

Interconfronto di metodi analitici per la quantificazione degli zuccheri su filtri PM_{2.5}

M.C. Pietrogrande¹, C. Colombi², E. Cuccia², V. Gianelle²,
P. Lazzeri³, M. Visentin¹

¹Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche, Università di Ferrara,
²ARPA Regione Lombardia, Milano,
³APPA, Trento.



Studio in interconfronto organizzato da gruppo PMx di IAS

- Evidenza dell'impatto di combustione biomasse,
- richiesta crescente di determinare anidrozuccheri in attività di monitoraggio e ricerca,
- diverse procedure analitiche, in assenza di una standardizzata,
- interconfronto: studiare la comparabilità delle diverse procedure e la qualità dei dati.

Analizzati **6 zuccheri**:

- levoglucosano, mannosano, galattosano
- biozuccheri: marker di emissioni biogeniche:
 - glucosio: piante e microorganismi
 - arabitolo, mannitolo: spore fungine.

10 laboratori partecipanti

ARPA Lombardia, ARPA Piemonte, APPA Trento
 UniFE, UniGE, UniMI, UniVE,
 CNR-IIA, CNR-ISAC, Fondazione E. Mach.



Lab code	Sepration Instrument	Detection Instrument	Extraction solvent/derivatization
EC-PAD1	Dionex ICS2500	PAD	water
EC-PAD2	Metrohm 886	PAD	water
EC-PAD3	Dionex ICS1000	PAD	water
EC-PAD4	Thermo Scientific Dionex ECD-3000RS	PAD	water
EC-PAD5	Dionex DX500	PAD	water
EC-MS	Dionex ICS 5000	MS Quadrupolo	water
GC-MS1	GC-MS (Agilent)	MS Quadrupolo (Agilent)	ACN, BSTFA derivatization
GC-MS2	GC-MS ((Thermo)	MS Ion Trap (Thermo)	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (9:1)/ BSTFA derivatization
LC-MS	UHPLC	HQOMS (Orbitrap)	water
NMR		Varian Unity INOVA 600MHz	water

Tutti i tipi dei metodi attualmente più utilizzati

Campioni distribuiti ad ogni laboratorio:

- 29 campioni PM2.5:
 - 16 filtri campionati a Milano-Pascal,
 - 10 filtri campionati a Borgo Valsugana (Trento),
 - 3 filtri sintetici, ottenuti nebulizzando soluzioni di zuccheri a concentrazione nota;

- 3 soluzioni acquose standard.

Tempistica dello studio:

- Campionamento a settembre/ottobre 2014 e marzo 2015;
- invio ai laboratori: maggio 2015;
- raccolta risultati luglio/settembre 2015.

Trattamento dei dati

Outlier: identificati con criterio di Chauvenet e rimossi;

Valori inferiori LOD: sostituiti con il valore LOD/2 solo se non risultano outlier.

Precisione interlaboratorio:

- per ogni campione è stata calcolata media, mediana, SD e SD% sui dati dei vari laboratori;
- per ogni laboratorio si sono raggruppati i dati ed è stata calcolata media, SD e IC al 95%.

Accuratezza delle misure:

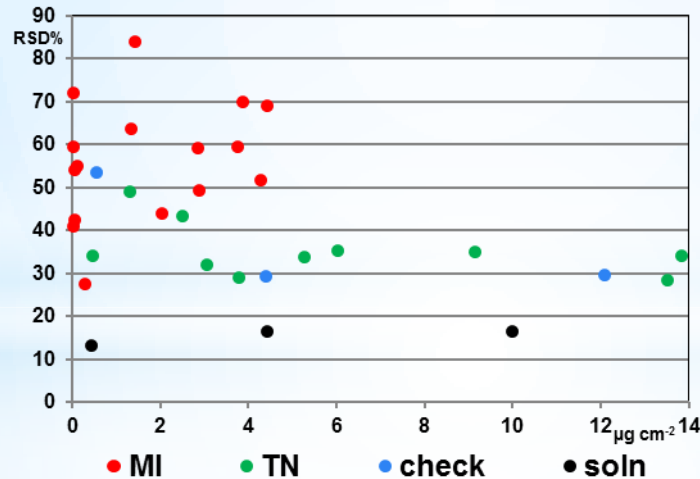
per ogni dato si è calcolato l'errore%:
$$\varepsilon\% = \frac{i_{meas} - i_{theor}}{i_{theor}} \cdot 100$$

utilizzando la mediana dei dati riportati dai laboratori come valore teorico i_{theor}

- per ogni campione è stata calcolato l'errore% medio sui dati dei vari laboratori;
- per ogni laboratorio si sono raggruppati i dati e si è calcolato l'errore% medio e IC al 95%.

Levoglucosano: studio della precisione sui 10 laboratori

Valori medi e SD% dei dati di concentrazione per ogni campione.



Variabilità dipende da:

- concentrazione dell'analita,
- complessità campione,
- scarsa omogeneità del campione.

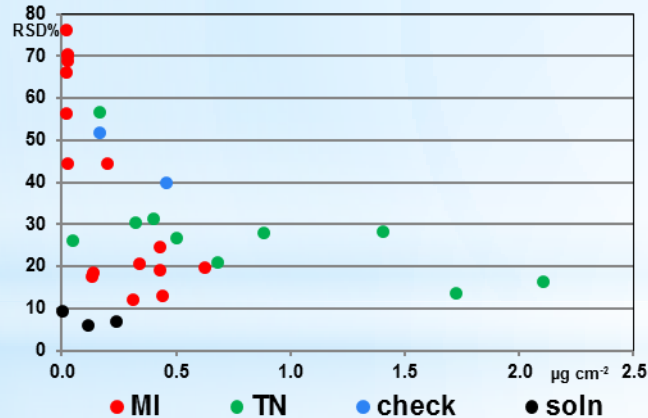
RSD%: **~50%** su filtri campionati a **Milano**: conc media: $\approx 2 \mu\text{g cm}^{-2} \approx 300 \text{ ng m}^{-3}$

RSD%: **~35%** su filtri campionati a **Trento**: conc media: $\approx 5 \mu\text{g cm}^{-2} \approx 800 \text{ ng m}^{-3}$

RSD%: **~17%** su soluzioni **standard**.

Mannosano e galattosano: studio della precisione su 7 laboratori:
EC-PAD1, EC-PAD2, EC-PAD5, EC-MS, GC-MS1, GC-MS2, LC-MS.

Valori medi e SD% dei dati di concentrazione per ogni campione



Mannosano:

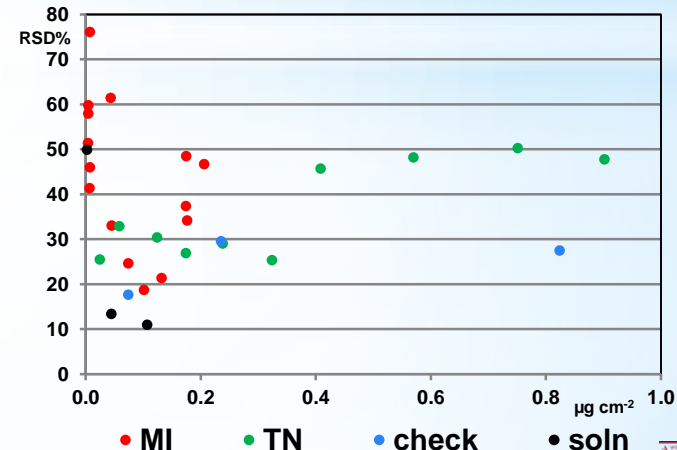
RSD%: **~40%** su filtri campionati a **Milano**
(conc media: $\approx 0.2 \mu\text{gcm}^{-2} \approx 30\text{ngm}^{-3}$)

RSD%: **~27%** su filtri campionati a **Trento**
(conc media: $\approx 0.8 \mu\text{gcm}^{-2} \approx 120\text{ngm}^{-3}$)

Galattosano:

RSD%: **~45%** su filtri campionati a **Milano**
(conc media: $\approx 0.1 \mu\text{gcm}^{-2} \approx 15\text{ngm}^{-3}$)

RSD%: **~30%** su filtri campionati a **Trento**
(conc media: $\approx 0.3 \mu\text{gcm}^{-2} \approx 40\text{ngm}^{-3}$)



Studio del **contributo dei singoli laboratori** alla variabilità complessiva:
valori medi e I.C. al 95% dei dati di concentrazione aggregati per ogni laboratorio.

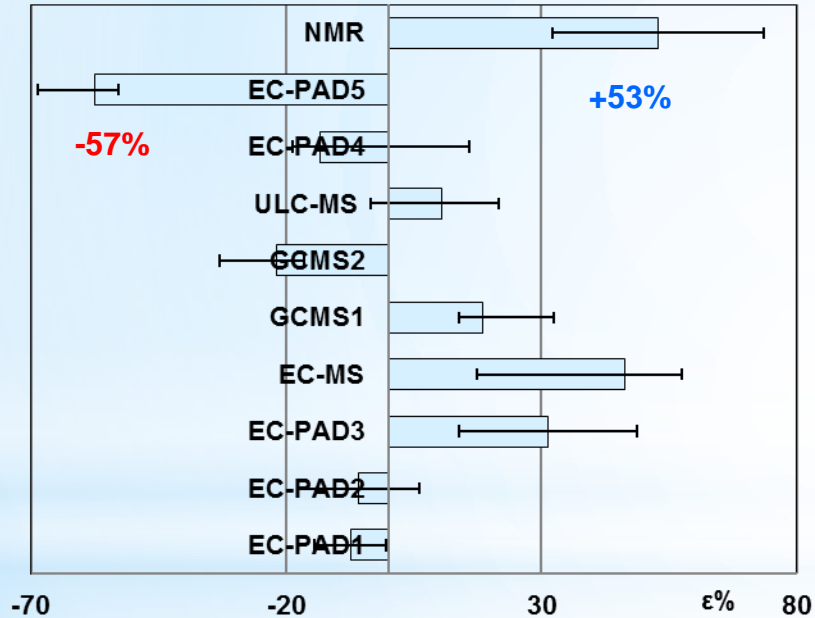
	EC-PAD1	EC-PAD2	EC-PAD3	EC-PAD4	EC-PAD5	EC-MS	GCMS1	GCMS2	LC-MS	NMR
Levoglucozan										
mean (μcm^{-2})	3.69	3.17	4.06	3.49	1.64	3.52	4.00	2.81	4.27	6.72
I.C.	1.64	1.43	1.80	1.30	0.85	1.87	1.47	1.28	1.88	1.60
Mannosan										
mean (μcm^{-2})	0.50	0.52			0.72	0.49	0.38	0.40	0.50	
I.C.	0.22	0.31			0.34	0.25	0.15	0.20	0.22	
Galattosano										
mean (μcm^{-2})	0.20	0.12			0.22	0.29	0.16	0.24	0.33	
I.C.	0.09	0.08			0.11	0.13	0.06	0.10	0.12	

One Way ANOVA:

Levoglucozanosano: ci sono differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) tra le medie dei laboratori;

Mannosano e galattosano: non ci sono differenze statisticamente significative ($p < 0.05$) tra le medie dei laboratori.

Levoglucozano: studio dell'accuratezza dei **singoli laboratori:**
valori medi di $\epsilon\%$ sui dati di concentrazione raggruppati per laboratorio.



$\epsilon\%$: $\pm 20\%$ per 6 su 10 laboratori (67%)

Yttri et al., 2015: $\epsilon\%$ tra -63 e 20% su 13 laboratori
(5 GC-MS)

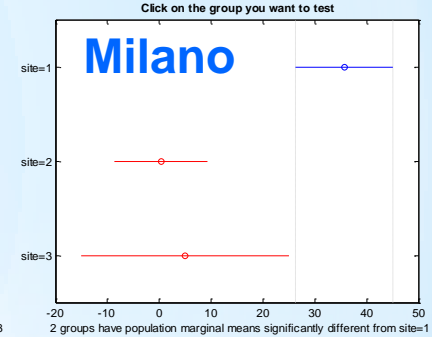
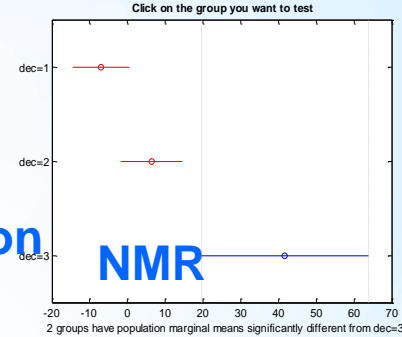
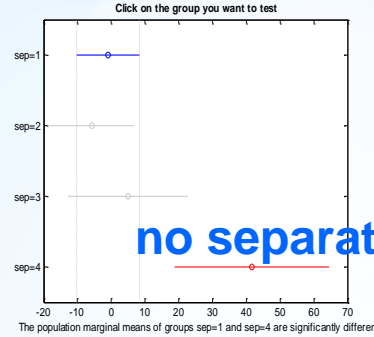
One Way ANOVA:

Ci sono differenze statisticamente significative ($p < 0.05$)
tra le medie dei 10 laboratori.

N Way ANOVA:

individuare i fattori (caratteristiche di analisi) che contribuiscono alla variabilità dei dati:

- **separazione** (EC, GC, LC, **no**),
- **rivelazione** (PAD, MS, **NMR**),
- **sito** (**Milano**, Trento, check).

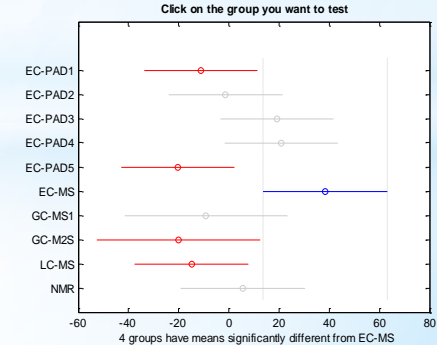
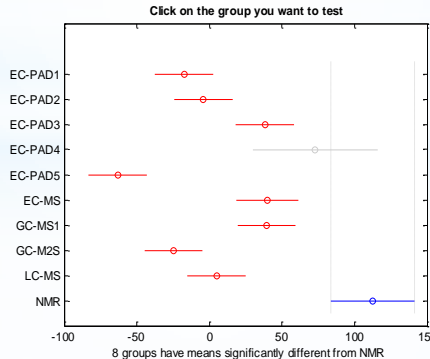


Campioni di **Milano**

Campioni Check e soluzioni standard

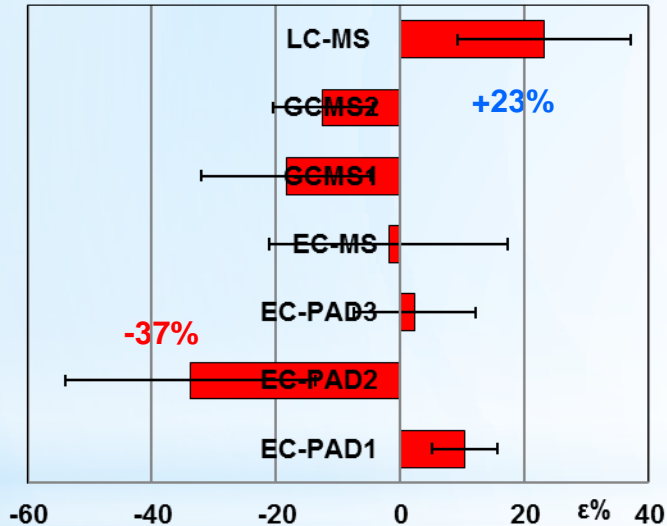
Procedura NMR:

- può essere affetta da interferenze positive di altri componenti del campione, poiché non prevede separazione preliminare:
- effetto principalmente su campioni di Milano più complessi e più diluiti



Studio dell'accuratezza dei **singoli laboratori**: valori medi di $\epsilon\%$ sui dati di concentrazione raggruppati per laboratorio.

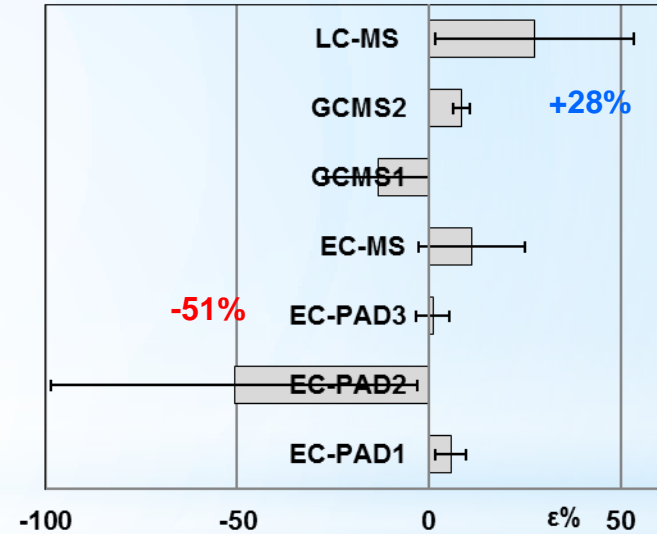
Mannosano



$\epsilon\%$: $\pm 18\%$ per 5 su 7 laboratori (72 %)

Yttri et al., 2015: $\epsilon\%$ tra -60 e +69 %

Galattosano:

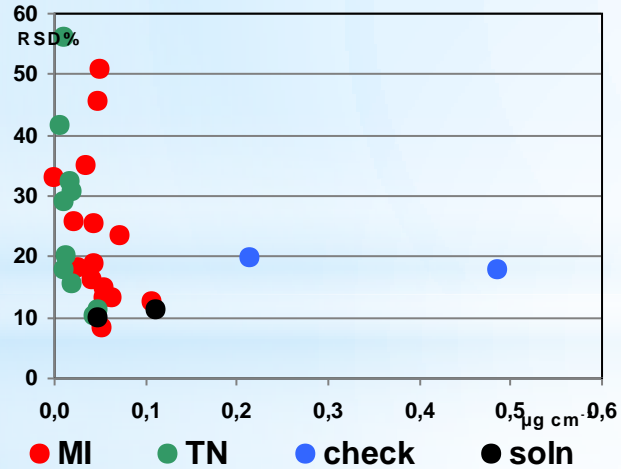


Yttri et al., 2015: $\epsilon\%$ tra -84 e +68%

N Way ANOVA: solo la variabile **separazione** determina una differenza significativa ($p < 0.05$) tra i laboratori:
LC > EC > GC

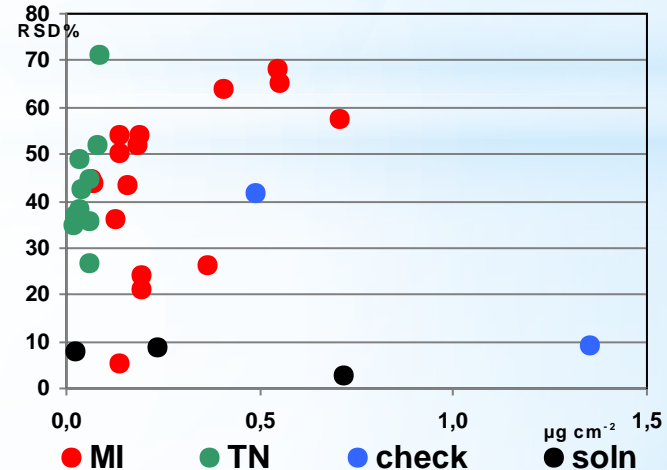
Arabitolo e **glucosio**: studio della precisione su 5 laboratori:
EC-PAD1, EC-PAD2, EC-MS, GC-MS2, LC-MS.

Valori medi e SD% dei dati di concentrazione per ogni campione



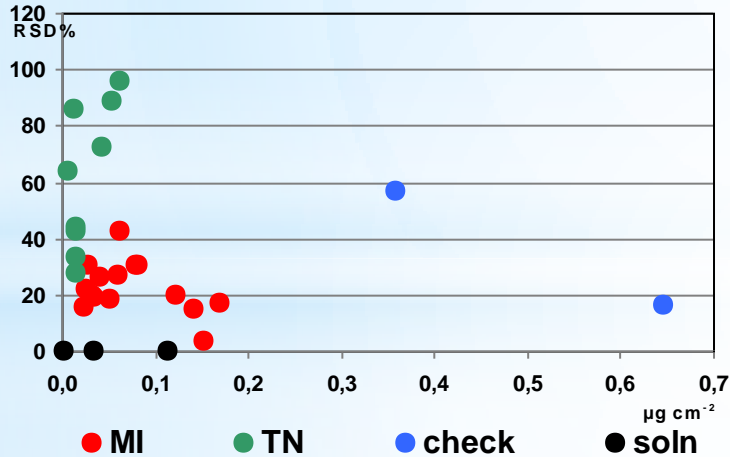
Arabitolo:
RSD%: $\approx 27\%$ su filtri campionati a **Milano** \approx **Trento**
Milano: conc media: $\approx 50\text{ngcm}^{-2} \approx 7\text{ngm}^{-3}$
Trento: conc media: $\approx 20\text{ngcm}^{-2} \approx 3\text{ngm}^{-3}$

Glucosio:
RSD%: $\sim 40\%$ su filtri campionati a **Milano** \approx **Trento**
Milano: conc media: $\approx 300\text{ngcm}^{-2} \approx 40\text{ngm}^{-3}$
Trento: conc media: $\approx 50\text{ngcm}^{-2} \approx 7\text{ngm}^{-3}$



Mannitolo: studio della precisione su 4 laboratori: EC-PAD1, EC-PAD2, EC-MS, GC-MS2.

Valori medi e SD% dei dati di concentrazione per ogni campione



Mannitolo:

RSD%: **~26%** su filtri campionati a **Milano**

(conc media: $\approx 70\text{ngcm}^{-2} \approx 10\text{ngm}^{-3}$)

RSD%: **~60%** su filtri campionati a **Trento**

(conc media: $\approx 30\text{gcm}^{-2} \approx 4\text{ngm}^{-3}$)

3 biozuccheri: studio del contributo dei singoli laboratori alla variabilità complessiva: valori medi e I.C. dei dati di concentrazione aggregati per i 5 laboratori.

	EC-PAD1	EC-PAD2	GC-MS2	EC-MS	LC-MS
Arabitol					
mean	0.12	0.11	0.13	0.06	0.22
I.C.	0.12	0.08	0.10	0.04	0.18
Glucose					
mean	0.28	0.14	0.27	0.24	0.15
I.C.	0.13	0.14	0.11	0.11	0.10
Mannitol					
mean	0.17	0.13	0.47	0.10	
I.C.	0.15	0.12	0.30	0.07	

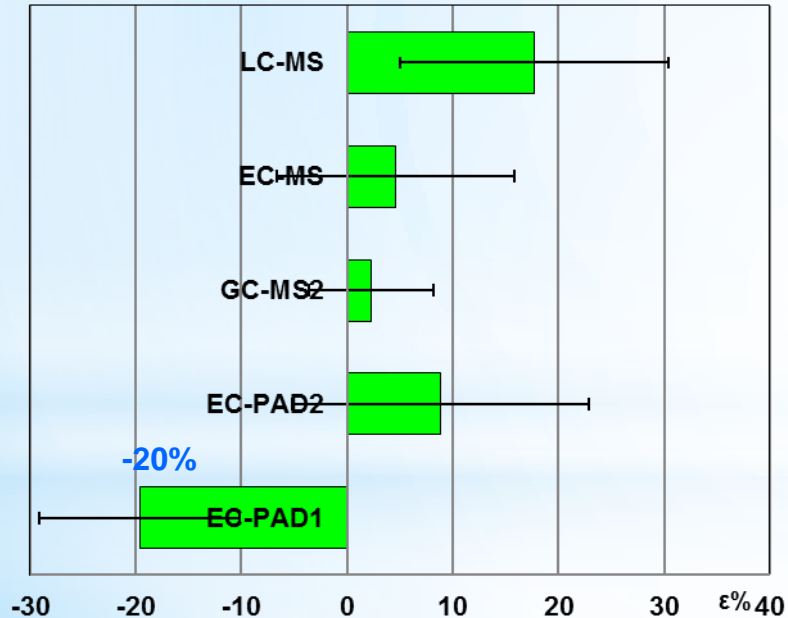
One Way ANOVA:

non ci sono differenze statisticamente significative tra i laboratori.

Studio dell'accuratezza dei **singoli laboratori**:

valori medi di $\epsilon\%$ sui dati di concentrazione raggruppati per laboratorio.

Arabito



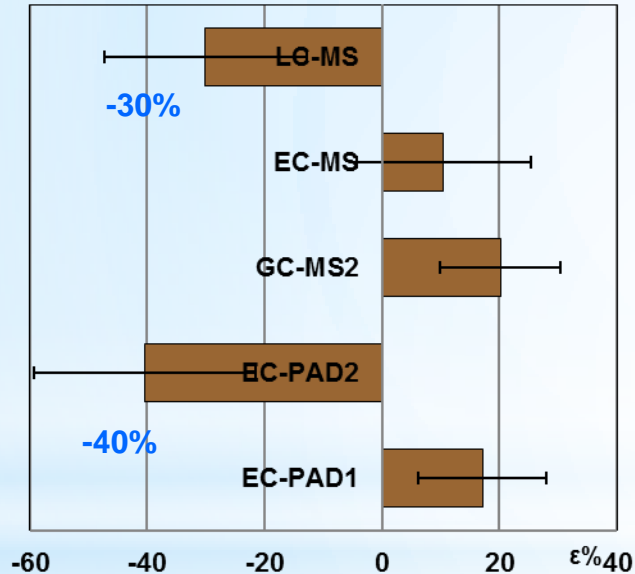
One Way ANOVA:

c'è differenza significativa ($p < 0.05$) tra i laboratori.

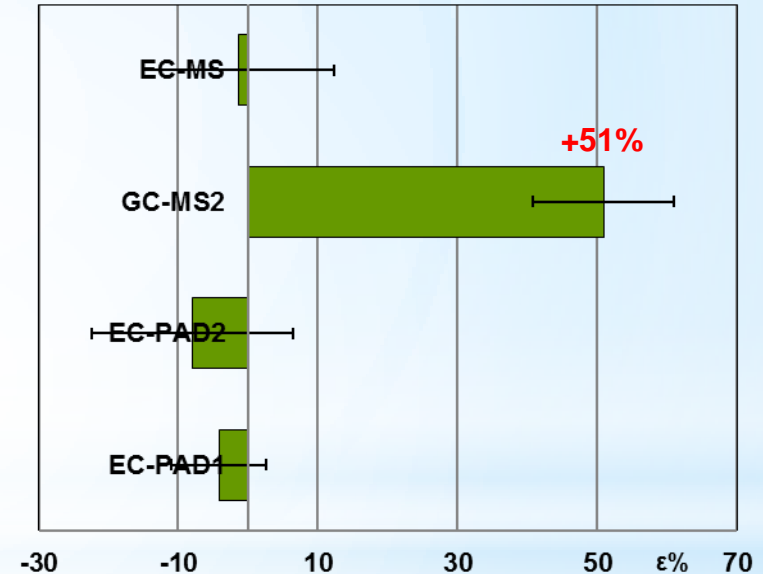
Studio dell'accuratezza dei **singoli laboratori**:

valori medi di $\epsilon\%$ sui dati di concentrazione raggruppati per laboratorio.

Glucosio:



Mannitolo



One Way ANOVA:

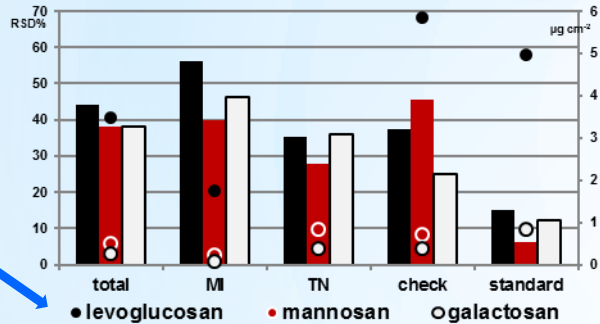
c'è differenza significativa ($p < 0.05$) tra i laboratori.

Precisione interlaboratorio: valori medi e SD% dei dati di concentrazione per gruppi di campioni

3 anidrozuccheri

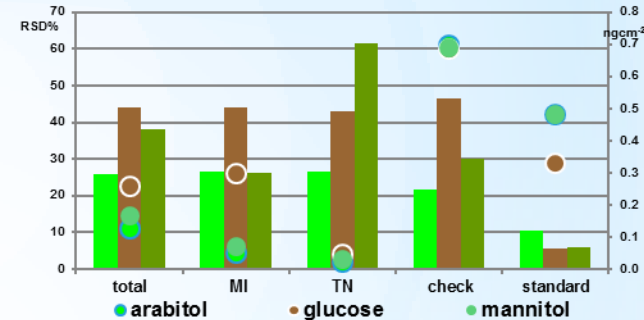
EC-PAD1, EC-PAD2, EC-PAD5, EC-MS, GC-MS1, GC-MS2, LC-MS

10
laboratori



3 biozuccheri

EC-PAD1, EC-PAD2, EC-MS, GC-MS2, LC-MS



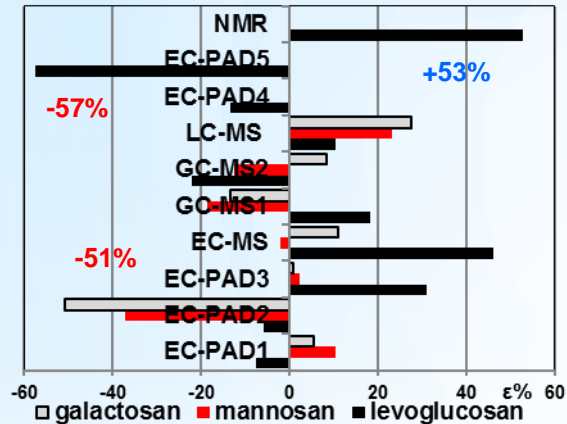
RSD% su filtri: $\approx 40\%$ fino a $\approx 30\%$ (filtri + concentrati)

Riproducibilità intralaboratorio
accettabile e indipendente dalla procedura

Accuratezza dei singoli laboratori: valori medi di $\epsilon\%$ sui dati di concentrazione raggruppati per laboratorio.

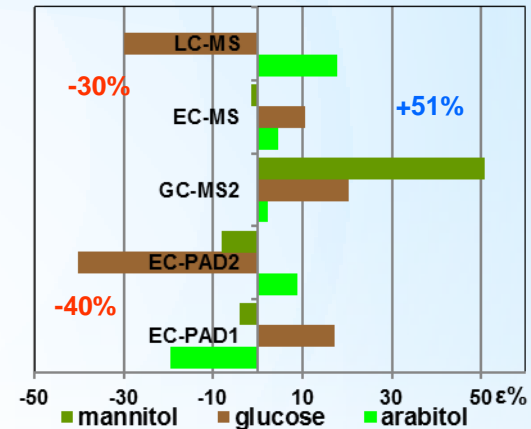
3 anidrozuccheri

EC-PAD1, EC-PAD2, EC-PAD5, EC-MS, GC-MS1, GC-MS2, LC-MS



3 biozuccheri

EC-PAD1, EC-PAD2, EC-MS, GC-MS2, LC-MS



$\epsilon\%$: $\pm 20\%$ per 72% dei laboratori

Accuratezza
accettabile e indipendente dalla procedura

N.B.: accuratezza della singola procedura (campioni + complessi e diluiti)

Metodi confrontabili:

nessuna procedura di separazione/rivelazione produce risultati significativamente diversi per gli zuccheri:

- separazioni diverse: GC \approx EC più recenti,
- indipendenti da rivelatore, PAD vs. MS,
- indipendenti da estrazione, acqua vs. solvente.

Ringraziamenti:

A tutti ricercatori dei laboratori che hanno partecipato allo studio:

- APPA Trento, Fondazione E. Mach,
- ARPA Piemonte,
- UniGE,
- ARPA Lombardia, UniMI,
- UniVE,
- UniFE,
- CNR-ISAC, Bologna,
- CNR-IIA, Roma.