione (HR, $m/\Delta m = 12000$) consente di risolvere molte delle interferenze poliatomiche.

Per esempio, l'utilizzo della MR per la quantificazione del ^{59}Co permette la separazione del segnale dalle interferenze di $^{19}\text{F}^{40}\text{Ar}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{23}\text{Na}^{36}\text{Ar}$, $^{41}\text{K}^{18}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}$. L'uso dell'HR è invece indispensabile per eliminare le interferenze di $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{38}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$, $^{39}\text{K}^{36}\text{Ar}$, $^{59}\text{Co}^{16}\text{O}$, $^{58}\text{Ni}^{17}\text{O}$ dal segnale dell' ^{75}As ;

- applicare adeguate correzione dei dati, calcolando sperimentalmente l'equazione di correzione da applicare al segnale dell'elemento da determinare. Il fattore di correzione (*FC*) viene calcolato aggiungendo quantità (es. *C1* e *C2*) crescenti dell'elemento interferente al campione di analisi (3.2) e misurando il segnale generato alla massa dell'elemento da determinare.

Per esempio, l'interferenza di $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$ sul segnale del ^{114}Cd viene corretta secondo l'equazione:

$$I(^{114}\text{Cd}) = I(^{114}\text{Cd}) - [I(^{98}\text{Mo}) \times FC]$$

$$FC = \frac{[I_{C1}(^{114}\text{Cd}) - I_{C2}(^{114}\text{Cd})]}{[I_{C1}(^{98}\text{Mo}) - I_{C2}(^{98}\text{Mo})]}$$

I_{C1} = segnale ottenuto alla concentrazione *C1*, alle masse del ^{98}Mo e del ^{114}Cd ;

I_{C2} = segnale ottenuto alla concentrazione *C2*, alle masse del ^{98}Mo e del ^{114}Cd .

4.3 Interferenze dovute a ioni con doppia carica. La maggior parte degli ioni prodotti nel plasma è a singola carica. Ciò deriva dal fatto che il primo potenziale di ionizzazione dell'Ar (15.76 eV) è più elevato di quello di quasi tutti gli altri elementi. Solo gli elementi aventi un'energia di ionizzazione più bassa di quella di prima ionizzazione dell'Ar contribuiscono in modo significativo alla produzione di ioni con doppia carica (es. gli alcalino terrosi, le terre rare e alcuni elementi di transizione). Per risolvere e/o ridurre le interferenze dovute a ioni con doppia carica è possibile:

- ottimizzare alcuni parametri strumentali critici. Potenziale della RF relativamente basso e alta velocità del flusso del gas di trasporto del campione permettono di minimizzare la formazione di ioni con doppia carica.

Per monitorare la formazione di ioni con doppia carica si introduce nella soluzione di *tuning* (3.11) un elemento con bassa energia di ionizzazione (es. il Ba) al fine di valutare il rapporto $^{137}\text{Ba}^{++}/^{137}\text{Ba}^+$. Un valore di $^{137}\text{Ba}^{++}/^{137}\text{Ba}^+ \leq 0,06$ è indicativo di formazione di doppie cariche trascurabile (7.2);

- utilizzare una Ris strumentale più alta qualora si lavori con uno spettrometro HR-ICP-MS.

Per esempio, l'utilizzo della MR ($m/\Delta m = 4000$) per la quantificazione del ^{60}Ni permette la separazione del segnale dalla interferenza dello $^{120}\text{Sn}^{++}$.

- Nota 1.** È raccomandabile monitorare le interferenze 4.1, 4.2 e 4.3 giornalmente e per ciascuna matrice biologica poiché il loro peso è in funzione dell'ottimizzazione dei parametri strumentali e della quantità dell'elemento interferente nativo.
- Nota 2.** La determinazione degli elementi anche su altre masse rispetto a quelle selezionate (masse alternative) sono utili per confermare il dato analitico.
- Nota 3.** Nel caso di utilizzo di altri tipi di ICP-MS è raccomandabile consultare il manuale operativo fornito dal produttore e verificare attraverso analisi della soluzione di *tuning* (3.11) le specifiche richieste per avere una bassa produzione di ossidi e doppie cariche nel sistema.

Le interferenze 4.1, 4.2 e 4.3 che cadono sugli elementi del metodo alle masse selezionate sono state riassunte nelle Tabella 2, insieme alla Ris strumentale ($m/\Delta m$) e le eventuali azioni correttive (*FC*) necessarie per la loro risoluzione.

Tabella 2. Masse analitiche selezionate e alternative, potenziali interferenti, risoluzione strumentale e azioni correttive per l'applicazione del metodo

Elemento	Masse (m/z)		Interferenti alle masse selezionate	Peso degli interferenti	Risoluzione strumentale ($Ris=m/\Delta m$) e azioni correttive
	selezionate	alternative			
As	75		$^{59}\text{Co}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}$, $^{36}\text{Ar}^{39}\text{K}$	NT	HR
Cd	114	111	$^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$, ^{114}Sn	NT	LR; FC ₁
Co	59		$^{40}\text{Ar}^{19}\text{F}$, $^{43}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^1\text{H}$, $^{42}\text{Ca}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{36}\text{Ar}^{23}\text{Na}$, $^{118}\text{Sn}^{++}$	NT	MR
Cr	52	53	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$, $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$, $^{104}\text{Pd}^{++}$	NT	MR
Hg	202	200	$^{186}\text{W}^{16}\text{O}$, $^{186}\text{Os}^{16}\text{O}$	T	LR
Ir	193	191	$^{177}\text{Hf}^{16}\text{O}$	T	LR
Mn	55		$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}$, $^{39}\text{K}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}$, $^{110}\text{Cd}^{++}$, $^{110}\text{Pd}^{++}$	NT	MR
Mo	100	98	$^{40}\text{Ar}^{60}\text{Ni}$, $^{36}\text{Ar}^{64}\text{Zn}$	T	LR
Ni	60		$^{44}\text{Ca}^{16}\text{O}$, $^{36}\text{Ar}^{24}\text{Mg}$, $^{120}\text{Sn}^{++}$	NT	MR
Pb	208	206, 207	Nessuno		LR
Pd	106	108, 110	$^{88}\text{Sr}^{18}\text{O}$, $^{90}\text{Zr}^{16}\text{O}$, $^{40}\text{Ar}^{66}\text{Zn}$	NT	MR; FC ₂
Pt	195	196	$^{179}\text{Hf}^{16}\text{O}$	T	LR
Rh	103		$^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}$, $^{63}\text{Cu}^{40}\text{Ar}$	NT	MR; FC ₃
Sb	121	123	Nessuno		LR
Sn	120	118	$^{80}\text{Se}^{40}\text{Ar}$	T	LR
Tl	205	203	$^{189}\text{Os}^{16}\text{O}$	T	LR
V	51		$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}$, $^{37}\text{Cl}^{14}\text{N}$, $^{40}\text{Ar}^{11}\text{B}$	NT	MR
W	186	184	Nessuno		LR

T: Trascurabile

NT: Non Trascurabile

FC₁: Fattore di correzione, da verificare giornalmente, per l'interferenza isobarica di ^{114}Sn (vedi 4.1) e per l'interferenza poliatomiche del $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$ (vedi 4.2);

FC₂: Fattore di correzione, da verificare giornalmente, per l'interferenza poliatomiche di $^{90}\text{Zr}^{16}\text{O}$;

FC₃: Fattore di correzione, da verificare giornalmente, per l'interferenza poliatomiche di $^{87}\text{Sr}^{16}\text{O}$;

LR: Low Resolution ($m/\Delta m=300$);

MR: Medium Resolution ($m/\Delta m=4000$);

HR: High Resolution ($m/\Delta m=10000$)

Le interferenze non spettrali comprendono:

- 4.4 **Interferenze fisico-chimiche dovute alla matrice.** Sono associate ai processi che governano il trasporto del campione al nebulizzatore (effetti di viscosità), la formazione dell'aerosol e trasporto al plasma (tensione superficiale), l'eccitazione e la ionizzazione all'interno del plasma e la trasmissione degli ioni all'interfaccia. Anche alti livelli di solidi disciolti nel campione possono causare formazione di precipitati nell'orifizio dei coni *sampler* e *skimmer* causando una loro occlusione e determinando una perdita di trasmissione ionica. Tali interferenze provocano differenze di risposta strumentale tra il campione e i livelli di concentrazione per la retta di taratura, nonché diminuzione di sensibilità e precisione strumentale. È, quindi, indispensabile un'appropriata diluizione e/o mineralizzazione del campione (9.1), l'uso del metodo di taratura mediante aggiunte note (6.4) e del metodo della standardizzazione interna (6.5) per compensare le interferenze fisico-chimiche descritte e la deriva strumentale a breve e lungo termine del segnale (12.1.4).
- 4.5 **Interferenze dovute all'effetto memoria.** Si verificano quando isotopi degli elementi in un precedente campione contribuiscono al segnale misurato in un campione successivo. L'effetto memoria può essere il risultato di materiale depositato sui coni *sampler* e *skimmer*, in torcia e camera di nebulizzazione. Tale effetto dipende dall'elemento e può essere minimizzato attraverso accurati lavaggi (es. con acqua deionizzata ultrapura) tra un campione e l'altro. Nel caso di sospetta presenza di effetto memoria lungo la corsa analitica è necessario ripetere l'analisi dopo un lungo intervallo di lavaggio o, eventualmente, dopo aver smontato e pulito alcune parti del sistema.

5. MATERIALI E APPARECCHIATURE

5.1 Pre-trattamento

- 5.1.1 Provette in plastica *metal-free*, contenenti un attivatore di coagulazione, per la raccolta del siero.
- 5.1.2 Contenitori o provette in plastica per la raccolta delle urine.
- 5.1.3 Provette in plastica *metal-free*, contenenti un anticoagulante, per la raccolta del sangue.
- 5.1.4 Aghi *metal-free* per il prelievo del sangue.
- 5.1.5 Provette in polistirene da 15 mL per il trattamento dei campioni e la preparazione delle soluzioni.
- 5.1.6 Micropipette elettroniche (o manuali) a volume variabile nell'intervallo 10-100 μL , 100-1000 μL , 1000-5000 μL e incertezza dichiarata dal produttore.
- 5.1.7 Puntali usa e getta per le micropipette.
- 5.1.8 Piastra riscaldante in grado di allocare provette in plastica e mantenere la temperatura necessaria per la mineralizzazione del sangue.
- 5.1.9 Agitatore meccanico.
- 5.1.10 Materiali di Riferimento Certificati (MRC) (es. *Lyophilized Human Serum*, *Lyophilized Human Urine*, e *Lyophilized Human Blood*).

Nota. Nella determinazione degli elementi, fenomeni di contaminazione e/o perdite possono inficiare il risultato analitico. Fonti potenziali di contaminazione includono l'uso di materiale in plastica non idoneo che può introdurre errori in positivo o in negativo nella determinazione analitica per rilascio dalla superficie o adsorbimento dell'elemento sulla superficie. Di conseguenza, è preferibile effettuare procedure di lavaggio dei contenitori o delle provette che prevedono il contatto per una notte con una soluzione al 10% (v/v) di HNO_3 concentrato ad elevata purezza (6.1.2) e successivo risciacquo con acqua deionizzata ultrapura (6.1.1). L'analisi del bianco reagente (9.2) consente di tenere sotto controllo eventuali contaminazioni dei materiali.

5.2 ICP-MS

- 5.2.1 Pompa peristaltica a velocità variabile per il trasporto del campione al nebulizzatore.
- 5.2.2 Nebulizzatore pneumatico (tipo *Meinhard* o equivalente) per la formazione dell'aerosol del campione.
- 5.2.3 Camera di nebulizzazione (tipo *Scott* o equivalente) raffreddata ad acqua per la rimozione delle gocce a maggior volume del campione e la riduzione della formazione di alcune specie interferenti.
- 5.2.4 *Guard electrode*, sottile foglio di platino inserito tra la torcia e la spirale d'induzione magnetica per ottenere maggior sensibilità analitica.
- 5.2.5 Gas Ar a elevato grado di purezza (> 99,99%) per ridurre al minimo la possibilità di contaminazione analitica e formazione di specie interferenti.
- 5.2.6 Autocampionatore (facoltativo).

6. REAGENTI E SOLUZIONI

6.1 **Reagenti.** Utilizzare reagenti ad elevata purezza al fine di evitare il più possibile la contaminazione del campione, reperibili in commercio o preparabili in laboratorio a partire da un reagente di grado analitico tramite doppia distillazione.

6.1.1 Acqua deionizzata ultrapura la cui resistività risulti $\geq 18,0 \text{ M}\Omega/\text{cm}$.

6.1.2 HNO_3 concentrato (67%) ad elevato grado di purezza.

Nota. L'analisi del bianco reagente (9.2) consente di tenere sotto controllo eventuali contaminazioni dovute ai reagenti.

6.2 **Soluzioni di riferimento monoelementari (3.8).** Utilizzare soluzioni ad elevata purezza e con concentrazione dell'elemento e incertezza certificate, reperibili in commercio già in soluzione. Nel metodo, sono usate soluzioni di riferimento monoelementari concentrate a 100 mg/L o a 1000 mg/L. Le soluzioni sono conservate alla temperatura di $+4 \text{ }^\circ\text{C}$.

6.3 **Soluzioni multielementari (3.9).** Vengono preparate giornalmente in laboratorio tramite diluizioni successive con acqua deionizzata ultrapura (6.1.1) a partire dalle soluzioni monoelementari (6.2). È necessario prestare attenzione all'unione dei singoli elementi in funzione della compatibilità e stabilità tra gli elementi stessi e del livello di concentrazione degli elementi atteso nel campione di prova (3.1). È importante tenere in mente che i livelli di As e Mo nei campioni di urina sono più alti di almeno un fattore 5 rispetto agli altri elementi, e che i livelli di Ir, Pd, Pt e Rh nei campioni di siero e urina sono più bassi di circa un fattore 10 rispetto agli altri elementi. A tal fine, è preferibile preparare 4 differenti soluzioni multielementari A, B, C e D contenenti i seguenti elementi:

– per l'analisi di campioni di siero e urina:

soluzione A: Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn, Tl, V, W;

soluzione B: As, Mo;

soluzione C: Ir, Pd, Pt e Rh.

– per l'analisi di campioni di sangue:

soluzione D: Cd, Hg, Mn, Pb.

Preparare tali soluzioni a concentrazioni adeguate (es. A: 500 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$; B: 5000 $\mu\text{g/L}$ e 500 $\mu\text{g/L}$; C: 50 $\mu\text{g/L}$ e 5 $\mu\text{g/L}$; D: 500 $\mu\text{g/L}$ e 50 $\mu\text{g/L}$) per ottenere i livelli di concentrazione necessari per la retta di taratura (6.4) e i livelli di fortificazione dei campioni necessari per il calcolo del recupero (9.4) e della precisione (9.5) del metodo e del campione CQI (9.6).

6.4 **Soluzioni per il metodo di taratura (3.12).** Gli intervalli della retta di taratura devono essere scelti in funzione del livello di concentrazione dell'elemento atteso nel campione, della sensibilità strumentale e compresi all'interno dell'intervallo di linearità del metodo (10.3). A tal fine, aggiungere ad un campione (o *pool* di campioni) di siero, urina o sangue volumi appropriati delle soluzioni A, B, C e D (6.3) per preparare i seguenti intervalli di concentrazione finale per la retta di taratura:

- *Siero e urina:*
 - 0,25-50 µg/L per ciascuno dei seguenti elementi:
Cd, Co, Cr, Hg, Mn, Ni, Pb, Sb, Sn, Tl, V, W;
 - 2,5-500 µg/L per ciascuno dei seguenti elementi:
As, Mo;
 - 25-5000 ng/L per ciascuno dei seguenti elementi:
Ir, Pd, Pt e Rh.
- *Sangue:*
 - 0,75-150 µg/L per ciascuno dei seguenti elementi:
Cd, Mn, Hg, Pb.

Nota. È consigliato, all'interno degli intervalli di taratura riportati, preparare almeno 5 livelli crescenti di concentrazione (incluso lo zero). I livelli di concentrazione per la retta di taratura devono essere preparati giornalmente.

6.5 Soluzione degli standard interni (3.10). Viene preparata giornalmente tramite diluizioni successive con acqua deionizzata ultrapura (6.1.1) a partire dalle soluzioni di riferimento monoelementari (6.2). È necessario scegliere standard interni che non siano presenti a concentrazioni significative all'interno del campione di prova e che abbiano caratteristiche (es. massa e energia di ionizzazione) quanto più possibile simili agli elementi da determinare. Per la determinazione degli elementi in un ampio spettro di masse è consigliato usare almeno due standard interni aggiunti al campione di analisi (3.2) a concentrazione sufficientemente alta da ottenere una buona precisione sul segnale degli standard interni e minimizzare il più possibile l'errore derivante dall'eventuale presenza naturale degli standard interni nel campione. Nel metodo, il gallio (Ga) a $m/z=69$ viene utilizzato per la correzione delle masse comprese nell'intervallo $m/z=51$ (V) e $m/z=60$ (Ni) e l'indio (In) a $m/z=115$ per la correzione delle masse comprese nell'intervallo $m/z=75$ (As) e $m/z=208$ (Pb). A tal fine, preparare la soluzione degli standard interni a concentrazione adeguata (es. soluzione E: 100 µg/L di Ga e In) per ottenere 1 µg/L di Ga e In in tutti i campioni (3.2-3.7) e nei livelli di concentrazione per la retta di taratura (6.4).

Nota. È possibile aggiungere una soluzione degli standard interni differente e a concentrazione più alta in funzione della sensibilità strumentale.

6.6 Soluzione di tuning (3.11). Viene preparata tramite diluizioni successive con acqua deionizzata ultrapura (6.1.1) a partire dalle soluzioni di riferimento monoelementari (6.2). È opportuno che tale soluzione contenga un numero di elementi congruo a coprire l'intero spettro delle masse. A tal fine, preparare la soluzione di *tuning* contenente boro (B), Ba, Co, Ga, In, litio (Li), lutezio (Lu), sodio (Na), Rh, scandio (Sc), Tl, ittrio (Y) e uranio (U) alla concentrazione di 1 µg/L (o di 10 µg/L in funzione della sensibilità strumentale) in una soluzione acquosa all'1% (v/v) di HNO₃ (6.1.2).

Nota. È consigliato consultare il manuale operativo dello strumento ICP-MS e eventualmente preparare la soluzione di *tuning* e di calibrazione delle masse suggerita dalla casa produttrice.

7. OPERAZIONI STRUMENTALI PRELIMINARI

7.1 **Controlli prima dell'accensione dello spettrometro.** Prima dell'uso dello strumento procedere come segue:

- assicurarsi che i parametri ambientali della stanza rientrino nelle specifiche di temperatura (18-24°C) e umidità relativa (<50-60%);
- controllare che l'Ar sia disponibile e a pressione > 8 bar;
- assicurarsi che la camera di nebulizzazione sia vuota;
- assicurarsi che i coni non presentino deposizioni o erosioni;
- assicurarsi che i tubicini della pompa peristaltica non presentino deformazioni e/o alterazioni della naturale colorazione;
- controllare il livello di liquido del recipiente di scarico della pompa peristaltica;
- valutare lo stato di pulizia di tutto il sistema e, se necessario, ricorrere alla pulizia delle parti del sistema e/o alla loro sostituzione.

7.2 **Ottimizzazione dello spettrometro HR-ICP-MS.** Prima di eseguire l'analisi, per garantire che il sistema lavori con adeguata sensibilità e stabilità, procedere come segue:

- aspirare la soluzione di *tuning* (3.11) preparata secondo quanto riportato in 6.6;
- eseguire, in LR, la centratura x/y/z della torcia e l'ottimizzazione di parametri quali il flusso del gas Ar di trasporto del campione e del gas Ar ausiliario, la potenza della RF e le lenti (solo per l'HR). Il voltaggio del rivelatore SEM deve essere variato solo in caso eccezionale, al fine di non deteriorarne l'efficienza nel tempo;
- verificare che l'intensità dell' ^{115}In sia $\geq 8 \times 10^5$ conteggi per secondo (cps) in LR, $\geq 7 \times 10^4$ cps in MR e $\geq 1,5 \times 10^4$ cps in HR quali parametri minimi per ottenere un'adeguata sensibilità strumentale;

- verificare che la variazione del segnale sulle masse del ^7Li , ^{115}In e ^{238}U in LR sia $\leq 5\%$ per ciascun elemento, espressa come deviazione standard relativa percentuale (DSR%), quale parametro minimo per ottenere un'adeguata stabilità strumentale;

- verificare che la formazione di ossidi come rapporto $^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}/^{137}\text{Ba}$ in LR sia $\leq 0,01$;
- verificare che la formazione di doppie cariche come rapporto $^{137}\text{Ba}^{++}/^{137}\text{Ba}^+$ in LR sia $\leq 0,06$.

I valori di sensibilità, stabilità, ossidi e doppie cariche necessari prima di eseguire l'analisi dei campioni mediante HR-ICP-MS sono riassunti in Tabella 3. Qualora non siano raggiunti tali valori variare opportunamente il settaggio dell'RF, la posizione della torcia, i flussi dei gas e del campione, le lenti ottiche, ecc.

Nota. Nel caso di utilizzo di uno strumento ICP-MS differente è necessario procedere con l'ottimizzazione secondo le istruzioni riportate nel manuale d'uso.

Tabella 3. Valori di sensibilità, stabilità, formazione di ossidi e doppie cariche necessari prima di eseguire l'analisi dei campioni mediante HR-ICP-MS

Parametro	Segnale	Valore richiesto
Sensibilità	Intensità ^{115}In in LR	$\geq 8 \times 10^5$ cps/1 $\mu\text{g/L}$
Sensibilità	Intensità ^{115}In in MR	$\geq 7 \times 10^4$ cps/1 $\mu\text{g/L}$
Sensibilità	Intensità ^{115}In in HR	$\geq 1,5 \times 10^4$ cps/1 $\mu\text{g/L}$
Stabilità	DSR% su ^7Li , ^{115}In e ^{238}U (in LR)	$\leq 5\%$
Formazione ossidi	Intensità $^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}/^{137}\text{Ba}$ (in LR)	$\leq 0,01$
Formazione doppie cariche	Intensità $^{137}\text{Ba}^{++}/^{137}\text{Ba}$ (in LR)	$\leq 0,06$

7.3 **Calibrazione delle masse.** La calibrazione delle masse sulle tre risoluzioni (LR, MR e HR) deve essere effettuata nei seguenti casi:

- nel caso di prolungata inattività dello strumento;
- nel caso in cui venga mosso o spostato lo strumento;
- dopo l’installazione o l’aggiornamento del software;
- nel caso in cui lo strumento venga spento completamente e/o vengano meno le condizioni di vuoto;
- nel caso in cui le condizioni ambientali della stanza (temperatura e umidità) siano o siano state molto instabili.

In queste situazioni, si deve procedere come segue:

- aspirare la soluzione di *tuning* (3.11) preparata secondo quanto riportato in 6.6;
- verificare che i segnali delle masse degli elementi siano correttamente assegnati e centrati all’interno delle relative finestre di massa in ciascuna risoluzione (LR, MR e HR);
- controllare che la curva di calibrazione sia continua lungo lo spettro di masse e che non presenti andamenti anomali.

Nota. Nel caso di utilizzo di uno strumento ICP-MS differente è necessario procedere con la calibrazione delle masse secondo le istruzioni riportate nel manuale d’uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

È necessario eseguire le operazioni di raccolta e conservazione del campione in modo tale da garantire il più possibile la stabilità e l'omogeneità del campione e l'assenza di fenomeni di contaminazione e/o perdita degli elementi causati dall'ambiente di laboratorio, dall'operatore, dal materiale e dai reagenti usati. Si suggeriscono, pertanto, alcune misure di sicurezza da osservare:

- uso di un laboratorio di Classe 100 (numero di particelle di grandezza maggiore di 0,5 μm inferiore a 100 per 30 cm^3 di aria);
- uso di una cappa chimica aspirante;
- decontaminazione delle superfici di lavoro;
- uso di appositi indumenti come camici e guanti monouso *powder-free*.

8.1. **Raccolta dei campioni di prova (3.1).** I campioni di siero e sangue vengono raccolti in provette *metal-free* specifiche per l'analisi degli elementi in traccia (5.1.1, 5.1.3). L'urina viene raccolta in contenitori (5.1.2) previamente decontaminati secondo la procedura descritta in 5.1 (Nota).

8.2. **Conservazione dei campioni di prova (3.1).** La temperatura e la durata del periodo di conservazione possono inficiare il risultato analitico. A temperatura ambiente il materiale biologico va incontro a rapide degradazioni/trasformazioni (chimiche, microbiologiche e/o enzimatiche). L'abbassamento della temperatura e alcuni accorgimenti (es. acidificazione del campione di urina) riducono l'entità e la velocità di tali trasformazioni. L'appropriata conservazione riduce anche i fenomeni di adsorbimento/rilascio dell'elemento dai contenitori utilizzati per la raccolta. A tal fine, la procedura di conservazione è la seguente:

- acidificare il campione di urina pervenuto al laboratorio aggiungendo una quantità di HNO_3 (6.1.2) circa pari all'1% (v/v) del campione;
- conservare i campioni di siero, urina e sangue alla temperatura di $+4^\circ\text{C}$ se il trattamento e l'analisi vengono effettuati entro periodi di tempo brevi (minori di 1 settimana) e alla temperatura di -20°C se il trattamento e l'analisi vengono effettuati dopo periodi di tempo maggiori di 1 settimana.

9. TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

9.1 **Trattamento dei campioni di prova (3.1).** Preparare almeno 2 aliquote indipendenti per ciascun campione di prova pervenuto al laboratorio. Il trattamento dipende dalla matrice da analizzare e viene effettuato come segue:

– *Siero e urina*

Prima di effettuare il prelievo dell'aliquota di siero o urina, agitare il campione di prova (3.1) con un miscelatore (5.1.9) al fine di ottenere un campione il più possibile omogeneo.

Pipettare un volume di 1000 μL di campione in una provetta in polistirene da 15 mL (5.1.5) aggiungere 50 μL di HNO_3 (6.1.2), 50 μL della soluzione degli standard interni (soluzione E, 6.5) e 3900 μL di acqua deionizzata ultrapura (6.1.1). Agitare il campione di analisi (3.2) e procedere alla determinazione degli elementi (Sezione 13). Il fattore di diluizione (pari a 5) dei campioni di analisi deve essere considerato nel calcolo della concentrazione finale degli elementi nel campione di prova (Sezione 14).

– *Sangue*

Prima di effettuare il prelievo dell'aliquota di sangue, agitare il campione di prova (3.1) con un miscelatore (5.1.9) al fine di ottenere un campione il più possibile omogeneo. Pipettare un volume di 1000 μL di campione in una provetta in polistirene da 15 mL (5.1.5), aggiungere 2000 μL di HNO_3 (6.1.2) e sottoporre a mineralizzazione a $80\pm 3^\circ\text{C}$ per 3 ore su piastra riscaldante (5.1.8). Dopo aver lasciato raffreddare a temperatura ambiente la provetta contenente la soluzione, pipettare 1000 μL di tale soluzione in un'altra provetta di polistirene da 15 mL, aggiungere 50 μL della soluzione degli standard interni (soluzione E, 6.5) e 3950 μL di acqua deionizzata ultrapura (6.1.1). Agitare il campione di analisi (3.2) e procedere alla determinazione degli elementi (Sezione 13).

Il fattore di diluizione (pari a 15) dei campioni di analisi deve essere considerato nel calcolo della concentrazione finale degli elementi nel campione di prova (Sezione 14).

Nel caso in cui il campione di prova pervenuto al laboratorio contenga un elemento a concentrazione fuori dall'intervallo di linearità del metodo (10.3), è possibile effettuare una diluizione maggiore aggiustando, di conseguenza, il volume dei reagenti e della soluzione degli standard interni da aggiungere al campione.

Nel caso in cui pervenga al laboratorio una quantità ridotta di campione di prova, è possibile prelevarne un volume minore aggiustando, di conseguenza, il volume dei reagenti e della soluzione degli standard interni da aggiungere al campione.

Nota. Qualsiasi deviazione dalla procedura di trattamento proposta deve produrre dei campioni le cui analisi soddisfino i requisiti minimi richiesti per il programma di controllo della qualità (Sezione 12).

9.2 **Trattamento del bianco reagente (3.3).** Preparare almeno 2 aliquote indipendenti di bianco reagente. Tale campione deve contenere i reagenti negli stessi volumi usati per il trattamento dei campioni di prova (9.1) secondo quanto segue:

- *Bianco reagente per l'analisi di siero e urina*
Pipettare un volume di 4900 µL di acqua deionizzata ultrapura (6.1.1) in una provetta in polistirene da 15 mL (5.1.5), aggiungere 50 µL di HNO₃ (6.1.2) e 50 µL della soluzione degli standard interni (soluzione E, 6.5). Agitare il campione del bianco reagente e procedere alla determinazione degli elementi (Sezione 13).
- *Bianco reagente per l'analisi del sangue*
Pipettare un volume di 1000 µL di acqua deionizzata ultrapura (6.1.1) in una provetta in polistirene da 15 mL (5.1.5), aggiungere 2000 µL di HNO₃ (6.1.2) e sottoporre a mineralizzazione a 80±3°C per 3 ore su piastra riscaldante (5.1.8). Dopo aver lasciato raffreddare a temperatura ambiente la provetta contenente la soluzione, pipettare 1000 µL di tale soluzione in un'altra provetta di polistirene da 15 mL, aggiungere 50 µL della soluzione degli standard interni (soluzione E, 6.5) e 3950 µL di acqua deionizzata ultrapura. Agitare il campione del bianco reagente e procedere alla determinazione degli elementi (Sezione 13).
Il valore del bianco reagente deve essere sottratto al valore della concentrazione degli elementi nel campione di analisi (Sezione 14).

Nota. Qualora il valore del bianco non rispetti il requisito minimo di accettabilità (12.1.2) vi è evidenza di contaminazione degli elementi e/o dei loro interferenti. In tal caso, occorre eliminare o ridurre a livelli trascurabili la causa della contaminazione secondo quanto riportato in 12.1.2.

9.3 Trattamento del campione MRC (3.4). Preparare almeno 2 aliquote indipendenti per ciascun campione MRC (5.1.10). I campioni se in forma liofilizzata devono essere ricostituiti aggiungendo acqua deionizzata ultrapura (6.1.1) secondo le indicazioni fornite dal produttore. Agitare il campione ricostituito con un miscelatore (5.1.9) al fine di ottenere una soluzione il più possibile omogenea. Il trattamento del campione MRC viene effettuato seguendo la procedura descritta per i campioni di prova (9.1). I campioni MRC servono per verificare l'esattezza media percentuale (\overline{Esatt} %) del metodo (10.4) in fase di validazione.

Nota. I campioni MRC, una volta ricostituiti, possono essere conservati alla temperatura di -20°C per le analisi successive.

9.4 Trattamento del campione per il calcolo del recupero (3.5): Preparare un campione (o *pool* di campioni) non fortificato (L0: livello di base) e lo stesso campione (o *pool* di campioni) fortificato ad almeno 2 livelli di fortificazione (es. L1: livello basso; L2: livello alto) per gli elementi non certificati nei campioni MRC. Tali livelli devono ricadere all'interno dell'intervallo di linearità del metodo (10.3). L'aggiunta (*spike*) degli elementi deve essere effettuata direttamente sul campione di prova (o *pool* di campioni di prova) e solo successivamente il campione fortificato viene trattato seguendo la procedura descritta in 9.1.

Gli elementi non certificati nei campioni MRC usati nel metodo sono i seguenti: Ir, Pd, Pt e Rh. A tal fine, aggiungere ad un campione (o *pool* di campioni) di siero o urina volumi appropriati della soluzione C (6.3) per preparare idonei livelli di concentrazione finale. I campioni L0, L1 e L2 vengono usati per verificare il recupero medio percentuale (\overline{Rec} %) del metodo (10.4) in fase di validazione.

- 9.5 **Trattamento del campione per il calcolo della precisione (3.6).** Preparare un campione (o *pool* di campioni) non fortificato (L0: livello di base) e lo stesso campione (o *pool* di campioni) fortificato ad almeno 2 livelli di fortificazione (es. L1: livello basso; L2: livello alto) per tutti gli elementi del metodo. Tali livelli devono ricadere all'interno dell'intervallo di linearità del metodo (10.3). L'aggiunta (*spike*) degli elementi deve essere effettuata direttamente sul campione di prova (o *pool* di campioni di prova) e solo successivamente il campione fortificato viene trattato seguendo la procedura descritta in 9.1.

A tal fine, aggiungere ad un campione (o *pool* di campioni) di siero, urina o sangue volumi appropriati delle soluzioni A, B, C e D (6.3) per preparare idonei livelli di concentrazione finale. I campioni L0, L1 e L2 vengono usati per verificare la precisione del metodo in condizione di ripetibilità (10.5) e di riproducibilità intra-laboratorio (10.6) in fase di validazione.

- 9.6 **Trattamento del campione di controllo della qualità (3.7).**

– *Per il programma CQI*

Preparare un campione fortificato per tutti gli elementi del metodo. Il livello di fortificazione scelto deve ricadere all'interno della retta di taratura (6.4) e deve essere prossimo al livello atteso nel campione di prova. L'aggiunta (*spike*) degli elementi deve essere effettuata direttamente sul campione di prova (o *pool* di campioni di prova) e solo successivamente il campione fortificato viene trattato seguendo la procedura descritta in 9.1.

A tal fine, aggiungere ad un campione (o *pool* di campioni) di siero, urina o sangue volumi appropriati delle soluzioni A, B, C e D (6.3) per preparare un idoneo livello di concentrazione finale. Il campione CQI viene usato per verificare il recupero medio percentuale ($\overline{Rec}\%$) (12.1.3), la deriva strumentale (*Deriva%*) (12.1.4), il limite di ripetibilità (12.1.5) durante la sequenza analitica giornaliera e il controllo statistico del metodo nel tempo (12.1.6).

– *Per il programma CQE*

Preparare almeno 2 aliquote indipendenti del campione CQE (3.7). Il trattamento viene effettuato seguendo la procedura descritta per i campioni di prova (9.1). Il campione CQE viene usato per la verifica periodica delle prestazioni del laboratorio (12.2).

Nota. Il campione CQI inserito e letto ripetutamente in ogni sequenza analitica giornaliera può anche essere rappresentato da un campione MRC (9.3). L'utilizzo di un campione fortificato per tutti gli elementi del metodo è consigliato per eludere la difficoltà e il costo di reperimento di consistenti quantitativi di campione MRC.

10. VALIDAZIONE INTRA-LABORATORIO (*IN-HOUSE*)

La verifica dell' idoneità del metodo e dell' attendibilità dei risultati è valutata mediante validazione *in-house*. Tale studio è stato eseguito sulla base dell' esperienza acquisita dal laboratorio (Bocca *et al.*, 2010; Bocca *et al.*, 2011a; Bocca *et al.*, 2011b; Alimonti *et al.*, 2011) e dei riferimenti normativi internazionalmente riconosciuti (Thompson & Wood, 1995; AOAC 1998; Thompson *et al.*, 2002; CITAC, EURACHEM, 2002; LGC, 2003; Magnusson & Örnemark, 2014; ISO 5725:2004). Fornisce la stima delle caratteristiche prestazionali del metodo e dei fattori che incidono, in maniera significativa, sull' incertezza da associare ai risultati, secondo quanto richiesto dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005.

I parametri utilizzati per definire le caratteristiche prestazionali sono i seguenti:

- specificità (3.14);
- LoD e LoQ (3.15, 3.16);
- linearità (3.17);
- esattezza e/o recupero (3.19, 3.20);
- precisione in condizioni di ripetibilità (3.23);
- precisione in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio (3.25).

I dati della validazione sono valutati a fronte di requisiti minimi di accettabilità predefiniti dal laboratorio e/o sulla base dei risultati ottenuti dopo applicazione di idonei test di significatività. Tali dati sono indispensabili per stimare quantitativamente le componenti per il calcolo dell' incertezza tipo composta del metodo (u_c) (3.31; 11.3).

10.1 Specificità (3.14). Lo studio delle interferenze (Sezione 4) che possono causare un aumento apparente del segnale dell' elemento da determinare prevede una o più delle seguente procedure:

- scelta di un isotopo alternativo dell' elemento da determinare libero da interferenza;
- identificazione della Ris strumentale dello spettrometro HR-ICP-MS alla quale il segnale dell' interferente è separato inequivocabilmente da quello dell' elemento da determinare;
- calcolo di adeguate equazioni di correzione, tramite aggiunta deliberata dell' interferente al campione di analisi (3.2), per sottrarre il contributo del segnale dell' interferente da quello dell' elemento da determinare;
- conferma che, alle condizioni scelte, le interferenze risultino risolte, trascurabili o adeguatamente corrette (es. attraverso l' analisi di campioni MRC).

Le interferenze che cadono sulle masse analitiche selezionate degli elementi sono riportate nella Tabella 2 (pag. 13), insieme alle procedure scelte per la loro separazione e/o correzione.

10.2 LoD (3.15) e LoQ (3.16). Sono determinati attraverso l' analisi di almeno 10 aliquote del campione di prova (3.1) (o *pool* di campioni) che subiscono l' intera procedura di trattamento descritta in 9.1. Si consiglia di eseguire due letture ($n=2$) per ogni aliquota. Si raccomanda di utilizzare un campione di prova che contenga gli elementi ad un livello di concentrazione bassa o trascurabile.

Il LoD e LoQ sono calcolati come la concentrazione corrispondente a multipli dello scarto tipo secondo le formule:

$$LoD = 3 \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$LoQ = 10 \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

s = scarto tipo delle 10 aliquote;

n = numero di letture su ogni aliquota del campione (es. $n=2$).

In generale, il LoD e il LoQ del metodo devono essere tali da poter determinare l'elemento al livello richiesto nello specifico programma di biomonitoraggio. È comunque possibile quantificare gli elementi a concentrazioni tra il LoD e il LoQ anche se il dato sarà caratterizzato da minore accuratezza e precisione.

I valori di LoD e LoQ alle masse selezionate sono riportati in Tabella 4.

Nota. Il LoD e il LoQ del metodo devono essere determinati per ogni matrice biologica separatamente e riverificati ogni volta che si osservano rilevanti cambiamenti nelle prestazioni strumentali.

Tabella 4. Limite di rivelabilità (LoD) e limite di quantificazione (LoQ) degli elementi in siero, urina e sangue e intervallo di linearità del metodo

Elemento	Unità di misura	Siero			Urina			Sangue		
		LoD	LoQ	Linearità	LoD	LoQ	Linearità	LoD	LoQ	Linearità
⁷⁵ As	µg/L	0,15	0,50	1,25-1000	0,92	3,04	1,25-1000	-	-	-
¹¹⁴ Cd	µg/L	0,05	0,17	0,125-100	0,01	0,03	0,125-100	0,24	0,79	0,50-500
⁵⁹ Co	µg/L	0,03	0,10	0,125-100	0,02	0,07	0,125-100	-	-	-
⁵² Cr	µg/L	0,01	0,03	0,125-100	0,01	0,03	0,125-100	-	-	-
²⁰² Hg	µg/L	0,16	0,53	0,25-100	0,25	0,82	0,25-100	0,48	1,58	0,50-500
¹⁹³ Ir	ng/L	0,50	1,65	12,5-10000	0,50	1,65	12,5-10000	-	-	-
⁵⁵ Mn	µg/L	0,01	0,03	0,125-100	0,02	0,07	0,125-100	0,47	1,55	0,50-500
¹⁰⁰ Mo	µg/L	0,12	0,40	1,25-1000	1,0	3,3	1,25-1000	-	-	-
⁶⁰ Ni	µg/L	0,07	0,23	0,125-100	0,12	0,40	0,125-100	-	-	-
²⁰⁸ Pb	µg/L	0,04	0,13	0,125-100	0,13	0,43	0,125-100	0,45	1,48	0,50-500
¹⁰⁶ Pd	ng/L	3,1	10,2	12,5-10000	7,7	25,4	12,5-10000	-	-	-
¹⁹⁵ Pt	ng/L	0,74	2,44	12,5-10000	1,34	4,42	12,5-10000	-	-	-
¹⁰³ Rh	ng/L	2,0	6,6	12,5-10000	6,7	22,1	12,5-10000	-	-	-
¹²¹ Sb	µg/L	0,01	0,03	0,125-100	0,01	0,03	0,125-100	-	-	-
¹²⁰ Sn	µg/L	0,06	0,20	0,125-100	0,04	0,13	0,125-100	-	-	-
²⁰⁵ Tl	µg/L	0,01	0,03	0,125-100	0,03	0,10	0,125-100	-	-	-
⁵¹ V	µg/L	0,01	0,03	0,125-100	0,01	0,03	0,125-100	-	-	-
¹⁸⁴ W	µg/L	0,02	0,07	0,125-100	0,01	0,03	0,125-100	-	-	-

10.3 Linearità (3.17). Viene determinata attraverso l'analisi di campioni fortificati mediante aggiunte note (*spike*) adeguatamente distribuite tra un limite inferiore (per es., il valore del LoD o del LoQ del metodo) e un limite superiore significativamente più alto della concentrazione attesa nel campione. Per ogni livello di concentrazione viene eseguita l'analisi in duplicato. La risposta strumentale viene graficata in funzione della concentrazione misurata e la relazione fra le due viene espressa attraverso il coefficiente di correlazione lineare (r). In un metodo multielementare, è possibile considerare come requisito minimo di accettabilità un valore di r che sia almeno $\geq 0,990$ per ciascun elemento.

Gli intervalli di concentrazione all'interno dei quali il metodo risulta lineare alle masse selezionate sono riportati in Tabella 4.

Nota. La linearità deve essere determinata per ogni matrice biologica separatamente e riverificata ogni volta che si osservano cambiamenti rilevanti nelle prestazioni strumentali.

10.4 Esattezza (3.19) e/o recupero (3.20). Sono determinati attraverso analisi di 10 aliquote indipendenti del campione MRC (3.4) o dei campioni fortificati (3.5) che subiscono l'intera procedura di trattamento descritta in 9.3 e 9.4. Dato che il *bias* di un metodo può variare in funzione della matrice e del livello di concentrazione dell'elemento, si raccomanda di analizzare vari campioni MRC e vari livelli di fortificazione.

A tal fine, preparare campioni di vari MRC per ciascuna matrice in studio (5.1.10) e diversi livelli (es. L1 e L2) di fortificazione. L'esattezza media percentuale ($\overline{Esatt}\%$) e il recupero medio percentuale ($\overline{Rec}\%$) sono calcolati secondo le formule:

$$\overline{Esatt}\% = \left(\frac{\overline{C}_{oss}}{C_{MRC}} \right) \times 100$$

\overline{C}_{oss} = concentrazione media dell'elemento misurato nel campione MRC;
 C_{MRC} = concentrazione certificata dell'elemento nel campione MRC.

$$\overline{Rec}\% = \left(\frac{\overline{C}_{oss} - \overline{C}_{nativo}}{C_{spike}} \right) \times 100$$

\overline{C}_{oss} = concentrazione media dell'elemento misurata nel campione fortificato;
 \overline{C}_{nativo} = concentrazione media dell'elemento misurata nello stesso campione non fortificato;
 C_{spike} = concentrazione aggiunta (*spike*) dell'elemento.

La media delle misurazioni viene poi comparata con il valore di riferimento certificato del campione MRC o teorico dello *spike*. Per un metodo multielementare, è possibile considerare come requisito minimo di accettabilità un valore di $\overline{Esatt}\%$ e/o $\overline{Rec}\%$ che cada all'interno del $\pm 20\%$ per gli elementi a livello di $\mu\text{g/L}$ e $\pm 25\%$ per gli elementi a livello di ng/L e, in ogni caso, al livello di fortificazione più alto (L2) dovrebbe corrispondere un $\overline{Rec}\%$ maggiore.

I valori dell'esattezza o recupero ottenuti applicando il metodo sono riportati in Tabella 5 per il siero, l'urina e il sangue.

Nota 1. L'incertezza associata all'errore sistematico (11.2.1; 11.2.2) viene usata per il calcolo dell'incertezza composta del metodo (11.3).

Nota 2. Il *bias* è anche monitorato nel tempo attraverso l'analisi del campione CQI durante ogni sequenza analitica giornaliera (12.1.3).

Tabella 5. Valori di esattezza, recupero e precisione in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio ottenuti applicando il metodo

Elemento	Unità di misura	C_{MRC}	C_{spike}	\bar{C}_{oss}	$\overline{Esatt} \% \text{ o } \overline{Rec} \%$	$\overline{CV}_R \%$
Matrice siero						
As	µg/L	1,3	-	1,3	100	24
Cd	µg/L	0,50	-	0,50	100	17
Co	µg/L	0,23	-	0,24	104	18
Cr	µg/L	0,54	-	0,57	105	16
Hg	µg/L	1,1	-	1,1	100	19
Ir	ng/L	-	100	117	117	29
Mn	µg/L	8,9	-	8,1	91	19
Mo	µg/L	0,52	-	0,55	106	16
Ni	µg/L	4,0	-	4,2	105	23
Pb	µg/L	2,9	-	3,0	103	18
Pd	ng/L	-	100	82	82	33
Pt	ng/L	-	100	111	111	28
Rh	ng/L	-	100	107	107	35
Sb	µg/L	51,6	-	53,5	104	25
Sn	µg/L	1,24	-	1,30	105	18
Tl	µg/L	0,029	-	0,031	107	14
V	µg/L	0,71	-	0,79	111	19
W	µg/L	0,15	-	0,15	100	20
Matrice urina						
As	µg/L	142	-	156	110	12
Cd	µg/L	4,6	-	5,1	112	6,1
Co	µg/L	10,0	-	9,7	97	7,7
Cr	µg/L	19,7	-	19,6	100	17
Hg	µg/L	40,7	-	50,5	124	15
Ir	ng/L	-	100	128	128	28
Mn	µg/L	12,3	-	11,3	92	20
Mo	µg/L	49,3	-	49,5	100	1,7
Ni	µg/L	50,4	-	52,7	105	9,0
Pb	µg/L	40,3	-	109	109	10
Pd	ng/L	-	100	125	125	22
Pt	ng/L	-	100	85,0	85	15
Rh	ng/L	-	100	115	115	16
Sb	µg/L	99,9	-	108	109	11
Sn	µg/L	54,6	-	57,0	104	13
Tl	µg/L	9,26	-	10,6	114	2,2
V	µg/L	25,2	-	25,6	102	13
W	µg/L	0,17	-	0,14	82	7,4
Matrice sangue						
Cd	µg/L	0,67	-	0,72	107	17
Hg	µg/L	1,97	-	2,07	105	9,6
Mn	µg/L	20,1	-	20,2	100	11
Pb	µg/L	14,8	-	16,2	109	6,9

C_{MRC} : concentrazione certificata dell'elemento nei seguenti campioni MRC: *Lyophilized Human Serum level I*, *Lyophilized Human Urine level II*; *Lyophilized Human Blood level I* (Seronorm, Billingstad, Norvegia);

C_{spike} : concentrazione aggiunta (*spike*) dell'elemento;

\bar{C}_{oss} : concentrazione media osservata dell'elemento;

$\overline{Esatt} \%$: esattezza media % dell'elemento;

$\overline{Rec} \%$: recupero medio % dell'elemento;

$\overline{CV}_R \%$: coefficiente di variazione medio % dell'elemento al livello di base (L0).

- 10.5 **Precisione in condizioni di ripetibilità (3.23):** Viene determinata attraverso l'analisi di almeno 10 aliquote indipendenti del campione (o *pool* di campioni) non fortificato (L0: livello di base) e dello stesso campione (o *pool* di campioni) fortificato a due livelli (es. L1 e L2) di concentrazione, che subiscono l'intera procedura di trattamento descritta in 9.5. L'analisi è effettuata dallo stesso operatore, con la stessa strumentazione e nella stessa giornata analitica. La ripetibilità viene espressa secondo la formula:

$$\overline{CV}_r \% = \left(\frac{s_r}{\bar{x}} \right) \times 100$$

\bar{x} = media delle 10 misurazioni;

s_r = scarto tipo di ripetibilità delle 10 misurazioni.

I valori del \overline{CV}_r % variano al variare del livello (es. L0, L1 o L2) di concentrazione dell'elemento nel campione e dall'effetto matrice (es. omogeneità). In un metodo multi-elementare, è possibile considerare come requisito minimo di accettabilità un \overline{CV}_r % che sia <15% per gli elementi a livello di $\mu\text{g/L}$ e <25% per gli elementi a livello di ng/L e, in ogni caso, al livello di fortificazione più alto (L2) dovrebbe corrispondere un \overline{CV}_r % minore.

Il limite di ripetibilità (r) (3.24) viene calcolato a partire dai valori di s_r secondo la formula:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r$$

t = variabile di Student per $(n-1)$ gradi di libertà al livello di confidenza del 95%.

Tale parametro rappresenta la differenza massima ammissibile tra due aliquote indipendenti del campione ed è utilizzato per verificare se il metodo opera in condizioni di ripetibilità (la differenza fra le due aliquote indipendenti, in termini di concentrazione, deve essere \leq di r) (12.1.5).

Nota. Con cadenza definita dal laboratorio, ma non inferiore a due volte l'anno, è consigliato riverificare la ripetibilità del metodo.

- 10.6 **Precisione in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio (3.25):** Viene determinata attraverso l'analisi di almeno 10 aliquote indipendenti del campione (o *pool* di campioni) non fortificato (L0: livello di base) e dello stesso campione (o *pool* di campioni) fortificato a due livelli (es. L1 e L2) di concentrazione, che subiscono l'intera procedura di trattamento descritta in 9.5. L'analisi è effettuata da operatori diversi in un minimo di tre giornate di analisi a distanza di tempo, variando quanto più possibile i parametri del metodo. I parametri da variare possono includere:

- taratura: preparare la retta di taratura di fresco in ogni giornata di analisi prevedendo anche l'uso di soluzioni di riferimento monoelementari di differenti produttori;
- materiali e reagenti (es. usare pipette di differenti produttori);
- condizioni strumentali: eseguire l'ottimizzazione dello strumento in ogni giornata di analisi prevedendo piccole variazioni di alcuni parametri strumentali (es. flusso del gas di trasporto del campione, RF).

La riproducibilità intra-laboratorio viene espressa secondo la formula:

$$\overline{CV}_R \% = \left(\frac{s_R}{\bar{x}} \right) \times 100$$

\bar{x} = media delle 10 misurazioni:

s_R = scarto tipo di riproducibilità delle 10 misurazioni.

I valori del $\overline{CV}_R\%$ variano al variare del livello (es. L0, L1 e L2) di concentrazione dell'elemento nel campione e dall'effetto matrice (es. omogeneità). In un metodo multielementare, è possibile considerare come requisito minimo di accettabilità un $\overline{CV}_R\%$ che sia $< 25\%$ per gli elementi a livello di $\mu\text{g/L}$ e $< 35\%$ per gli elementi a livello di ng/L e, in ogni caso, al livello di fortificazione più alto (L2) dovrebbe corrispondere un $\overline{CV}_R\%$ minore.

I valori della precisione in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio ottenuti applicando il metodo sono riportati in Tabella 5 per il siero, l'urina e il sangue.

Il limite di riproducibilità intra-laboratorio (R) (3.26) viene calcolato a partire dai valori di s_R secondo la formula:

$$R = \sqrt{2} \times t \times s_R$$

t = variabile di Student per $(n-1)$ gradi di libertà al livello di confidenza del 95%.

Tale parametro rappresenta la differenza massima ammissibile tra due aliquote indipendenti del campione ed è utilizzato per verificare se il metodo opera in condizioni di riproducibilità (la differenza fra le due aliquote indipendenti, in termini di concentrazione, deve essere \leq di R).

Nota 1. Con cadenza definita dal laboratorio, ma non inferiore a due volte l'anno, è consigliato rivedere la riproducibilità intra-laboratorio del metodo.

Nota 2. La riproducibilità intra-laboratorio, a differenza della ripetibilità, comprende tutte le possibili fonti di variazione che normalmente gravano sul lavoro routinario del laboratorio (es. operatori, apparecchiature, materiali e soluzioni di riferimento, tempi, temperatura, ecc.), perciò, l'incertezza associata alla riproducibilità intra-laboratorio (11.2.3) viene usata per il calcolo dell'incertezza composta del metodo (11.3).

11. STIMA DELL'INCERTEZZA ESTESA

La stima dell'incertezza di misura è stata valutata ed espressa seguendo le indicazioni fornite da norme e linee guida riconosciute nel settore (Barwick & Ellison, 2000; UNI CEI ENV 13005:2000; European Accreditation Expert group, 2003; EUROLAB Technical Report No 1/2007; ISO 21748:2010; Ellison *et al.*, 2014). L'approccio generale prevede le seguenti fasi:

- Fase 1. Identificazione delle fonti d'incertezza (11.1)
- Fase 2. Quantificazione delle componenti dell'incertezza (11.2)
- Fase 3. Combinazione delle componenti per ottenere l'incertezza tipo composta (u_c) del metodo (11.3)
- Fase 4. Calcolo dell'incertezza estesa (U) del metodo (11.4)

La norma ISO 21748:2010 suggerisce l'approccio top-down (olistico) per il calcolo dell'incertezza composta utilizzando dati di accuratezza e precisione ottenuti in fase di validazione del metodo. Successivamente, si identificano le componenti residue non adeguatamente valutate negli studi di accuratezza e precisione, e qualora significative, si quantificano e combinano nel calcolo dell'incertezza composta.

11.1 Identificazione delle fonti d'incertezza. Le fonti che possono contribuire all'incertezza associata alla misura di un elemento nel siero, urina e sangue sono le seguenti:

- materiali e apparecchiature (es. purezza dei reagenti, del campione MRC e delle soluzioni monoelementari, taratura delle pipette);
- effetti del campione (es. omogeneità, stabilità e comportamento dello *spike* aggiunto alla matrice);
- condizioni di misurazione (es. temperatura e umidità del laboratorio, linearità della retta di taratura, uso della standardizzazione interna);
- effetti legati all'operatore;
- altri possibili effetti casuali.

Le fonti elencate non sono tutte indipendenti, ma alcune di esse sono correlate fra loro. Pertanto, il procedimento di calcolo dell'incertezza di misura viene semplificato raggruppando le fonti e quantificando l'incertezza dovuta alle componenti raggruppate (11.2).

11.2 Quantificazione delle componenti dell'incertezza. Le componenti dell'incertezza considerate sono le seguenti:

- *incertezza associata all'accuratezza del metodo*
calcolata a partire dallo studio dell'esattezza e del recupero (10.4). Tale componente rappresenta l'incertezza associata all'errore di tipo sistematico del metodo e comprende fonti d'incertezza quali purezza dei reagenti, dei campioni MRC e delle soluzioni di riferimento ed effetti dovuti al campione (es. omogeneità, stabilità).
- *incertezza associata alla precisione del metodo*
calcolata a partire dallo studio della precisione in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio (10.6). Tale componente rappresenta l'incertezza associata all'errore di tipo casuale e comprende fonti di incertezza quali operatore, apparecchiature (es.

taratura delle pipette), condizioni di misurazione (es. temperatura del laboratorio, linearità della retta di taratura) e altri possibili effetti casuali.

– *incertezza associata ad altre fonti*

comprende le altre potenziali fonti di incertezza non incluse nello studio dell'esattezza/recupero e della precisione (es. comportamento dello *spike* aggiunto alla matrice).

Ogni componente viene espressa con le dimensioni di uno scarto tipo e rappresenta quindi l'incertezza tipo (u) (3.27).

11.2.1 **Incetezza tipo dell'esattezza ($u_{\overline{Esatt}}$) (3.28).** Viene misurata secondo la formula:

$$u_{\overline{Esatt}} = \overline{Esatt} \times \sqrt{\left(\frac{u_{MRC}}{\overline{C}_{MRC}}\right)^2 + \left(\frac{s_{oss}}{\overline{C}_{oss} \sqrt{n}}\right)^2}$$

Il termine \overline{Esatt} corrisponde all'esattezza media del metodo per ciascun elemento ottenuta in fase di validazione (10.4) tramite misure ripetute del campione MRC (9.3).

Nel primo termine sotto radice quadrata, u_{MRC} corrisponde all'incertezza associata al valore certificato dal produttore per ciascun elemento nel campione MRC (5.1.10) ed è calcolata secondo la formula:

$$u_{MRC} = \frac{DS_{certif}}{\sqrt{6}}$$

dove DS_{certif} è la deviazione standard certificata per ciascun elemento e $\sqrt{6}$ è il fattore che tiene conto della distribuzione triangolare dei valori intorno al valore medio assumendo, quindi, che tale distribuzione sia simmetrica. Il valore di \overline{C}_{MRC} rappresenta la concentrazione certificata dell'elemento nel campione MRC.

Nel secondo termine sotto radice quadrata, s_{oss} è lo scarto tipo dei valori e \overline{C}_{oss} è il valore medio dell'elemento nel campione MRC, mentre n corrisponde al numero di misurazioni effettuate per stimare l'esattezza media.

Il contributo dell'esattezza e della sua incertezza viene considerato nel calcolo dell'incertezza composta del metodo dopo applicazione di un test di significatività (es. t-test) per verificare se l'esattezza sia o non sia significativamente diversa da 1. Il valore osservato di t_{oss} si calcola secondo la formula:

$$t_{oss} = \frac{|1 - \overline{Esatt}|}{u_{\overline{Esatt}}}$$

Questo valore viene confrontato con il valore critico (t_{crit}) per $(n-1)$ gradi di libertà al livello di confidenza del 95% dove n è il numero di misurazioni effettuate per stimare l'esattezza media. Se t_{oss} è minore di t_{crit} allora l'esattezza non è significativamente diversa da 1 e l'incertezza è calcolata secondo la formula:

$$u_{\overline{Esatt}'} = \frac{t_{crit} \times u_{\overline{Esatt}}}{1,96}$$

Se t_{oss} è maggiore di t_{crit} allora l'esattezza è significativamente diversa da 1 e l'incertezza è calcolata secondo la formula:

$$u_{\overline{Esatt}} = \sqrt{\left(\frac{1-\overline{Esatt}}{k}\right)^2 + (u_{\overline{Esatt}})^2}$$

Con k che corrisponde al fattore di copertura che sarà utilizzato nel calcolo dell'incertezza estesa (U) (11.4).

I valori dell'incertezza tipo dell'esattezza sono calcolati scegliendo, per ciascuna matrice in studio (5.1.10), il campione MRC che contiene concentrazioni comparabili al valore atteso nei campioni di prova.

11.2.2 Incertezza tipo del recupero ($u_{\overline{Rec}}$) (3.29). Viene misurata secondo la formula:

$$u_{\overline{Rec}} = \overline{Rec} \times \sqrt{\left(\frac{u_{spike}}{C_{spike}}\right)^2 + \left(\frac{s_{oss}}{(\overline{C}_{oss} - \overline{C}_{nativo})\sqrt{n}}\right)^2}$$

Il termine \overline{Rec} corrisponde al recupero medio del metodo per ciascun elemento ottenuto in fase di validazione (10.4) tramite misure ripetute del campione fortificato per il calcolo del recupero (9.4).

Nel primo termine sotto radice quadrata, u_{spike} corrisponde all'incertezza associata alle soluzioni di riferimento monoelementari (6.2) utilizzate per fortificare il campione ed è calcolata secondo la formula:

$$u_{spike} = \frac{DS_{certif}}{\sqrt{3}}$$

dove DS_{certif} è la deviazione standard dichiarata dal produttore per ciascuna soluzione monoelementare e $\sqrt{3}$ è il fattore che tiene conto della distribuzione rettangolare dei valori intorno al valore vero assumendo, quindi, che tale distribuzione sia uniforme. Il valore di C_{spike} rappresenta la concentrazione aggiunta (*spike*) dell'elemento.

Nel secondo termine sotto radice quadrata, s_{oss} è lo scarto tipo dei valori e $(\overline{C}_{oss} - \overline{C}_{nativo})$ rappresenta il valore medio dell'elemento nel campione fortificato, mentre n corrisponde al numero di misure effettuate per stimare il recupero medio.

Il contributo del recupero e della sua incertezza viene considerato nel calcolo dell'incertezza composta del metodo dopo applicazione di un test di significatività (es. t-test) per verificare se il recupero sia o non sia significativamente diverso da 1. Il valore osservato di t (t_{oss}) si calcola secondo la formula:

$$t_{oss} = \frac{|1-\overline{Rec}|}{u_{\overline{Rec}}}$$

Questo valore viene confrontato con il valore critico (t_{crit}) per $(n-1)$ gradi di libertà al livello di confidenza del 95% dove n è il numero di misurazioni effettuate per stimare il recupero. Se t_{oss} è minore di t_{crit} allora il recupero non è significativamente diverso da 1 e l'incertezza è calcolata secondo la formula:

$$u_{Rec'} = \frac{t_{crit} \times u_{Rec}}{1,96}$$

Se t_{oss} è maggiore di t_{crit} allora il recupero è significativamente diverso da 1 e l'incertezza è calcolata secondo la formula:

$$u_{Rec''} = \sqrt{\left(\frac{1 - Rec}{k}\right)^2 + (u_{Rec})^2}$$

Con k che corrisponde al fattore di copertura che sarà utilizzato nel calcolo dell'incertezza estesa (U) (11.4).

I valori dell'incertezza tipo del recupero sono calcolati per il livello di concentrazione L0 (livello di base) e i livelli di concentrazione L1 (livello basso) e L2 (livello alto) per ciascuna matrice in studio (siero, urina e sangue).

- 11.2.3 **Incetenza tipo di riproducibilità intra-laboratorio (u_R) (3.30).** Viene misurata a partire dai valori dello scarto tipo di riproducibilità intra-laboratorio per ciascun elemento ottenuti in fase di validazione (10.6) tramite misurazioni ripetute del campione per il calcolo della precisione (9.5), secondo la formula:

$$u_R = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$$

S_R = scarto tipo di riproducibilità intra-laboratorio delle misure;

n = numero di misure effettuate nello studio di riproducibilità intra-laboratorio.

I valori dell'incertezza tipo di riproducibilità intra-laboratorio sono calcolati per il livello di concentrazione L0 (livello di base) e i livelli di concentrazione L1 (livello basso) e L2 (livello alto) per ciascuna matrice in studio (siero, urina e sangue).

- 11.2.4 **Incetenza associata ad altre potenziali fonti.** Gli effetti di altre potenziali fonti d'incetenza sono state valutate separatamente e, per ognuna, sono state fatte le seguenti considerazioni:

– *effetto della standardizzazione interna*

è considerato trascurabile poiché viene aggiunta la stessa quantità di soluzione degli standard interni (es. soluzione E, 6.5) ai livelli per la retta di taratura (6.4) e a tutti i campioni (3.2-3.7);

– *effetto del comportamento dello spike aggiunto al campione*

è considerato trascurabile presupponendo un comportamento simile fra l'elemento aggiunto e l'elemento nativo già presente nel campione.

- 11.3 **Combinazione delle componenti per ottenere l'incetenza tipo composta (u_c) (3.31).** Le componenti significative dell'incetenza individuate e quantificate (11.1, 11.2) sono combinate secondo la formula:

$$u_c = \sqrt{u_{Esatt/Rec}^2 + u_R^2}$$

L'incertezza tipo composta viene calcolata per il livello di concentrazione L0 (livello di base) e i livelli di concentrazione L1 (livello basso) e L2 (livello alto) per ciascuna matrice in studio (siero, urina e sangue).

- 11.4 **Calcolo dell'incertezza estesa (U) (3.32).** Viene determinata moltiplicando l'incertezza tipo composta u_c per un fattore di copertura k , secondo la formula:

$$U = u_c \times k$$

dove, per $k=2$ e per una distribuzione normale, il valore di U fornisce un intervallo contenente approssimativamente il 95% della distribuzione dei valori.

Alla concentrazione finale dell'elemento nel campione di analisi deve essere assegnata la sua U espressa con la stessa unità di misura del dato analitico ($\mu\text{g/L}$ o ng/L a seconda dell'elemento) secondo la formula:

$$C \pm U$$

C = concentrazione finale dell'elemento in $\mu\text{g/L}$ o ng/L ;

U = incertezza estesa associata all'elemento in $\mu\text{g/L}$ o ng/L .

Il laboratorio è tenuto a dichiarare il fattore k ogni qualvolta viene fornita la concentrazione finale dell'elemento nel campione di prova (Sezione 14).

In Tabella 6 sono riportati i valori di concentrazione finale dell'elemento e l'incertezza estesa associata in $\mu\text{g/L}$ o ng/L ottenuti per il livello di base (L0) nelle tre matrici.

Tabella 6. Valori di concentrazione finale (C) e incertezza estesa associata (U) in $\mu\text{g/L}$, eccetto che per Ir, Pd, Pt e Rh in ng/L , ottenuti per il livello di base (L0) nelle tre matrici

Elemento	Unità di misura	Siero		Urina		Sangue	
		$C \pm U$	$U\%$	$C \pm U$	$U\%$	$C \pm U$	$U\%$
As	$\mu\text{g/L}$	1,35±0,69	51	13,3±3,6	27	-	-
Cd	$\mu\text{g/L}$	0,10±0,04	35	0,23±0,04	17	1,35±0,47	35
Co	$\mu\text{g/L}$	0,31±0,11	36	0,11±0,02	16	-	-
Cr	$\mu\text{g/L}$	0,14±0,05	34	0,08±0,03	35	-	-
Hg	$\mu\text{g/L}$	1,32±0,55	42	2,40±0,85	36	6,31±1,29	21
Ir	ng/L	2,61±1,53	59	2,05±1,28	62	-	-
Mn	$\mu\text{g/L}$	0,88±0,35	40	0,11±0,05	42	9,40±2,19	23
Mo	$\mu\text{g/L}$	1,01±0,34	34	30,3±1,46	5	-	-
Ni	$\mu\text{g/L}$	2,51±1,17	46	0,67±0,13	19	-	-
Pb	$\mu\text{g/L}$	0,39±0,16	41	0,83±0,21	25	25,6±4,3	17
Pd	ng/L	32,5±21,5	66	23,9±10,9	45	-	-
Pt	ng/L	4,19±2,51	55	7,72±3,00	39	-	-
Rh	ng/L	38,4±26,8	69	24,5±9,30	38	-	-
Sb	$\mu\text{g/L}$	0,11±0,05	51	0,08±0,02	24	-	-
Sn	$\mu\text{g/L}$	0,43±0,16	38	0,22±0,06	28	-	-
Tl	$\mu\text{g/L}$	0,04±0,01	30	1,30±0,17	14	-	-
V	$\mu\text{g/L}$	0,06±0,02	40	0,03±0,01	26	-	-
W	$\mu\text{g/L}$	0,12±0,05	46	0,05±0,01	27	-	-

- Nota 1.** I valori di U associati ai tre livelli di concentrazione L0, L1 e L2 possono essere utilizzati per definire la relazione lineare esistente tra il livello di concentrazione dell'elemento e la sua incertezza estesa. L'equazione di correlazione ottenuta graficando queste due grandezze può essere usata per il calcolo dell'incertezza associata a tutti i risultati compresi tra L0 e L2.
- Nota 2.** Ogni laboratorio che utilizza il metodo per matrici biologiche differenti e/o con uno strumento differente, deve verificare l'incertezza come parte del normale processo di ri-validazione.

12. PROGRAMMA DI CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Il controllo della qualità del dato si ottiene tramite esecuzione del controllo della qualità interno (CQI; 12.1) ed esterno (CQE; 12.2).

12.1 Controllo della qualità interno (CQI). Il programma CQI consente sia la verifica della qualità dei dati analitici che devono soddisfare requisiti minimi di accettabilità stabiliti dal laboratorio, sia il controllo delle prestazioni del metodo nel tempo attraverso l'uso di carte di controllo (CC). Il laboratorio è tenuto a registrare tutti i risultati del programma CQI in fase di applicazione periodica del metodo. L'ottenimento di valori diversi dai criteri minimi stabiliti deve comportare idonee azioni correttive.

Il programma CQI comprende la verifica di:

- linearità della retta di taratura (12.1.1);
- livello del bianco reagente (12.1.2);
- recupero sul campione CQI (12.1.3);
- deriva strumentale sul campione CQI (12.1.4);
- limite di ripetibilità sul campione CQI (12.1.5);
- controllo statistico del metodo, previa costruzione della CC (12.1.6).

12.1.1 Verifica della linearità della retta di taratura (3.12, 3.17). Prevede misurazioni ripetute dei livelli della retta di taratura, preparata come descritto in 6.4, all'inizio della sequenza analitica giornaliera e prima dell'analisi dei campioni. Il requisito minimo di accettabilità prevede che il coefficiente di correlazione lineare r della retta di taratura sia $\geq 0,990$. Nel caso in cui tale condizione non sia soddisfatta, è necessario preparare e analizzare nuovamente i livelli di taratura, dopo aver effettuato azioni correttive, quali ad es., nuova ottimizzazione dello strumento e calibrazione delle masse, correzione degli effetti dovuti alla matrice (interferenze, non omogeneità del campione) e preparazione di nuove soluzioni per la retta di taratura (6.4).

12.1.2 Verifica del livello del bianco reagente (3.3). Prevede misurazioni dei campioni del bianco reagente preparati come descritto in 9.2, all'interno della sequenza analitica giornaliera. Si consiglia di eseguire misurazioni subito dopo la retta di taratura, dopo ogni 20 campioni e alla fine della sequenza analitica. Qualora il valore del bianco reagente indichi presenza di contaminazione da laboratorio e/o strumento (livello >5 volte il LoD del metodo), è necessario preparare e analizzare nuovamente il bianco reagente, dopo aver effettuato azioni correttive, quali ad es., pulizia delle parti dello strumento (coni, camera di nebulizzazione, iniettore, ecc.) e sostituzione dei reagenti. Dopo aver ottenuto valori accettabili del bianco reagente è necessario analizzare nuovamente il gruppo di campioni affetti da contaminazione.

12.1.3 Verifica del recupero sul campione CQI (3.7, 3.20). Prevede misurazioni ripetute del campione CQI preparato come descritto in 9.6, all'interno della sequenza analitica giornaliera. Si consiglia di eseguire misurazioni subito dopo la retta di taratura, dopo ogni 20 campioni e alla fine della sequenza analitica.

Il recupero percentuale viene calcolato secondo la formula:

$$\overline{Rec}\% = \left(\frac{\bar{C}_{oss} - \bar{C}_{nativo}}{C_{spike}} \right) \times 100$$

\bar{C}_{oss} = concentrazione media dell'elemento misurata nel campione fortificato;
 \bar{C}_{nativo} = concentrazione media dell'elemento misurata nello stesso campione non fortificato;
 C_{spike} = concentrazione aggiunta (*spike*) dell'elemento.

È considerato accettabile un *Rec%* che cada all'interno del $\pm 20\%$ per gli elementi a livello di $\mu\text{g/L}$ e $\pm 25\%$ per gli elementi a livello di ng/L . Se il *Rec%* dell'elemento cade al di fuori di tale intervallo devono essere effettuate azioni correttive, quali ad es. nuova ottimizzazione dello strumento e calibrazione delle masse e correzione degli effetti dovuti alla matrice (es. interferenze, non omogeneità del campione). Dopo aver ottenuto valori accettabili del *Rec%* è necessario analizzare nuovamente il gruppo di campioni affetti da inadeguato recupero.

- 12.1.4 **Verifica della deriva strumentale sul campione CQI (3.7, 3.21).** Prevede misurazioni ripetute del campione CQI preparato come descritto in 9.6, all'interno della sequenza analitica giornaliera. Si consiglia di eseguire misurazioni subito dopo la retta di taratura, dopo ogni 20 campioni e alla fine della sequenza analitica. La deriva percentuale viene calcolata secondo la formula:

$$Deriva\% = \left(\frac{C_{successivo} - C_{precedente}}{C_{precedente}} \right) \times 100$$

$C_{precedente}$ = concentrazione dell'elemento misurata nel campione CQI;
 $C_{successivo}$ = concentrazione dell'elemento misurata nel campione CQI riletto durante la sequenza analitica.

È considerata accettabile una *Deriva%* massima del $\pm 15\%$ per tutti gli elementi. Se la *Deriva%* dell'elemento è maggiore devono essere effettuate azioni correttive, quali ad es. nuova ottimizzazione dello strumento e calibrazione delle masse e correzione degli effetti dovuti alla matrice (es. interferenze, non omogeneità del campione, parametri ambientali). Dopo aver ottenuto valori accettabili della *Deriva%* è necessario analizzare nuovamente il gruppo di campioni affetti da elevata deriva.

- 12.1.5 **Verifica del limite di ripetibilità sul campione CQI (3.7, 3.24).** Prevede misurazioni in doppio del campione CQI preparato come descritto in 9.6, all'interno della sequenza analitica giornaliera. Viene verificato che lo scarto tipo di ripetibilità (s_r) sia compatibile con il limite di ripetibilità (r) calcolato in fase di validazione (10.5). A tal fine, si applica la seguente formula, che esprime il criterio di accettabilità per una prova in doppio:

$$|C1 - C2| \leq r$$

$C1$ = concentrazione osservata dell'elemento nel primo campione CQI;
 $C2$ = concentrazione osservata dell'elemento nel secondo campione CQI;

In caso di esito negativo della verifica anche con tre o quattro prove, il laboratorio è tenuto ad approfondire le diverse fasi del procedimento per scoprire i motivi della prestazione insufficiente.

12.1.6 **Verifica del controllo statistico del metodo, tramite la CC (3.22).** La CC si costruisce attraverso misurazione ripetute (≥ 25) del campione CQI (9.6) ottenute in un lungo periodo di tempo, da cui si calcola la media e lo scarto tipo (ISO 7873:1993; ISO 7870-1:2014; ISO 7870-2:2013; Hovind *et al.*, 2011). Si procede, quindi, alla costruzione di un grafico secondo le seguenti indicazioni:

- linea centrale: è la media dei valori del campione del CQI fin qui ottenuti;
- limiti di allarme superiore e inferiore: è la media +2 volte e -2 volte lo scarto tipo dei valori del campione CQI;
- limiti di azione superiore e inferiore: è la media +3 volte e -3 volte lo scarto tipo dei valori del campione CQI.

I valori di controllo ottenuti durante ogni sequenza analitica giornaliera devono essere riportati all'interno delle rispettive CC e devono essere effettuate le seguenti interpretazioni:

1. Il metodo è sotto controllo ed è possibile considerare valido il risultato analitico se:
 - il valore è all'interno dei limiti di allarme;
 - il valore è tra il limite di allarme e il limite di azione e i due valori precedenti erano all'interno dei limiti di allarme.
2. Il metodo è sotto controllo ed è possibile considerare valido il risultato analitico (nonostante si evidenzino linee di tendenza che devono essere considerate nell'immediato) se:
 - i valori sono all'interno dei limiti di allarme con almeno uno degli ultimi tre valori tra limite di allarme e limite di azione;
 - sette valori in ordine consecutivo gradualmente aumentano o diminuiscono;
 - su undici valori, dieci si trovano dallo stesso lato della linea centrale.
3. Il metodo è fuori controllo e non è possibile considerare valido il risultato analitico se:
 - il valore si trova fuori dai limiti di azione;
 - il valore si trova tra il limite di allarme e il limite d'azione e almeno uno dei due valori di controllo precedenti è anch'esso tra il limite di allarme e il limite d'azione (regola del due su tre).

In questo ultimo caso, l'azione da intraprendere è quella di eseguire l'analisi di almeno altri 2 campioni CQI. Se i nuovi valori del CQI cadono all'interno dei limiti di allarme i campioni possono essere analizzati nuovamente; se invece i due valori permangono oltre i limiti di allarme è necessario sospendere le analisi e verificare le possibili cause (es. reagenti, retta di taratura, contenitori, ecc.).

Nota 1. Quando si riportano i valori del campione CQI (9.6) nella CC è raccomandabile: i) riportare una cifra significativa in più rispetto ai risultati dei campioni di analisi (3.2); ii) riportare i valori al di sotto del LoD (3.15).

Nota 2. È raccomandabile valutare nel tempo l'idoneità dei limiti di controllo e della linea centrale nel rivelare situazioni fuori controllo statistico. I limiti di controllo e la linea centrale sono valutati o con cadenza annuale o dopo che sono stati raccolti 60 punti nella CC. Le eventuali modifiche dei limiti di controllo e della linea centrale sono prese in considerazione solo a seguito di variazioni significative nella dispersione dei risultati e/o nello scostamento sistematico che si possono verificare nei seguenti casi: i) su 60 dati, il numero dei risultati oltre i limiti di allarme è ≥ 6 o ≤ 1 ; tale situazione indica che la dispersione dei risultati è cambiata; ii) la media dei 60 risultati rispetto al valore medio

usato per la costruzione della linea centrale mostra una differenza \geq di 0,35 lo scarto tipo; tale situazione indica che il valor medio è cambiato.

12.2 Controllo della qualità esterno (CQE). Il programma CQE si effettua attraverso la partecipazione a prove valutative inter-laboratorio o PT (3.33). Tali prove consistono nell'analisi di un campione CQE (3.7) da parte dei laboratori partecipanti e nel confronto dei risultati ottenuti a fronte di criteri prestabiliti dall'ente organizzatore. Il laboratorio è tenuto a registrare i risultati relativi alla partecipazione ai PT (es. data di esecuzione della prova, metodo applicato, ecc.). L'ottenimento di valori non accettabili deve comportare sia idonee azioni correttive sia la verifica dell'efficacia delle azioni correttive eseguite.

Il programma CQE comprende (Mann & Brookman, 2011):

- scelta di un adeguato PT (12.2.1);
- partecipazione al PT (12.2.2);
- verifica dei criteri di accettabilità ed eventuali azioni correttive (12.2.3).

12.2.1 Scelta di un adeguato PT. Procedere alla scelta del circuito PT in modo che i seguenti requisiti siano soddisfatti:

- la matrice dei campioni CQE deve essere il più possibile simile alla matrice biologica analizzata tramite applicazione del metodo;
- i livelli degli elementi presenti nel campione CQE devono essere il più possibile comparabili con quelli normalmente misurati tramite applicazione del metodo;
- la strumentazione analitica deve risultare adeguata alla quantificazione di elementi nei livelli di concentrazione presenti nel campione CQE;
- altri criteri di scelta possono includere: la competenza dell'ente organizzatore, la frequenza di distribuzione del campione CQE, l'omogeneità del campione CQE, il numero dei laboratori partecipanti, l'elaborazione del dato secondo criteri prestabiliti (es. *z-score*) e riconosciuti (es. ISO 13528:2005), la pubblicazione dell'esito in un report.

12.2.2 Partecipazione al PT. La frequenza di partecipazione al PT viene stabilita in funzione dei rischi (es. esperienza dell'operatore, disponibilità di MRC, stabilità della tecnica di misura, uso del dato finale, ecc.). La partecipazione ad adeguati PT permette di:

- verificare periodicamente, e in maniera obiettiva e indipendente, la qualità delle analisi eseguite applicando il metodo;
- identificare i problemi analitici e attuare azioni di miglioramento del metodo;
- abilitare il personale alla prova analitica;
- valutare dai dati del PT, in casi specifici, l'incertezza del metodo (ISO 21748:2010).

Il campione CQE deve essere preparato seguendo lo stesso trattamento dei campioni di prova (9.1) e analizzato eseguendo la stessa procedura dei campioni di analisi riportata in Sezione 13.

12.2.3 Verifica dei criteri di accettabilità ed eventuali azioni correttive. Il risultato ottenuto dal laboratorio viene elaborato dall'ente organizzatore e convertito, generalmente, in uno *z-score* (ISO 13528:2005; Mann & Brookman, 2011), secondo la formula:

$$z = \frac{x - X}{s}$$

x = risultato ottenuto dal laboratorio;

X = valore assegnato dall'ente organizzatore;

s = scarto tipo dei risultati ottenuti dai laboratori partecipanti.

Il valore dello z - *score* ottenuto dal laboratorio viene interpretato come segue:

- $|z| \leq 2$: il risultato viene considerato accettabile;
- $2 < |z| < 3$: il risultato viene considerato questionabile e il laboratorio dovrebbe comunque verificare il proprio operato;
- $|z| \geq 3$: il risultato viene considerato non accettabile e il laboratorio deve eseguire azioni correttive e verificarne l'efficacia.

La gestione dei risultati non accettabili deve prevedere il ri-esame dell'intero procedimento analitico al fine di individuare le cause della non conformità e stabilire le idonee azioni correttive. L'evidenza dell'efficacia delle azioni correttive eseguite viene fornita effettuando nuovamente la prova sul campione oggetto di non conformità.

Nota. Se il laboratorio partecipa regolarmente a PT i risultati delle prove valutative possono essere riportate su specifiche CC (3.22), i cui limiti di allarme e azione sono posti pari a $z = \pm 2$ e $z = \pm 3$ rispettivamente, attraverso le quali è possibile avere una valutazione approfondita delle prestazioni del laboratorio nel tempo, includendo la visualizzazione di possibili effetti sistematici o andamenti.

13. DETERMINAZIONE ANALITICA

La determinazione analitica prevede le seguenti fasi (Figura 2):

- 13.1 **Configurazione dello strumento.** Prima di procedere all'analisi dei campioni è indispensabile:
- effettuare i controlli preliminari (7.1): verificare l' idoneità dell'intero sistema (es. controllare i parametri ambientali e lo stato delle parti dello strumento quali camera di nebulizzazione, coni, ecc.);
 - effettuare l'ottimizzazione dello strumento (7.2): aspirare la soluzione di *tuning* (6.6) e verificare che siano soddisfatti i valori di sensibilità, stabilità, formazione di ossidi e doppie cariche richiesti per l'esecuzione del metodo mediante HR-ICP-MS (vedi Tabella 3);
 - effettuare la calibrazione delle masse alle tre risoluzioni (LR, MR e HR) (7.3): nei casi riportati in 7.3 aspirare la soluzione di *tuning* (6.6) e verificare che i segnali delle masse degli elementi siano correttamente assegnati e centrati nelle relative finestre di massa e che la curva di calibrazione non presenti andamenti anomali.
 - definire il metodo analitico: impostare i parametri strumentali, analitici e di acquisizione dati idonei all'esecuzione del metodo mediante HR-ICP-MS (Tabella 7).

Tabella 7. Parametri idonei all'esecuzione del metodo mediante HR-ICP-MS (Element 2, ThermoFisher, Brema, Germania)

Parametri	Valori
Strumentali	
Potenza della RF	1250 kW
Flusso gas plasma	15 L/min
Flusso gas nebulizzatore	0,8-1,1 L/min
Flusso gas ausiliario	0,8-1,1 L/min
Portata del campione	0,8-1,1 mL/min
Analitici	
Masse selezionate in LR	¹¹⁴ Cd, ²⁰² Hg, ¹⁹³ Ir, ¹⁰⁰ Mo, ²⁰⁸ Pb, ¹⁹⁵ Pt, ¹²¹ Sb, ¹²⁰ Sn, ²⁰⁵ Tl, ¹⁸⁶ W
Masse selezionate in MR	⁵⁹ Co, ⁵² Cr, ⁵⁵ Mn, ⁶⁰ Ni, ¹⁰⁶ Pd, ¹⁰³ Rh, ⁵¹ V
Masse selezionate in HR	⁷⁵ As
Masse degli standard interni	¹¹⁵ In in LR, MR e HR; ⁶⁹ Ga in MR
Acquisizione dati	
Modalità di rivelazione	Conteggio di ioni (<i>pulse counting</i>)
Finestra analitica	Massa: 100%; ricerca: 80%; integrazione: 60%
Punti per picco	20

Nota. Nella definizione del metodo analitico è raccomandabile aggiungere anche le masse alternative riportate in Tabella 2 che, come previamente descritto in 4.3 (Nota 2), sono utili per la conferma del dato.

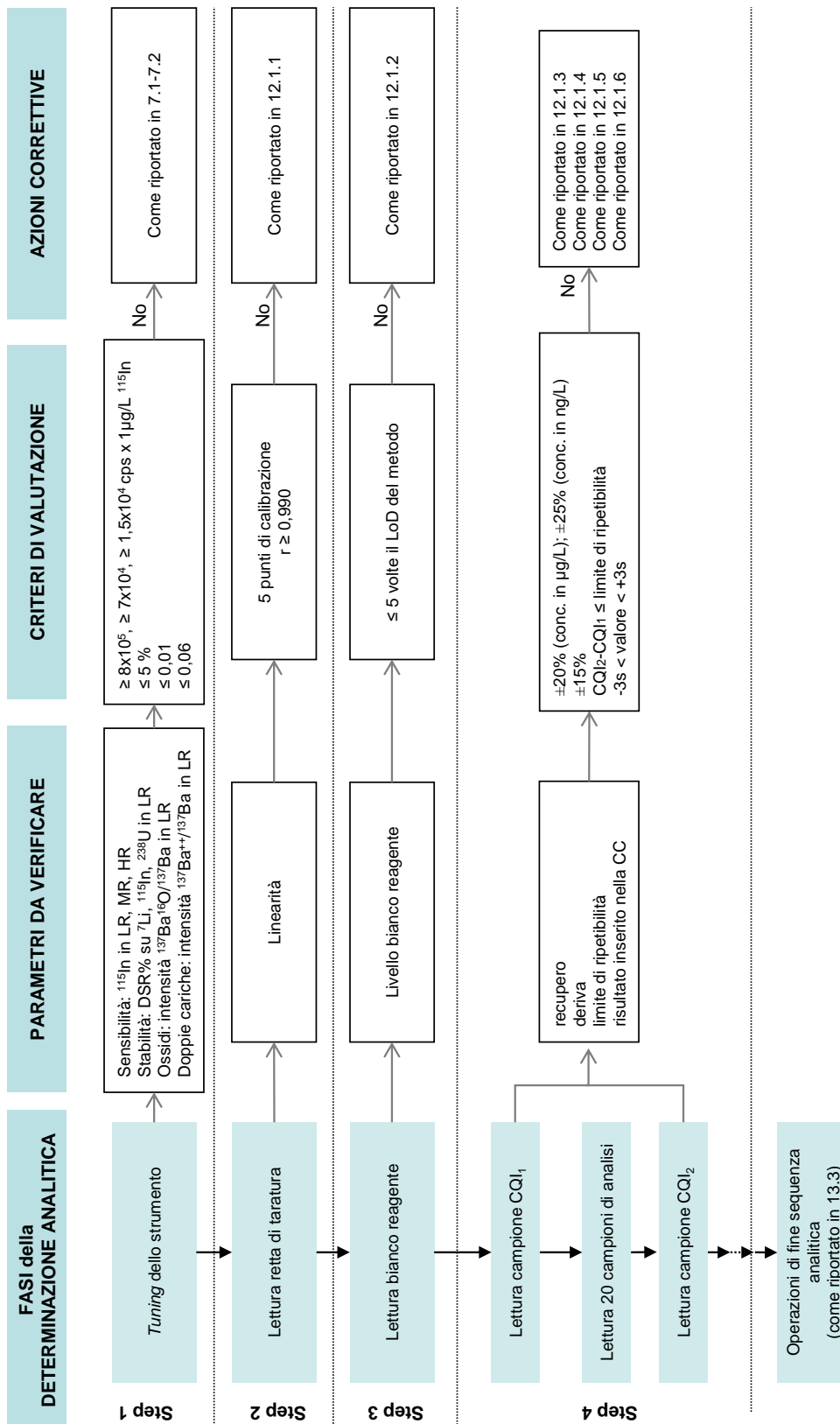


Figura 2. Schema della procedura analitica

13.2 Sequenza analitica. Prevede le seguenti fasi:

- *Letture della retta di taratura*
misurare i livelli di concentrazione per la retta di taratura (6.4) e verificare il requisito minimo di accettabilità stabilito per la linearità della retta di taratura (12.1.1). Nel caso in cui tale condizione non sia soddisfatta è necessario procedere secondo quanto riportato in 12.1.1. È preferibile eseguire 2 letture per ogni livello di concentrazione.
- *Letture del campione del bianco reagente (9.2)*
leggere il campione e verificare il requisito minimo di accettabilità stabilito per il valore del bianco (12.1.2). Nel caso in cui tale condizione non sia soddisfatta è necessario procedere secondo quanto riportato in 12.1.2;
- *Letture del campione CQI (9.6)*
leggere il campione subito dopo il bianco reagente, ogni 20 campioni di prova e alla fine della sequenza analitica giornaliera, e verificare il requisito minimo di accettabilità stabilito per il *Rec%* e la *Deriva%* giornalieri (12.1.3, 12.1.4, 12.1.5). Nel caso in cui tale condizione non sia soddisfatta è necessario procedere secondo quanto riportato in 12.1.3, 12.1.4 e 12.1.5;
- *Letture dei campioni di analisi (9.1)*
è preferibile eseguire 2 letture per ogni campione.

Alcuni accorgimenti durante la procedura analitica sono i seguenti:

- aspirare i campioni per almeno 30 secondi prima dell'acquisizione dei dati in maniera da far condizionare e stabilizzare il sistema;
- tra un campione e l'altro è necessario lasciare un tempo di risciacquo con acqua deionizzata ultrapura sufficiente per eliminare l'effetto memoria (4.5);
- i campioni di prova che risultano avere concentrazioni più alte rispetto all'intervallo di linearità del metodo (10.3) devono essere adeguatamente diluiti e ri-analizzati;
- i campioni di analisi non devono contenere materiale non dissolto che potrebbe deteriorare e/o otturare alcune parti del sistema (coni, nebulizzatore, tubicini, ecc.).

13.3 Operazioni da eseguire alla fine di ogni sessione di lavoro: per evitare che le parti sensibili dello strumento si deteriorino nel tempo e lo strumento sia in condizioni idonee per le analisi successive, è necessario:

- aspirare acqua deionizzata ultrapura per almeno 10 minuti;
- verificare lo stato di pulizia della camera di nebulizzazione, dell'iniettore, della torcia e dei coni, mediante il controllo dei cps dell'acqua deionizzata ultrapura per gli elementi del metodo;
- se necessario, ricorrere alla pulizia della camera di nebulizzazione, iniettore, torcia e coni, ponendo le parti interessate in un bagno acido (HNO_3 al 10% v/v) per qualche ora, successivamente lavandole con acqua deionizzata ultrapura e lasciandole asciugare prima di ri-montarle sul sistema;
- svuotare totalmente i tubi di aspirazione e scarico del campione.

14. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

I risultati dei campioni di analisi devono essere riportati tenendo in considerazione i valori ottenuti per ciascun elemento nel campione del bianco reagente (9.2) e il fattore di diluizione utilizzato durante il trattamento (9.1), come segue:

$$C = (\bar{C}_{campione} - \bar{C}_{bianco}) \times D$$

$\bar{C}_{campione}$ = concentrazione media misurata nel campione di analisi;

\bar{C}_{bianco} = concentrazione media misurata nel campione del bianco reagente;

D = fattore di diluizione utilizzato nel trattamento.

I dati devono essere riportati in $\mu\text{g/L}$ o ng/L a seconda delle concentrazioni osservate.

È indispensabile associare ad ogni valore di C la sua incertezza estesa (U), dichiarando il fattore k utilizzato per il calcolo, secondo la formula:

$$C \pm U$$

C = concentrazione finale dell'elemento in $\mu\text{g/L}$ o ng/L ;

U = incertezza estesa associata all'elemento in $\mu\text{g/L}$ o ng/L .

Indicare per l'incertezza estesa due cifre significative e arrotondare i risultati dell'elemento nel campione in modo da essere coerenti con l'incertezza dichiarata.

Altre informazioni necessarie possono essere le seguenti:

- fornire dettagli sulle modalità di calcolo dell'incertezza estesa e delle sue componenti;
- fornire i risultati di alcuni o tutti gli indicatori del programma CQI (Sezione 12);
- fornire indicazioni sulla bibliografia e riferimenti normativi utilizzati per l'esecuzione del metodo e il calcolo dei vari parametri (Bibliografia e riferimenti normativi).

15. MISURE DI SICUREZZA

15.1 Ogni prodotto chimico deve essere considerato come un potenziale pericolo per la salute e l'esposizione deve essere ragionevolmente la più bassa possibile. Ogni laboratorio è responsabile di tenere a disposizione, per tutto il personale coinvolto nell'analisi, la normativa in materia di manipolazione sicura dei reagenti e relative schede di sicurezza. È responsabilità dell'utilizzatore del metodo conformarsi alle disposizioni pertinenti alla prevenzione dell'inquinamento ambientale e allo smaltimento dei rifiuti biologici (15.2). Devono essere adottate particolari precauzioni per la manipolazione dei campioni biologici, seguendo le indicazioni riportate nei documenti sulla biosicurezza (WHO, 2004).

Nel metodo è previsto l'utilizzo di matrici biologiche di origine umana, acidi concentrati e metalli dissolti in soluzione acida, e pertanto alcune precauzioni da adottare sono le seguenti:

- durante il trattamento dei campioni, è necessario lavorare sotto cappa chimica aspirante, utilizzare guanti monouso e indossare altri dispositivi di protezione individuale quali camici, occhiali e maschera;
- durante il trattamento dei campioni di sangue, verificare che la temperatura della piastra riscaldante e il tempo di mineralizzazione siano idonei a non provocare eccessivi fumi, fuoriuscita del campione, deterioramento e/o deformazione dei contenitori;
- verificare che la velocità di rotazione dell'agitatore meccanico sia adatta a non provocare fuoriuscita del campione e che il contenitore sottoposto ad agitazione sia integro e chiuso;
- utilizzare micropipette dotate di eiettore dei puntali, i quali vanno scaricati nei raccoglitori di rifiuti speciali (15.2) e disinfettare la micropipetta al termine della giornata;
- dopo il trattamento dei campioni, i guanti devono essere rimossi facendo in modo che tale manovra non comporti un'esposizione a rischi e, subito dopo, le mani devono essere lavate;
- nel caso di contatto con gli occhi e/o pelle di un reagente è necessario utilizzare il lavaocchi e sciacquare la parte come riportato sulla relativa scheda di sicurezza.

15.2 Lo smaltimento dei rifiuti biologici è compito del laboratorio e deve soddisfare le regolamentazioni nazionali e internazionali (DPR 254/2003; DL.vo 152/2006; DL.vo 205/2010; Direttiva 2008/98/CE). Alcune precauzioni sono le seguenti:

- i rifiuti biologici devono essere smaltiti separatamente;
- tutto il materiale di plastica monouso che è stato a contatto con materiale biologico deve essere chiuso in buste di plastica *biohazard* (o equivalente);
- le buste di plastica *biohazard* devono essere, a loro volta, raccolte in contenitori etichettati specificatamente (es. Codice CER) per la presenza di rifiuti biologici.

BIBLIOGRAFIA E RIFERIMENTI NORMATIVI

- Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Pino A. *Programma per il biomonitoraggio dell'esposizione della popolazione italiana (PROBE): dose interna dei metalli*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2011. (Rapporti ISTISAN 11/09).
- AOAC Peer Verified Methods Advisory Committee. *AOAC Peer Verified Methods Program – Manual on Policies and Procedures*. Gaithersburg, USA: AOAC International; 1998.
- Barwick VJ, Ellison SLR. *VAM project 3.2.1. Development and Harmonisation of Measurement Uncertainty Principles Part (d): Protocol for uncertainty evaluation from validation data*. Teddington: LGC; 2000. (LGC/VAM/1998/088).
- Bocca B, Mattei D, Pino A, Alimonti A. Uncertainty evaluation in the analysis of biological samples by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. Part A: Measurements of Be, Cd, Hg, Ir, Pb, Pd, Pt, Rh, Sb, U, Tl and W in human serum. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 2010;24(16):2363-9.
- Bocca B, Mattei D, Pino A, Alimonti A. Uncertainty evaluation in the analysis of biological samples by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. Part B: measurements of As, Co, Cr, Mn, Mo, Ni, Sn and V in human serum. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 2011a; 25: 453-458.
- Bocca B, Mattei D, Pino A, Alimonti A. Monitoring of environmental metals in human blood: the need for data validation. *Current Analytical Chemistry* 2011b;7(4):269-76.
- CITAC, EURACHEM. *Guide to quality in analytical chemistry: an aid to accreditation*. Teddington: LGC; 2002.
- Ellison SLR, Rosslein M, Williams A (Ed.). *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (QUAM)*. (EURACHEM/CITAC Guide CG4 Third edition). Teddington: LGC; 2012.
- EUROLAB (European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories). *Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*. Paris: EUROLAB Technical Secretariat; 2007. (EUROLAB Technical Report No 1/2007).
- Europa. Direttiva Quadro sui Rifiuti (2008/98/CE): Direttiva 2008/98/CE del parlamento europeo e del consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 312/28 del 22 novembre 2008.
- European Accreditation Expert group. *EA guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing*. Paris: EA; 2003. (EA 4/16 G: 2003).
- Hovind H, Magnusson B, Krysell M, Lund U, Mäkinen I (Ed.). *Internal Quality Control - Handbook for Chemical laboratories*. Fourth Edition 4. Oslo: Nordic Innovation; 2011. (Nordtest TR 569).
- ISO 13528:2005. *Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
- ISO 21748:2010. *Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*. Geneva: International Organization for Standardization; 2010.
- ISO 7870-1:2014. *Control charts - Part 1: General guidelines*. Geneva: International Organization for Standardization; 2014.
- ISO 7870-2:2013. *Control charts -- Part 2: Shewhart control charts*. Geneva: International Organization for Standardization; 2013.

- ISO 7873:1993. *Control Charts for arithmetic average with warning limits*. Geneva: International Organization for Standardization; 1993.
- ISO 5725:2004. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*. Geneva: International Organization for Standardization; 2004.
- Italia. Decreto del Presidente della Repubblica (DPR) 15 luglio 2003, n. 254 Regolamento recante disciplina della gestione dei rifiuti sanitari a norma dell'articolo 24 della legge 31 luglio 2002, n. 179. *Gazzetta Ufficiale* n. 211 del 11 settembre 2003.
- Italia. Decreto Legislativo (DL.vo) 3 aprile 2006, n. 152 "Norme in materia ambientale". *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.
- Italia. Decreto Legislativo (DL.vo) 3 dicembre 2010, n. 205. Disposizioni di attuazione della direttiva 2008/98/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 relativa ai rifiuti e che abroga alcune direttive. *Gazzetta Ufficiale* n. 288 del 10 dicembre 2010 - Suppl. Ordinario n. 269.
- LGC (Laboratory of the Government Chemist). *In-House Method Validation – A Guide for Chemical Laboratories*. Teddington: LGC; 2003.
- Magnusson B, Örnemark U (Ed.). *EURACHEM Guide: The fitness for purpose of analytical methods. a laboratory guide to method validation and related topics*. Second edition. Teddington: LGC; 2014.
- Mann I, Brookman B (Ed.). *EURACHEM Guide: Selection, use and interpretation of Proficiency Testing (PT) schemes*. Second Edition. Teddington: LGC; 2011.
- Thompson M, Ellison, SLR, Wood R. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis* (Technical report). *Pure & Appl Chem* 2002;74(5):835-55.
- Thompson M, Wood R. *Harmonized guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories*. *Pure & Appl Chem* 1995;67(4):649-66.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
- UNI CEI EN ISO/IEC 17043:2010. "Valutazione della conformità - Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio". Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2010.
- UNI CEI ENV 13005:2000. *Guida all'espressione dell'incertezza di misura*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2000.
- UNI EN ISO 9001:2008. *Sistemi di gestione per la qualità – Requisiti*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2008.
- World Health Organization. *Laboratory biosafety manual*. 3rd ed. Geneva: WHO; 2004.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di settembre 2015, 2° Suppl.*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, settembre 2015