

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

SCUOLA DI SCIENZE

Dipartimento di Chimica Industriale “Toso Montanari”

Corso di Laurea Magistrale in

Chimica Industriale

Classe LM-71 - Scienze e Tecnologie della Chimica Industriale

**“ASSISTED FACTORIAL EXPERIMENTAL DESIGN”
PER L’OTTIMIZZAZIONE DELLA DETERMINAZIONE
DI BENZENE EMATICO IN GC-FID**

Tesi di laurea sperimentale

CANDIDATO

Andrea Balacchi

RELATORE

Chiar.ma Prof.ssa Domenica Tonelli

CORRELATORE

Chiar.mo Prof. Sergio Zappoli

Dott. Roberto Ballardini

Anno Accademico 2021-2022

Indice

1.	Benzene.....	3
2.	Tossicologia occupazionale.....	5
	2.1 <i>Il benzene nella tossicologia occupazionale</i>	7
	2.2 <i>Benzene ematico</i>	10
3.	Parte sperimentale.....	12
	3.1 <i>Reagenti e materiali usati</i>	12
	3.2 <i>Strumentazione e condizioni operative</i>	12
	3.3 <i>Preparazione delle soluzioni standard di benzene</i>	15
	3.4 <i>Calibrazione della micro-pipetta semiautomatica</i>	17
4.	DoE (Design of Experiment).....	19
5.	Risultati.....	22
	5.1 <i>Prova I</i>	25
	5.2 <i>Prova A</i>	27
	5.3 <i>Prova B</i>	29
	5.4 <i>Prova AB</i>	31
	5.5 <i>Prova C</i>	33
	5.6 <i>Prova AC</i>	35
	5.7 <i>Prova BC</i>	37
	5.8 <i>Prova ABC</i>	39
6.	Risultati DoE.....	41
	6.1 <i>Effetti dei trattamenti</i>	42
	6.2 <i>Calcolo della varianza e della deviazione standard per ciascuna prova</i>	43
	6.3 <i>Calcolo della devianza</i>	44
	6.4 <i>Calcolo della varianza totale e ANOVA</i>	45
	6.5 <i>Carta di Pareto e curva di Lorenz</i>	46
	6.6 <i>Effetti A, B e C</i>	49
	6.7 <i>Interazione effetti A-B</i>	51
	6.8 <i>Interazione effetti A-C</i>	52
	6.9 <i>Interazione effetti B-C</i>	54
	6.10 <i>Elaborazione di un modello per la previsione dei risultati</i>	55
7.	Conclusioni.....	59
8.	Bibliografia	63
9.	Ringraziamenti.....	66

1. Benzene

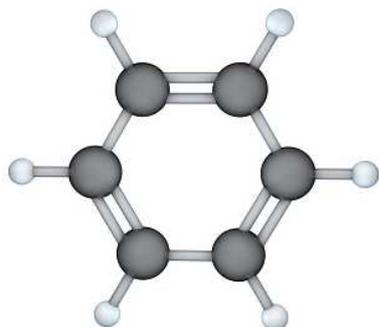


Figura 1: rappresentazione semplificata di una molecola di benzene

Il benzene, una molecola organica aromatica la cui formula bruta è C_6H_6 , è stato ampiamente utilizzato in passato in ambito industriale come solvente per vernici, colle o gomme. Questo ha comportato per tanti lavoratori una significativa esposizione alla sostanza mielotossica e cancerogena con gravi conseguenze per la salute. Successivamente alla scoperta della pericolosità della sostanza, il benzene è stato sostituito nella maggior parte dei processi industriali, lasciando il posto laddove possibile a solventi decisamente meno pericolosi. Si è

inoltre cercato di ridurre la presenza di benzene anche nei composti di uso comune quali per esempio le benzine, così da minimizzare l'esposizione della popolazione e di tutti i lavoratori a contatto con tali sostanze. Tuttavia ancora oggi risulta essere un inquinante ambientale molto comune, addirittura definito ubiquitario, perché presente nei fumi di combustione di sigaretta e nelle emissioni provenienti da scarichi veicolari non catalizzati, anche se in concentrazioni ampiamente minori rispetto al recente passato. Come conseguenza della sua grande diffusione ed estrema pericolosità, è senza dubbio considerata una sostanza sulla quale ancora oggi occorre porre grande attenzione: vengono infatti eseguiti controlli periodici sull'aria negli ambienti di lavoro e in zone urbane nelle quali potrebbero essere emesse quantità significative di benzene. Oltre al controllo negli ambienti di lavoro, risulta di fondamentale importanza anche il monitoraggio dell'esposizione e dello stato di salute dei lavoratori presenti in tali ambienti.

Proprio in funzione della pericolosità della sostanza, non è possibile adottare un valore limite di esposizione al benzene al di sotto del quale una persona possa ritenersi al sicuro, al punto che anche chi si occupa di processi in cui il benzene è presente come impurezza o intermedio di reazione, è opportuno che si mantenga monitorato. D'altronde le aziende hanno l'obbligo di mettere il lavoratore in condizioni tali da essere esposto il meno possibile alla sostanza, con l'impegno di rivedere e rimpiazzare - nei limiti del possibile - i processi industriali e i reagenti che possano causare un'esposizione a benzene. Tuttavia, in certi casi, questo non sarà possibile: quindi sono stati fissati dei limiti di concentrazione nell'ambiente di lavoro e nei fluidi biologici del lavoratore (urine e sangue), che periodicamente devono essere valutati da esperti.

Un'intossicazione da benzene in elevate quantità, definita acuta, può portare velocemente un uomo alla morte; nel caso in cui l'esposizione si protragga per lunghi periodi a quantitativi

inferiori, l'intossicazione può invece essere chiamata cronica, ma i danni all'organismo risultano essere comunque catastrofici: danneggiamento dei tessuti ossei, diminuzione delle cellule del midollo osseo, anemia aplastica o leucemia. Il benzene è stato infatti classificato nel gruppo 1 dall'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), ovvero nella famiglia di composti per cui ci sono sufficienti evidenze di cancerogenicità negli esseri umani.

La pericolosità del benzene è ulteriormente aumentata dalla facilità con cui può essere assorbito dall'organismo. La sostanza è infatti molto volatile e può causare intossicazione per ingestione, inalazione, ma anche per semplice contatto dermico. Nonostante le svariate possibilità, l'inalazione risulta essere nettamente la maggiore via di assorbimento della sostanza, anche in funzione del fatto che ad oggi le principali fonti di esposizione a benzene sono il fumo di sigaretta e l'inquinamento da utilizzo di combustibili fossili, principalmente carburanti per automobili.

Una volta inalato, il benzene viene per lo più espulso tal quale nell'espirsto, per almeno un 50% del totale, mentre l'altra metà viene metabolizzata, espulsa tal quale in urina oppure si accumula nel sangue con tempi di emivita di circa 9-24 ore, tempi che potrebbero dilatarsi ulteriormente a causa della tendenza della sostanza a depositarsi nel tessuto adiposo per essere successivamente rilasciata lentamente nel sangue.

2. Tossicologia occupazionale

La tossicologia occupazionale è una branca della medicina del lavoro che si occupa di studiare l'esposizione di un gruppo di lavoratori ad agenti chimici derivanti dalle lavorazioni industriali. Il medico del lavoro è preposto a verificare tutti i processi industriali che interessano ogni singolo lavoratore, studiare le schede di sicurezza di ciascun reagente o prodotto utilizzato e valutare per ciascun gruppo di lavoratori o per ciascuna mansione se possa esistere qualche rischio correlato all'uso o alla produzione di agenti chimici. In tal caso prescrive, con cadenze previste da un protocollo, analisi utili a valutare lo stato di salute del lavoratore, così da correggere atteggiamenti sbagliati di un lavoratore o spingere l'azienda a rivedere i processi che possono presentare pericoli per la salute umana non contrastabili con azioni preventive o correttive. Le analisi prescritte sono generalmente eseguite su svariati tipi di fluidi biologici, ma la maggior parte riguarda campioni di sangue o urina del lavoratore. Il campione di sangue viene tipicamente ricavato mediante prelievo venoso con l'intento di ottenere siero, plasma o sangue intero, in funzione della matrice consigliata dagli enti di riferimento per lo specifico esame prescritto dal medico del lavoro. La raccolta delle urine, invece, è un compito del lavoratore e viene generalmente eseguita all'interno di barattoli sterili, secondo i tempi definiti dal medico. Possono, ad esempio, essere raccolte le urine di inizio turno, ovvero l'ultima urina che il lavoratore espelle prima di iniziare il proprio turno di lavoro. Un caso speciale relativo alle urine di inizio turno è quello delle urine di inizio turno settimanale, caso in cui la raccolta del campione viene eseguita dopo il giorno di riposo del lavoratore e quindi prima dell'inizio della settimana lavorativa. Questo tipo di campione può essere utile per avere una sorta di bianco del campione del lavoratore, ovvero per avere un'idea di quanto il lavoratore sia esposto alle sostanze di interesse tossicologico al di fuori della propria attività lavorativa, o anche per capire se il soggetto preso in esame sia in grado di metabolizzare o eliminare durante il turno di riposo le sostanze pericolose con cui è stato a contatto nel proprio ambiente lavorativo. Inoltre possono essere raccolte le urine di fine turno. Al contrario del precedente caso, le urine di fine turno sono la prima minzione che il lavoratore espelle al termine del proprio turno di lavoro. Anche in questo caso è possibile che il medico del lavoro decida di prendere in considerazione le urine di fine turno settimanale, e cioè le urine raccolte il giorno prima del proprio turno di riposo. In questo caso lo scopo è proprio quello di quantificare l'esposizione del lavoratore agli agenti chimici presenti nel proprio ambiente di lavoro e valutare se possa essere considerato a rischio o no.

Come soluzione estrema a eventuali esposizioni eccessive da parte di un lavoratore, il medico del lavoro può decidere di imporre un cambio di mansione o rivedere e correggere il metodo di lavoro nel caso in cui i comportamenti del lavoratore non siano coerenti con le norme di sicurezza - per esempio con l'utilizzo di idonei dispositivi di protezione individuale. Tipicamente le analisi di tossicologia occupazionale prescritte dal medico del lavoro consistono nel ricercare metaboliti di certe sostanze o residui immutati del composto target nella matrice biologica, considerata come la più indicativa da parte degli enti preposti a questo tipo di controlli. Indicazioni in merito al tipo di analisi da effettuare relativamente a ciascuna sostanza ed eventuali limiti massimi di esposizione dei lavoratori possono essere rintracciati in svariati modi, anche se, laddove possibile e se presenti, i riferimenti principali sono l'associazione italiana degli igienisti industriali (AIDII) a livello nazionale, mentre a livello internazionale sono: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) e American Industrial Hygiene Association (AIHA), ovvero i corrispettivi statunitensi dell'AIDII. Mensilmente, con lo scopo di presentare gli aggiornamenti relativi alle ultime novità ed agli studi più innovativi nel campo dell'igiene industriale, viene pubblicato da AIHA il Journal of Occupational and Environmental Hygiene (JOEH), punto di riferimento a livello mondiale per chiunque si occupi di igiene industriale. Da questi enti vengono contemporaneamente trattati tanto l'esposizione dei lavoratori quanto lo studio degli ambienti di lavoro industriali, temi complementari e strettamente connessi tra loro. In aggiunta a quanto già citato, vista l'importanza dell'argomento, in Italia è stato appositamente emanato il decreto legislativo 81 del 2008 e successive modifiche e integrazioni, completamente incentrato sulla sicurezza nel mondo del lavoro. A più riprese vengono analizzate le sostanze cancerogene o sospette cancerogene, e, nello specifico, la loro gestione per limitare al massimo l'esposizione dei lavoratori, essendo considerate in assoluto le più pericolose sul medio-lungo periodo. L'allegato XLIII è per esempio interamente dedicato ai valori massimi di esposizione negli ambienti di lavoro per le sostanze cancerogene o sospette cancerogene, tra le quali risulta essere presente il benzene ^[1].

La medicina del lavoro, così come la tossicologia occupazionale, è in continua evoluzione: sempre alla ricerca di migliori indicatori biologici di esposizione a sostanze pericolose e rigorosamente concentrata nel determinare quali agenti chimici e in quali quantità possono creare problemi alla salute dell'uomo. Per questo motivo si è da sempre instaurata una solida collaborazione tra igienisti industriali - che si occupano di questi studi - e chimici, interessati a sviluppare metodi quantitativi che permettano di eseguire le analisi richieste dai medici del lavoro in modo accurato e preciso.

2.1 Il benzene nella tossicologia occupazionale

Come già accennato in precedenza il benzene rappresenta ancora oggi un tema di grande interesse e attenzione per i medici del lavoro, in quanto l'esposizione alla sostanza deve sempre essere controllata in modo rigoroso, così da garantire al massimo l'incolumità del lavoratore. A tal fine il medico del lavoro è tenuto a studiare le schede di sicurezza di ciascun composto utilizzato nel processo industriale e porre la massima attenzione anche alle impurezze o ad eventuali composti indesiderati ottenuti dal processo. Se dovesse essere riscontrata la presenza di benzene anche in quantitativi piuttosto ridotti, sarebbe opportuno che il medico del lavoro prescrivesse svariate analisi per escludere la possibile esposizione del lavoratore alla sostanza cancerogena.

Come già accennato, il benzene è tra le sostanze maggiormente monitorate anche in fase di analisi ambientale, al punto che nel D.Lgs 81/08, allegato XLIII, viene riportato un TLV-TWA (Threshold Limit Value – Time Weighted Average) pari ad appena 3.25 mg/Nm³ d'aria a 20 °C e 101.3 KPa, valore misurato o calcolato sulla base di un'esposizione di otto ore lavorative [11]. Tale riferimento sarà destinato a diminuire ulteriormente nei prossimi anni, così da massimizzare l'attenzione dei datori di lavoro a tutti i processi che prevedono l'uso di benzene tra i reagenti o i prodotti. Infatti, come riportato dalla direttiva UE 2022/431 del Parlamento europeo e del Consiglio del 9 marzo 2022, che si occupa di protezione dei lavoratori contro i rischi derivanti da un'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni durante il lavoro, le concentrazioni di benzene ambientale dovranno subire un'ulteriore diminuzione anno dopo anno: dall'attuale e già citato 3.25 mg/Nm³ di TLV-TWA si dovrà arrivare a contenere le concentrazioni di benzene al di sotto di 1.65 mg/Nm³ dal 5 aprile 2024 ed infine non superare 0.66 mg/Nm³ dopo il 5 aprile 2026 [12]. L'Unione Europea sta quindi intraprendendo una campagna contro il benzene con l'intento di ridurre sempre di più la concentrazione negli ambienti di lavoro, al fine di evitare malattie professionali dovute a tale agente chimico.

Si è già discusso il fatto che il benzene sia un inquinante ubiquitario, ma nel campo della tossicologia occupazionale, ancora oggi, sono numerosi gli operatori quotidianamente o potenzialmente esposti a tale sostanza: addetti all'industria petrolchimica, addetti alla distribuzione di carburanti, manutentori di impianti o siti dedicati al deposito di carburanti, addetti all'industria della chimica di sintesi, addetti delle cokerie, addetti alla riparazione di autoveicoli e altre attività lavorative che possano portare a esposizione a concentrazioni maggiori di benzene rispetto alla popolazione generale. Fanno parte di quest'ultima categoria di lavoratori, per esempio: i vigili del fuoco, gli addetti a bonificare o scavare in un terreno

inquinato da benzene, ma anche chiunque lavori per tanto tempo nel traffico urbano, quindi la polizia municipale o gli operai che si occupano di ripristinare il manto stradale o la segnaletica orizzontale e verticale. In aggiunta alle persone professionalmente esposte, è opportuno porre particolare attenzione ai fumatori: svariati studi hanno provato che tale categoria è esposta a una concentrazione significativamente più elevata rispetto a chi non ha questa abitudine, al punto che gli enti di riferimento, per certi tipi di metaboliti, hanno in più occasioni indicato differenti valori limite per la popolazione generale fumatrice e per i non fumatori [3,4,5].

Questo aspetto permette sicuramente di evidenziare come, nel campo della tossicologia occupazionale, risulti decisamente complicato il processo di monitoraggio dell'esposizione di ciascun lavoratore al benzene. A tal proposito, viene indicata in letteratura una lunga serie di biomarcatori che possono essere presi in considerazione. Ciascuno di essi presenta punti di forza e di debolezza che il medico del lavoro deve tenere bene in considerazione, in fase di prescrizione delle analisi da effettuare o in fase di interpretazione dei risultati.

Un altro aspetto fondamentale è il momento in cui viene eseguito il monitoraggio biologico dei lavoratori. Infatti il tempo gioca un ruolo fondamentale per avere risposte valide dalle analisi effettuate. Generalmente è opportuno che il medico del lavoro si organizzi per far raccogliere le urine o fare il prelievo venoso ai lavoratori in giornate in cui essi siano soggetti a esposizione significativa, quindi nelle giornate che possano rappresentare la situazione peggiore per la salute del lavoratore. Questo perché il tempo di permanenza del benzene e dei suoi metaboliti all'interno del corpo è variabile. Perciò il medico del lavoro potrebbe anche consigliare il monitoraggio del lavoratore significativamente esposto al rischio per più volte e con una certa regolarità, così da avere dati che possano essere rappresentativi della reale esposizione.

È opportuno ora fare una panoramica di tutti i biomarcatori che possono essere prescritti dal medico del lavoro a un soggetto esposto a benzene, sia per inalazione, sia per i più rari casi di ingestione o contatto dermico.

In origine, la medicina del lavoro trovò nel fenolo urinario un primo biomarcatore: un metabolita del benzene ma con una ridottissima specificità, al punto da non soddisfare in alcun modo le aspettative del medico preposto alle sempre maggiori restrizioni, previste una volta che la sostanza è stata considerata cancerogena e assegnata al gruppo 1. Per far fronte a questa nuova necessità si tentò di analizzare la concentrazione di benzene tal quale presente nell'aria espirata; si scoprì infatti che larga parte del benzene inalato veniva espulso immutato, in breve tempo, nel normale processo di respirazione. Ma è proprio il breve tempo nel quale tale sostanza viene espulsa che portò alla ricerca di nuovi biomarcatori, maggiormente efficaci anche su un più lungo periodo. Furono quindi introdotti nel tempo sempre più biomarcatori,

ancora oggi utilizzati in differente misura. Il primo degno di speciale menzione è l'acido S-fenil-mercapturico (SPMA) urinario, un metabolita specifico, al quale fu aggiunto un altro metabolita urinario, l'acido trans,trans-muconico (t,t-MA). Il t,t-MA è presente in quantità maggiori nelle urine rispetto al SPMA, ma presenta l'inconveniente di essere un metabolita urinario anche dell'acido sorbico, una sostanza che viene spesso utilizzata come conservante alimentare e che può essere naturalmente presente in alcuni frutti. Per non sovrastimare l'esposizione a benzene, il medico del lavoro potrebbe decidere di dare l'indicazione ai lavoratori di prelevare le urine lontano dai pasti e, parallelamente, prescrivere anche le analisi dell'acido S-fenil-mercapturico urinario. I due metaboliti urinari, come biomarcatori del benzene, dovrebbero mantenersi in un rapporto massa/massa di circa 20:1, informazione questa che può essere utile per valutare se uno dei due dati possa essere stato alterato da agenti esterni, non connessi all'esposizione al benzene. I due biomarcatori vengono indicati da ACGIH come ideali per valutare l'esposizione lavorativa a benzene e presentano valori di riferimento definiti: inferiore a 500 µg/g di creatinina urinaria nei soggetti professionalmente esposti a benzene per l'acido trans,trans-muconico, mentre per l'acido S-fenil-mercapturico il risultato, per essere ritenuto sotto controllo, deve rimanere inferiore a 25 µg/g di creatinina ^[6,7,8].

Un'altra analisi che può essere prescritta per valutare l'esposizione a basse concentrazioni, anche se non presenta ufficialmente un BEI (biological exposure index), è la ricerca del benzene che viene espulso tal quale in urina. Tale determinazione permette di rilevare concentrazioni fino a pochi decimi di microgrammo di sostanza su litro di matrice, anche se si deve considerare come fattore critico l'elevata volatilità del benzene e, di conseguenza, la breve vita media dell'indicatore. Questo implica un'accurata programmazione della data di raccolta e consegna del campione e la conservazione dello stesso in flaconi che non permettano la fuoriuscita dell'analita, come per esempio vial con chiusura crimp, utilizzabili per analisi gascromatografiche in spazio di testa ^[8].

A questo quadro, già piuttosto vario e complesso, è opportuno aggiungere anche l'analisi del benzene ematico. La quantificazione dell'analita benzene tal quale, in matrice sangue intero, viene a volte scarsamente considerata dei medici del lavoro a causa della metodica invasiva di raccolta del campione. Tuttavia, tale analisi permette di avere indicazioni affidabili di esposizione recente a benzene, tenendo conto dell'emivita relativamente ridotta della sostanza. Il benzene ematico è inoltre non soggetto ad alterazioni dovute alla dieta del lavoratore e può essere prescritto dal medico del lavoro contemporaneamente alle analisi cliniche su sangue che generalmente il lavoratore esegue con cadenza regolare per verificare il proprio stato di salute. In questo modo il prelievo venoso non servirebbe solo per valutare l'esposizione del lavoratore

a benzene, ma implicherebbe il semplice riempimento di una provetta aggiuntiva rispetto a quelle già previste dal profilo di check-up clinico prescritto dal medico. Le difficoltà dell'analisi del benzene ematico non sono tuttavia legate esclusivamente al prelievo del campione di sangue, ma anche a questioni puramente tecniche. Si deve infatti tenere in considerazione la composizione estremamente più complessa della matrice ematica rispetto a quella urinaria, per cui si devono prendere una serie di precauzioni ed eseguire trattamenti ad hoc sul campione ematico tali da consentire un'analisi corretta. È in questa direzione quindi che si è tentato di sviluppare il metodo di seguito proposto.

2.2 Benzene ematico

Ad oggi il benzene ematico viene determinato in tutti i laboratori per via gascromatografica. Questo avviene mediante l'estrazione dell'analita dal sangue e la conseguente introduzione dello stesso in colonna ^[3,4,5,9,10,11,12]. Per ottenere risultati soddisfacenti è fondamentale effettuare una valutazione sul tipo di rilevatore utilizzato per riconoscere e quantificare il benzene. La maggior parte dei metodi presi in considerazione dalla bibliografia prevede l'utilizzo del rilevatore gas-massa, così da ottenere uno spettro utile al riconoscimento e alla quantificazione del benzene ^[3,5,9,10,11]. Come alternativa a questo rilevatore, a costi nettamente ridotti ma con perdita di sensibilità, è possibile utilizzare un detector a ionizzazione di fiamma (FID). Questo rilevatore, al contrario del precedente, permette il riconoscimento dell'analita sul cromatogramma esclusivamente per confronto del tempo di ritenzione del picco considerato con quello di uno standard di benzene. Questo fatto costituisce un limite notevole quando si lavora con una matrice complessa come il sangue. Il FID, infatti, non permette di discriminare se, in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'analita, venga rilevata dal detector qualche altra sostanza che andrebbe ad alterare il segnale, causando una sovrastima della concentrazione di benzene nel campione in analisi. È possibile superare tale problematica variando i parametri che influenzano la separazione cromatografica. In prima istanza vi è sicuramente la scelta della colonna cromatografica, variabile in lunghezza, polarità, tipo di materiale costituente la fase stazionaria e spessore del film. Successivamente, è possibile modificare le condizioni della corsa cromatografica, come la temperatura dell'iniettore, la programmata termica o il flusso di gas in colonna. Ottimizzare tali parametri è fondamentale per evitare la presenza di picchi imputabili alla matrice, sovrapposti a quello dell'analita, ma anche per fare in modo che il picco ottenuto sia simmetrico e facilmente distinguibile dal rumore di fondo strumentale. Inoltre, per

evitare la sovrapposizione di picchi, si deve analizzare una serie di campioni di pazienti non esposti a benzene e verificarne il cromatogramma in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'analita. Se nessuno dei campioni analizzati presenta picchi sovrapposti o immediatamente adiacenti a quello dell'analita, si può ragionevolmente stabilire che la matrice non ha un'influenza diretta sul dato quantitativo del benzene ematico e si può quindi procedere a gestire un'altra questione di rilevante importanza: l'estrazione del benzene dalla matrice sangue. Questo stadio è cruciale ed esistono numerosi studi che prevedono differenti trattamenti al campione al fine di avere la massima efficienza di estrazione dell'analita, con conseguente incremento della sensibilità minima del metodo ^[3,5,9,10,11,13,14]. Senza ombra di dubbio la microestrazione in fase solida (SPME) è una delle tecniche più utilizzate ed efficienti perché permette di ottenere ottimi risultati, ma prevede l'utilizzo di strumentazione dedicata ^[5,10,13,14]. È possibile affermare lo stesso per la tecnica del "purge and trap", un processo che permette di aumentare enormemente la quantità di analita estratta dal sangue e introdotta in colonna, ma che non è possibile mettere in pratica se non si è in possesso dell'idonea strumentazione ^[3,9,11]. Con l'idea di far fronte alla necessità di quantificare il benzene ematico da parte di un qualunque laboratorio, dotato solamente di un gascromatografo con rilevatore FID, si è tentato di sviluppare un metodo caratterizzato da un'estrazione efficace dell'analita tale da consentire la sensibilità richiesta. Per accelerare l'ottenimento dei risultati e ridurre al minimo i tempi delle prove, si è optato per l'utilizzo di un autocampionatore in spazio di testa statico. Inoltre, con l'intento di ottenere quante più informazioni possibili, si è ritenuto indispensabile studiare il maggior numero di metodi già esistenti che, pur partendo da principi sostanzialmente differenti, potessero suggerire rimedi e soluzioni utili allo scopo prefisso ^[3,4,5,9,10,11,12]. Nel corso di questa fase di studio si è notato un aspetto sul quale già ci si era concentrati e che era stato già definito come elemento critico per il processo da sviluppare, ovvero la grande complessità della matrice. Per svariate matrici, infatti, il miglioramento della fase di estrazione si basa su un semplice aumentando della temperatura, volto a favorire il passaggio in fase gas - quindi nello spazio di testa - dei composti volatili presi in analisi. Nel caso del sangue, il solo effetto termico potrebbe non essere sufficiente a favorire l'estrazione di un quantitativo sufficiente di analita. Anzi, si deve tenere in considerazione che un aumento eccessivo di temperatura potrebbe causare un'alterazione significativa della matrice, come per esempio la denaturazione irreversibile delle proteine o una maggiore predisposizione del sangue a formare coaguli ^[3,10,11]. Conseguentemente, è stato studiato il comportamento della matrice al variare della temperatura di incubazione del vial e come questo fattore possa incidere sull'estrazione dell'analita dal sangue. A questo studio se ne è affiancato un altro basato su trattamenti chimici sulla matrice.

3. Parte sperimentale

3.1 Reagenti e materiali usati

Per l'esecuzione delle prove sono stati utilizzati i seguenti reagenti:

- Benzene (TCI Europe), purezza > 99.5 %, densità 0.879 kg/L
- Acqua deionizzata (Supelco), codice prodotto 1.16754.5000
- Acetone (Supelco), purezza > 99.8 %
- Toluene (Supelco), purezza 99.8 %
- Tetraidrofurano (VWR chemicals), purezza \geq 99.9 %
- N-esano (Supelco), purezza 98.0 %
- Cicloesano (Supelco), purezza 99.8 %
- Metanolo (Supelco), purezza 99.8 %

Sono stati inoltre utilizzati:

- Matracci tarati (Hirschmann) classe A da 50.00 ± 0.08 mL
- Matracci tarati (Hirschmann) classe A da 500.00 ± 0.25 mL
- Micro-pipetta (Brand) per capillari in vetro
- Micro-pipetta semiautomatica a volume variabile (Finnpipette) 20-200 μ L
- Micro-pipetta semiautomatica a volume variabile (VWR) 1-5 mL
- Sonda termometrica (Delta Ohm) HD 9219
- Bilancia analitica (Sartorius) CP 225D-OCE
- pH-metro (Hanna Instruments) HI2030-02 con elettrodo in vetro HI11310

3.2 Strumentazione e condizioni operative

Per l'esecuzione delle prove si è utilizzato un gascromatografo Agilent, modello 8860 con rilevatore FID, abbinato a un autocampionatore in spazio di testa Agilent modello 7697A, strumentazione già utilizzata dal laboratorio per eseguire quantificazione di solventi comuni su urina. La colonna utilizzata, ideale per separare e quantificare svariati tipi di composti volatili prevalentemente apolari, è una Agilent 125-1064 DB-1 in silice fusa, lunga 60 m, con diametro di 0.530 mm e spessore interno del film di rivestimento in dimetilpolisilossano dello spessore di 3 μ m. La lunghezza della colonna, sommata alla scarsa polarità della fase stazionaria,

permette di separare efficacemente solventi anche tra loro piuttosto simili, quali benzene e cicloesano, o anche isomeri posizionali come per esempio orto, meta e para-xilene. Per analizzare la matrice ematica, si è tentato di mantenere invariate la colonna cromatografica e la programmata termica, già utilizzate per l'analisi delle urine di interesse della tossicologia occupazionale, con l'intento di non dover sostituire la colonna nel passaggio da una problematica analitica ad un'altra, favorendo così la routine del laboratorio. I parametri operativi del GC sono i seguenti:

- Temperatura dell'iniettore: 220 °C;
- Programmata termica: temperatura iniziale di 50 °C mantenuta per dieci minuti, quindi incremento fino a 150 °C con una velocità di riscaldamento di 5 °C al minuto, seguito da un ulteriore aumento fino a 250 °C con una velocità di riscaldamento di 10 °C al minuto e mantenimento della temperatura finale per tre minuti (con l'intento di spurgare la colonna). Durata totale della programmata di temperatura: 43 minuti.

All'interno della colonna viene flussato elio, un gas inerte che permette il trasporto degli analiti in fase gassosa senza avere il rischio di reazioni indesiderate. Inoltre, la qualità dei picchi ottenuti nel cromatogramma, a causa della minore massa atomica dell'elio rispetto a quella dell'azoto, è migliore e permette di ottenere un segnale strumentale meno rumoroso. Il flusso di elio in colonna è costante e impostato a 4 mL/min, un compromesso per far eluire tutti i composti che si desidera analizzare e al contempo mantenere per ciascuno di essi una buona risoluzione. Con l'intento di iniettare quanto più analita in colonna, fattore utile a migliorare le performance del metodo, si è optato per un'iniezione pulsed splitless, con un flusso iniziale di elio di 34 mL/min, utile a spingere tutta la fase gas in colonna in tempi ridotti. Tale scelta non presenta rischio di sovraccarico della colonna, a causa delle concentrazioni tipicamente piuttosto basse dei composti volatili nei fluidi biologici, anche se porta ad ottenere picchi con peggiore rapporto altezza/ampiezza. Tuttavia è opportuno considerare che la lunghezza della colonna, 60 metri, permette la completa risoluzione dei picchi di tutti i composti volatili, generalmente quantificati su urina o sangue. Si ottiene dunque un valido compromesso tra rapporto altezza/ampiezza del picco, che si riduce rispetto a una iniezione di tipo split, e l'area sottesa ad esso, che si mantiene piuttosto elevata, fattore utile per poter quantificare concentrazioni ridotte di sostanze organiche volatili (SOV). Il rilevatore FID è alimentato con idrogeno come combustibile, aria come comburente e azoto come gas inerte, utile a mantenere costante il segnale. I flussi di idrogeno, aria e azoto sono rispettivamente 30, 400 e 25 mL/min

e non subiscono variazioni nel corso della programmata termica. La temperatura del rilevatore FID è stata impostata a 300 °C.

Per quanto riguarda le condizioni operative dell'autocampionatore in spazio di testa, si è deciso di poterle cambiare, per l'analisi di sangue, rispetto a quelle tipiche della matrice urinaria. Come già accennato in precedenza, il sangue intero prevede una gestione nettamente più complessa e anche le temperature in gioco devono necessariamente essere riviste rispetto a quelle utilizzate nel caso delle urine. Anche i vial, da 20 mL con chiusura crimp, sono stati sostituiti con quelli da 10 mL sulla base dei differenti volumi di campione analizzato.

L'autocampionatore è caratterizzato da un forno, la cui temperatura può essere regolata dall'operatore, utile a favorire il passaggio dei solventi nello spazio di testa, quindi nella fase gas tra il fluido analizzato e il tappo del vial. Un altro parametro regolabile è il tempo di riscaldamento al quale viene sottoposto il campione, il quale deve essere sufficiente per permettere che si raggiunga uno stato di equilibrio nel sistema gas-liquido. A questo punto, un ago viene automaticamente inserito nel vial e inizia a flussare azoto per mettere in pressione il sistema. Questo processo favorisce ulteriormente il passaggio in spazio di testa dei composti volatili e il trasporto degli stessi, attraverso prima un loop e poi una transfer line, verso l'iniettore e quindi la colonna cromatografica. La temperatura di ciascuno degli elementi che compongono l'autocampionatore può essere regolata dall'operatore, mantenendo un gradiente di temperatura di almeno 15 °C tra ciascuno di essi, utile a favorire il mantenimento in fase gas degli analiti e facilitarne il trasporto in direzione colonna. Un altro parametro da tenere in considerazione è il tempo di apertura del loop, una valvola la cui funzione è paragonabile a quella delle tradizionali siringhe da GC, ovvero permettere di iniettare più o meno analita in colonna. Anche in questo caso, è opportuno considerare che un maggiore tempo di apertura del loop porta alla diminuzione del rapporto altezza/ampiezza dei picchi ottenuti nel cromatogramma, a causa del maggior allargamento della banda contenente i composti presenti nello spazio di testa del campione.

3.3 Preparazione delle soluzioni standard di benzene

Dalle pubblicazioni consultate, si è notato che in quasi tutti i casi il campione di sangue, raccolto in provette contenenti litio-eparina o sodio-EDTA come anticoagulante, viene diluito con acqua [3,10]. Questa soluzione viene adottata per far sì che il sangue subisca minori alterazioni rispetto al trattamento a caldo e per ridurre la concentrazione di proteine, lipidi, saccaridi e sali nella matrice. Inoltre il sangue, a seguito della diluizione con acqua, presenta una minore viscosità e un maggiore coefficiente di diffusione che causano una migliore estrazione dell'analita dalla matrice. A tal proposito sono state eseguite una serie di prove atte alla valutazione dei volumi di sangue da utilizzare e la relativa diluizione. Si è valutato di optare per un compromesso che favorisca l'estrazione dell'analita, ma che in contemporanea faccia fronte alle effettive disponibilità di campione ematico nella quotidiana routine di un laboratorio. A tal proposito, dopo una serie di prove mirate, si è optato per l'utilizzo di vial da 10 mL con chiusura crimp, in cui introdurre 1 mL di acqua e un pari volume di campione di sangue, effettuando dunque una diluizione 1:1. Questa scelta si basa sul fatto che le più piccole provette generalmente utilizzate per questo tipo di analisi contengono volumi di sangue poco superiori a 2 mL. Scegliendo un volume di campione ematico pari a 1 mL si è certi che si possa portare a termine l'analisi senza dover ripetere il prelievo, con la conseguente necessità di dover attendere nuovamente un periodo ritenuto idoneo e rappresentativo dal medico del lavoro dell'esposizione del lavoratore al benzene. Si è valutato come soddisfacente un rapporto 1:5 di volume di liquido rispetto alla capienza totale del vial, con uno spazio di testa pari a 8 mL, utile a favorire l'estrazione di un'elevata quantità di analita. Anche questa decisione è derivata da un compromesso tra la quantità minima di sangue che permette di ottenere la sensibilità desiderata, i quantitativi ridotti di campione a disposizione e un volume dello spazio di testa che non diluisca troppo il benzene, ma nello stesso tempo non sia troppo piccolo da rendere difficile il passaggio dell'analita nella fase gassosa.

Al fine di avere un campione di "bianco", analogo ai campioni che si sarebbero testati, da utilizzare per ottenere il grafico di calibrazione, si è optato per un pool di campioni di sangue, ottenuti da prelievi venosi di soggetti non esposti a benzene, che progressivamente sono stati additivati di benzene, in modo da avere concentrazioni rappresentative del materiale ematico dei lavoratori esposti. Tali campioni sono stati prelevati sotto forma di sangue intero in provette contenenti sodio-EDTA come anticoagulante e sono stati miscelati in modo da ottenere un unico campione rappresentativo della popolazione generale, che potesse fungere da matrice alla

quale aggiungere lo standard di benzene e anche da “bianco” per stimare eventuali interferenze. Come già anticipato, le interferenze prese in considerazione sono state quelle da matrice, verificando che nessuno dei campioni testati presentasse picchi in corrispondenza del tempo di ritenzione del benzene, e quelle dovute a eventuali impurezze presenti nello standard di benzene impiegato per ottenere la curva di calibrazione. Questa seconda valutazione è stata necessaria a causa della scarsa solubilità del benzene in acqua. Si è ritenuto infatti opportuno effettuare una serie di prove di solubilità nei solventi più comunemente utilizzati in laboratorio, utili a escludere la presenza di impurezze che eluissero in corrispondenza o immediata prossimità del picco del benzene. Inoltre, considerata la concentrazione ridotta di benzene che si desidera quantificare, è indispensabile accertarsi anche che il solvente utilizzato non contenga benzene come impurezza in concentrazione significativa. È opportuno considerare, infatti, che il benzene è diluito nel solvente con un rapporto volumetrico inferiore a 1:1000; ciò significa che la presenza di benzene come impurezza, anche solo pari allo 0.1% nel solvente porterebbe la concentrazione dell'analita in soluzione a variazioni notevoli, alterando in modo sostanziale i risultati delle prove.

I solventi che si sono testati per eseguire la diluizione di benzene sono stati toluene, tetraidrofurano, n-esano, cicloesano, metanolo, acqua e acetone. Come intuibile, a causa della loro affinità al benzene, toluene e n-esano hanno dato le risposte maggiormente soddisfacenti, ma si è esclusa la possibilità di utilizzarli perché il cromatogramma di entrambi ha evidenziato la presenza di benzene come impurezza, a concentrazioni che avrebbero potuto influire pesantemente sui risultati delle analisi. Inoltre il n-esano eluisce a un tempo di ritenzione piuttosto simile al benzene, dato che la colonna cromatografica scelta separa i composti essenzialmente sulla base della massa molare e polarità, non estremamente differenti per i due composti. Nel caso del cicloesano, quest'ultimo problema risulta essere ulteriormente amplificato, in quanto il relativo picco cromatografico è ancora più vicino a quello del benzene. Per questo motivo anche il cicloesano è stato escluso dalla lista dei possibili diluenti da utilizzare. Alcol metilico e acqua, a causa della loro polarità, non hanno presentato caratteristiche soddisfacenti in termini di solubilità dell'analita. Risposte discretamente valide, al contrario, sono state ottenute dalle prove eseguite con THF e acetone, due solventi piuttosto solubili in acqua, ma in cui allo stesso tempo viene ben solubilizzato il benzene; queste caratteristiche hanno permesso che la seconda diluizione avvenisse direttamente in acqua distillata, sostanza a sua volta affine alla matrice ematica. In ultimo, si è optato per l'utilizzo dell'acetone semplicemente per la maggiore disponibilità in laboratorio, dato che le risposte ottenute usando i due solventi sono risultate decisamente paragonabili.

Si è deciso, quindi, che la preparazione degli standard avrebbe dovuto seguire dei semplici passaggi: una prima diluizione in acetone e una seconda diluizione in acqua distillata. Gli standard di benzene in sangue intero, a concentrazione nota, sono stati ottenuti direttamente all'interno dei vial, aggiungendo piccoli volumi della soluzione standard del benzene a volumi noti di pool di sangue utilizzato. Ricordando che il benzene è un inquinante ubiquitario, nonostante i campioni fossero stati prelevati da pazienti non direttamente esposti a benzene, si è dovuto tenere in considerazione la possibilità che basse concentrazioni di analita potessero essere presenti nel campione di uno qualunque dei soggetti sottoposti a prelievo, soprattutto se fumatori. Per questo motivo, prima di ciascuna prova, si è ritenuto indispensabile effettuare un'analisi del bianco del pool di sangue utilizzato, così da eseguire la correzione opportuna nella valutazione della concentrazione di benzene negli standard utilizzati per la retta di calibrazione.

Una difficoltà aggiuntiva per la buona riuscita dei test è stata anche la necessità di avere campioni di sangue relativamente “freschi”, mantenuti a temperature refrigerate e analizzati al massimo una settimana o dieci giorni dopo il prelievo, così da ridurre al massimo la presenza di coaguli o emolisi nei campioni, variabili volutamente escluse dallo studio a causa del loro probabile e imprevedibile impatto sulla determinazione analitica ^[3,10,11]. A tal proposito si consideri che generalmente, in un laboratorio clinico, un campione coagulato o emolizzato è considerato non conforme e inadatto all'esecuzione di una qualunque analisi.

3.4 Calibrazione della micro-pipetta semiautomatica

Per tutte le prove eseguite viene utilizzata una micro-pipetta semiautomatica a volume variabile tra i 20 e 200 μL . Allo scopo di aumentare l'attendibilità di tutti i dati ottenuti, la pipetta è stata calibrata. Per la calibrazione si è utilizzata acqua bidistillata alla temperatura di 26 °C, misurata con la sonda termometrica Delta Ohm HD 9219, e la bilancia analitica Sartorius CP 225D-OCE a cinque cifre decimali. La calibrazione consiste nell'aggiungere ad una navicella da pesata, tarata e posizionata sulla bilancia, un volume noto e costante di acqua per sei volte registrando la massa per ciascuna aggiunta. L'operazione è stata condotta su quattro volumi erogati, e precisamente: 20 μL , 50 μL , 100 μL e 200 μL , in quanto sono quelli utilizzati per addizionare il benzene al sangue. Si sono utilizzati i criteri di accettabilità della calibrazione stabiliti dal laboratorio ospitante, quindi il valore assoluto del coefficiente di variazione percentuale e

l'errore sistematico devono essere inferiori al 5% per volumi $\leq 50 \mu\text{L}$ e al 3% per volumi $> 50 \mu\text{L}$.

La Tabella 1 riporta i dati ottenuti:

Capacità nominale C_n (μL)	20	50	100	200
Pesata 1 (g) A_1	0,02060	0,04929	0,09886	0,19578
Pesata 2 (g) A_2	0,02014	0,05009	0,09734	0,19614
Pesata 3 (g) A_3	0,01988	0,04989	0,09878	0,19502
Pesata 4 (g) A_4	0,01999	0,05015	0,09826	0,19505
Pesata 5 (g) A_5	0,02044	0,04998	0,09842	0,19307
Pesata 6 (g) A_6	0,02021	0,04988	0,09833	0,19501
Valore medio (g) \bar{A}	0,02021	0,04988	0,09833	0,19501
Capacità misurata C_m $\bar{A} * W_t$	20,30	50,09	98,75	195,85
Errore sistematico percentuale $\sigma \%$ $\sigma \% = \frac{(C_m - C_n)}{C_n} * 100$	1,5	0,19	-1,25	-2,08
Coefficiente di variazione percentuale $CV\%$ $CV\% = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^6 \frac{(A_i - \bar{A})^2}{5}}}{\bar{A}} * 100$	1,3	0,62	0,553	0,544

Tabella 1: dati e calcoli relativi alla calibrazione della micro-pipetta semiautomatica utilizzata per le aggiunte di benzene

La pipetta viene ritenuta idonea all'utilizzo, in quanto rientrante nei parametri di accuratezza e precisione previsti dal laboratorio ospitante. Questo significa che il suo utilizzo non dovrebbe introdurre errori sistematici nel processo analitico.

4. DoE (Design of Experiment)

Il DoE (Design of Experiment) al giorno d'oggi è una tecnica statistica piuttosto utilizzata per verificare l'impatto di una o più variabili su di un processo e, parallelamente, valutare le possibili interazioni tra ogni variabile considerata. Il DoE cambia la classica prospettiva sperimentale che prevede di mantenere tutte le variabili costanti ad eccezione di una che viene modificata, introducendo un approccio modellistico nel quale è l'intero spazio sperimentale che viene indagato, utilizzando opportune e pianificate composizioni dei fattori sperimentali che si ritengono efficaci relativamente al fenomeno studiato. La strategia risulta essere vantaggiosa, in quanto è più agevole mettere in evidenza, oltre che i singoli effetti delle variabili, anche l'interazione positiva o negativa fra loro esistente.

Al fine di tenere in considerazione contemporaneamente tutti i fattori da cui il processo è dipendente, il DoE permette, quindi, di eseguire uno studio relativamente a ciascuna variabile e alla combinazione tra esse. Viene analizzato ciascun fattore introdotto nel processo, a ogni livello, con l'intento di ridurre il numero di prove da eseguire, ma al contempo migliorare la qualità delle modifiche apportate al metodo, con una valutazione a tuttotondo delle prove che si stanno eseguendo. Proprio per questo motivo, alla base del DoE vi è senza dubbio una dispendiosa, ragionata e mirata progettazione dello studio che si vuole eseguire nella sua interezza: da quelle che sono le variabili da prendere in considerazione al processo al quale si intendono applicare i fattori che si desiderano studiare, in modo da ottenere il miglior risultato possibile dal processo, purché rimanga sostenibile da un punto di vista pratico ed economico. È di estrema importanza che il processo sul quale si intende applicare il DoE sia conosciuto a fondo, in modo da definire chiaramente quali sono i fattori che possono influenzare i risultati dell'esperimento e facendo in modo di non avere interferenze non correlabili alle prove eseguite, ossia riducendo al minimo l'effetto di fattori incontrollati che, come già descritto in precedenza, per il benzene ematico potrebbero essere l'utilizzo di campioni emolizzati o caratterizzati dalla presenza di coaguli. Solo una volta che si sono considerati tutti questi aspetti si procede con una serie di prove, in cui si combinano tra loro tutte le possibilità prese in considerazione: ogni variabile, a ogni livello scelto in fase di progettazione, viene testata sul processo. Anche le variabili stesse vengono tra loro combinate ai differenti livelli previsti in fase di progettazione, così da testare ogni combinazione possibile e poter effettuare una valutazione complessiva di ciascuna variabile e dell'interazione che ciascuna di esse ha con le altre. Per esempio, il DoE permette di valutare se due variabili, entrambe apparentemente

migliorative per il processo, in combinazione tra loro abbiano un effetto additivo, e quindi ulteriormente migliorativo, o al contrario si contrastino tra loro.

Nel caso del benzene ematico, avendo già deciso a priori le condizioni operative cromatografiche e che la diluizione del sangue debba essere 1:1 con acqua, si sono considerate come variabili del DoE quelle che potessero incidere sull'estrazione dell'analita dalla matrice. Nello specifico si sono considerati come fattori di interesse: la temperatura di incubazione del vial nell'autocampionatore per spazio di testa, l'aggiunta di acido o di sodio cloruro al campione. Come già detto in precedenza, la temperatura può giocare un ruolo fondamentale nell'estrazione del benzene dal sangue, ma occorre ribadire che questa complessa matrice contiene una serie di composti organici termolabili. Di particolare interesse è il dato riportato in letteratura riguardo la temperatura critica, pari a 43 °C, alla quale le proteine iniziano a denaturarsi, un fattore che cambia notevolmente le caratteristiche della matrice [3,10,11]. Non conoscendo se la denaturazione delle proteine sia un fattore che favorisce l'estrazione di benzene dal sangue, si è scelto di testare una temperatura di incubazione maggiore a quella critica e una inferiore. Il primo fattore scelto per il DoE è dunque la temperatura di incubazione dei vial. I livelli presi in considerazione sono due: 40 e 60 °C.

Con l'intento di uniformare la forza ionica dei campioni di sangue, che tra loro potrebbero essere molto differenti, svariati studi propongono l'aggiunta di sodio cloruro alla matrice [3,10]. L'aumento della salinità della soluzione finale potrebbe favorire il passaggio del benzene dal sangue allo stato gas dello spazio di testa. Per questo motivo si è deciso di considerare due livelli nel DoE relativi al fattore forza ionica: il primo con assenza di sodio cloruro, utilizzando semplice acqua distillata per la diluizione dei campioni; il secondo impiegando acqua con concentrazione di NaCl pari a 5 g/L, che significa una concentrazione aggiuntiva del sale nel sangue pari a 2.5 g/L.

L'ultimo fattore preso in considerazione è il pH del campione, che, se sufficientemente basso, è causa della denaturazione chimica delle proteine. In questo caso l'interesse è principalmente volto a studiare l'impatto sul processo che potrebbe avere la denaturazione a basse temperature o la combinazione della denaturazione chimica e termica sul campione. I livelli considerati nel DoE sono anche in questo caso due. Si intende valutare l'impatto che potrebbe avere l'utilizzo di una soluzione acida per la diluizione del campione di sangue rispetto alla semplice aggiunta di acqua distillata. Il primo livello è rappresentato dall'utilizzo di acqua distillata, il secondo dall'utilizzo di una soluzione acquosa di acido solforico a concentrazione 1.8 M. Ovviamente, come previsto dal DoE, si definiranno le prove per valutare la combinazione di ciascuna variabile a ciascun livello e, considerata la complessità della matrice, per verificare la

ripetibilità del metodo, si eseguiranno cinque repliche per ciascuna prova. Un DoE per tre variabili, ciascuna considerata su due livelli e con cinque repliche per ciascuna prova, porta all'esecuzione di quaranta prove totali, che possono poi essere tra loro confrontate così da ottenere la valutazione finale dello studio eseguito.

Per semplicità si è deciso di associare una lettera a ciascuna delle variabili utilizzate:

- Temperatura di incubazione dei vial (A)
- Acidificazione del campione (B)
- Aggiunta di NaCl (C)

Ai livelli è stato associato il segno “meno” per il livello basso (40 °C come temperatura di incubazione del vial, assenza di sodio cloruro e di acido), mentre il segno “più” è stato associato al livello alto (temperatura di incubazione del vial: 60 °C, soluzioni acquose di acido solforico 1.8 M e di NaCl 5 g/L per la diluizione del campione). Per convenzione si decide di nominare ciascuna combinazione con le sole lettere delle variabili caratterizzate da segno positivo.

Per ottenere le combinazioni possibili si struttura il DoE come da Tabella 2:

	A	B	C
1	-	-	-
A	+	-	-
B	-	+	-
AB	+	+	-
C	-	-	+
AC	+	-	+
BC	-	+	+
ABC	+	+	+

Tabella 2: rappresentazione grafica della struttura del DoE, in cui A, B e C rappresentano le variabili prese in considerazione, mentre + e - i livelli relativi a ciascuna variabile. A sinistra della tabella viene riportato il nome assegnato a ogni prova

Il risultato che si desidera ricavare dal DoE è comprendere quale pre-trattamento del campione di sangue porti alla migliore estrazione dell'analita, quindi alla maggiore area del picco del benzene nel cromatogramma. Occorre sottolineare che, per lo studio del DoE, occorre sottrarre all'area di ciascun picco preso in considerazione quella del rispettivo bianco. Questo perché, per avere campioni ematici quanto più freschi possibile, si dovranno utilizzare per ciascuna delle prove dei pool di campioni di sangue differenti, contenenti quindi una concentrazione variabile di benzene.

5. Risultati

Per sviluppare il DoE è stata condotta una serie di prove su campioni addizionati di benzene, in modo da ottenere una concentrazione di 1.37 $\mu\text{g/L}$ di sangue. La scelta deriva dal fatto che si desidera ricavare una retta di calibrazione nell'intervallo di concentrazioni da 0.280 a 2.69 $\mu\text{g/L}$, tipico dei livelli ematici di benzene, sia per le persone esposte che per la popolazione generale, per cui il valore di riferimento è attualmente considerato pari o inferiore a 0.72 $\mu\text{g/L}$ ^[15]. Il valore di 1.37 $\mu\text{g/L}$, intermedio rispetto ai punti estremi della retta di calibrazione, è stato considerato particolarmente rappresentativo. Nonostante le cinque repliche siano state eseguite solo per la concentrazione target del DoE, per ciascun set di prove si è ricavata una retta di calibrazione a cinque punti, così da poter valutare se la risposta strumentale fosse sempre lineare. Tale valutazione non sarà considerata ai fini del DoE, ma sarà sfruttata per trarre le conclusioni finali sul miglior metodo di estrazione del benzene dal sangue.

I punti scelti per la costruzione delle curve di calibrazione, riferiti alla concentrazione di benzene, sono i seguenti:

- Bianco del pool di sangue (differente per ciascuna delle prove eseguite)
- 0.280 $\mu\text{g/L}$
- 0.695 $\mu\text{g/L}$
- 1.37 $\mu\text{g/L}$
- 2.69 $\mu\text{g/L}$

La retta di calibrazione comprende inevitabilmente anche il “bianco” che è stato considerato come il valore relativo alla concentrazione nulla di benzene. Occorre ricordare che, avendo utilizzato pool di sangue differenti per ciascuna prova eseguita, i dati presi in analisi nel DoE sono inevitabilmente influenzati dalla concentrazione di benzene presente nel “bianco”. Per questo motivo, a ciascuno standard iniettato, è stato sottratto il rispettivo valore di “bianco”.

Come detto in precedenza, si è proceduto alla preparazione dello standard di benzene mediante due diluizioni, la prima in acetone, la seconda in acqua distillata. In un matraccio da 50 mL sono stati introdotti 20 μL di benzene, portati successivamente a volume con acetone. Il matraccio è stato ben agitato in modo da omogeneizzare il contenuto; quindi, si sono prelevati 20 μL di soluzione che sono stati introdotti in un matraccio da 500 mL, a sua volta portato a volume utilizzando acqua distillata. La soluzione così ottenuta possiede una concentrazione pari

a 14.08 µg/L di benzene. Chiaramente, per evitare il rischio di possibili evaporazioni di benzene, che avrebbero causato una diminuzione della concentrazione con conseguente alterazione dei risultati, si è preparata per ciascuna prova del DoE una soluzione di benzene fresca.

Per ottenere i pool di sangue intero, con aggiunta di EDTA come anticoagulante, sono stati eseguiti prelievi in giornata su persone non professionalmente esposte a benzene. Ogni aliquota di sangue è stata trasferita in una provetta da 50 mL, delicatamente agitata per un tempo sufficiente ad ottenere un pool omogeneo. Dopo la miscelazione è stato rapidamente preparato il campione in ciascun vial dedicato all'analisi, per evitare che la parte liquida e quella corpuscolata del sangue si separassero, dando vita a un campione eterogeneo con l'intrinseco rischio di alterare i risultati delle prove. Per la preparazione di ogni vial si sono utilizzate pipette semiautomatiche per il prelievo di 1 mL di sangue e di 1 mL di acqua.

Si è applicato immediatamente un tappo con chiusura crimp al vial del bianco. Al contrario, per gli standard, la chiusura crimp con tappo è stata effettuata immediatamente dopo aver addizionato al campione la soluzione acquosa di benzene utilizzando una pipetta semiautomatica come da Tabella 3.

Volume standard (µL)	Volume totale (mL)	Concentrazione benzene in soluzione (µg/L)	Concentrazione benzene relativa al sangue (µg/L)
20	2.020	0.139	0.280
50	2.050	0.343	0.695
100	2.100	0.670	1.37
200	2.20	1.28	2.69

Tabella 1: volumi dello standard di benzene utilizzati nella preparazione dei campioni di sangue e conseguenti concentrazioni

In cui:

- “volume standard” corrisponde alla quantità di soluzione standard di benzene aggiunto nel vial per spazio di testa;
- “volume totale” è il volume di liquido totale presente nel vial, considerando i volumi additivi;

- “concentrazione benzene in soluzione” è il calcolo della concentrazione totale di benzene presente nel vial, ottenuta moltiplicando la concentrazione dello standard (14.08 µg/L) per il volume aggiunto e dividendo per il volume totale;
- “concentrazione benzene relativa al sangue” è il valore più interessante della prova, cioè quello che sarà utilizzato per il DoE. È il calcolo della concentrazione di benzene che dovrebbe essere presente nel sangue per ottenere un picco equivalente a quello della prova effettuata. Si calcola moltiplicando la concentrazione del benzene in soluzione per il volume totale diviso il volume di sangue utilizzato per la prova (1 mL).

Nelle prove si è considerata trascurabile l’incidenza della riduzione del volume dello spazio di testa come conseguenza dell’aggiunta delle aliquote di soluzione standard, trattandosi di volumi piuttosto contenuti.

Le variabili del DoE, ovvero i trattamenti effettuati sul sangue prima dell’analisi, sono state tutte applicate in fase di diluizione del campione. Nel caso B si è utilizzata una soluzione acquosa di acido solforico 1.8 M, mentre nel caso C una soluzione acquosa di NaCl (5 g/L). Per la combinazione tra i casi B e C si è optato per l’utilizzo di una soluzione di acido solforico 1.8 M contenente 5 g/L di sodio cloruro.

Per ridurre al minimo le variabili legate al fattore tempo e all’invecchiamento dei campioni, ogni set di vial è stato preparato e caricato sullo strumento immediatamente, analizzando in ordine casuale i vari punti e le repliche di ciascuna prova prevista dal DoE. Per rendere quanto meno soggettiva possibile l’integrazione dei picchi del cromatogramma, si è deciso di procedere all’analisi dei dati utilizzando sempre gli stessi parametri. Anche la visualizzazione del cromatogramma è stata fatta sempre nelle medesime condizioni, mantenendo costante il rapporto tra il tempo della corsa cromatografica e l’intensità del segnale del picco.

5.1 Prova 1

Nella “prova 1” tutte le variabili sono mantenute al livello meno, per cui:

- Temperatura dell'autocampionatore: 40 °C
- Nessuna aggiunta di acido
- Nessuna aggiunta di NaCl

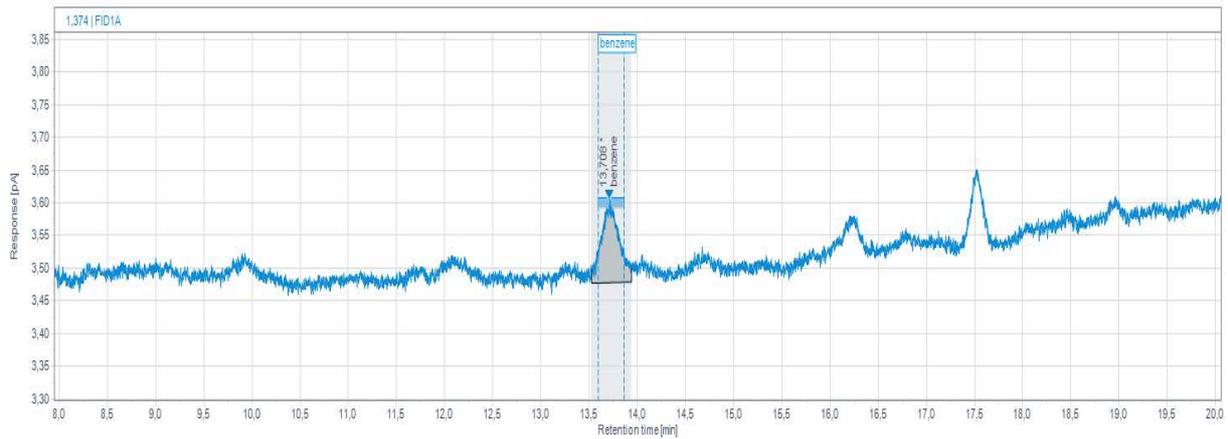


Figura 2: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova 1 con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova 1 sono riportati in Tabella 4:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.32
0.280	0.74
0.695	0.92
1.37	1.40
1.37	1.24
1.37	1.24
1.37	1.38
1.37	1.34
2.69	2.60

Tabella 2: dati ottenuti dalla prova 1

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 3 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

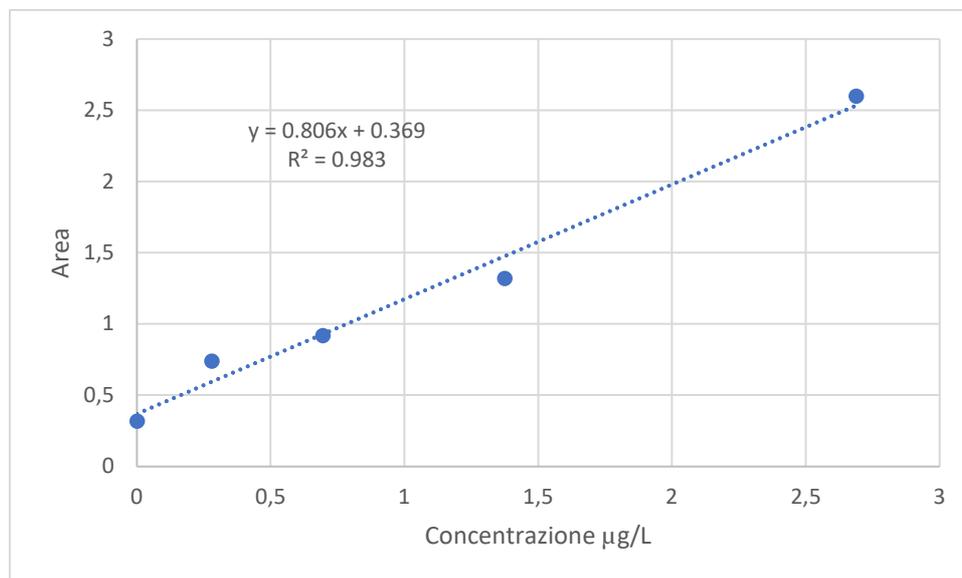


Figura 3: retta di calibrazione ottenuta dalla prova 1

La retta presenta un R^2 di 0.983, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, non risulta essere coagulato in alcun vial.

5.2 Prova A

Nella “prova A” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 60 °C
- Nessuna aggiunta di acido
- Nessuna aggiunta di NaCl

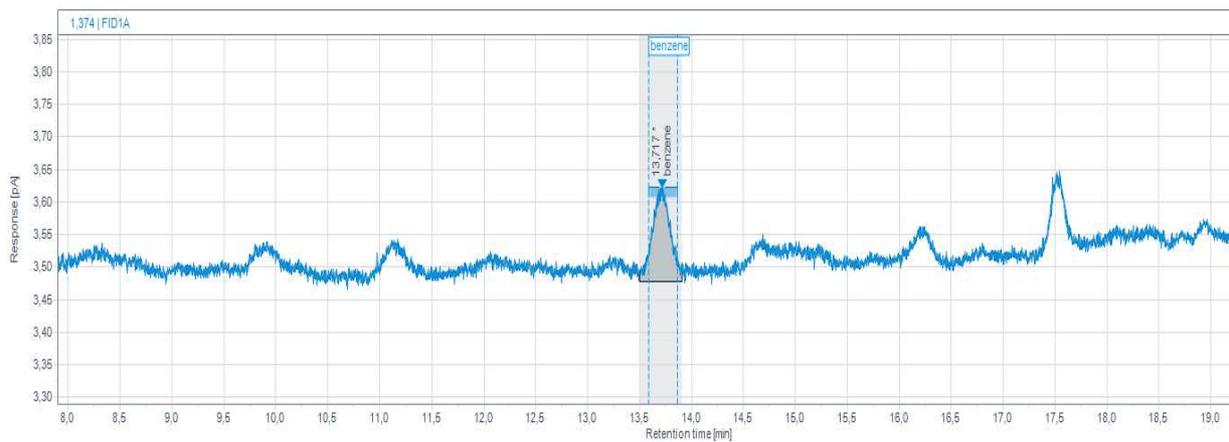


Figura 4: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova A con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova A sono riportati in Tabella 5:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.42
0.280	0.73
0.695	0.84
1.37	1.72
1.37	1.66
1.37	1.77
1.37	1.63
1.37	1.82
2.69	2.95

Tabella 5: dati ottenuti dalla prova A

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 5 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

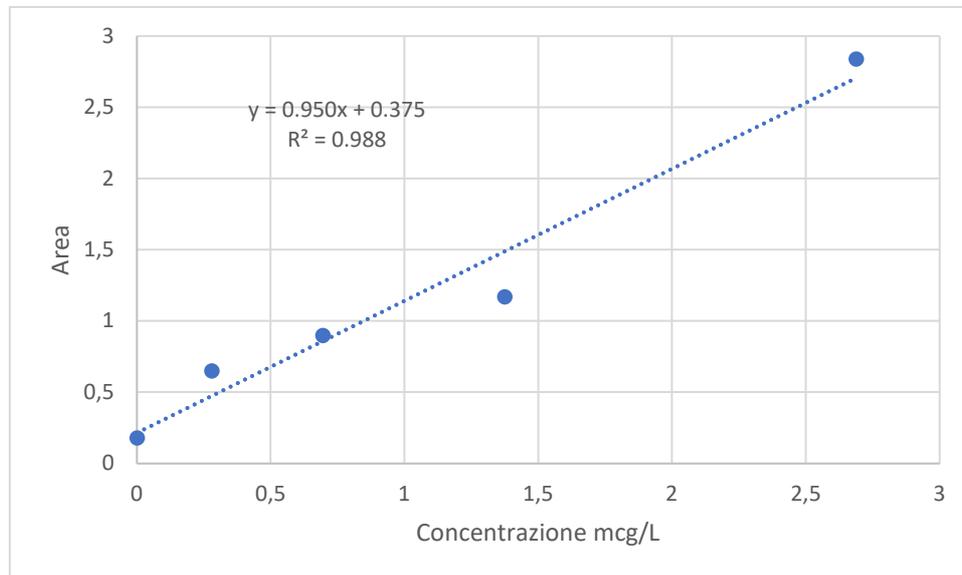


Figura 5: retta di calibrazione ottenuta dalla prova A

La retta presenta un R^2 di 0.988, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, risulta essere parzialmente coagulato in tutti i vial.

5.3 Prova B

Nella “prova B” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 40 °C
- Aggiunta di 1 mL di soluzione acquosa di acido solforico 1.8 M
- Nessuna aggiunta di NaCl

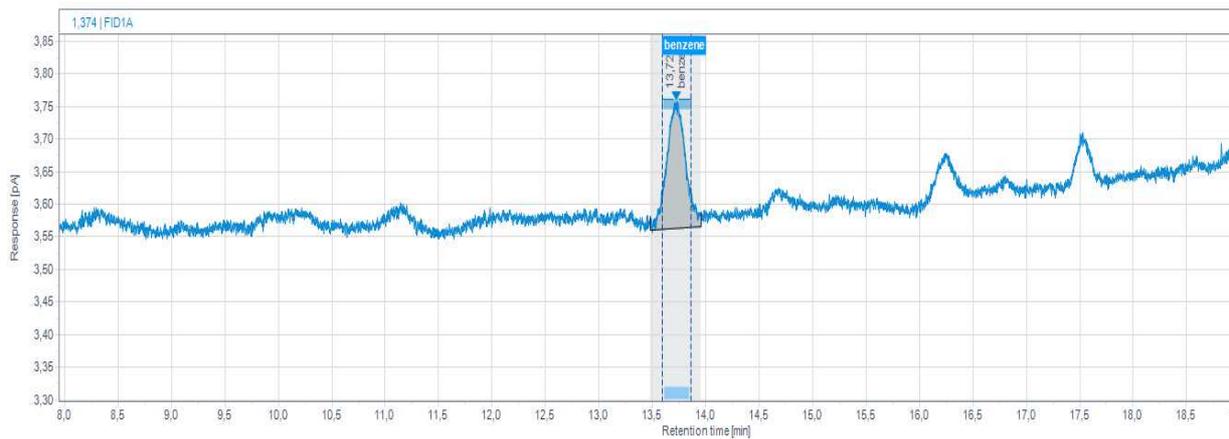


Figura 6: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova B con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova B sono riportati in Tabella 6:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.20
0.280	0.68
0.695	1.07
1.37	1.65
1.37	1.94
1.37	2.00
1.37	1.85
1.37	1.77
2.69	3.88

Tabella 6: dati ottenuti dalla prova B

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 7 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

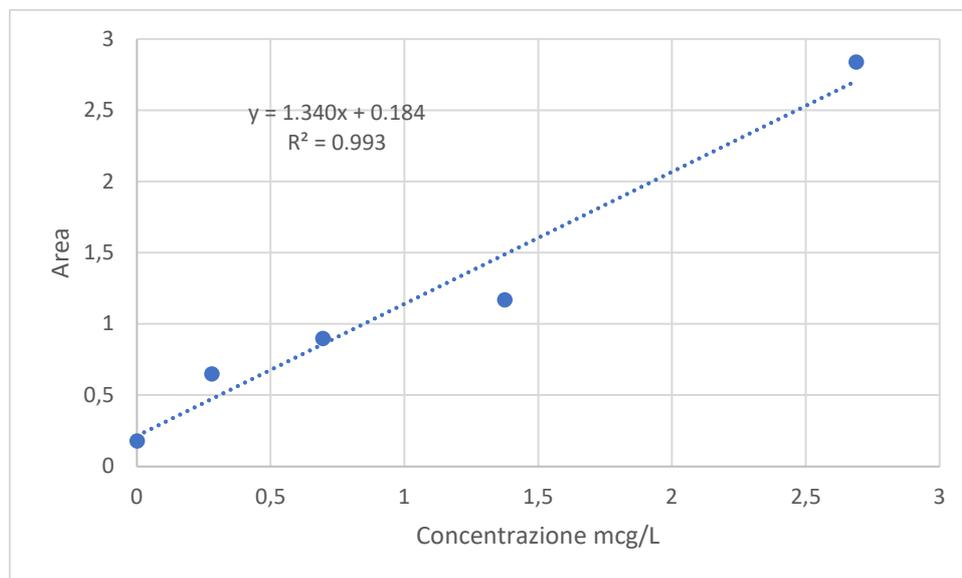


Figura 7: retta di calibrazione ottenuta dalla prova B

La retta presenta un R^2 di 0.993, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, risulta essere completamente coagulato in tutti i vial.

5.4 Prova AB

Nella “prova AB” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 60 °C
- Aggiunta di 1 mL di soluzione acquosa di acido solforico 1.8 M
- Nessuna aggiunta di NaCl

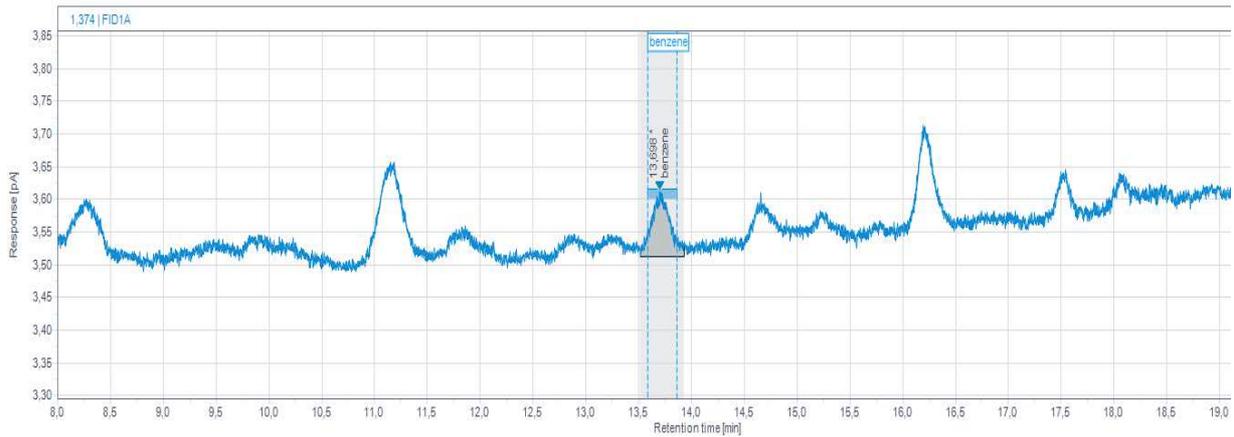


Figura 8: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova AB con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova AB sono riportati in Tabella 7:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.22
0.280	0.49
0.695	0.71
1.37	1.00
1.37	0.95
1.37	0.95
1.37	1.16
1.37	1.07
2.69	1.81

Tabella 7: dati ottenuti dalla prova AB

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 9 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

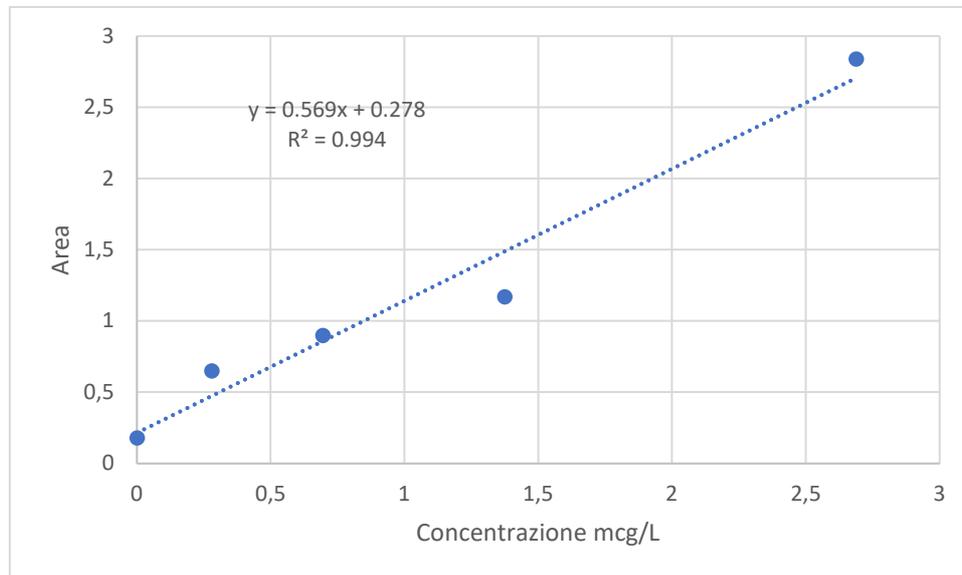


Figura 9: retta di calibrazione ottenuta dalla prova AB

La retta presenta un R^2 di 0.994, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, risulta essere completamente coagulato in tutti i vial.

5.5 Prova C

Nella “prova C” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 40 °C
- Nessuna aggiunta di acido
- Aggiunta di 1 mL di una soluzione acquosa di NaCl con concentrazione 5 g/L

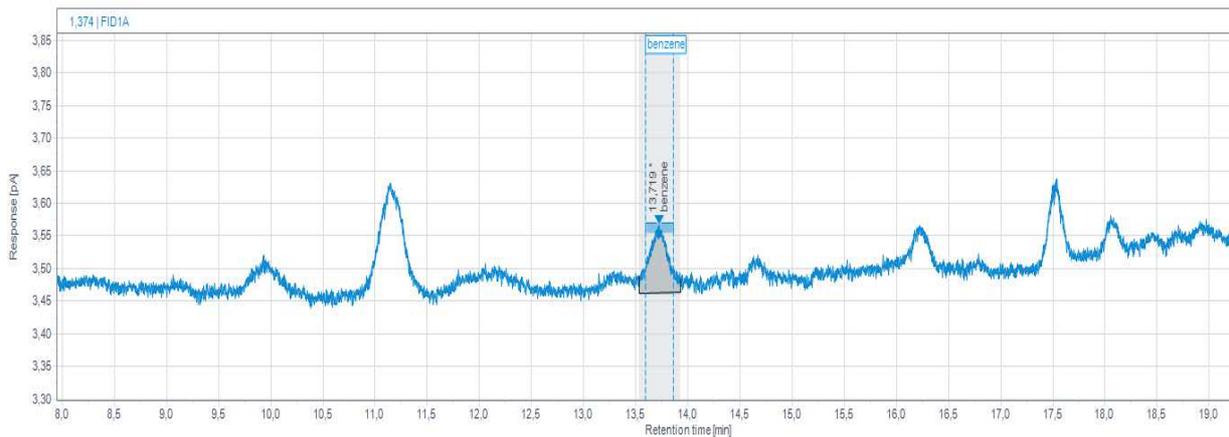


Figura 10: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova C con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova C sono riportati in Tabella 8:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.20
0.280	0.67
0.695	0.82
1.37	1.29
1.37	1.31
1.37	1.16
1.37	1.26
1.37	1.23
2.69	2.13

Tabella 8: dati ottenuti dalla prova C

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 11 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 $\mu\text{g/L}$ la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

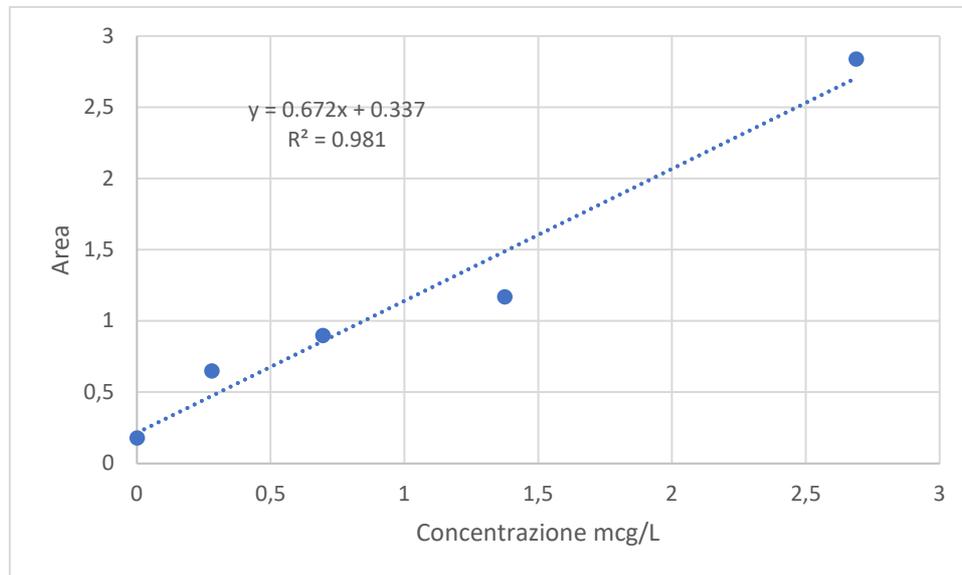


Figura 11: retta di calibrazione ottenuta dalla prova C

La retta presenta un R^2 di 0.981, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, non risulta essere coagulato in alcun vial.

5.6 Prova AC

Nella “prova AC” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 60 °C
- Nessuna aggiunta di acido
- Aggiunta di 1 mL di una soluzione acquosa di NaCl con concentrazione 5 g/L

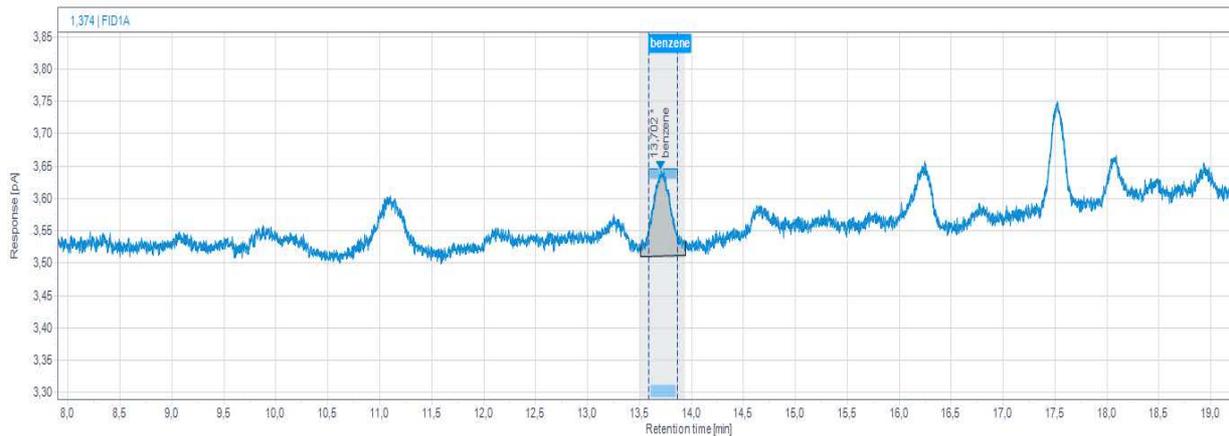


Figura 12: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova AC con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova AC sono riportati in Tabella 9:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.47
0.280	0.82
0.695	1.24
1.37	1.70
1.37	1.75
1.37	1.68
1.37	1.62
1.37	1.63
2.69	2.74

Tabella 9: dati ottenuti dalla prova AC

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 13 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

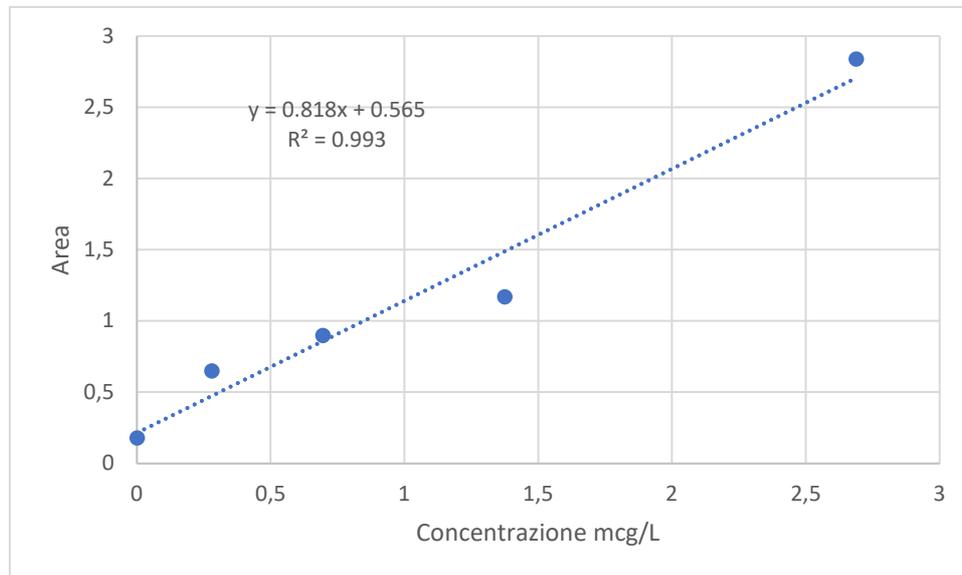


Figura 13: retta di calibrazione ottenuta dalla prova AC

La retta presenta un R^2 di 0.993, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, risulta essere parzialmente coagulato in tutti i vial.

5.7 Prova BC

Nella “prova BC” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 40 °C
- Aggiunta di 1 mL di una soluzione acquosa di NaCl (5 g/L) e acido solforico 1.8 M

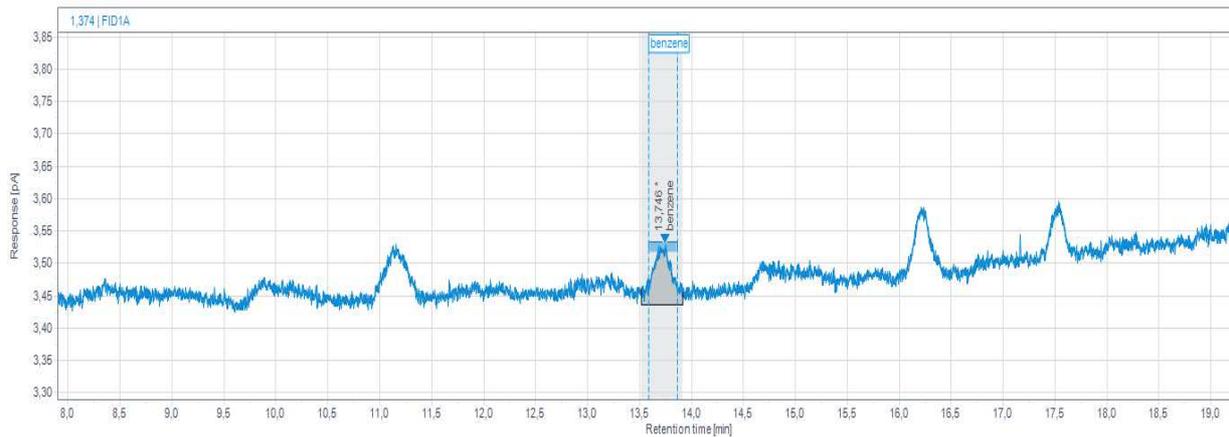


Figura 14: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova BC con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova BC sono riportati in Tabella 10:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.19
0.280	0.32
0.695	0.82
1.37	1.14
1.37	1.27
1.37	1.21
1.37	1.06
1.37	1.19
2.69	1.87

Tabella 10: dati ottenuti dalla prova BC

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 15 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

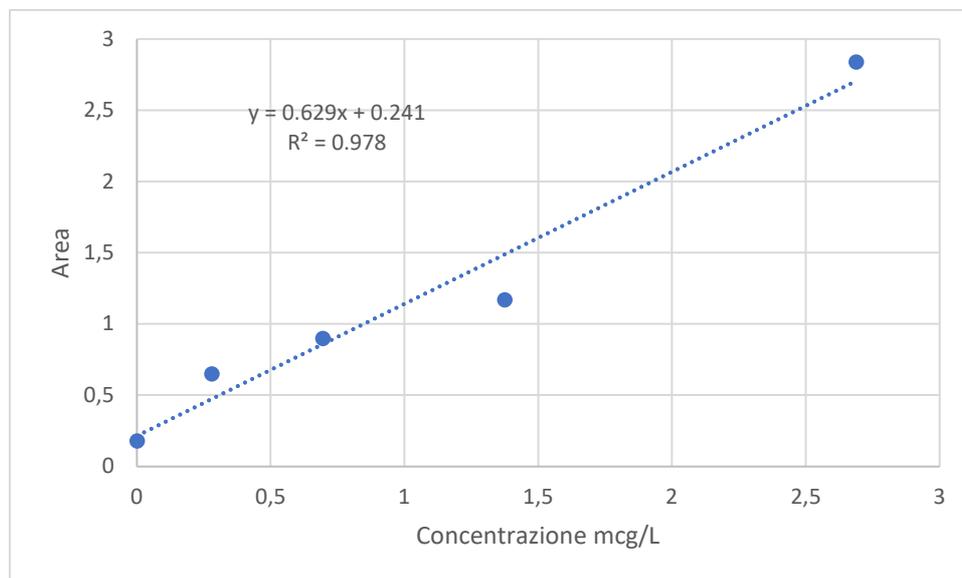


Figura 15: retta di calibrazione ottenuta dalla prova BC

La retta presenta un R^2 di 0.978, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, risulta essere completamente coagulato in tutti i vial.

5.8 Prova ABC

Nella “prova ABC” il campione di sangue viene trattato come segue:

- Temperatura dell'autocampionatore: 60 °C
- Aggiunta di 1 mL di una soluzione acquosa di NaCl (5 g/L) e acido solforico 1.8 M

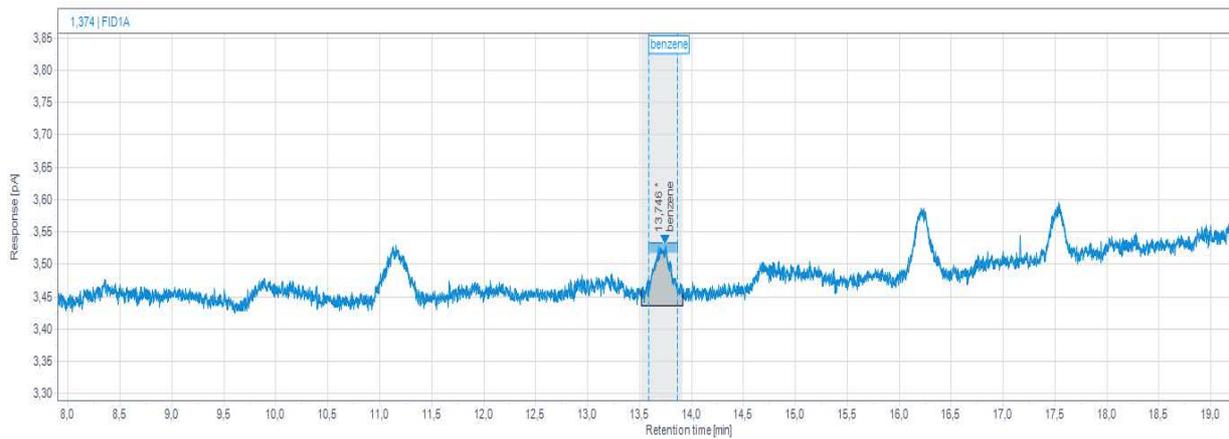


Figura 16: esempio di cromatogramma ottenuto dalla prova ABC con benzene alla concentrazione di 1.37 µg/L. Evidenziato il picco del benzene.

I dati ottenuti dalla prova ABC sono riportati in Tabella 11:

Concentrazione (µg/L)	Area del picco
Bianco	0.18
0.280	0.65
0.695	0.90
1.37	1.22
1.37	1.14
1.37	1.08
1.37	1.16
1.37	1.25
2.69	2.84

Tabella 11: dati ottenuti dalla prova ABC

La relativa retta di calibrazione è riportata in Figura 17 ed è stata ricavata considerando per lo standard alla concentrazione di 1.37 µg/L la media aritmetica delle cinque ripetizioni eseguite:

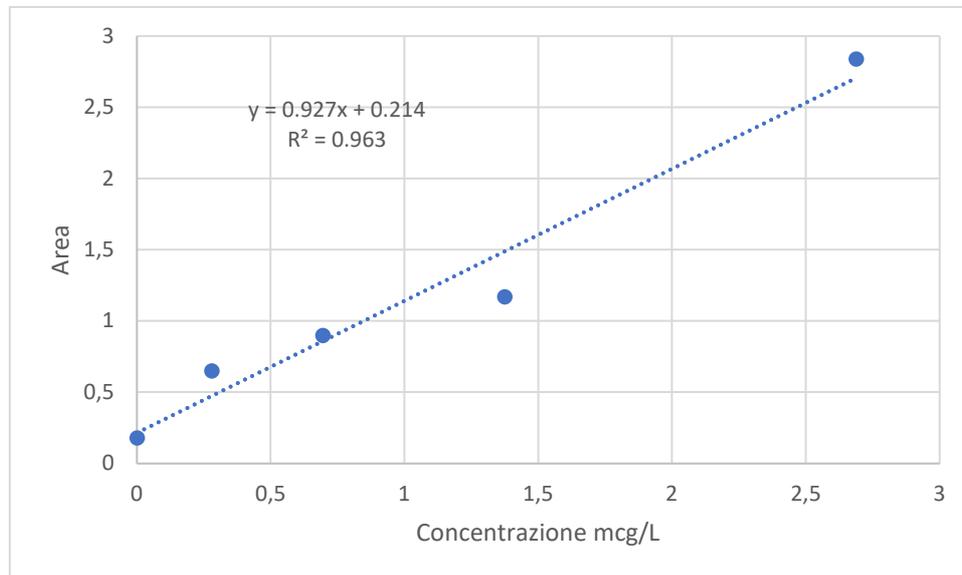


Figura 17: retta di calibrazione ottenuta dalla prova ABC

La retta presenta un R^2 di 0.963, risultato che può essere ritenuto sufficientemente soddisfacente per l'intervallo di linearità che si sta considerando. Il sangue, al termine dell'analisi, risulta essere completamente coagulato in tutti i vial.

6. Risultati DoE

Come illustrato in precedenza, il disegno sperimentale è stato strutturato sulla base di otto prove, ciascuna di esse replicata cinque volte così da verificare la ripetibilità del dato ottenuto dalla determinazione quantitativa. In Tabella 12 sono riportati tutti i risultati ottenuti per ciascuna combinazione di variabili, corretti ciascuno per il valore di bianco del pool di sangue utilizzato come matrice a cui aggiungere il benzene. Per ciascuna delle prove viene riportata la media aritmetica dell'area del picco, calcolata dalle cinque repliche. È immediatamente visibile che i risultati ottenuti con la prova B, applicando come variabile positiva la sola acidificazione del campione con acido solforico, risultino nettamente migliori rispetto a qualunque altro set di prove eseguite:

Prova	Fattori			Area del picco - osservazioni sperimentali corrette per il "bianco"					R media
	A	B	C	R1	R2	R3	R4	R5	
1	-	-	-	1.08	0.92	0.92	1.06	1.02	1.00
A	+	-	-	1.30	1.24	1.35	1.21	1.40	1.30
B	-	+	-	1.45	1.74	1.80	1.65	1.57	1.64
AB	+	+	-	0.78	0.73	0.73	0.94	0.85	0.81
C	-	-	+	1.09	1.11	0.96	1.06	1.03	1.05
AC	+	-	+	1.23	1.28	1.21	1.15	1.16	1.21
BC	-	+	+	0.95	1.08	1.02	0.87	1.00	0.98
ABC	+	+	+	1.04	0.96	0.90	0.98	1.07	0.99

Tabella 12: valori delle aree di picco ottenuti da ciascuna prova del DoE

L'analisi della varianza, dato fondamentale per effettuare qualunque tipo di valutazione sui dati ricavati, sarà affrontata al capitolo 6.2, nello specifico in Tabella 14.

6.1 Effetti dei trattamenti

Con l'intento di approfondire ulteriormente gli effetti delle variabili studiate sull'efficienza di estrazione del benzene, tutti i dati ottenuti dal DoE sono stati elaborati per cercare di comprendere quale sia effettivamente il metodo di trattamento del campione più efficace per l'ottenimento di risultati riproducibili e accurati. A tal proposito si sono evidenziati gli effetti che ciascun trattamento ha sull'estrazione dell'analita dal sangue, sia quando applicato singolarmente che in combinazione con altri trattamenti.

In Tabella 13 vengono riportati i dati ottenuti:

Media TA+	1.08	Media TA-	1.17
Media TB+	1.11	Media TB-	1.14
Media TC+	1.06	Media TC-	1.19
Media TAB+	0.96	Media TAB-	1.28
Media TAC+	1.21	Media TAC-	1.04
Media TBC+	1.07	Media TBC-	1.18
Media TABC+	1.25	Media TABC-	1.00

Tabella 13: medie degli effetti di ciascuna variabile e di ogni combinazione di variabile sul processo

I risultati ottenuti dalla combinazione dei fattori sembrerebbero dare risultati piuttosto contrastanti. Infatti, per ciascun parametro apparentemente migliorativo, si sono ottenuti risultati poco soddisfacenti combinando tra loro le variabili. Per questo motivo è di fondamentale importanza implementare lo studio e analizzare altri fattori, così da riuscire a ottenere la risposta al quesito oggetto del presente lavoro di tesi: qual è la migliore tecnica di estrazione del benzene dalla matrice sangue e come si può ulteriormente migliorare tale estrazione, al fine di ottenere la massima sensibilità del metodo.

6.2 Calcolo della varianza e della deviazione standard per ciascuna prova

In prima istanza è stata calcolata la varianza per ciascuna prova; da essa è stata estratta la varianza media, la varianza normalizzata rispetto a ciascuna prova ed a ciascun effetto, la deviazione standard correlata ad ogni singola prova e quella relativa alle tre variabili introdotte nel sistema.

È possibile ottenere la varianza utilizzando la formula:

$$S_n^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

in cui x_i è il valore ottenuto da ciascuna prova, \bar{x} il valore medio delle prove che si stanno considerando e n il numero di prove effettuate. In Tabella 14 vengono riportate le varianze relative a ciascuna variabile e ad ogni combinazione di variabili:

Prova	R1	R2	R3	R4	R5	Media	Var
1	1.08	0.92	0.92	1.06	1.02	1.00	0.0058
A	1.30	1.24	1.35	1.21	1.40	1.30	0.0061
B	1.45	1.74	1.80	1.65	1.57	1.64	0.0192
AB	0.78	0.73	0.73	0.94	0.85	0.81	0.0080
C	1.09	1.11	0.96	1.06	1.03	1.05	0.0035
AC	1.23	1.28	1.21	1.15	1.16	1.21	0.0028
BC	0.95	1.08	1.02	0.87	1.00	0.98	0.0062
ABC	1.04	0.96	0.90	0.98	1.07	0.99	0.0045

Tabella 14: dati ottenuti per le aree di picco da tutte le prove effettuate con relative media e varianza

Dalla stima della varianza ricavata sulle cinque repliche di ciascuna prova, è stato possibile ottenere il valore medio della varianza del processo, pari a 0.0070.

Rapportando il valore ottenuto con il numero di prove effettuate, è possibile ottenere una stima della varianza per ciascuna prova. Un DoE per tre variabili, ciascuna considerata su due livelli e con cinque repliche per ciascuna prova, prevede quaranta prove, per cui il numero di repliche totali è da considerarsi pari a 40. Per questa ragione la varianza relativa a ciascuna prova può essere considerata pari a 0.00018. Dividendo la varianza ottenuta per il numero di repliche eseguite, è possibile avere una stima della varianza correlata a ciascun effetto, ovvero a ciascuna variabile, che risulta pari a 0.0014.

Essendo la varianza il quadrato della deviazione standard, è possibile ottenere la deviazione standard relativa a ciascuna prova calcolando la radice quadrata della varianza stimata per una singola prova. Il risultato ottenuto è 0.013, che moltiplicato per i due livelli presi in considerazione per ciascuna prova, permette di ottenere una stima della deviazione standard correlata a ciascun effetto, pari quindi a 0.026. Quest'ultimo dato sarà utilizzato per valutare la varianza di ciascuna variabile introdotta nel processo.

6.3 Calcolo della devianza

La devianza totale (SS_T) viene calcolata con la seguente formula:

$$SS_T = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

dove x_i è il valore ottenuto da ciascuna prova, \bar{x} il valore medio delle prove che si stanno considerando e n il numero di prove effettuate.

La devianza tra i trattamenti SS_A è invece ricavata mediante la formula:

$$SS_A = \sum_{j=1}^t n * (\bar{x}_j - \bar{x})^2$$

in cui \bar{x}_j è la media – per ciascun trattamento effettuato – dei valori ricavati da ogni replica, \bar{x} il valore medio delle prove che si stanno considerando, t il numero di trattamenti effettuati e n il numero di repliche.

Infine, la devianza entro i trattamenti SS_R viene calcolata con la formula:

$$SS_R = SS_T - SS_A$$

dove SS_T è la devianza totale e SS_A quella tra i trattamenti.

Applicando le formule si ottengono i risultati di Tabella 15:

SS_T	2.552
SS_A	2.328
SS_R	0.224

Tabella 13: risultati della devianza totale SS_T , della devianza tra i trattamenti SS_A e della devianza entro i trattamenti SS_R

I gradi di libertà totali sono 39, ovvero il numero complessivo di prove effettuate meno uno. Quelli relativi alla devianza tra i trattamenti sono pari ai differenti trattamenti effettuati meno uno, quindi 7. Infine, quelli relativi alla devianza entro i trattamenti sono i rimanenti, quindi la differenza tra i totali e quelli relativi alla devianza tra i trattamenti, ovvero 32.

6.4 Calcolo della varianza totale e ANOVA

Fatte queste considerazioni è possibile calcolare la varianza per ciascun caso facendo il rapporto tra la devianza totale e i relativi gradi di libertà. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 16:

Var_T	0.065
Var_A	0.332
Var_R	0.007

Tabella 16: risultati della varianza totale Var_T , della varianza tra i trattamenti Var_A e della varianza entro i trattamenti Var_R

Al termine del test ANOVA (analysis of variance) eseguito è possibile notare che la varianza tra i trattamenti è nettamente superiore a quella entro i trattamenti ed anche alla totale. Questo induce a pensare che si possa ritenere significativa la differenza dei risultati ottenuti dai differenti trattamenti applicati, di conseguenza alcuni di questi trattamenti portano a risultati migliori. Un'ulteriore conferma può essere ottenuta mediante il test di significatività. Per questo test occorre ricavare un valore di F tabulato; si considera un valore di F per un grado di confidenza pari al 95% su 39 gradi di libertà totali, uguale a 2.31. Lo si confronta con F calcolato, ottenuto dal rapporto tra SS_A e SS_R . Dal calcolo si ottiene un valore di F calcolato pari a 47.45, nettamente superiore al valore tabulato e ciò implica una significativa differenza

tra i risultati ottenuti dai diversi trattamenti eseguiti sul campione. È possibile affermare, quindi, che i risultati ottenuti a seguito di trattamenti diversi non sono dettati dalla casualità, ma da un effettivo miglioramento nell'estrazione dell'analita dalla matrice sangue, se questa viene eseguita applicando una o più variabili tra quelle prese in considerazione.

6.5 Carta di Pareto e curva di Lorenz

Continuando ad approfondire l'analisi dei dati ottenuti, è possibile rappresentare su carta di Pareto, con relativa curva di Lorenz, gli effetti e gli effetti standardizzati di ciascuna prova eseguita. Tale diagramma può essere utile a valutare quali effetti incidano maggiormente sul processo, non differenziando tra quelli che hanno un impatto positivo e quelli che invece portano a peggiorare i risultati ottenuti. Tale valutazione può essere tuttavia fatta in seguito confrontando i dati grezzi e le relative medie ottenute con la media di tutte le prove eseguite. La rappresentazione degli effetti viene fatta riportando su un istogramma semplicemente il valore assoluto dell'effetto di ciascuna prova, come in Figura 18:

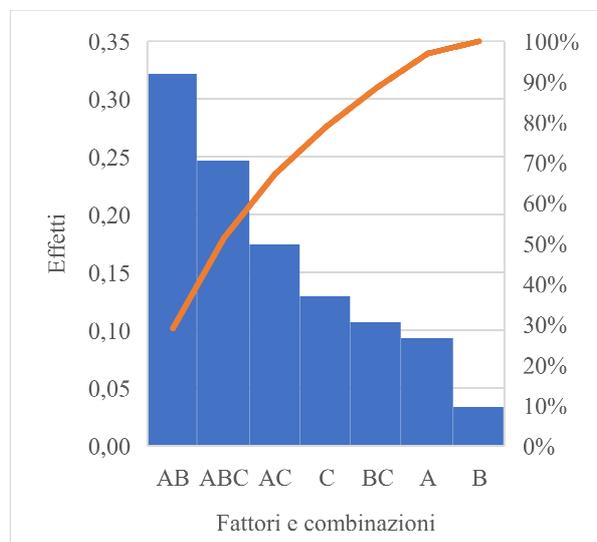


Figura 18: rappresentazione grafica degli effetti mediante l'utilizzo di carta di Pareto e curva di Lorenz

I dati riportati in Figura 16 sono stati ricavati dalla Tabella 17:

Prova	Effetto
A	0.09
B	0.03
C	0.13
AB	0.32
AC	0.17
BC	0.11
ABC	0.25

Tabella 17: valore assoluto degli effetti relativi a ciascuna variabile e combinazione di variabili

È possibile, inoltre, rappresentare gli effetti standardizzati, ottenuti dividendo il valore assoluto dell'effetto di ciascuna prova per la deviazione standard correlata a ciascun effetto, precedentemente calcolata - ovvero 0.026 – relativamente a ciascuna variabile e combinazione di variabili. L'istogramma ottenuto è qualitativamente paragonabile a quello di Figura 16.

I dati relativi agli effetti standardizzati sono riportati in Tabella 18:

Prova	Effetto standardizzato
A	3.53
B	1.27
C	4.89
AB	12.15
AC	6.59
BC	4.06
ABC	9.31

Tabella 18: valore assoluto degli effetti standardizzati relativi a ciascuna variabile e combinazione di variabili

da cui è stata elaborata la carta di Pareto con rispettiva curva di Lorenz, riportate in Figura 19:

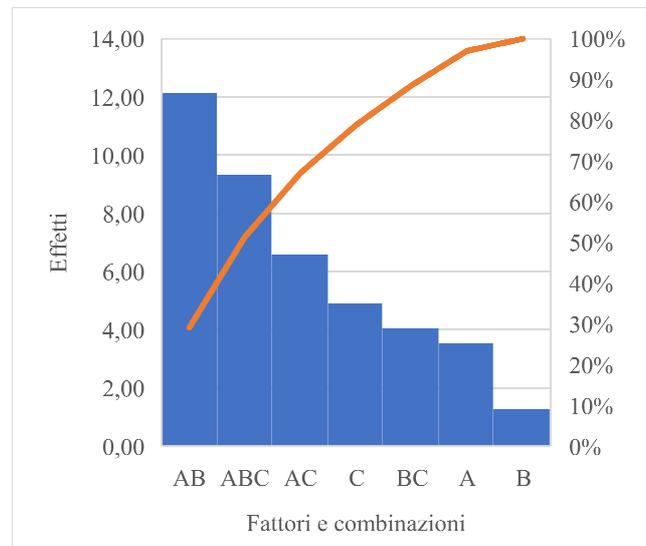


Figura 19: rappresentazione grafica degli effetti standardizzati mediante l'utilizzo di carta di Pareto e curva di Lorenz

Valutando i risultati ottenuti e osservando con attenzione ciascun effetto, si notano per lo più risultati negativi; è semplice comprendere che la combinazione delle variabili sembrerebbe non portare ai risultati sperati, ma a significativi peggioramenti del processo di estrazione del benzene dal sangue. Inevitabilmente gli effetti sottrattivi dei trattamenti effettuati portano, in prima istanza, a pensare che il trattamento più efficace possa essere quello che prevede l'utilizzo di una soluzione acquosa di sodio cloruro per la diluizione del campione di sangue. Tale conclusione è verosimilmente affrettata e scorretta, poiché probabilmente gli effetti della temperatura e dell'aggiunta di acido solforico sono inficiati negativamente nella valutazione dai pessimi risultati ottenuti quando si è provato a combinare più trattamenti. Potrebbe quindi essere una buona idea valutare attentamente anche i risultati ottenuti applicando ciascun singolo trattamento. La prova A e la prova B sembrano portare a estrazioni di analita dalla matrice maggiori rispetto agli altri casi. Al contrario, il trattamento C sembrerebbe essere meno significativo. Il fatto che nessun trattamento combinato porti a ottimi risultati incide anche sull'effetto ABC che, per come è strutturato il calcolo, è sovrastimato perché su di esso incidono positivamente le combinazioni aventi due livelli negativi e uno positivo (prova A, B e C). Per evitare di trarre conclusioni affrettate e valutare in modo più approfondito l'effetto ottenuto sul sistema dalla combinazione di più fattori, si è studiata nel dettaglio ogni prova e l'interazione esistente tra ciascuna variabile.

6.6 Effetti A, B e C

Sono stati studiati gli effetti correlati a ciascuna singola variabile introdotta nel processo e ne è stata graficata la tendenza mettendo in ascissa i due livelli più e meno, e in ordinata il valore dell'effetto. In Figura 20 viene riportato l'effetto A:

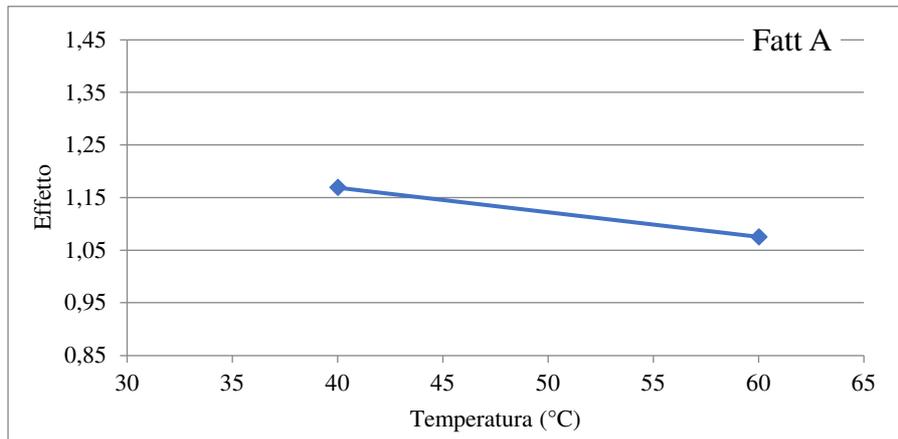


Figura 20: effetto del fattore A in relazione alla temperatura

L'effetto B è graficamente rappresentato dalla Figura 21:

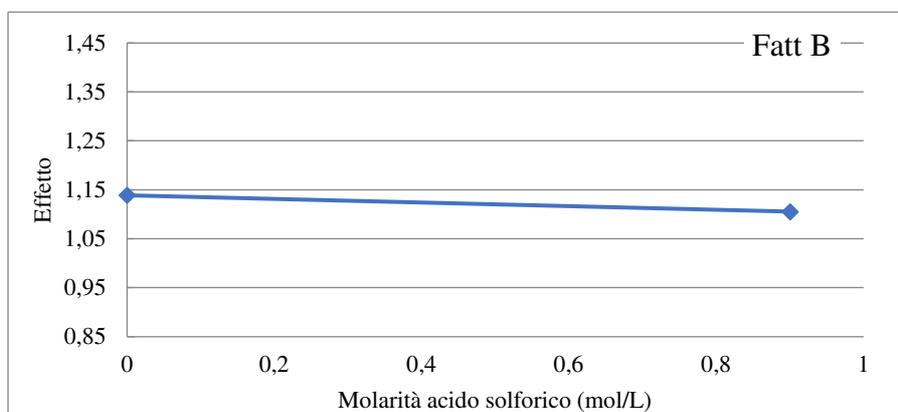


Figura 21: effetto del fattore B in relazione alla concentrazione di acido solforico

In Figura 22 viene riportato l'effetto C:

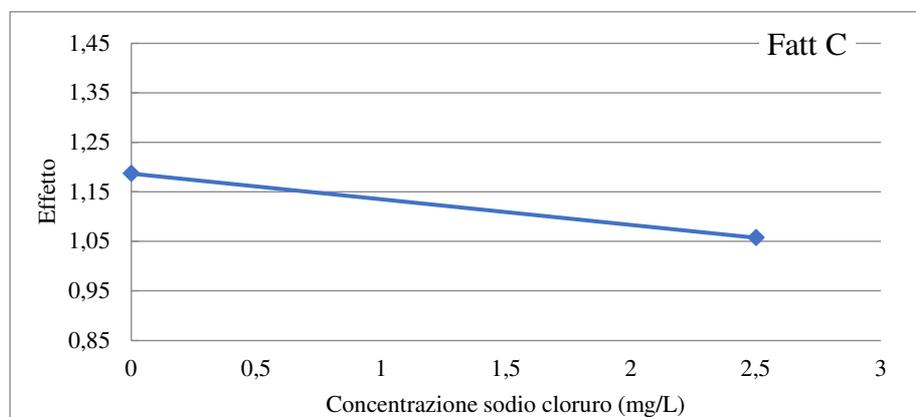


Figura 22: effetto del fattore C in relazione alla concentrazione di sodio cloruro

Tutti i fattori hanno un effetto apparentemente negativo sul sistema. Le tre rette presentano infatti un trend decrescente nel passaggio dal livello negativo a quello positivo. È quindi opportuno, a questo punto, valutare l'effetto dell'interazione tra ciascuna variabile.

6.7 Interazione effetti A-B

L'interazione che si ottiene sull'effetto B al variare del fattore A viene rappresentata graficamente in Figura 23:

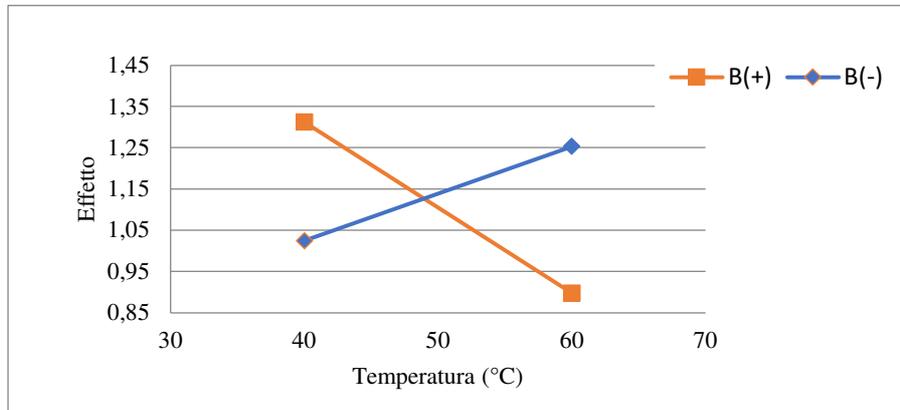


Figura 23: andamento dell'effetto B al variare del livello della temperatura

Al contrario in Figura 24 viene riportata l'interazione che, al variare del fattore B, si instaura sull'effetto A:

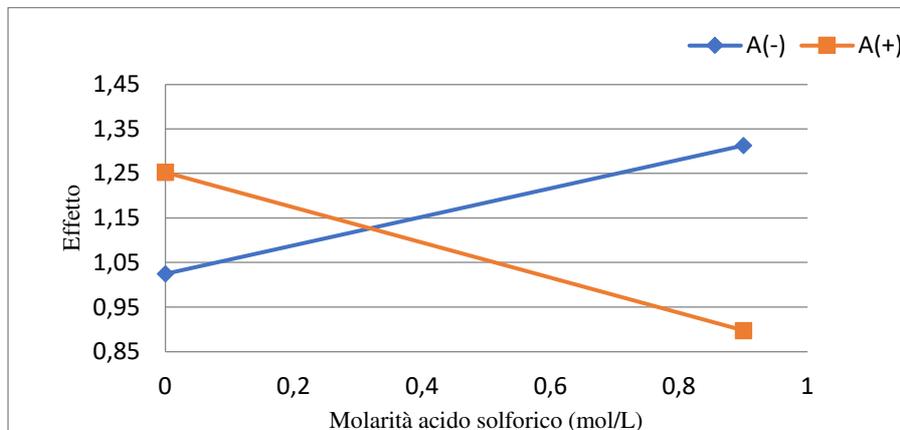


Figura 24: andamento dell'effetto A al variare della concentrazione di acido solforico

In entrambi i casi le rette si intersecano, con un andamento in direzione opposta. Queste considerazioni portano ulteriormente a confermare che l'acidificazione del campione di sangue e il trattamento dello stesso a più alte temperature, se combinati tra loro, non portano alcun miglioramento all'estrazione dell'analita dalla matrice.

6.8 Interazione effetti A-C

Lo stesso procedimento viene utilizzato anche per studiare gli effetti dell'interazione tra i fattori A e C. In Figura 25 viene riportata l'interazione che si ottiene sull'effetto C al variare della temperatura di incubazione del vial, nell'autocampionatore in spazio di testa:

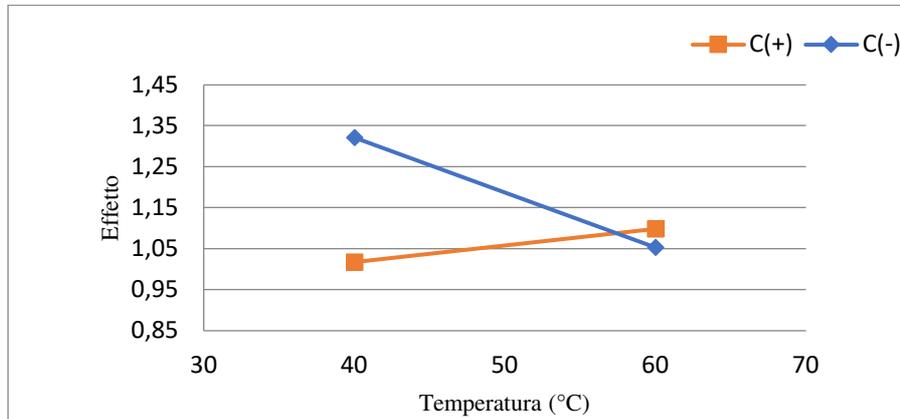


Figura 25: andamento dell'effetto C al variare della temperatura

Allo stesso modo viene riportata, in Figura 26, l'interazione che, al variare del fattore C, si instaura sull'effetto A:

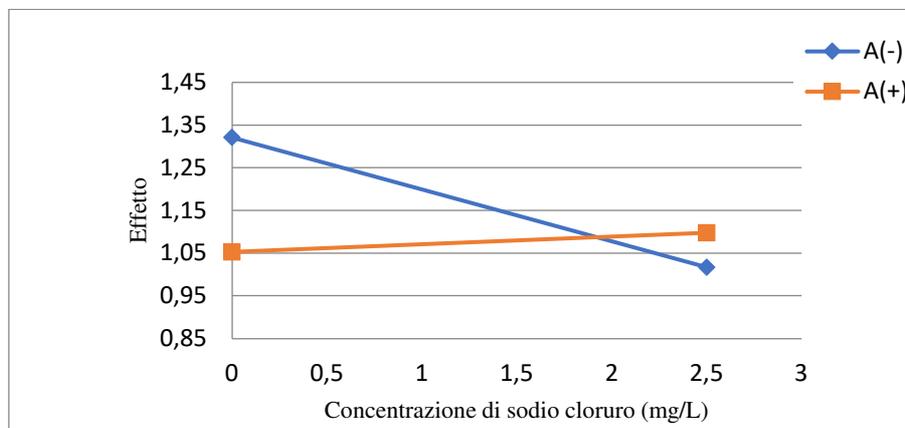


Figura 26: andamento dell'effetto A al variare della concentrazione di sodio cloruro

Grazie ai grafici appena mostrati è possibile confermare quanto anticipato in precedenza. L'interazione tra A e C ha un effetto complessivamente positivo; entrambe le rette relative al livello più hanno infatti una pendenza positiva e indicano un miglioramento dell'estrazione del benzene dal sangue, se paragonate al rispettivo livello meno. Tuttavia è opportuno osservare che, in entrambi i casi, il valore più alto dell'effetto si ottiene mantenendo entrambi i fattori al livello inferiore. Questi risultati ribadiscono che non si possa considerare semplicemente

l'andamento della retta relativa all'interazione, ma sia sempre necessario tenere nel dovuto conto anche i valori raggiunti da ciascun effetto preso in considerazione. D'altra parte non è da escludere che, impiegando concentrazioni di NaCl maggiori o temperature più alte di quelle studiate in questo disegno sperimentale, l'interazione positiva A-C possa portare ad un miglioramento sostanziale dell'estrazione dell'analita dalla matrice. Tale possibilità dovrà essere approfondita ulteriormente per escludere eventuali interazioni con fattori esterni, quale la maggiore denaturazione dei componenti organici del sangue o la maggiore predisposizione a formare coaguli.

6.9 Interazione effetti B-C

Ancora una volta viene studiata l'interazione di un fattore al variare di un altro. In questo caso in Figura 27 viene riportata l'interazione che si ottiene sull'effetto C al variare del fattore B:

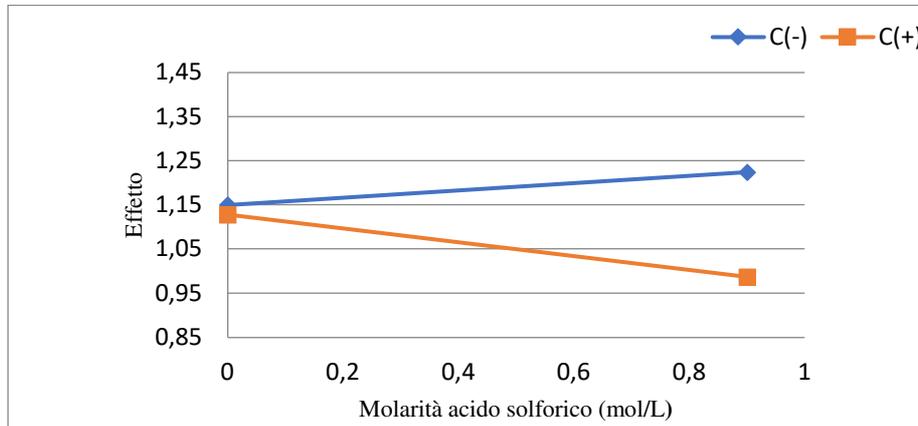


Figura 27: andamento dell'effetto C al variare della concentrazione di acido solforico

In Figura 28 la medesima operazione viene ripetuta per valutare l'interazione che, al variare del fattore B, si instaura sull'effetto C:

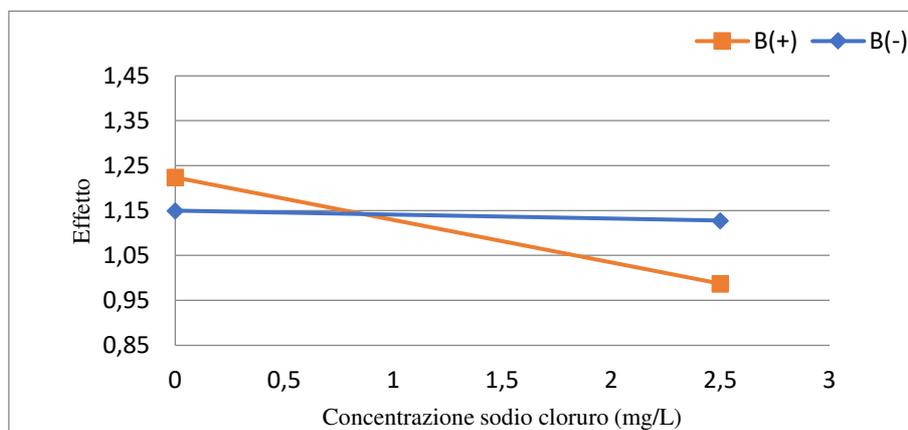


Figura 28: andamento dell'effetto B al variare della concentrazione di NaCl

Il fattore B conferma la sua scarsa compatibilità con altri trattamenti evidenziato dalla pendenza negativa di entrambe le rette, che prevedono la combinazione dei due effetti al livello positivo. Il fattore C, alle concentrazioni considerate in questo studio, sembrerebbe ancora una volta poco significativo.

6.10 *Elaborazione di un modello per la previsione dei risultati*

Dallo studio eseguito è possibile sviluppare un'equazione che metta in relazione tra loro gli effetti delle variabili usate per il DoE e ciascuna combinazione delle medesime. In tal modo si possono confrontare le previsioni ottenute dall'equazione con i dati sperimentali, per verificare l'efficacia di previsione del modello. Inoltre diventa possibile stimare il risultato di una qualunque combinazione dei fattori presi in considerazione in fase di disegno sperimentale. Per ottenere l'equazione si usano i valori degli effetti di ogni combinazione delle variabili A, B e C già riportati in Tabella 17, questa volta considerando anche il segno relativo a ciascun effetto. I dati vengono riportati in Tabella 19:

Prova	Effetto
A	- 0.09
B	- 0.03
C	- 0.13
AB	- 0.32
AC	0.17
BC	- 0.11
ABC	0.25

Tabella 19: *effetti relativi a ciascuna variabile e combinazione di variabili*

L'equazione è ottenuta usando la Formula 1:

$$P = \mu + \frac{eff_A}{2} * A + \frac{eff_B}{2} * B + \frac{eff_C}{2} * C + \frac{eff_{AB}}{2} * AB + \frac{eff_{AC}}{2} * AC + \frac{eff_{BC}}{2} * BC + \frac{eff_{ABC}}{2} * ABC$$

Formula 1: *equazione per la previsione di risultati adottando le variabili del DoE*

dove P è il valore della previsione, μ è la media di tutti i risultati ottenuti dal DoE, "eff" indica l'effetto della variabile riportata come pedice, A, B, C e le rispettive combinazioni sono ricavate dalle Formule 2, 3 e 4:

$$A = \frac{T_{prova} - \frac{(T_{max} + T_{min})}{2}}{\frac{(T_{max} - T_{min})}{2}}$$

Formula 2: *calcolo del fattore A, utile a ottenere previsioni di risultati adottando le variabili del DoE*

$$B = \frac{Acid_{prova} - \frac{(Acid_{max} + Acid_{min})}{2}}{\frac{(Acid_{max} - Acid_{min})}{2}}$$

Formula 3: calcolo del fattore B, utile a ottenere previsioni di risultati adottando le variabili del DoE

$$C = \frac{NaCl_{prova} - \frac{(NaCl_{max} + NaCl_{min})}{2}}{\frac{(NaCl_{max} - NaCl_{min})}{2}}$$

Formula 4: calcolo del fattore C, utile a ottenere previsioni di risultati adottando le variabili del DoE

in cui:

- T_{prova} , $Acid_{prova}$ e $NaCl_{prova}$ sono rispettivamente la temperatura, la concentrazione dell'acido solforico e di sodio cloruro prese in considerazione nella prova per la quale si vuole ottenere una previsione;
- T_{min} e T_{max} sono la temperatura minima e massima valutate dal DoE;
- $Acid_{min}$ e $Acid_{max}$ sono la concentrazione di H_2SO_4 minima e massima valutate dal DoE;
- $NaCl_{min}$ e $NaCl_{max}$ sono la concentrazione di sodio cloruro minima e massima valutate dal DoE.

Applicando le formule appena riportate per gli estremi minimi e massimi di ciascuna variabile presa in considerazione, è facile notare che si ottiene un valore pari a +1 nel caso in cui la variabile sia al suo valore di massimo e di -1 nel caso in cui sia al valore minimo valutato dal DoE. Si calcolano dunque i valori previsti per ciascuna prova, e quelli per ogni combinazione ottenibile dalle variabili A, B e C. I valori previsti per ogni prova sono riportati in Tabella 20:

Prova	Valore previsto
1	1.00
A	1.30
B	1.64
C	0.81
AB	1.05
AC	1.21
BC	0.98
ABC	0.99

Tabella 20: valori previsti, relativamente a ciascuna prova eseguita, durante il disegno sperimentale

In Figura 29 vengono graficati su un piano cartesiano i punti avente ascissa equivalente ai valori sperimentalmente osservati e in ordinata quelli predetti dalla equazione appena studiata:

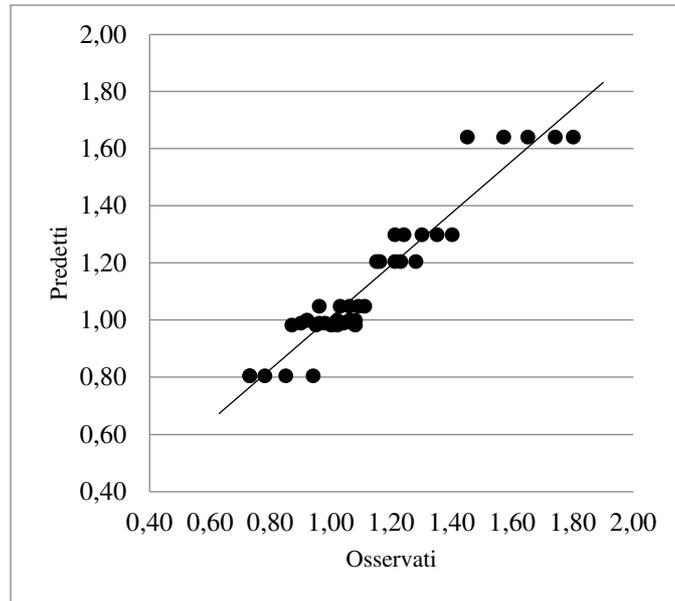


Figura 29: rappresentazione grafica dei punti ricavati sperimentalmente e di quelli predetti con la Formula 1

Lo stesso grafico è stato elaborato usando le medie sulle cinque repliche di ciascuna prova. I risultati sono riportati in Figura 30:

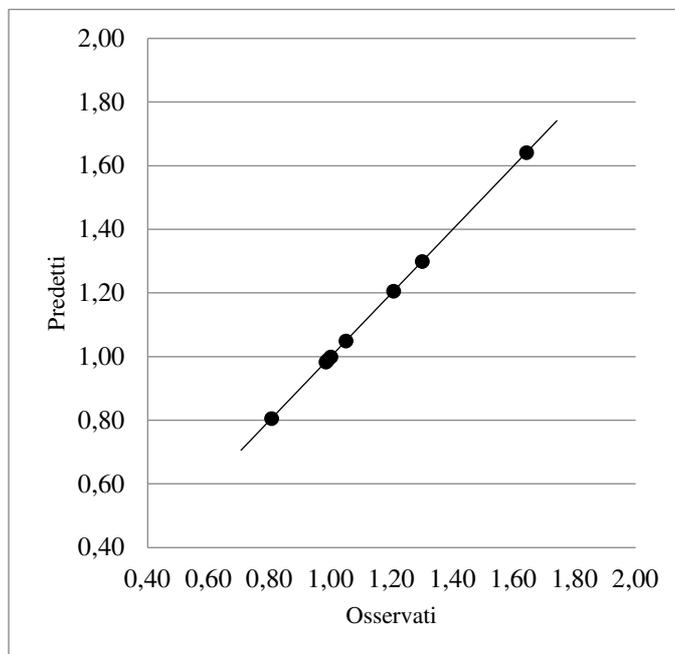


Figura 30: rappresentazione grafica delle medie di ciascuna prova sperimentale e dei punti predetti con la Formula 1

A giudicare dal risultato mostrato in Figura 30, appare molto soddisfacente la stima dei valori ottenuti usando l'equazione di predizione. I risultati predetti sono sostanzialmente equivalenti alla media dei risultati ottenuti per ogni singola prova, anche se si deve considerare che la stima viene fatta sulla base delle medie dei risultati ottenuti e degli effetti che ciascuna variabile ha sul processo.

7. Conclusioni

Il benzene ematico è, ancora oggi, un dato analitico ampiamente utilizzato dai medici del lavoro per valutare l'esposizione a breve termine dei lavoratori alla sostanza cancerogena. Permette infatti di fare valutazioni alternative e complementari rispetto ai biomarcatori urinari più utilizzati, come per esempio, l'acido trans-trans-muconico o l'acido S-fenilmercapturico. Per questo motivo il metodo ricavato dal disegno sperimentale strutturato durante il tirocinio e analizzato in questo elaborato sarà utilizzato di routine dal laboratorio Is.M.A.C. per soddisfare le richieste dei medici del lavoro facenti riferimento al settore della tossicologia occupazionale della struttura sanitaria.

La previsione indicativa del numero di richieste che saranno soddisfatte da parte di Is.M.A.C. è di circa 200 campioni all'anno. Vista la semplicità del trattamento del campione e la rapidità di esecuzione dell'analisi, potrebbe potenzialmente essere soddisfatto un numero significativamente maggiore di richieste. Complessivamente si può, quindi, ritenere soddisfacente il risultato ottenuto dalle prove effettuate, anche se, inevitabilmente, rielaborando il disegno sperimentale e ottimizzando le condizioni operative del gascromatografo e dell'autocampionatore in spazio di testa si possa migliorare ulteriormente il metodo, in termini di maggiori sensibilità e risoluzione strumentale. I trattamenti previsti dal DoE - relativamente all'aggiunta di sodio cloruro e all'aumento della temperatura di incubazione dei vial - sono stati scelti sulla base delle indicazioni della letteratura, ma si ritiene sia possibile introdurre altri parametri che potrebbero portare a ulteriori miglioramenti ^[3,4,10]. Effettivamente la decisione di acidificare il sangue, così da ottenere una completa denaturazione della matrice, è stata una possibilità valutata a monte del disegno sperimentale e non prevista in alcuna delle pubblicazioni consultate. Il trattamento ha, tuttavia, permesso di ottenere risultati validi, portando addirittura, nel caso della prova B, a quella che apparentemente sembrerebbe essere la migliore soluzione. Non essendo, infatti, riusciti a ottenere risultati soddisfacenti combinando tra loro i vari trattamenti presi in considerazione, useremo il confronto tra le prove A e B per valutare se ci siano differenze significative nell'estrazione dell'analita. Per fare ciò è opportuno utilizzare uno strumento già adottato in precedenza, ovvero l'analisi della varianza.

I risultati ricavati dalle prove A e B, corretti per il rispettivo “bianco”, sono stati riportati in Tabella 21:

Replica	Prova A	Prova B
1	1.30	1.45
2	1.24	1.74
3	1.35	1.80
4	1.21	1.65
5	1.40	1.57
Media	1.30	1.64

Tabella 21: risultati ottenuti dalle prove A e B

L’analisi della varianza viene invece riportata in Tabella 22:

	Devianza (SS)	Gradi di libertà	Varianza
Devianza totale (SS_T)	0.393	9	0.040
Devianza tra i trattamenti (SS_A)	0.292	1	0.29
Devianza entro i trattamenti (SS_R)	0.101	8	0.010

Tabella 22: analisi della varianza relativa al confronto tra i trattamenti A e B

Il valore tabulato di F per un livello di confidenza del 95% e per 10 repliche totali è 5.32. Il valore di F calcolato, ottenuto dal rapporto tra la devianza tra i trattamenti (SS_A) e quella entro i trattamenti (SS_R), è 23.19. Essendo il valore di F calcolato maggiore rispetto a quello tabulato, è possibile affermare che i due trattamenti portano a risultati significativamente diversi tra loro. Quindi uno dei due metodi dovrebbe dare risultati migliori. Considerando la evidente differenza tra le medie delle due prove, si stabilisce che il trattamento che porta alla migliore estrazione del benzene dal sangue sia quello della prova B:

- Incubazione del vial a 40 °C;
- Nessuna aggiunta di NaCl al campione;
- Aggiunta di 1 mL di soluzione acquosa di H₂SO₄ 1,8 M al campione.

Come anticipato in fase di valutazione dei risultati del DoE, occorrerebbe approfondire la questione relativa al trattamento del campione con sodio cloruro. I risultati ottenuti apparentemente non sembrano portare a miglioramenti, anzi, sembrano ridurre la quantità di benzene estratto dal sangue. Tuttavia, analizzando a fondo gli effetti ricavati dai risultati del DoE, il trattamento sembrerebbe mostrare un effetto lievemente positivo sull'estrazione dell'analita dalla matrice praticamente per ciascuna delle prove effettuate. Questo potrebbe portare a pensare che, utilizzando concentrazioni maggiori, si potrebbero avere risultati ancora migliori. Purtroppo, il poco tempo a disposizione non ha permesso di approfondire la questione, che potrà essere analizzata a fondo in un secondo momento. In fase di progettazione del DoE si è optato per il valore di 2,5 g/L di NaCl per il trattamento C in modo da evitare un eccessivo incremento delle concentrazioni di ioni sodio e cloruro nella matrice analizzata.

Anche nel caso degli altri due trattamenti, non si sono estremizzate le distanze tra gli effetti + e - di ciascuna prova, ma si potrebbe progettare un altro disegno sperimentale con valori più alti rispetto a quelli considerati in questa tesi per l'effetto +. È opportuno tuttavia considerare che, in realtà, analizzando nello specifico ciascun trattamento, si potrebbe pensare che l'unico per cui non dovrebbero esserci ulteriori variazioni a valori più elevati dell'effetto + sia il trattamento con acido. Come già riportato sopra, il campione di sangue nel caso del trattamento acido, risulta completamente coagulato. Il sangue, al termine di qualunque prova in cui sia stato utilizzato acido solforico, si presenta come un unico blocco solido all'interno del vial, formatosi a causa della denaturazione delle proteine presenti nel campione. È possibile quindi supporre che un ulteriore aumento della concentrazione dell'acido solforico non porterebbe a variazioni significative della matrice.

Al contrario i trattamenti con temperatura di incubazione più alta o aggiunta di sodio cloruro portano ad un campione solo parzialmente coagulato. Ciò induce a pensare che si potrebbero ottenere risultati differenti nel caso in cui si andasse ad aumentare ulteriormente la temperatura dell'autocampionatore in spazio di testa o la concentrazione di NaCl della soluzione utilizzata per la diluizione del campione di sangue. È tuttavia opportuno sottolineare che non si è riscontrata una relazione diretta tra la coagulazione del campione e l'ottenimento di una migliore estrazione dell'analita. Basti pensare che le combinazioni del trattamento acido con altri trattamenti, nonostante si sia verificata la coagulazione completa del campione, non hanno migliorato in alcun modo l'estrazione dell'analita dalla matrice. Non è dunque scontato che un aumento di temperatura o di concentrazione di NaCl conduca a risultati migliori di quelli ricavati da questo studio.

In Tabella 23 vengono infine riassunti i dati relativi a quello che è risultato il migliore dei trattamenti eseguiti su sangue:

Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Media	Deviazione standard
1.45	1.74	1.80	1.65	1.57	1.64	0.138

Tabella 23: riepilogo dati relativi al trattamento B

L'elaborazione del disegno sperimentale è stata fatta considerando una concentrazione che fosse circa a metà dell'intervallo di linearità del metodo: 1.37 µg/L.

Si è comunque ritenuto utile costruire una retta di calibrazione per ciascuna delle prove effettuate, così da escludere la possibilità di adottare un metodo che non garantisca linearità nell'intervallo tra 0.5 µg/L, concentrazione minima che si desidera raggiungere, e 2.69 µg/L, concentrazione che si considera difficilmente raggiungibile anche per soggetti esposti ^[5,12]. L'intervallo permette così di coprire tutte le casistiche: dalla popolazione generale, ovvero i soggetti non esposti a benzene, a chi invece è esposto professionalmente e abitualmente alla sostanza cancerogena. Anche analizzando con attenzione la retta di calibrazione ottenuta per la prova B si arriva a definire che il trattamento con il solo acido solforico 1.8 M sia il migliore tra quelli presi in considerazione: il coefficiente angolare della retta, che è direttamente proporzionale alla sensibilità del metodo, è massimo nel caso della prova B.

L'equazione della retta di calibrazione è $y = 1.3402 x + 0.1842$ con un $R^2 = 0.993$, a conferma della buona linearità dei punti.

Occorre però sottolineare che un'unica replica della curva di calibrazione non può essere considerata statisticamente riproducibile. È per questo motivo che non si è utilizzato il coefficiente angolare della retta di calibrazione come responso del DoE.

La possibilità di utilizzare il coefficiente angolare della curva di calibrazione come responso del disegno sperimentale è stata presa in considerazione nel corso della progettazione dello stesso, ma è stata inevitabilmente scartata, nonostante si considerasse il coefficiente angolare il più rappresentativo tra i responsi presi in considerazione. Infatti si sarebbero dovuti reperire quantitativi eccessivi di sangue per eseguire otto curve di calibrazione, da replicare cinque volte ciascuna. Occorre ricordare che, per tutte le determinazioni analitiche, è stato sempre utilizzato del sangue fresco, prelevato entro ventiquattro ore dall'inizio di ciascuna prova, così da ridurre al minimo la possibilità di formazione di coaguli. Tale processo avrebbe introdotto ulteriori variabili nel sistema, con il conseguente rischio di artefatti e conclusioni errate.

Anche il tempo a disposizione per sviluppare ed eseguire le prove non avrebbe permesso di portare a termine il disegno sperimentale. È per questo motivo che il DoE è stato sviluppato con l'intento di ricercare il trattamento che portasse alla migliore estrazione di analita dalla matrice a una concentrazione intermedia all'interno dell'intervallo che si desiderava studiare.

Il principale intento dell'elaborato è stato quello di poter trovare un'alternativa all'analisi del benzene nel sangue, in spazio di testa per via gascromatografica con spettrometro di massa. Il metodo proposto sviluppa un pre-trattamento del campione utilizzando sostanze di uso comune e una successiva analisi in spazio di testa per via gascromatografica con detector a ionizzazione di fiamma, uno strumento più economico e fruibile da parte dei laboratori di prova.

Sicuramente la sensibilità del metodo elaborato non può essere paragonata alle tradizionali determinazioni con spettrometro di massa, ma si ritiene possa essere sufficientemente soddisfacente per valutare l'esposizione a benzene dei lavoratori a rischio.

Questa tesi ha permesso di approfondire la tecnica del disegno sperimentale - strumento che può rivelarsi estremamente utile per un chimico - le conoscenze di tossicologia occupazionale e le problematiche annesse all'analisi di campioni biologici: argomenti stimolanti, in continua evoluzione e sempre al centro di nuovi studi e ricerche.

8. Bibliografia

- (1) *Dlgs. 9 aprile 2008, n.81 e successive modifiche e integrazioni*
- (2) *Direttiva del Consiglio Europeo 2022/431 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 9 marzo 2022*
- (3) *Alonso, M.; Castellanos, M.; Besalú, E.; Sanchez, J. M. "A Headspace Needle-Trap Method for the Analysis of Volatile Organic Compounds in Whole Blood". Journal of Chromatography A 2012, 1252, 23–30*
- (4) *Perbellini, L.; Pasini, F.; Romani, S.; Princivalle, A.; Brugnone, F. "Analysis of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and m-Xylene in Biological Samples from the General Population". Journal of Chromatography B 2002, 778 (1), 199–210*

- (5) Chambers, D. M.; Ocariz, J. M.; McGuirk, M. F.; Blount, B. C. "Impact of Cigarette Smoking on Volatile Organic Compound (VOC) Blood Levels in the U.S. Population". *NHANES 2003-2004. Environment International* **2011**, 37 (8), 1321–1328
- (6) Manno, M. "Il benzene oggi: da tossico industriale a cancerogeno ambientale". *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia* **2013**, 35:4, 247-250
- (7) Lovreglio, P.; Carrieri, M.; Barbieri, A.; Sabatini, L.; Fustinoni, S.; Andreoli, R.; D'Errico, M.N.; Basso, A.; Bartolucci, G.B.; Soleo, L. "Il monitoraggio dell'esposizione occupazionale ed ambientale a basse dosi di benzene" *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia* **2013**, 35:4, 251-255
- (8) Tranfo, G.; Paci, E.; Fustinoni, S.; Barbieri, A.; Carrieri, M. "Aspetti metodologici nel monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a basse dosi di benzene: criticità e possibili soluzioni" *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia* **2013**, 35:4, 256-258
- (9) Perbellini, L.; Faccini, G. B.; Pasini, F.; Cazzoli, F.; Pistoia, S.; Rosellini, R.; Valsecchi, M.; Brugnone, F. "Environmental and Occupational Exposure to Benzene by Analysis of Breath and Blood". *British Journal of Industrial Medicine* **1988**, 45 (5), 345–352
- (10) Alonso, M.; Castellanos, M.; Sanchez, J. M. "Evaluation of Matrix Effects in the Analysis of Volatile Organic Compounds in Whole Blood with Solid-Phase Microextraction". *Journal of Separation Science* **2013**, 36 (23), 3776–3782
- (11) Zhao, L.; Qin, X.; Hou, X.; Li, Y.; Zhang, K.; Gong, W.; Nie, J.; Wang, T. "Research on Determination of BTEX in Human Whole Blood Using Purge and Trap-Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Isotope Internal Standard". *Microchemical Journal* **2019**, 145, 308–312

- (12) Pekari, K.; Riekkola, M.L.; Aitio, A. “Simultaneous Determination of Benzene and Toluene in the Blood Using Head-Space Gas Chromatography”. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1989**, 491
- (13) Blount, B. C.; Kobelski, R. J.; McElprang, D. O.; Ashley, D. L.; Morrow, J. C.; Chambers, D. M.; Cardinali, F. L. “Quantification of 31 Volatile Organic Compounds in Whole Blood Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry”. *Journal of Chromatography B* **2006**, 832 (2), 292–301
- (14) Chambers, D. M.; Blount, B. C.; McElprang, D. O.; Waterhouse, M. G.; Morrow, J. C. “Picogram Measurement of Volatile N-Alkanes (n-Hexane through n-Dodecane) in Blood Using Solid-Phase Microextraction to Assess Nonoccupational Petroleum-Based Fuel Exposure”. *Analytical Chemistry* **2008**, 80 (12), 4666–4674
- (15) S.I.V.R. (Società Italiana dei Valori di Riferimento), **2017**. *Liste S.I.V.R. dei valori di riferimento. Edizione del 2017*

9. Ringraziamenti

Grazie alla Professoressa Tonelli e al Professor Zappoli. Il tempo che mi hanno dedicato, le osservazioni sempre stimolanti, l'attenzione e l'interesse dimostrato hanno facilitato e migliorato la realizzazione di questo elaborato.

Ringrazio Is.M.A.C. per avermi dato l'occasione di completare il ciclo di studi, parallelamente all'impegno lavorativo. Durante il tirocinio ho migliorato le mie conoscenze e lavorato su una tecnica che da sempre mi incuriosisce. In particolare un enorme grazie a Roberto, a tutta l'attenzione e la cura con la quale mi sta formando e facendo crescere professionalmente. Ringrazio Daura, fondatrice della struttura ed esempio di impegno e dedizione sul lavoro, mi ha sempre spronato a fare meglio e cercare nuovi stimoli. Grazie a Giorgio, per la fiducia che non mi ha mai fatto mancare, per avermi messo nelle condizioni di frequentare l'università e studiare nel corso degli ultimi due anni.

Un ringraziamento particolare va anche alla mia famiglia: Renzo, Rita, Arianna, Alessia, Francesco ed Enea. Per il sostegno che non mi hanno mai fatto mancare. Sono stati al mio fianco nei momenti più difficili, per sostenermi e incoraggiarmi sempre, con grande amore e pazienza.

Grazie alla mia seconda famiglia: Patrizia, Antonio, Matteo e Giulia, che con ospitalità e allegria hanno allietato anche le giornate più complicate, facendomi sentire sempre a casa.

Ringrazio i "nact" e i piccolini del gruppo. Ogni tensione e pensiero negativo inevitabilmente sparisce in loro compagnia, per far spazio a quella gioia e spensieratezza che solo persone come loro sanno regalare.

Grazie agli "ottomani", amici da sempre. Non potrei fare a meno delle avventure vissute insieme e della loro compagnia.

Ultimo ringraziamento, ma non per importanza, va alla mia futura moglie Sara. A lei devo dire grazie per la pazienza dimostrata nelle rinunce di questi ultimi due anni. Grazie per il sostegno, per avermi incoraggiato in ogni momento e aver sempre creduto in me. Per i momenti fantastici vissuti fino ad ora e per tutti quelli che divideremo da qui in avanti.