

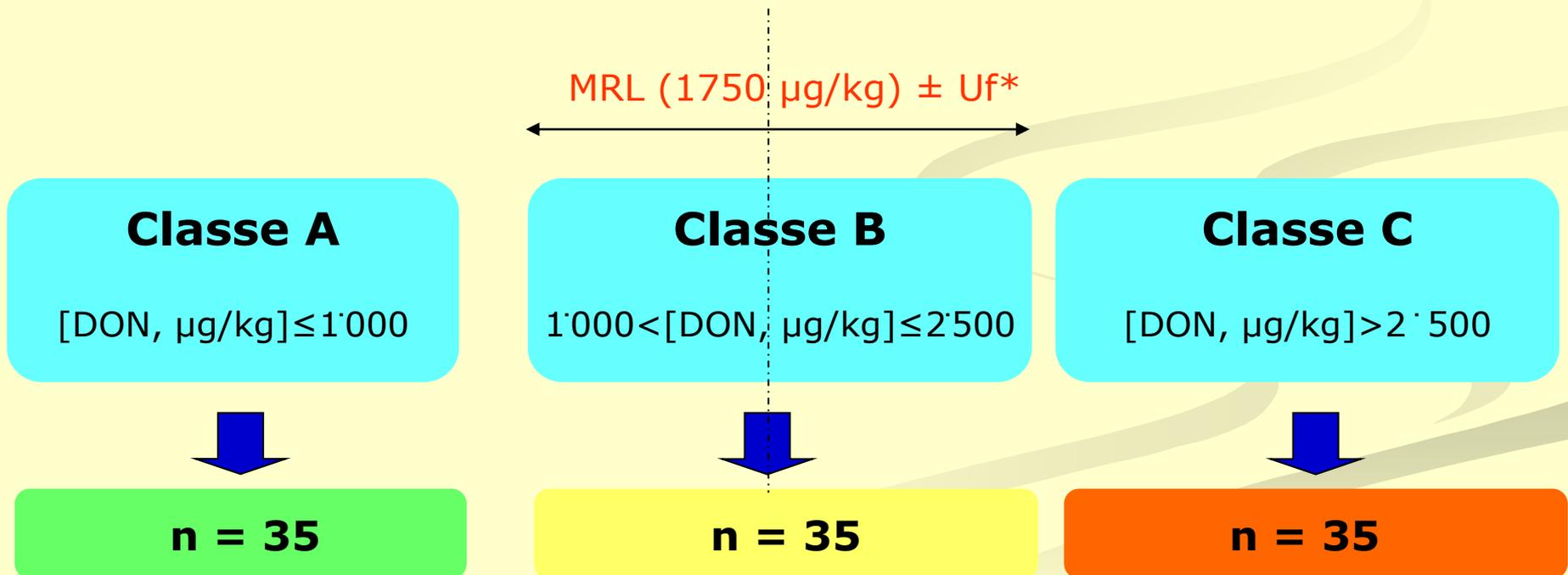
Casillo

Determinazione di DON in campioni di frumento duro mediante naso elettronico



Selezione dei campioni

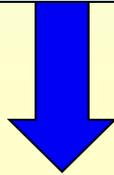
Della totalità dei campioni analizzati sono stati selezionati **105 campioni** da utilizzare per l'addestramento (calibrazione) del naso elettronico in funzione del contenuto di DON, considerando una equa rappresentazione delle **tre classi (35 campioni per classe)**, una distribuzione uniforme nell'intervallo di concentrazione e della più **eterogenea rappresentazione** delle **varietà** e delle **regioni geografiche di provenienza**.



Preparazione dei campioni



I **105 campioni** selezionati sono stati **suddivisi in due porzioni** da sottoporre entrambe ad analisi mediante naso elettronico.



Macinazione: è stata realizzata mediante molino Cyclotec 1093 (International PBI) con vaglio da 500 μm ed il macinato è stato conservato in un contenitore chiuso a temperatura ambiente fino al completamento delle analisi.

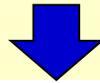


**Analisi diretta
delle
cariosidi**



Analisi dei campioni mediante ISENOSE 2000

Sono state condotte **5 repliche** di misurazione mediante naso elettronico sui **105 campioni** selezionati per un totale di **525 analisi per tipologia di campione (cariossidi e macinato)** che costituiscono le due banche dati per i campioni di frumento duro. Le repliche condotte sul singolo campione sono state eseguite in giorni diversi e distribuite nell'arco dell'intero periodo di analisi.



L'analisi è stata condotta su **2 grammi** di campione, in forma di **cariossidi o macinata**, in **vial per spazio di testa da 10 mL** opportunamente chiusi e collegati all'autocampionatore del sistema ISENOSE 2000.



Condizioni sperimentali:

- Gas carrier aria cromatografica (80% N₂, 20% O₂)
- Flusso di gas 300 mL min⁻¹
- Temperatura 40 °C
- Umidità del gas stabilizzata a 12 g m⁻³
- Tempo di generazione dello spazio di testa 600 s
- Tempo di acquisizione della linea di base 5 s
- Tempo di iniezione 15 s
- Tempo totale di acquisizione dati 180 s
- Tempo di ritardo tra due campioni successivi 180 s

Calibrazione: analisi statistica (DFA)

L'Analisi Discriminante (DFA) dei segnali ottenuti è stata effettuata ottimizzando **il numero di sensori** da prendere in considerazione, **il numero e la tipologia di "features"** da utilizzare nell'analisi.

	Misure	Fattore	A	B	C	Media
Cariossidi	525	3,98	84,0*	62,9*	61,1*	69,3*
Macinato	525	3,98	80,6*	70,9*	74,9*	75,4*

*valori espressi in percentuale

Il fattore viene calcolato come rapporto tra il numero di campioni ed il numero di variabili deve essere un numero compreso tra 3 e 6 per evitare erronee classificazioni derivanti da overfitting (erronea classificazione generata dall'errore strumentale piuttosto che da reali differenze) del modello*

$$\text{fattore} = \frac{\text{numero di misurazioni (525)}}{\text{numero di classi (3)} \times \text{numero di sensori (11)} \times \text{numero di features (4)}}$$

*Massart et al. 1988, *Chemometrics: A Textbook*, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Calibrazione: analisi statistica (DFA)

Sono stati valutati tre differenti approcci di calibrazione:

Approccio 1

Eliminazione dei campioni la cui percentuale di classificazione è risultata essere inferiore al 50% (***campioni anomali***)

Approccio 2

Eliminazione dei campioni il cui contenuto di DON è compreso nell'intervallo di concentrazione contiguo tra le classi (***campioni limite***)

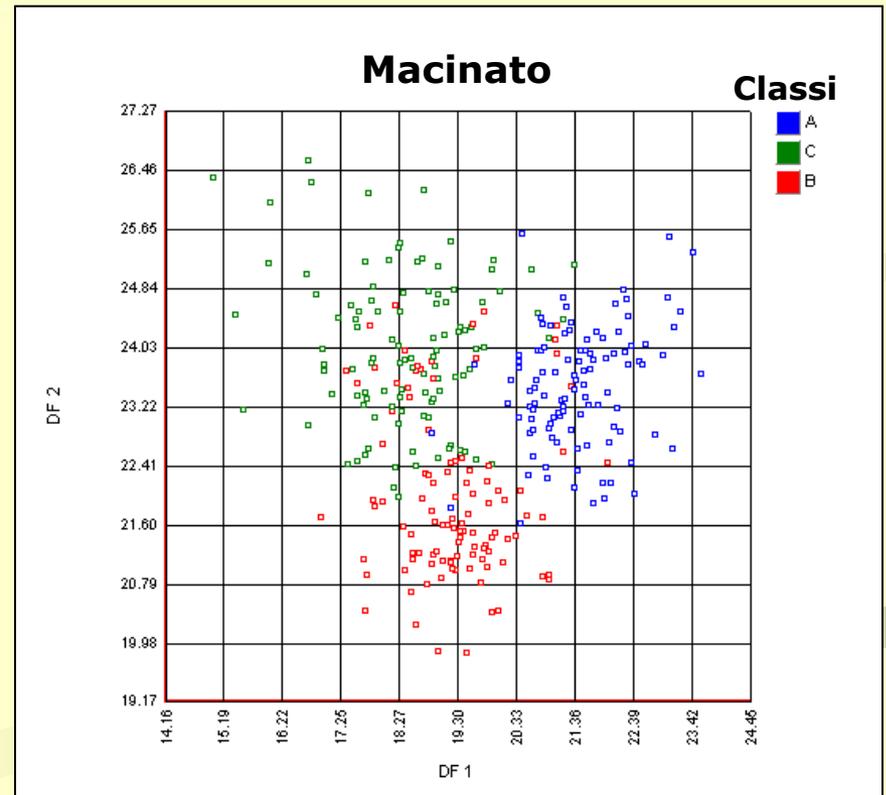
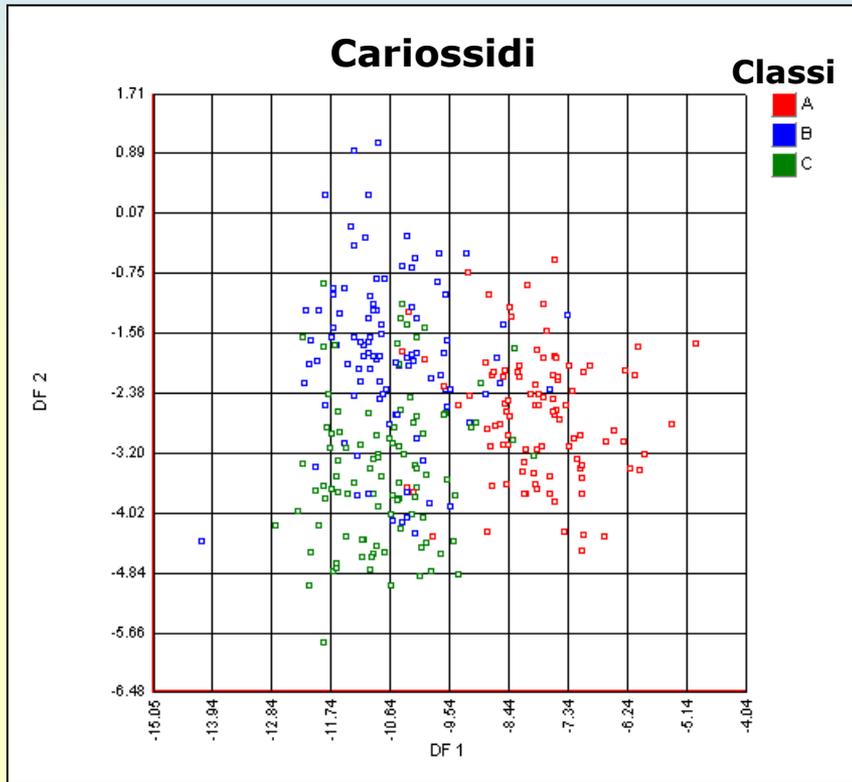
Approccio 3

Eliminazione sia dei campioni dell'approccio 1 (***campioni anomali***) che di quelli dell'approccio 2 (***campioni limite***)

Approccio	Misure	Fattore	Tipologia	A	B	C	Media
1	375	4,17	Cariossidi	92,0*	73,6*	72,8*	79,5*
	411	4,15	Macinato	86,1*	78,8*	79,6*	81,5*
2	375	4,17	Cariossidi	83,2*	72,8*	75,2*	77,1*
	375	3,79	Macinato	81,6*	78,4*	76,8*	78,9*
3	294	3,63	Cariossidi	91,8*	74,5*	80,6*	82,3*
	318	3,53	Macinato	95,3*	77,4*	83,0*	85,2*

* valori espressi in percentuale

Analisi statistica (DFA): approccio 3



Ottimizzazione

Al fine di migliorare ulteriormente le *performance* del metodo sviluppato, è stata condotta un'ulteriore prova che consiste nello standardizzare una procedura di **preparazione del campione** finalizzata a **limitare la perdita delle sue componenti volatili** prima di effettuare l'analisi mediante naso elettronico.

Macinazione in condizioni non standardizzate

macinazione



conservazione
a R.T.



pesata e chiusura
del *vial* a tenuta

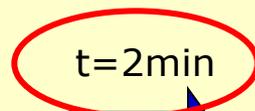


analisi

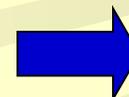


Macinazione in condizioni standardizzate

macinazione



pesata e chiusura del
vial a tenuta
(conservazione a R.T.)



analisi



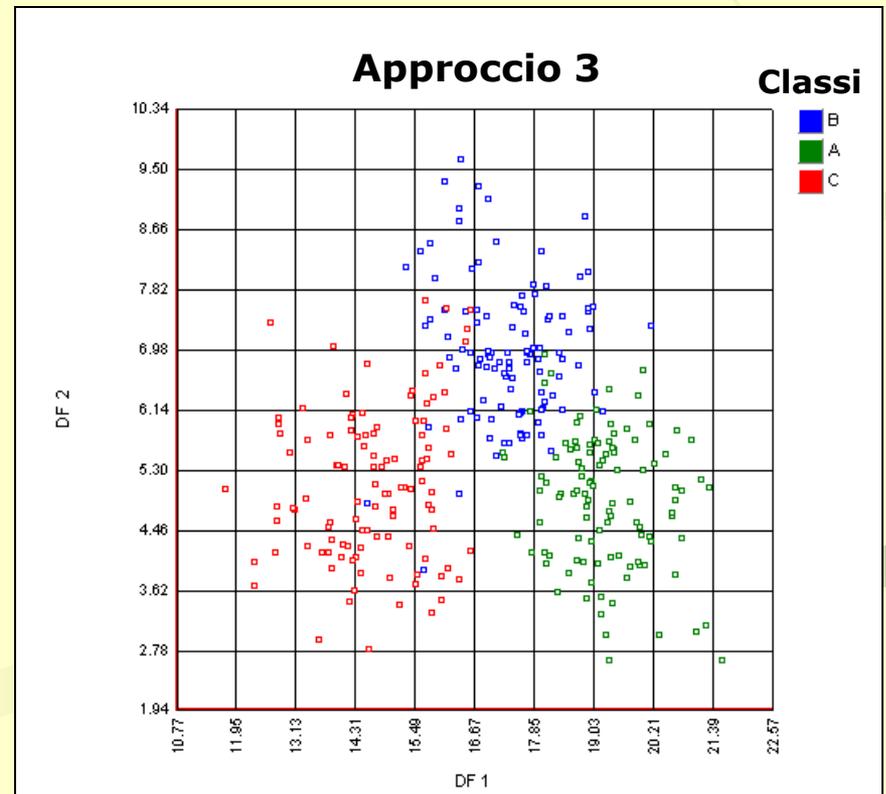
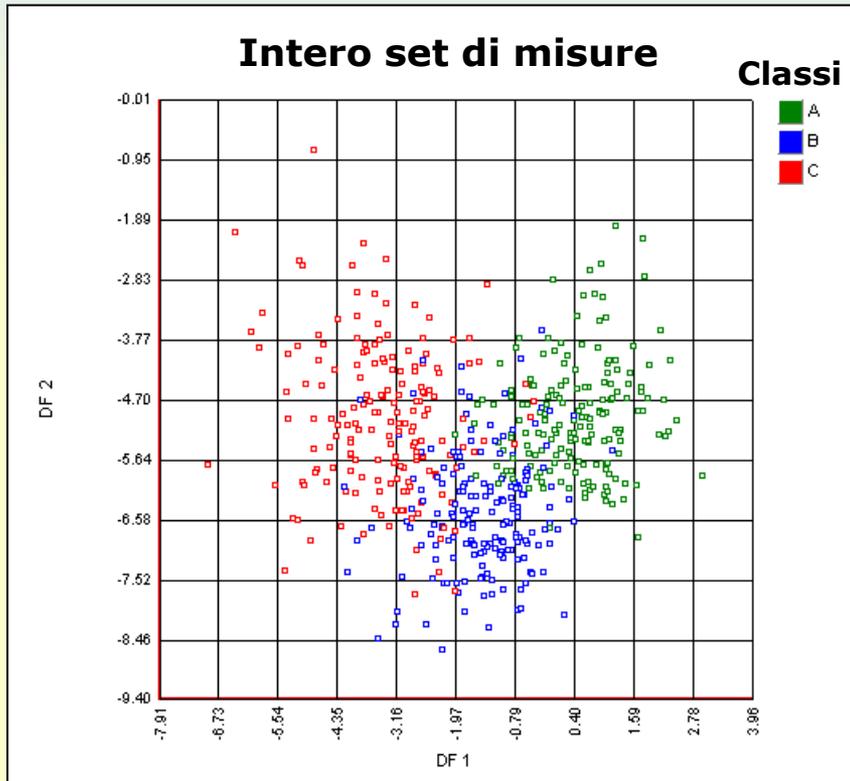
Calibrazione: DFA ottenute in condizioni standardizzate

La **DFA dei dati** ottenuti sia utilizzando la totalità delle determinazioni effettuate, che i tre differenti approcci nelle nuove condizioni di preparazione del campione (**condizioni standardizzate**), ha fornito **percentuali di riconoscimento superiori** a quelle precedentemente ottenute utilizzando **sia** i dati **dei campioni in forma di carioidi che macinati nelle condizioni non standardizzate**.

Approccio	Misure	Fattore	A	B	C	Media
Intero set di misure	525	3,98	89,7*	84,0*	86,3*	86,7*
1	441	3,34	92,5*	87,8*	90,5*	90,2*
2	375	3,13	95,2*	86,4*	92,0*	91,2*
3	324	3,27	94,4*	93,5*	93,5*	93,8*

* valori espressi in percentuale

Analisi statistica (DFA): campioni macinati in **condizioni standardizzate**



Cross-Validazione: *leave-one-out*

Il metodo che prevede l'utilizzo dell'intero set di misure, in condizioni di preparazione del campione **standardizzate** produce le **più alte percentuali di riconoscimento** nella fase di **validazione**.

Approccio	Tipologia	A	B	C	Media
Intero set di misure	Cariossidi	74,5*	54,9*	55,4*	61,9*
	Macinato	74,9*	64,6*	65,1*	68,2*
	Macinato CS	85,7*	77,7*	82,9*	82,1*
3	Cariossidi	70,3*	55,4*	61,7*	62,5*
	Macinato	74,9*	64,0*	61,7*	66,9*
	Macinato CS	80,0*	76,0*	67,4*	74,5*

* valori espressi in percentuale; CS = Condizioni Standardizzate

Dalla **totalità degli errori** riscontrati in fase di validazione (**17,9%**), circa la metà è rappresentata da **campioni erroneamente classificati in classe B**, i quali **prevedono** comunque l'**analisi HPLC** di conferma. Per tale ragione l'**effettiva percentuale** di erronea classificazione è pari al **9%**.

Tasso di riconoscimento individuale

E' possibile **minimizzare** ulteriormente l'errore fissando un **tasso di riconoscimento minimo dell'80%**, come parametro minimo di accettabilità della classificazione di un campione sottoposto ad analisi.

Approccio	Tipologia	A	B	C	Media
Intero set di misure	Macinato CS	91,7*	86,7*	91,8*	90,1*

* valori espressi in percentuale; CS = Condizioni Standardizzate

Le analisi condotte in cui il tasso di riconoscimento risulta inferiore all'80%, vengono **indirizzate ad analisi di conferma HPLC**.

L'**errore** commesso in validazione **diviene circa il 4%**, ma inevitabilmente aumentano i campioni da sottoporre ad analisi di conferma (17%). Gli errori commessi in queste condizioni si differenziano in **2% di falsi positivi e 2% di falsi negativi**.

Conclusioni E-Nose (I)

- ✓ **Tra i tre differenti approcci analitici**, ottenuti mediante analisi dei campioni in forma di cariossidi, macinato in condizioni non standardizzate e **macinato in condizioni standardizzate**, quest'ultimo è risultato quello che **produce le più alte percentuali di riconoscimento in calibrazione**.
- ✓ Il metodo che produce le **più alte percentuali di riconoscimento** nella fase di **validazione (82,1%)** è quello che prevede l'utilizzo delle **condizioni** di preparazione del campione **standardizzate** utilizzando l'**intero set di misure** (maggiore rappresentatività di tale set di misure nelle tre classi in calibrazione).
- ✓ Circa la metà della totalità degli errori riscontrati in fase di validazione (17,9%), è rappresentata da campioni erroneamente classificati in classe B, i quali prevedono comunque l'analisi HPLC di conferma. Per tale ragione l'**effettiva percentuale di erronea classificazione è pari al 9%**.

Conclusioni E-Nose (II)

- ✓ **Fissando un tasso di riconoscimento minimo dell'80%**, come parametro minimo di accettabilità della classificazione di un campione sottoposto ad analisi mediante naso elettronico, si ottiene un **incremento** ulteriore della **percentuale di corretto riconoscimento in validazione (90,1%)**.
- ✓ Tale condizione produce un'ulteriore **riduzione dell'errore percentuale commesso in validazione** (circa il **4%**), ma inevitabilmente **incrementa il numero di campioni da sottoporre ad analisi di conferma (17%)**.
- ✓ Questo accorgimento potrà rendersi **necessario nel caso di monitoraggio di campioni** per i quali è attesa una **elevata frequenza di contaminazione**. Al contrario sarà opportuno non considerare il tasso di riconoscimento percentuale definito dall'analisi, nel caso di monitoraggio di campioni di frumento con bassa frequenza di contaminazione da DON.