

# IL PROCESSO ANALITICO

## 1. Inquadramento del processo analitico

La Chimica analitica è nata e si è sviluppata per dare risposte alle necessità di analisi di campioni (acque, alimenti, metalli e leghe, fertilizzanti, ecc.), cioè per **risolvere dei problemi analitici**. La IUPAC definisce la **Chimica analitica** come: "Disciplina scientifica che sviluppa e applica metodi, strumenti e strategie per ottenere informazioni sulla composizione e sulla natura chimica della materia". Per ottenere questi risultati è necessario utilizzare una procedura analitica complessa, che si articola in diverse fasi successive.

Si definisce **campione** la porzione di materia che deve essere sottoposta ad analisi. All'interno del campione sono presenti:

- **Analita**: uno o più componenti costituenti il campione;
- **Matrice**: altre sostanze diverse dall'analita (solvente, interferenze, ecc.).

L'analisi chimica può essere finalizzata per due diversi scopi:

- **Analisi chimica qualitativa**: finalizzata a determinare le specie chimiche presenti nel campione;
- **Analisi chimica quantitativa**: finalizzata a determinare le quantità (concentrazioni) delle specie chimiche presenti nel campione.

Ovviamente la sequenza temporale è di solito la seguente:

- a. Analisi qualitativa
- b. Analisi quantitativa

Occorre sottolineare che l'analisi della medesima sostanza in materiali diversi può presentare problemi analitici anche sensibilmente differenti. La determinazione quantitativa di un dato analita in matrici diverse può comportare procedure analitiche diverse, anche a parità di metodo prescelto per la misura vera e propria: ad esempio la determinazione del ferro nel sangue, in una lega metallica o negli spinaci. La differenza nella composizione delle tre matrici citate potrebbe comportare problematiche analitiche differenti per quanto riguarda la determinazione del ferro, soprattutto per quanto riguarda la presenza di interferenze diverse. Questa situazione è indicata come "effetto matrice"; l'effetto matrice è quindi l'errore commesso nella determinazione dell'analita a causa degli altri componenti del campione.

Nella determinazione analitica si utilizzano: tecniche, metodi, procedure, protocolli. Ogni termine ha un preciso significato:

- **Tecnica analitica**: è l'insieme di principi teorici e accorgimenti sperimentali che sfrutta un fenomeno scientifico fondamentale per ottenere un'informazione sulla composizione di un certo campione. Esempi: spettroscopia, cromatografia, voltammetria, ecc.
- **Metodo analitico**: è l'applicazione di una tecnica analitica per risolvere un problema analitico specifico. Esempio: determinazione spettrofotometrica del Cr(VI) nelle acque dove può essere presente come inquinante
- **Procedura analitica**: è l'insieme delle istruzioni base necessarie per utilizzare un metodo analitico. La procedura è quindi la successione degli stadi operativi principali per quell'analisi. Esistono numerosi metodi standard indicati da vari Enti nazionali e internazionali (IUPAC, NBS, ISO, ecc.) sono in realtà procedure standardizzate; devono essere applicate in tutti i laboratori per ottenere risultati confrontabili e riconosciuti dalla normativa vigente
- **Protocollo analitico**: è l'insieme delle istruzioni e direttive dettagliate da eseguire rigidamente affinché il risultato possa essere accettato per fini particolari. E' quindi l'insieme delle istruzioni dettagliate da seguire rigidamente per eseguire l'analisi.

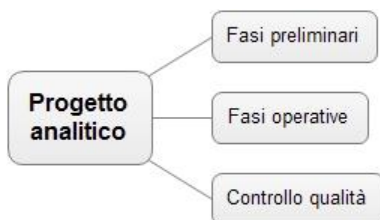
Durante l'esecuzione di una analisi si ottengono dei risultati numerici cioè si effettuano delle misurazioni che producono delle misure:

- **Misurazione**: è la determinazione analitica vera e propria
- **Misura**: informazione costituita da un numero, un'incertezza ed una unità di misura. La misura viene effettuata utilizzando un metodo di misura: è il procedimento che permette di passare dal segnale fornito dallo strumento (variabile strumentale) alla determinazione qualitativa e/o quantitativa della sostanza ricercata nel campione, cioè dell'analita (variabile chimica). La variabile strumentale e quella chimica sono legate da una qualche legge di dipendenza (per esempio la legge di Lambert-Beer della spettrofotometria) che le correla e che consente di trasformare il segnale letto in un dato numerico, come per esempio la concentrazione dell'analita. Questa trasformazione può essere realizzata con vari metodi di calibrazione (retta di lavoro, metodo delle aggiunte, standard interno, ecc.)

## 2. Il progetto analitico nel suo complesso

Per risolvere un problema analitico (analisi di un campione in laboratorio richiesta da un cliente), è fondamentale la determinazione del **progetto analitico** nel suo complesso, nel quale la procedura analitica vera e propria costituisce solo una singola fase.

Il progetto analitico prevede di norma tre fasi successive, ognuna delle quali suddivisa in ulteriori momenti:

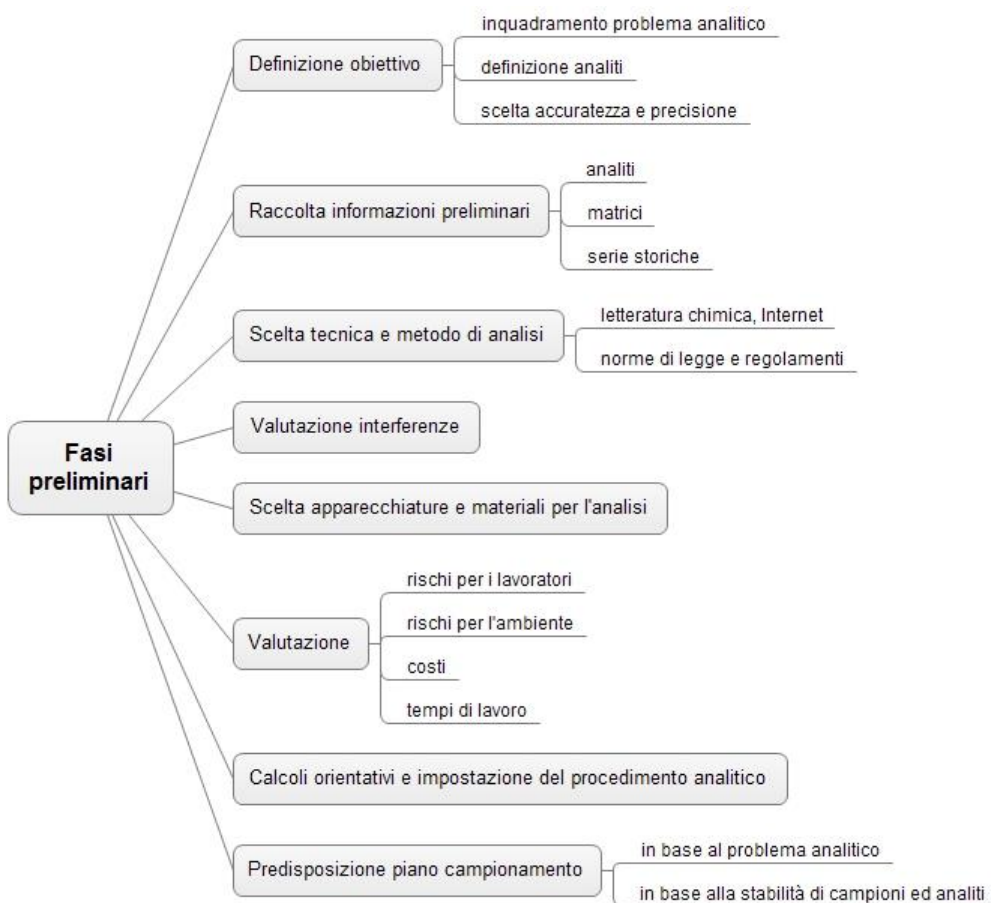


Nelle **fasi preliminari** verrà inquadrato il problema analitico e, valutando tutta una serie di aspetti e di problematiche (analiti, matrice, apparecchi, tempi, costi, ecc.) si progetteranno le successive fasi operative, tenendo conto dei vincoli e delle risorse a disposizione.

Nelle **fasi operative** si inizia con la raccolta del campione, si prosegue con gli opportuni trattamenti per rendere l'analita disponibile alle analisi e minimizzare le interferenze ed infine si procede con l'analisi vera e propria, che giunge solo dopo una lunga e articolata sequenza di fasi precedenti, ciascuna delle quali può provocare errori significativi. Quindi è inutile effettuare la fase analitica con la massima attenzione ma trascurare quelle precedenti, che sono altrettanto importanti. Le fasi operative si concludono con l'elaborazione dei risultati, la loro valutazione e la loro presentazione sotto forma di relazione finale o referto analitico.

Periodicamente è opportuno effettuare anche un **controllo di qualità** sulla organizzazione del laboratorio e delle sue procedure analitiche e sull'efficienza delle apparecchiature utilizzate.

## 2.1. Fasi preliminari



I **problemi analitici** che un chimico analista deve affrontare e risolvere possono essere molto diversi: alle domande del committente dovrà fornire le opportune risposte ma la strada da seguire, cioè la realizzazione del progetto analitico, potrà essere ogni volta diversa e questo costituisce la principale difficoltà:

domande (committente) --> risposte (chimico analista)

Seguono alcuni **esempi** tipici di problema analitico:

- controllo delle caratteristiche di una materia prima o di un prodotto finito;
- caratterizzazione di un prodotto da un punto di vista commerciale o legale, anche in termini di analisi di un prodotto concorrente (deformulazione) per capire come è fatto e come può essere stato ottenuto;
- controllo di parametri ambientali su di un territorio (acque, aria, terreno) per valutare l'inquinamento e gli effetti antropici;
- controlli clinici ed analisi dei metaboliti di farmaci.

La prima fase del progetto analitico è la **definizione dell'obiettivo**: cosa si vuole fare e come lo si vuole fare. Bisogna restringere il campo dell'analisi, definendo quali sono gli analiti da determinare e quale deve essere la precisione e l'accuratezza richiesta. Infatti è inutile determinare un analita a livello di ppm (parti per milione, ovvero mg/l in termini di concentrazione) quando è sufficiente determinare la % della sostanza analizzata.

Quindi si procede ricercando il maggior numero di **informazioni preliminari** sui campioni da analizzare, con particolare attenzione alle matrici ed alle eventuali interferenze. Probabilmente qualcuno ha già fatto quell'analisi e quindi è possibile ricavare informazioni utilissime dalla letteratura chimica specializzata e da Internet.

In base alle informazioni preliminari, alla **valutazione delle interferenze** ed agli obiettivi prefissati, si scelgono la **tecnica e la metodologia analitica**, facendo attenzione che spesso i metodi analitici sono definiti da **norme e regolamenti**, cioè esistono molti metodi di analisi ufficiali che devono essere rispettati perché l'analisi effettuata abbia un valore legale. A questo punto è possibile effettuare alcune simulazioni analitiche per confermare l'efficacia delle scelte fatte fin qui.

Se tutto procede bene si passa alla **scelta dei materiali e apparecchiature per l'analisi**. Ovviamente gli apparecchi sono limitati dalle risorse disponibili mentre per i materiali occorre valutare i rischi per i lavoratori e l'ambiente, i costi e i tempi di lavoro. E' opportuno non utilizzare, se possibile, reattivi tossici o molto costosi o che richiedono tempi di lavoro molto lunghi.

Successivamente si imposta il processo analitico effettuando i **calcoli** opportuni per la preparazione delle varie soluzioni e standard di lavoro.

Si predispose infine il **piano di campionamento**: quanti campioni devono essere prelevati e le modalità di prelievo affinché il campione analizzato sia significativo, tenendo presente che esistono norme e regolamenti che disciplinano anche il campionamento. E' evidente che il prelievo del campione sarà diverso dovendo analizzare un bidone di materiale, piuttosto che un vagone ferroviario di una certa materia prima oppure il terreno di una tenuta agricola di centinaia di ettari o l'acqua di un fiume. Occorre inoltre tenere presente la stabilità del campione: a volte è necessario analizzare il campione direttamente al prelievo ("in situ") per evitare la sua decomposizione durante il trasporto oppure è necessaria la sua stabilizzazione.

### 2.1.1. Ulteriori aspetti relativi alla risoluzione di un problema analitico

La soluzione di un problema analitico non è sempre immediata e spesso è anche legata all'esperienza dell'operatore che deve risolverlo; in ogni caso è opportuno tener presente che l'approccio al problema analitico deve essere sistematico, cioè non si deve improvvisare ma di solito è opportuno considerare gli elementi descritti di seguito, che dovrebbero guidare l'analista ad una scelta ragionata e motivata della metodica analitica:

1. **Componenti del campione**: è necessario distinguere analita e matrice, considerando la provenienza del campione e quindi la sua probabile composizione. Ad esempio volendo analizzare il Ca in un'acqua, si ha un campione relativamente semplice in cui la maggior parte della matrice è l'acqua stessa, che ovviamente non interferisce; se si utilizza una normale titolazione complessometrica con EDTA e NET come indicatore si avrà l'interferenza del Mg, mentre utilizzando un indicatore specifico del Ca (muresside o acido calconcarbonico) ed un particolare pH si riuscirà a dosare solo il Ca. La scelta della procedura analitica dovrà anche tener conto del rapporto analita/matrice, ovvero della quantità di analita effettivamente presente nel campione analizzato
1. **Aspetto merceologico**: il tipo e la provenienza del campione incognito sono determinanti per:
  2. avere un'idea preliminare della composizione del campione
  3. valutare il tipo di precisione richiesta nel referto finale, cioè nel risultato che si deve fornire. Ad esempio dovendo determinare il K nel sangue (analisi cliniche) o in un fertilizzante potassico, si avrà un problema

analitico ben diverso; varieranno le potenziali interferenze (nel campione di sangue si hanno anche altri metalli come il Na, mentre nel fertilizzante non si avranno questi problemi) e varierà la precisione richiesta (nel campione di sangue la quantità di analita presente è molto più bassa e quindi sarà richiesta una precisione maggiore). Questa analisi si potrebbe effettuare con la tecnica fotometrica in emissione

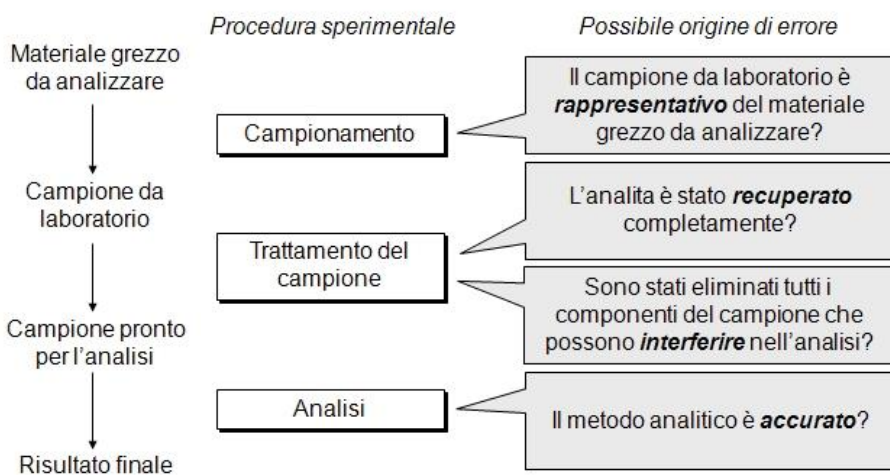
4. **Aspetto legislativo:** le analisi tecniche di prodotti commerciali o naturali sono regolate da precise norme di legge, che stabiliscono molto spesso direttamente l'intera procedura analitica ed il modo di presentare i risultati. Ad esempio l'analisi dell'acqua (realizzata in una struttura come l'ARPA) è soggetta a norme precise per il dosaggio dei vari elementi. Per fare un esempio la determinazione dell'ammoniaca prevede, per legge, l'uso del reattivo di Nessler e la tecnica spettrofotometrica nel VS: l'uso di un'altra metodica analitica, per quanto valida, non produce risultati riconosciuti ufficialmente
5. **Letteratura chimica:** poiché esistono già, opportunamente codificate, moltissime procedure analitiche, di fronte ad un problema analitico è opportuno consultare la letteratura specializzata, per verificare se esistono o meno procedure analitiche già sperimentate e codificate. Mentre fino a qualche anno fa questa ricerca prevedeva l'uso di riviste, testi, pubblicazioni, ecc. oggi è possibile effettuare ricerche rapide ed efficaci utilizzando le tecnologie multimediali, come ad esempio l'accesso alla rete Internet, che mette a disposizione una bibliografia immensa su qualsiasi problema analitico.

### 2.1.2. Il processo analitico semplificato

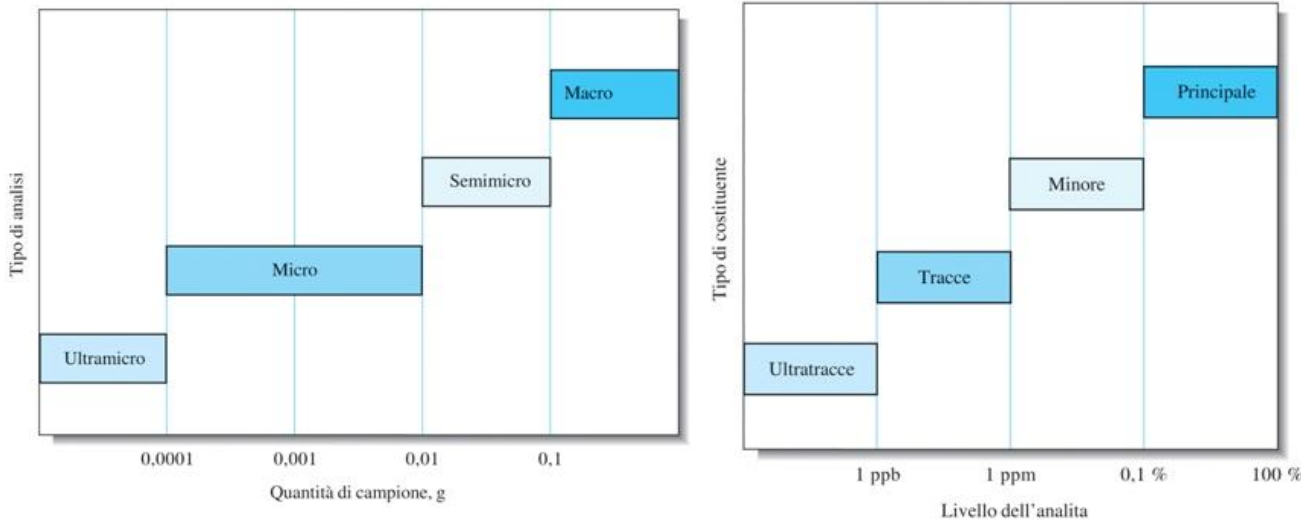
La qualità del risultato di un'analisi dipende dalla accuratezza di tutte le procedure sperimentali che a partire dal materiale grezzo da analizzare portano al risultato finale: gli errori compiuti nei vari stadi della procedura determinano l'errore complessivo del risultato; è quindi necessario prestare la massima attenzione a tutte le procedure sperimentali presenti nel processo analitico e non solo all'analisi vera e propria.

Nel seguente **schema semplificato** sono indicati i principali passaggi in cui si articola il processo analitico:

1. Campionamento
2. Trattamento del campione
3. Analisi



Le analisi possono essere classificate in base alla **quantità di campione da analizzare**, come indicato nel seguente grafico; molte tecniche utilizzate per macroanalisi non possono essere utilizzate per le analisi ultramicro:



E' altrettanto importante la **percentuale di analita del campione**: gli analiti presenti in tracce richiedono tecniche più sensibili e le loro determinazioni sono particolarmente soggette ad errori dovute ad interferenze e contaminazioni. Analizzare un campione di piccole dimensioni non è equivalente a determinare un analita presente in tracce in un campione di grandi dimensioni, anche se la quantità assoluta di analita può essere simile. La precisione e l'accuratezza "accettabili" di un'analisi dipendono anche dalla frazione di analita nel campione: per analiti presenti in tracce ed ultratracce sono tollerate accuratze e precisioni molto minori rispetto a quelle accettate per i costituenti principali di un campione.

## 2.2. Fasi operative



### 2.2.1. Campionamento

**Prelievo del campione**: il prelievo del campione o campionamento è la fase più delicata dell'intero progetto analitico e, se non effettuato correttamente, può produrre errori fino al 30% sul valore finale. Il **campione deve essere significativo** cioè deve rappresentare l'intero materiale da analizzare. La procedura di campionamento è tanto più

delicata quanto più il campione è poco omogeneo e deve avvenire in modo casuale, cioè occorre evitare selezioni più o meno consapevoli.

Se l'incertezza sul campionamento è elevata, la misura non sarà accurata indipendentemente dalla precisione del metodo analitico utilizzato, poiché sarà l'incertezza sul campionamento a determinare l'incertezza complessiva dell'analisi. In tal caso non è vantaggioso investire risorse nella messa a punto di un metodo analitico più preciso poiché il miglioramento dell'incertezza dell'analisi non si riflette in un parallelo miglioramento dell'incertezza totale. All'opposto metodi meno precisi ma più veloci ed economici potrebbero permettere l'analisi di un numero più elevato di campioni (migliorando quindi la deviazione standard della media).

Le **modalità di prelievo** variano in relazione allo stato fisico del materiale da analizzare.

**Campioni gassosi:** sono i più semplici da prelevare perché sono sempre omogenei. I campioni gassosi vengono fatti fluire liberamente all'interno di contenitori di vetro o di materiale inerte per i gas campionati tipo **canister**.



Si tratta di contenitori sferici, di volumi diversi, dotati di valvole di ingresso e di uscita in cui raccogliere i gas. In alternativa i gas vengono raccolti mediante sistemi di aspirazione con pompe oppure creando il vuoto nel contenitore di raccolta. E' indispensabile l'uso di un flussimetro e di un termometro per l'esatta misura del volume prelevato. E' inoltre fondamentale stabilire l'ora più opportuna per il prelievo (ad esempio nel monitoraggio dell'inquinamento dell'aria in una città) e la corretta manutenzione e taratura delle apparecchiature di prelievo.



In alcuni casi, come per l'analisi dell'aria, è possibile effettuare l'analisi insieme al campionamento, utilizzando le **fiale Dragèr**: si tratta di fiale riempite di un opportuno reattivo cromogeno, specifico per un determinato analita gassoso. Dopo aver fatto passare la quantità di aria prevista nella fiala, il reattivo si colora e in base all'intensità della colorazione, mediante una scala presente sulla fiala, si risale direttamente alla concentrazione di analita in corrispondenza del limite colorato. Un esempio è l'analisi di vapori di  $\text{NH}_3$  presenti nell'aria.

E' anche possibile disporre in un apposito supporto varie fiale Dragèr, ognuna specifica per un certo analita, in parallelo e quindi, mediante una pompa aspirante, far passare la quantità di aria richiesta. Al termine si può determinare la concentrazione dei vari analiti attraverso la lettura sulle scale delle singole fiale dei limiti raggiunti dalla colorazione.

**Campioni liquidi:** se omogenei vengono facilmente prelevati mediante bottiglie, beute, ecc. Se non omogenei oppure con emulsioni vanno energicamente agitati prima del prelievo. Se il campione presenta stratificazioni è opportuno prelevare in ciascuno strato.



Ad esempio per il prelievo di acqua in un corpo idrico oppure di un liquido all'interno di un serbatoio, si possono utilizzare bottiglie di vetro o di polietilene fissate su di una lunga asta, che vengono immerse nel campione: alla profondità desiderata, mediante una fune collegata al tappo di chiusura, la bottiglia viene aperta e preleva il liquido fino al completo riempimento e quindi viene recuperata dall'operatore che effettua il campionamento.

**Campioni solidi:** sono i più complessi perché possono essere non omogenei. Esistono numerosi dispositivi di prelievo tra cui sessole e carotatori manuali e meccanici, specifici per i materiali da campionare (compatti, granulari, polveri, ecc.)



sessola

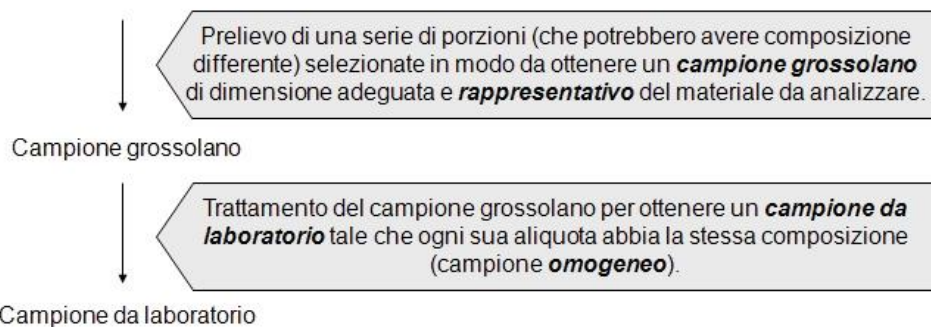


carotatore manuale

**Riduzione del campione:** spesso il campione è troppo grande per potere essere analizzato completamente, oppure la procedura analitica è inserita in un processo produttivo ed ha la funzione di controllare le caratteristiche di una materia prima o del prodotto finito. In entrambi i casi è necessario prelevare una parte del campione per l'analisi mediante un campionamento. Il risultato finale del campionamento è il campione da laboratorio, dal quale vengono ottenute le aliquote per effettuare le analisi successive del medesimo campione, in modo da presentare alla fine un risultato medio.

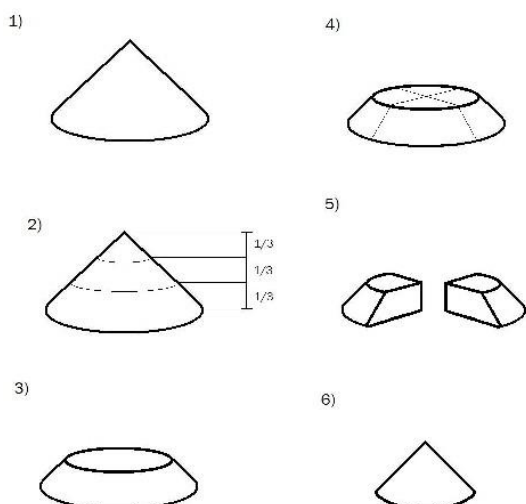
In genere la riduzione del campione viene effettuata direttamente nel luogo di prelievo, in modo da trasportare in laboratorio solo la quantità di materiale che verrà effettivamente analizzata, in genere 100-500 g.

Materiale grezzo da analizzare



La riduzione del campione, che permette di ottenere il campione da laboratorio partendo dal campione grossolano, si può effettuare in vari modi; il più comune è il **metodo della quartatura**, nelle varianti a cono e a superficie.

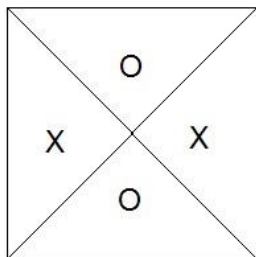
**Quartatura a cono:**



Il materiale viene accumulato fino a formare un cono, quindi si divide il cono in 3 parti in altezza, si scartano i 2/3 superiori e si tiene il terzo inferiore. Tale porzione viene suddivisa in 4 parti, si scartano due parti opposte e le due residue parti opposte vengono di nuovo sovrapposte e mescolate fino a formare un nuovo cono. Si ripete la procedura di scarto e quartatura fino ad ottenere una quantità di materiale idonea per l'analisi.



### Quartatura a superficie:



In questo caso il campione viene disposto in forma quadrata su di una superficie piana, quindi si divide in 4 parti seguendo le diagonali del quadrato: le due parti opposte indicate con (O) vengono scartate, le due parti opposte indicate con (X) vengono nuovamente miscelate, si procede alla formazione di un nuovo quadrato e così via, fino ad ottenere la quantità di materiale desiderata.

Al termine della riduzione del campione, se necessario, si può effettuare una fase di **macinazione** sul campione ridotto e quindi facilmente lavorabile con un piccolo dispendio di energia e di tempo. Occorre tener presente che la macinazione riscalda il campione e quindi può produrre:

- perdita di componenti volatili;
- variazioni dello stato di ossidazione dell'analita od altre trasformazioni legate al contatto con l'aria;
- variazione del contenuto di acqua.

### **2.2.2. Conservazione e trasporto del campione**

Dopo aver ridotto in modo opportuno la quantità di campione prelevato si procede alla preparazione per il suo trasporto in laboratorio. In genere si predispongono **varie aliquote omogenee** da utilizzare per l'analisi vera e propria, per le repliche, per la conservazione di una aliquota da utilizzare in eventuali contestazioni e controlli giudiziari. Ad esempio si possono preparare 5 aliquote: 1 per l'analisi, 1 per il controllo, 1 per la controparte, 1 per l'archivio, 1 per l'autorità giudiziaria. E' necessario compilare il verbale di campionamento, in cui sono specificate modalità, tempi, luoghi, operatori, ecc. e infine i contenitori vengono sigillati.

Il campione deve arrivare in laboratorio nelle **stesse condizioni di prelievo**, senza subire cambiamenti di alcun genere, ad esempio fermentazioni batteriche o perdite di analiti volatili. Le alterazioni possibili del campione sono dovute a:

- processi fisici (evaporazione, sublimazione, degradazione fotochimica...);
- processi chimici (reazioni con la matrice, ossidazione da parte dell'aria...);
- processi biologici (attività enzimatica, contaminazione microbica...).

I **recipienti di trasporto** dovranno essere costituiti da materiali inerti senza alcuna azione catalitica, se è il caso perfettamente sterili. Le materie plastiche possono adsorbire analiti apolari o poco polari, il vetro può rilasciare ioni metallici, adsorbire analiti polari o catalizzare reazioni di decomposizione.

La temperatura va mantenuta ad un livello tale da inibire qualsiasi reazione chimica o biochimica, di solito a 4°C. In ogni caso vanno sempre rispettati i protocolli di campionamento che spesso sono normati per legge.

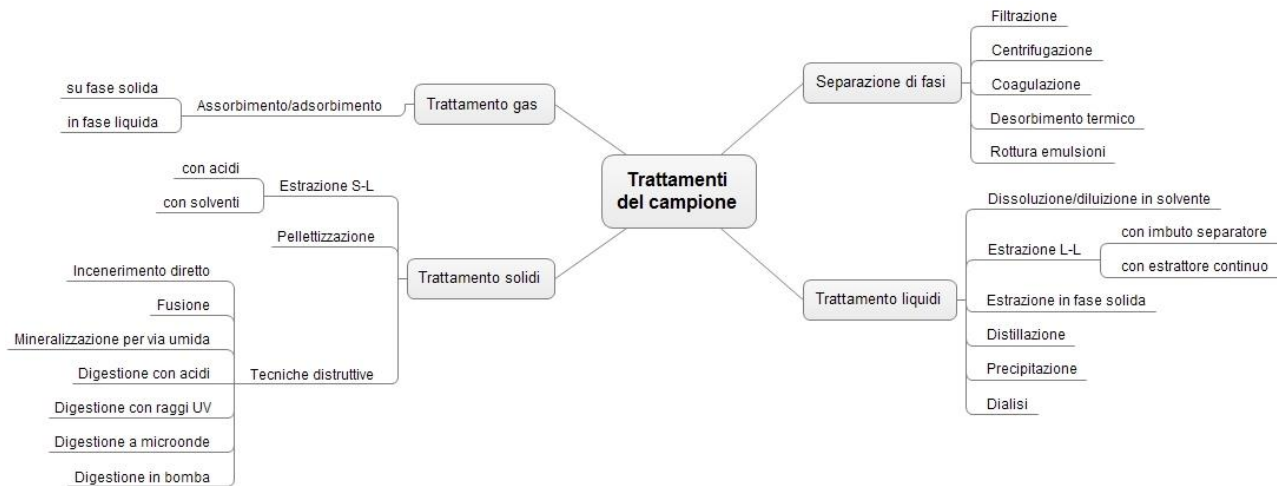
In alcuni casi l'analisi viene condotta "**in situ**" (in sito) direttamente nel luogo di campionamento mediante apparecchi portatili perché l'analita non è idoneo al trasporto, come ad esempio nella determinazione dell'O<sub>2</sub> disciolto nelle acque, effettuata mediante un ossimetro o la determinazione del pH mediante l'uso di pHmetri portatili.

### **2.2.3. Trattamento del campione**

Solo in rari casi il campione prelevato che arriva in laboratorio è omogeneo e può essere immediatamente analizzato. Spesso è suddiviso in fasi con granulometria diversa, oppure è costituito da una emulsione.

Nella maggior parte dei casi il campione è solido e quindi dovrà essere portato in soluzione oppure sottoposto ad estrazione dell'analita per eliminare le interferenze. Se il campione è liquido potrebbe essere torbido e quindi richiedere una filtrazione preliminare. Oppure si tratta di un campione gassoso ma l'analita di interesse è presente in quantità minima e quindi è richiesta una preliminare concentrazione.

Il campione richiede quasi sempre una serie di **trattamenti preliminari**, che possono essere riassunti nel seguente schema:

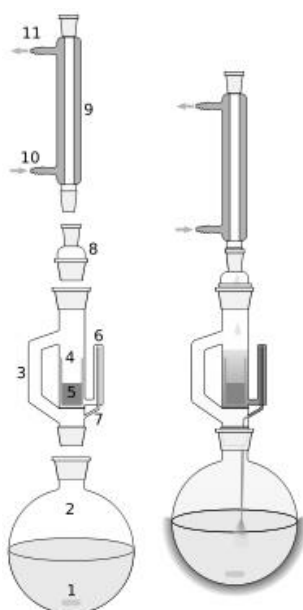


**Rottura emulsioni:** una emulsione è una dispersione di due liquidi tra loro immiscibili (esempio acqua-olio). In questo caso è necessario inibire l'azione degli agenti emulsionanti che stabilizzano l'emulsione. Vi sono vari metodi:

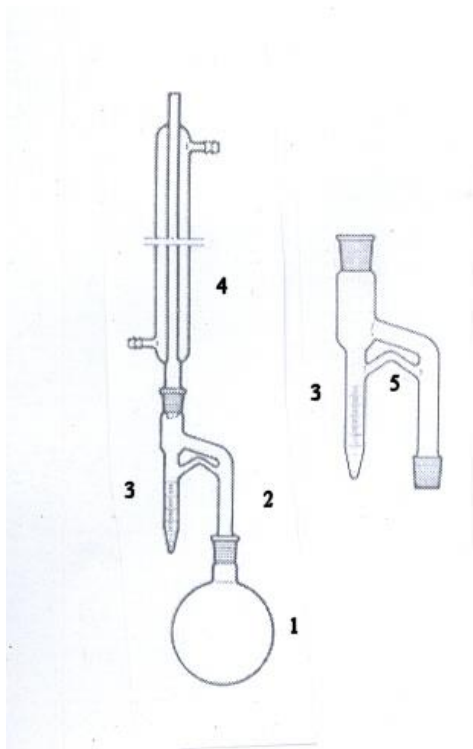
- trattamenti termici: riscaldamento o raffreddamento
- centrifugazione e ultracentrifugazione
- trattamento con grandi quantità di elettroliti forti come NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oppure acidi non ossidanti, che aumentano la forza ionica saturando la fase acquosa e aumentando la conducibilità elettrica
- addizione di sali di Al o di Fe che si idrolizzano e precipitano in fiocchi, favorendo la coagulazione e l'agglomerazione di particelle solide (flocculazione)
- uso di sostanze organiche specifiche (e costose) che facilitano la rottura dell'emulsione
- trattamento con agenti precipitanti come argille o polimeri

**Estrazione L-L o S-L:** se l'analita è disperso o sciolto in una matrice complessa si può provare ad estrarlo utilizzando un solvente in cui abbia una elevata solubilità e che non sciolga invece la matrice. Si può operare in modo discontinuo o continuo. Se il campione è solido viene fatto bollire con il solvente di estrazione con refrigerante a ricadere per un tempo opportuno. Al termine l'analita viene recuperato per filtrazione e successiva evaporazione del solvente.

Se il campione è liquido viene trattato col solvente in imbuto separatore e quindi, come nel caso precedente, l'analita viene recuperato per evaporazione del solvente. Lavorando in modo continuo si possono utilizzare appositi estrattori, come l'estrattore di Soxhlet e l'estrattore di Marcusson.



**Estrattore di Soxhlet:** è utilizzato ad esempio per estrarre i grassi contenuti nei prodotti di origine (per esempio caffè, cacao, ecc.). È formato da un pallone (2) in cui si pone il solvente di estrazione (1), di solito una miscela di etere etilico ed etere di petrolio, riscaldato elettricamente; il solvente evapora e sale nella parte superiore dell'estrattore attraverso un condotto (3). L'estrattore è dotato di una cartuccia (4) contenente il campione (5); il solvente che evapora viene abbattuto in un refrigerante a ricadere (9), dotato di ingresso (10) ed uscita (11) dell'acqua di raffreddamento, posto al di sopra dell'estrattore. Il solvente condensato ricade come liquido nella cartuccia, dove estrae il grasso e quindi la soluzione, tramite un sifone (6), viene periodicamente scaricato attraverso un tubicino (7) nel pallone, dove il grasso si accumula. Si tratta quindi di un estrattore continuo che permette di estrarre totalmente il grasso contenuto nel campione attraverso vari cicli successivi di estrazione.

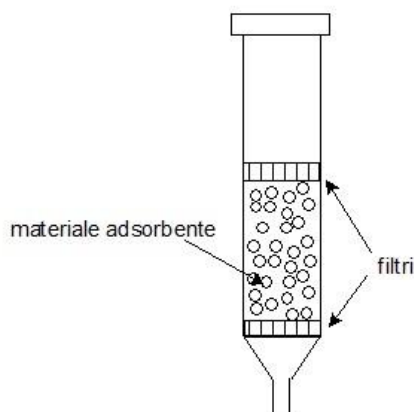


**Estrattore di Marcussone:** è utilizzato per estrarre l'acqua da prodotti organici. In realtà è stato progettato per determinare il contenuto di acqua nei prodotti petroliferi ma può anche essere adattato anche per altri campioni.

Il campione liquido, addizionato di xilene, viene introdotto nel pallone (1). Lo xilene è in grado di sciogliere leggermente l'acqua a caldo e di separarla a freddo. Si fa bollire la miscela e i vapori di xilene, mediante il condotto (2), vanno nel refrigerante a ricadere (4), dove vengono condensati e ricadono nel contenitore graduato (3). Qui l'acqua estratta dallo xilene si separa e siccome è più densa va sul fondo, mentre lo xilene si stratifica sopra. Raggiunto un certo livello, tramite il sifone (5) ricade nel pallone (1) e il ciclo prosegue fino a completa estrazione dell'acqua dal campione.

Quando il livello di acqua in (3) non aumenta più l'estrazione è completa e, tramite la scala graduata, si può anche determinare il contenuto di acqua in origine presente nel campione estratto. In una variante il contenitore (3) è provvisto di un rubinetto per il recupero dell'acqua o dell'estratto.

**Estrazione in fase solida (Solid Phase Extraction - SPE):** questa tecnica viene utilizzata per purificare gli analiti separandoli dalla matrice e/o per preconcentrarli quando si trovano in tracce nel campione.



Si utilizzano colonnine (cartucce) in vetro o polipropilene, contenenti un opportuno materiale adsorbente, trattenuto all'interno di due filtri di teflon o polietilene con pori da circa 20  $\mu\text{m}$ . Inizialmente la colonna viene condizionata facendo passare solo il solvente presente nella soluzione analitica. Quindi il campione viene fatto passare nella colonna e l'analita e la matrice vengono adsorbiti. Dopo si procede con un lavaggio utilizzando un solvente a basso potere eluente, che elimina la matrice mentre il campione rimane adsorbito. Si lava infine con un altro solvente ad alto potere eluente, che provoca il desorbimento del campione e ne permette il recupero.

Con questa tecnica si realizza la purificazione e la preconcentrazione dell'analita, a condizione di avere materiali adsorbenti con elevata specificità.

I meccanismi di separazione dell'analita sono quelli tipici della cromatografia: è possibile utilizzare materiali adsorbenti polari o non polari, scambiatori di ioni, esclusione, ecc. I solventi utilizzati si classificano in base alla polarità, utilizzando le **serie eluotrope** della cromatografia: all'aumentare della polarità aumenta anche il potere eluente. Ad esempio la seguente serie, della quale sono riportati solo i termini iniziali e finali, ordina alcuni solventi in base alla polarità:

n-esano iso-ottano  $\text{CCl}_4$  ...  $\text{CH}_3\text{OH}$   $\text{H}_2\text{O}$   $\text{CH}_3\text{COOH}$   
 non polare ---> polarità crescente polare

**Incenerimento diretto (Dry Ashing - DA):** è un drastico trattamento per eliminare la componente organica di un campione e conservare solo la **parte inorganica**. Quantità di campione da 1 a 5 g vengono essiccati in stufa a 105°C (volendo si può determinare l'umidità presente nel campione tramite la riduzione di peso), quindi si incenerisce in capsula di porcellana o crogiolo di platino direttamente su becco bunsen, coprendo con vetro da orologio per evitare schizzi che provocherebbero perdita di campione.

Al termine dello sviluppo di fumi, si porta in muffola a 600°C fino a che le ceneri divengono bianche. Le ceneri vengono riprese con  $\text{HCl}$  al 10% o con  $\text{HNO}_3$  al 10% se si vogliono determinare i cloruri.

**Fusione con basi forti e/o silicati (alkali fusion) o ossidanti (oxydant fusion):** viene utilizzata per portare in soluzione silicati o materiali argillosi insolubili nei comuni acidi forti. In un crogiolo di platino si aggiungono 0.5-2 g di campione e quindi la miscela di fusione, fino a raddoppiare la quantità. Le principali miscele di fusione sono le seguenti:

- NaOH/KOH/LiOH da soli o in miscela
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> da soli o in miscela
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + KNO<sub>3</sub>
- Borace/Litio tetraborato/Litio metaborato
- Na<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- NaOH/Persolfato

Si mescolano il campione e la miscela utilizzata, si scaldano su becco bunsen cautamente, evitando schizzi o esplosioni. Quindi si porta in muffola a 1000°C, i silicati fondono e si forma una massa vetrosa che, dopo raffreddamento, si stacca dal crogiolo e può essere attaccata con HCl al 10%; se si forma un precipitato di SiO<sub>2</sub> si elimina per filtrazione e il filtrato viene utilizzato per le analisi richieste. Questa tecnica non può essere utilizzata per analisi in ultra-tracce (inferiori a 10 µg/l) perché le miscele di fusione contengono dei contaminanti.

**Mineralizzazione per via umida (wet digestion):** a differenza dell'incenerimento diretto, in questo caso l'attacco del campione e la solubilizzazione degli analiti viene effettuata mediante un opportuno reattivo liquido. Vi sono vari casi:

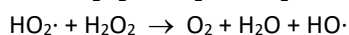
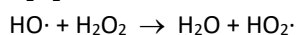
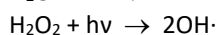
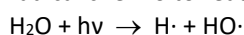
A pressione atmosferica per trattamento con acidi con o senza ossidanti (acid digestion): si utilizza quando è necessario eliminare la parte organica dal campione ma l'analita inorganico è volatile e quindi andrebbe perso con un eccessivo riscaldamento. Un'aliquota di campione di 0,5-2 g viene essiccata in capsula di teflon o porcellana e quindi si procede alla mineralizzazione vera e propria con il reattivo acido, sotto cappa aspirante e su bagno a sabbia (per evitare schizzi) a 150-200°C. Vengono utilizzate diverse miscele acido o acido+ossidante, tra le quali:

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 vol. + HNO<sub>3</sub> 65%
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 vol. + acqua regia (HCl + HNO<sub>3</sub> 1 + 3)
- HNO<sub>3</sub> 65% + HClO<sub>4</sub> 64%
- HNO<sub>3</sub> 65% + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%

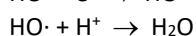
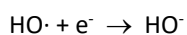
In ogni caso occorre fare molta attenzione alla possibilità di esplosioni. Al termine della mineralizzazione la soluzione viene tirata cautamente a secco: il residuo solido dovrebbe essere bianco; se non lo è bisogna ripetere il trattamento con una aliquota inferiore di miscela ossidante. Quando il residuo è bianco si riprende con HCl 10% e si procede alle analisi previste sulla soluzione analitica così ottenuta.

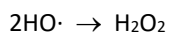
Con forno a microonde e acidi ossidanti (microwawe acid digestion): si lavora come nel caso precedente ma si utilizza un sistema di riscaldamento a microonde per l'attacco chimico, ermeticamente chiuso, che permette di ridurre i tempi di lavorazione. L'apparecchio contiene un diodo termoelettronico (magnetron) che emette microonde nella banda S (2-4 GHz). Queste radiazioni eccitano i livelli rotazionali delle molecole di acqua del campione, che ruotando molto rapidamente si urtano tra loro e producono una grande quantità di calore per attrito. Il campione viene inserito in contenitori di materiali trasparenti alle microonde, come teflon e quarzo. Dato che il riscaldamento è molto rapido si sviluppano in tempi brevi grandi quantità di vapori, che vengono controllati con appositi sistemi per la misura della temperatura e della pressione, per evitare esplosioni. Si raggiungono temperature di 200°C ma in tempi molto brevi e si possono trattare fino a 4-6 campioni contemporaneamente.

Con raggi UV (UV digestion): questo metodo di attacco del campione viene utilizzato per mineralizzare sostanze organiche non molto stabili e per eliminare inquinanti organici come i tensioattivi dalle acque poco inquinate, prima della loro analisi. Il campione, contenuto in campioni di quarzo, addizionato con ossidanti come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene esposto alla luce di una lampada che emette radiazioni UV ad alta energia; il trattamento è piuttosto lungo e può richiedere qualche ora. Avviene un processo di **fotolisi** che demolisce le sostanze organiche attraverso la formazione di specie radicaliche molto reattive, come indicato nelle seguenti reazioni a catena:



Possono avvenire reazioni inibenti, che portano alla scomparsa dei portatori di catena:

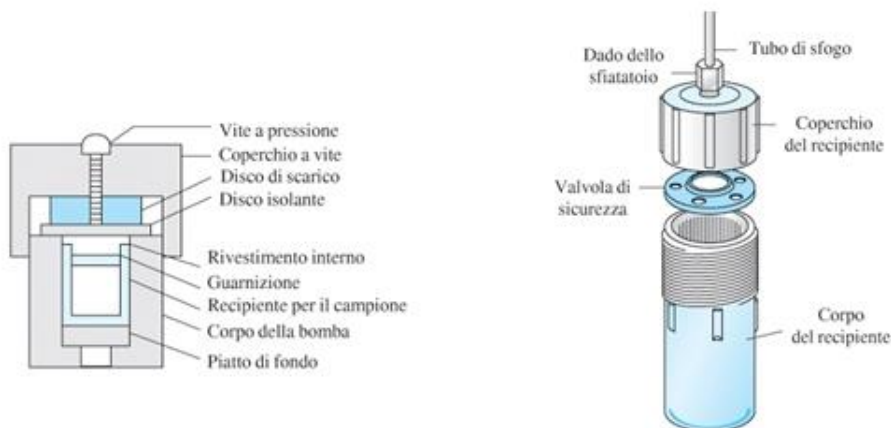




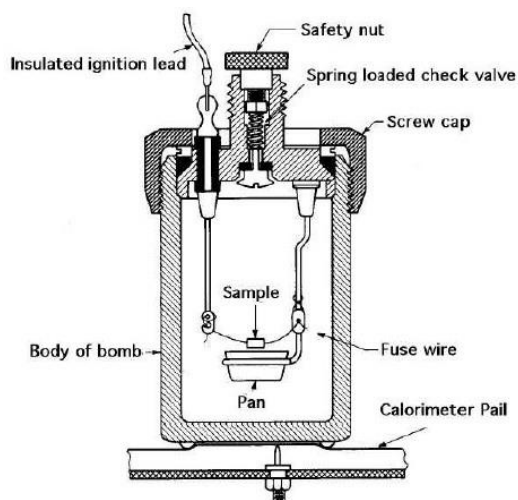
I radicali e l'ossigeno prodotto ossidano e demoliscono progressivamente le sostanze organiche

In bomba sotto pressione con acidi ossidanti (acid digestion bomb): nei processi di mineralizzazione si sviluppano grandi quantità di gas, vapori e schizzi che possono portare a perdita di campione; inoltre elementi volatili (Hg, As, cloruri di Ni, ecc.) vanno in gran parte persi. Per evitare tali inconvenienti, si può operare in ambiente chiuso, utilizzando le cosiddette "bombe", recipienti di acciaio molto robusto, che forniscono un ambiente chiuso in cui raggiungere temperature elevate. La digestione in bomba permette di attaccare materiali molto tenaci e resistenti, utilizzando vari sistemi:

- digestione con acidi in ambiente chiuso, in autoclave o meno;
- digestione con microonde;
- digestione in presenza di  $\text{O}_2$ .



Nella figura precedente sono mostrate due bombe per digestione (attacco) del campione: a sinistra una bomba utilizzata per la digestione con acidi, a destra una bomba utilizzata nella digestione con microonde.



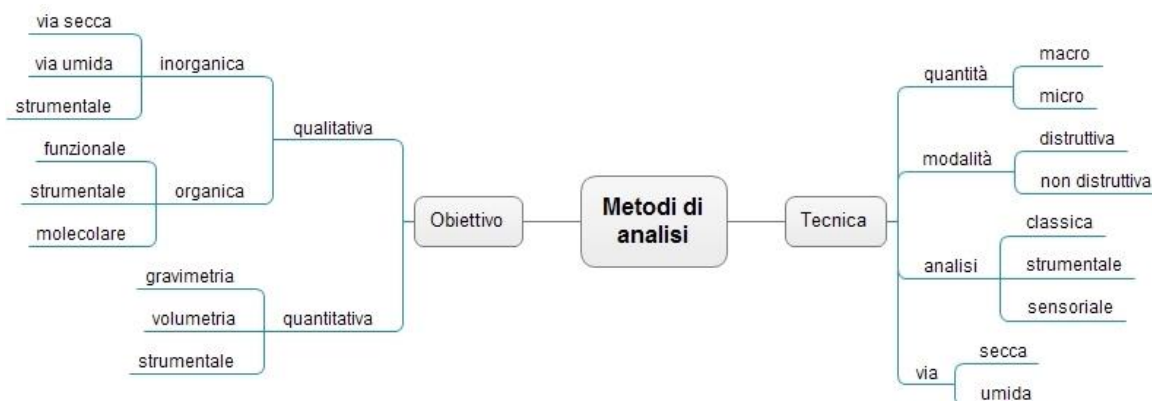
A fianco è mostrata una bomba per combustione in presenza di  $\text{O}_2$  del tutto analoga alla bomba di Mahler, utilizzata nei calorimetri per la determinazione sperimentale del potere calorifico. La bomba viene saturata di  $\text{O}_2$ , il campione deposto nel crogiolo di quarzo o Pt (pan) e quindi si provoca la combustione facendo passare corrente elettrica nel filo immerso nel campione: il filo diventa incandescente ed accende la miscela. La bomba è chiusa da un robusto tappo a vite ed è dotata di una valvola di sicurezza (safety nut) che si rompe in caso di eccessiva pressione per evitare l'esplosione del recipiente.

Al termine si recupera la parte inorganica che è rimasta nel crogiolo mentre gli elementi come C, H, N, ecc. che formavano la parte organica sono dispersi con i fumi di combustione.

Nella digestione in bomba si raggiungono temperature di 150-250°C e pressioni di 70-120 kPa, tali da disgregare e portare in soluzione anche i materiali più resistenti.

### 3. Metodi di analisi strumentale

Esistono moltissimi metodi di analisi chimica, per cui non è facile individuare i criteri per una loro classificazione. Lo schema seguente propone alcuni criteri di classificazione:



### 3.1. Dal punto di vista tecnico

Analisi per via secca e umida: nei metodi per **via secca** il campione viene direttamente riscaldato su un bunsen, ad esempio per eliminare mediante pirolisi la parte organica del campione. Nei metodi per **via umida** il campione viene fatto reagire con opportuni reattivi acidi e/o ossidanti (attacco del campione) allo scopo di mineralizzarlo, portandolo in una soluzione generalmente acquosa. La soluzione ottenuta verrà utilizzato per le analisi vere e proprie, ad esempio la ricerca di un determinato metallo mediante precipitazione di un suo sale poco solubile.

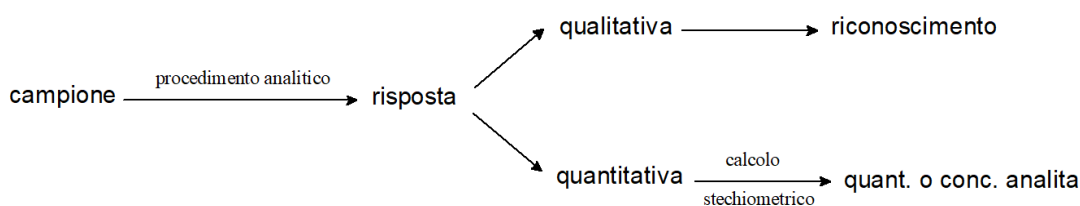
Analisi macroscopica e microscopica: è un modo di classificare i metodi analitici facendo riferimento alle **masse** o ai **volumi** con i quali si lavora, come indicato nella seguente tabella:

Massa campione	Tipo di analisi
0,5 - 1 g	Macro
50 - 100 mg	Semimicro
1 mg	Micro

La tendenza odierna è quella di considerare anche la concentrazione dell'analita presente nel campione. Fino a qualche anno fa era difficile scendere a concentrazioni di ppm (parti per milione - mg/kg di materiale) mentre oggi è comune lavorare in tracce o ultratracce, con campioni di qualche mg e quantità di analita dell'ordine di ppb (parti per miliardo - µg/kg di materiale). Particolari strumenti possono arrivare a determinare quantità di analita dell'ordine dei picogrammi ( $10^{-12}$  g) e dei femtogrammi ( $10^{-15}$  g).

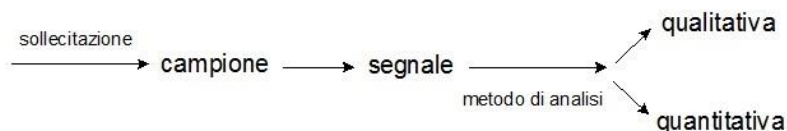
Analisi distruttiva e non distruttiva: quando si deve lavorare mediante reazioni chimiche, il campione viene quasi sempre distrutto. Ovviamente ciò non ha importanza se, ad esempio, si sta analizzando un campione di una lega metallica. Se il campione è un oggetto prezioso (un'opera d'arte, un reperto archeologico, ecc.) non deve essere distrutto e quindi si utilizzano tecniche specifiche non distruttive o addirittura "in situ". A volte ciò non è possibile e allora in questi casi è opportuno analizzare, e quindi distruggere, quantità minime di campione.

Analisi classica e strumentale: l'analisi **classica** utilizza procedimenti di analisi **interamente chimici** mediante reazioni di laboratorio opportunamente scelte che utilizzano soltanto la normale vetreria (dal becher alla buretta) e la bilancia. Mediante la misura di masse o di volumi e semplici calcoli stechiometrici, si effettua l'analisi qualitativa e/o quantitativa. Non vengono utilizzati altri strumenti.



Nell'analisi **strumentale** si possono sfruttare moltissimi fenomeni chimici e fisici di **interazione con la materia** del campione: interazione luce-materia (metodi ottici come UV-VIS, IR, emissione, ecc.), proprietà elettriche (metodi elettrochimici come potenziometria, conduttimetria, ecc.), separazione dei componenti (metodi cromatografici come la GLC, HPLC, ecc.).

In questo caso il campione viene sottoposto ad una sollecitazione (variabile chimica) e produce in risposta un **segnale** (variabile strumentale) che viene confrontato con quello prodotto da quantità note dello stesso analita. Nei metodi strumentali il dato analitico viene ottenuto non in modo diretto ma deriva dall'elaborazione del segnale e dal suddetto confronto.



Analisi sensoriale: utilizza semplicemente i **sensi umani**. Anche se le indicazioni fornite dai sensi (colore, odore, sapore, ecc.) sono soggettive, possono essere utilizzate a fini analitici a condizione di lavorare in modo rigorosamente standardizzato. L'analisi sensoriale (AS) è utilizzata ad esempio in campo alimentare col metodo del **panel test**: un gruppo di persone selezionate e addestrate viene chiamata a stabilire le caratteristiche organolettiche di un alimento (olio di oliva, vino, birra, ecc.), assegnando dei punteggi di qualità a vari indicatori (aroma, sapore, ecc.) che sono risultati correlabili con la composizione dell'alimento, derivante dall'analisi chimica.

### 3.2. Dal punto di vista dell'obiettivo

Analisi qualitativa e quantitativa: l'analisi qualitativa ha lo scopo di identificare le specie chimiche presenti nel campione (elementi chimici o composti chimici cioè molecole). Può essere condotta con due diversi scopi:

- si vuole rispondere alla domanda: esiste questa specie chimica nel campione? Si tratta in questo caso di una **identificazione** ovvero di una **analisi qualitativa di riconoscimento**, come ad esempio la ricerca di un determinato inquinante nell'acqua, di pesticidi all'interno di un frutto, ecc.
- si vuole rispondere alla domanda: cosa è presente nel campione che può interessare? In questo caso si analizza un campione totalmente sconosciuto in cui è richiesto di determinare la composizione o almeno i componenti principali, senza ulteriori indicazioni. Si tratta di **analisi qualitativa di ricerca**, come ad esempio stabilire perché una determinata materia plastica è ingiallita nel tempo, ecc.

L'approccio analitico nei due diversi casi è completamente diverso, così come sono diversi i costi ed i tempi necessari alla conclusione del processo analitico.

L'analisi quantitativa ha invece lo scopo di determinare in quali proporzioni sono contenute le sostanze (composti, molecole, elementi chimici) presenti nel campione. Può essere iniziata solo:

- dopo aver verificato la presenza dell'analita in quantità rilevabili;
- dopo aver acquisito informazioni sul probabile ordine di grandezza delle quantità presenti, allo scopo di scegliere il giusto approccio analitico, strumentale o meno.

In realtà la distinzione tra analisi qualitativa e quantitativa è oggi in parte superata dalla strumentazione a disposizione: ad esempio con un apparecchio di emissione al plasma ICP è possibile valutare la presenza di 30-40 elementi diversi (con certi apparecchi fino a 70 elementi contemporaneamente!) e condurre nello stesso momento una prima analisi quantitativa, prima di passare, eventualmente, a dosaggi più specifici.

Con uno spettrofotometro IR a trasformata di Fourier FTIR, è possibile analizzare la composizione di una miscela di solventi e determinarne la composizione percentuale in un unico passaggio analitico.

Quindi oggi la distinzione tra le due fasi analitiche non è più così netta e in molte tecniche le due analisi sono largamente sovrapposte utilizzando metodi strumentali.

Lo schema che segue approfondisce ulteriormente le possibili analisi qualitative e quantitative, indicando alcuni dei principali metodi di analisi.





## 4. Analisi qualitativa

### 4.1. Analisi inorganica per via secca

**Saggio alla fiamma:** si mette a contatto un filo di Pt o di Ni-Cr precedentemente bagnato in HCl con il campione in polvere: gli elementi inorganici presenti formano cloruri volatili che, inserendo il filo nella fiamma di un bunsen, producono colorazioni caratteristiche, in quanto gli elettroni degli atomi degli elementi vengono eccitati e ritornando allo stato fondamentale riemettono l'energia termica assorbita sotto forma di radiazioni luminose nel campo del VIS, colorando in modo caratteristico la fiamma del bunsen.

Elemento	Colorazione
Ba	Verde pallido
B	Verde brillante
Ca	Rosso arancio
K	Lilla
Li	Rosso carminio
Na	Giallo
Cu	Verde acqua
Sr	Rosso scarlatto

Alcuni esempi sono riportati nella tabella a fianco.

Il saggio può essere condotto anche su alcune sostanze organiche. Ad esempio mettendo a contatto un filo di Cu con una materia plastica come il PVC (polivinilcloruro), si formano cloruri di rame che colorano la fiamma di un verde caratteristico (saggio di Beilestein)

**Saggio per fusione e/o disgregazione:** si pone una piccola quantità di campione su di un pezzo di carbone insieme a  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e quindi si espone al calore della fiamma di un bunsen. Il campione fonde e reagisce con il carbonato sodico: in tal modo alcuni elementi formano ossidi e carbonati di colorazione caratteristica.

In alternativa al carbonato sodico si usa il borace  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , ovvero il sodio tetraborato decaidrato, che forma con vari elementi metallici dei borati di colorazione caratteristica (saggio alla **perla di borace**).

Elemento	Fiamma ossidante	Fiamma riducente
Co	Blu notte	Blu notte
Cr	Giallo verde	Verde
Fe	Giallo/rosso	Verde
Mn	Violetto	Incolore
Ni	Rosso viola	Grigio
Cu	Verde	Verde

Per riscaldamento il borace rigonfia perdendo l'acqua di cristallizzazione, quindi si decompone e libera anidride borica  $\text{B}_2\text{O}_3$ . Utilizzando la fiamma ossidante del bunsen si fa reagire l'anidride borica con gli ossidi metallici formati nel campione per effetto del riscaldamento, producendo una perla vetrosa con una colorazione caratteristica. Trattando la perla con la fiamma riducente del bunsen, oppure in presenza di un riducente come il carbone, si ha un caratteristico cambiamento di colore, come indicato nella tabella a fianco.



fine si può inserire il campione in una capsula di porcellana in presenza di opportune miscele di reattivi, che danno luogo a colorazioni caratteristiche e/o ne causano la fusione e quindi facilitano la successiva solubilizzazione in acqua, in modo da procedere con successiva analisi per via umida.

Analisi strumentale: vari elementi o composti possono essere determinati mediante eccitazione con raggi X con una tecnica detta fluorescenza a raggi X (XRF). La struttura dei cristalli, inorganici ed organici, può essere studiata con la diffrazione a raggi X. La tecnica FTIR permette di individuare la struttura di moltissime molecole organiche ed i relativi gruppi funzionali. Una tecnica distruttiva per l'analisi di elementi metallici è la quantometria, evoluzione moderna della spettrografia. L'analisi delle superfici dei materiali può essere effettuata con la microscopia elettronica.

#### 4.2. Analisi inorganica per via umida

Analisi con saggi specifici: è una tecnica non strumentale nella quale è possibile riconoscere la presenza di determinati elementi chimici tramite reazione con reagenti specifici. Per esempio gli alogenuri  $X^-$  possono essere riconosciuti mediante precipitazione dell'alogenuro di argento  $AgX$ , di colore caratteristico, con una soluzione di  $AgNO_3$ , oppure i  $SO_4^{2-}$  vengono riconosciuti per precipitazione di  $BaSO_4$  con una soluzione di  $BaCl_2$ .

Analisi sistematica: è una tecnica non strumentale in cui il campione viene portato in soluzione e quindi trattato, in successione, con una serie di reattivi specifici che provocano la precipitazione selettiva di vari metalli. Di solito si utilizzano **6 gruppi analitici**:

Gruppo	Reattivo	Precipitato
1	HCl	Cloruri di Ag, Pb, Hg(I)
2	H <sub>2</sub> S	Solfuri di As, Sb, Sn(II), Sn(IV), Cu, Hg(II), Pb, Bi, Cd
3	NH <sub>3</sub> a pH 9	Idrossidi di Al, Fe, Cr
4	H <sub>2</sub> S + NH <sub>3</sub> + NH <sub>4</sub> Cl	Solfuri di Zn, Mn, Ni, Co
5	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonati di Ca, Sr, Ba
6	---	Rimangono in soluzione Li, Na, K, Mg
Insolubile	---	Composti insolubili come ad esempio TiO <sub>2</sub>

#### 4.3. Analisi organica

Analisi elementare classica: si mineralizza il campione e poi si cerca, con reattivi specifici, la presenza di elementi come N, P, alogeni e alcuni metalli

Analisi elementare strumentale: permette la ricerca e la determinazione qualitativa/quantitativa di C, N, S e H utilizzando apposite apparecchiature in cui il campione viene ossidato mediante riscaldamento e formazione di gas come CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O che vengono separati e determinati quantitativamente mediante GC con rivelatore HWD.

Analisi funzionale classica: permette di determinare i gruppi funzionali organici presenti nel campione, attraverso l'uso di reattivi specifici che formano precipitati o colorazioni caratteristiche oppure attraverso la formazione di derivati con caratteristiche precise (punto di fusione, ecc.). Ad esempio la presenza del glucosio o di zuccheri riducenti viene accertata tramite il reattivo di Fehling, che produce la precipitazione di Cu<sub>2</sub>O rosso.

Analisi funzionale strumentale: la presenza dei vari gruppi funzionali è determinata in modo rapido e preciso con la tecnica FTIR. Grazie allo sviluppo dei PC negli ultimi anni è diventata molto importante la spettrometria di massa MS, specie nelle versioni accoppiate con la gascromatografia GC-MS o con la cromatografia liquida LC-MS: i vari analiti presenti nel campione vengono separati dalla tecnica cromatografica e quindi le singole molecole organiche del campione, che arrivano una alla volta nello spettrometro di massa, vengono frammentate e la tecnica, analizzando i frammenti con apposite librerie computerizzate e software molto avanzati, riesce a ricostruire la struttura della molecola iniziale, anche su piccolissime quantità di analita.

La spettrofotometria UV-VIS, poco selettiva, permette comunque di verificare la presenza di anelli aromatici o sistemi coniugati in genere, tramite l'analisi dei picchi dello spettro causati da questi caratteristici cromofori. In alcuni casi è possibile effettuare dell'analisi qualitativa organica attraverso la fluorimetria molecolare, che ha il vantaggio di essere molto sensibile.

Analisi molecolare strumentale: è simile alla precedente e si realizza con le stesse tecniche. In questo caso lo scopo è quello di individuare specie chimiche specifiche in una matrice molto complessa, come ad esempio determinare la presenza di uno specifico additivo all'interno di un detergente o di una materia plastica. Le tecniche strumentali permettono di individuare analiti presenti anche in tracce o ultratracce, che sfuggirebbero alle analisi classiche.

## 5. Analisi quantitativa

### 5.1. Analisi gravimetrica

L'analita viene trasformato, attraverso la reazione con un reattivo precipitante, in una forma insolubile che precipita e quindi la sua massa (ovvero il suo peso) viene determinata per mezzo di una bilancia analitica. Dal peso ottenuto, nota la forma pesata, si risale con il calcolo stechiometrico alla quantità iniziale di analita.

In questa tecnica sono coinvolte varie fasi come: separazione dell'analita dalla matrice, precipitazione, filtrazione, essiccamento; pertanto si tratta di un metodo analitico abbastanza preciso e selettivo ma piuttosto lungo e quindi oggi poco usato. La gravimetria non è adatta all'analisi di piccole quantità di analita; occorre comunque ricordare che la bilancia analitica è ancora lo strumento più preciso di cui si dispone in laboratorio.

### 5.2. Analisi volumetrica

E' basata sulle **titolazione**, cioè sulla reazione completa e stechiometrica tra l'analita ed un reattivo titolante, a concentrazione nota. Al termine della reazione, segnalata da un adatto sistema indicatore, leggendo il volume di titolante utilizzato tramite una buretta, attraverso un calcolo stechiometrico si risale alla quantità di analita iniziale.

La volumetria è una tecnica non strumentale ancora molto usata, soprattutto per campioni con matrici non troppo complesse, perché rapida, precisa e poco costosa.

Per poter utilizzare un metodo volumetrico devono essere soddisfatte le seguenti **condizioni**:

- 1) la reazione che avviene nella titolazione deve essere veloce e con stechiometria definita
- 2) deve essere disponibile un adatto standard per la titolazione e un adatto sistema indicatore (ottico o strumentale)
- 3) non deve essere sensibile alle eventuali interferenze, cioè la reazione deve avvenire solo con l'analita che interessa determinare

Il **punto equivalente** (PE) è il punto teorico di fine titolazione, al quale gli equivalenti di titolante sono uguali agli equivalenti di analita (non si può dire lo stesso delle moli perché dipende dai coefficienti di reazione - se sono tutti unitari allora la stessa cosa si può dire anche delle moli).

Il **punto finale** (PF) è il punto effettivo di fine titolazione, al quale corrisponde il viraggio dell'indicatore e dipende anche dall'abilità dell'analista a cogliere tale punto, se si utilizza un indicatore chimico e non un sistema strumentale (potenziometria, conduttimetria, ecc.). La differenza (PF - PE) costituisce l'**errore di titolazione**, che deve essere ovviamente ridotto al minimo.

Le titolazioni si possono classificare in due modi diversi: a seconda della reazione che utilizzano, a seconda delle modalità operative che vengono seguite



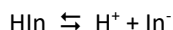
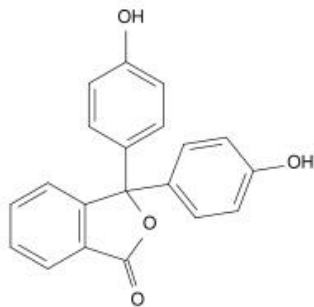
In generale le titolazioni possono essere usate quando la concentrazione iniziale dell'analita non è inferiore a  $10^{-3}$ - $10^{-4}$  M; utilizzando tecniche particolari, come ad esempio una titolazione potenziometrica con elaborazione dei dati secondo Gran, è possibile scendere a concentrazioni iniziali dell'ordine di  $10^{-5}$  M. In ogni caso la volumetria non è adatta all'analisi di analiti in tracce.

### 5.2.1. Acidimetria/alcalimetria

Nell'**acidimetria** si utilizza un acido (in genere forte) a titolo noto per titolare una base forte o debole o miscele di basi. La reazione di titolazione è quindi:  $H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$

Durante la titolazione si forma la specie poco dissociata  $H_2O$  e questo provoca una variazione di pH più o meno netta al PE, causa del viraggio dell'indicatore o della netta variazione di una qualche proprietà misurabile da un apparecchio (nella potenziometria: pH misurabile con un elettrodo a vetro oppure potenziale elettrochimico E misurabile con un elettrodo al Pt, conducibilità nella conduttimetria, ecc.).

Se si effettua una titolazione "classica" con indicatori ottici, si usano come **indicatori** degli acidi/basi deboli HIn in cui la forma protonata HIn e deprotonata  $In^-$  hanno colori diversi (o sono incolori) e in cui il rapporto  $[HIn]/[In^-]$  è determinato dal pH.



Come esempio è riportata la formula della fenolftaleina: si tratta di un acido debole con 2 gruppi fenolici acidi e un intervallo di viraggio tra 8,0 e 9,8. La forma acida è incolora mentre la forma basica è violetta. A pH inferiore a 8,0 prevale la forma acida (incolora) con i due gruppi OH fenolici protonati in quanto  $[HIn]/[In^-] > 10$ , mentre a pH maggiore di 9,8 prevale la forma basica (violetta) con i due gruppi fenolici salificati cioè deprotonati  $O^-$  in quanto  $[HIn]/[In^-] < 0,1$ .

Questi limiti definiscono il **campo di viraggio** dell'indicatore.

La netta variazione di pH in corrispondenza del PE provoca una netta variazione di tale rapporto e quindi fa prevalere una specie sull'altra, con conseguente variazione del colore della soluzione (viraggio). Naturalmente se la soluzione analitica è già colorata (ad esempio la determinazione dell'acidità totale di un vino rosso) non è possibile utilizzare un indicatore ed allora si ricorre ad una titolazione strumentale che permette di costruire la curva di titolazione e da qui risalire al PE.

Così come è possibile titolare **acidi poliprotici**, è anche possibile titolare **basi poliossidriliche** a condizione che gli equilibri di dissociazione siano nettamente separati, come ad esempio nel caso della titolazione dei carbonati  $CO_3^{2-}$  con HCl a titolo noto utilizzando il metodo del doppio indicatore: prima la fenolftaleina, al cui viraggio corrisponde la forma  $HCO_3^-$  e quindi il metilarancio, in successione nella stessa soluzione che viene titolata, a cui corrisponde la completa protonazione dei carbonati e quindi la forma  $H_2CO_3$  (ovvero  $CO_2 + H_2O$ ). Sempre con lo stesso metodo è possibile titolare miscele:  $NaOH + Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3 + Na_2CO_3$ , ecc.

Nell'**alcalimetria** si utilizza una base (in genere forte) a titolo noto per titolare un acido forte o debole o miscele di acidi. La reazione di titolazione è quindi:  $OH^- + H^+ \rightarrow H_2O$

Valgono le stesse considerazioni fatte per l'acidimetria.

### 5.2.2. Ossidimetria

Utilizza titolazioni redox, ovvero reazioni ossidante + riducente o viceversa. In questo caso al PE varia in modo netto il potenziale elettrochimico E della coppia redox in equilibrio che prevale in quel momento. Tale netta variazione causa il viraggio dell'indicatore oppure può essere rilevata con un sistema strumentale, come ad esempio un potenziometro dotato di elettrodo al Pt come elettrodo indicatore.

Gli **indicatori** ossidimetrici sono loro volta delle coppie redox in equilibrio in cui la forma Ox ha un colore diverso rispetto alla forma Red e quindi, come nel caso degli indicatori acido/base, è il rapporto  $[Ox]/[Red]$  a determinare il colore della soluzione analitica e tale rapporto dipende, a sua volta, dal potenziale elettrochimico.

Vi sono diverse titolazioni ossidimetriche, tra le quali:

- permanganometria: il titolante è  $KMnO_4$  a titolo noto in soluzione acida. Dato che la forma ossidata  $MnO_4^-$  è violetta e la forma ridotta in ambiente acido  $Mn^{2+}$  è incolora, in questo caso il titolante fa da autoindicatore
- bicromatometria: il titolante è  $K_2Cr_2O_7$  in ambiente acido
- iodimetria: in questo metodo si utilizza una soluzione di  $I_2$  a titolo noto come ossidante
- iodometria: si tratta di una redox indiretta. L'analita, che deve avere caratteristiche ossidanti, viene fatto reagire con un eccesso di KI, producendo  $I_2$ , che viene titolato con il riducente tiosolfato sodico  $Na_2S_2O_3$  a titolo noto, utilizzando tipicamente come indicatore la salda d'amido, una dispersione di amido solubile in acqua

### 5.2.3. Titolazioni di precipitazione

Si tratta di titolazioni in cui la reazione tra analita e titolante produce la formazione di una specie chimica poco solubile. Il caso più comune è l'**argentometria**, che si utilizza per determinare gli alogenuri ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  e  $\text{I}^-$ ) per titolazione con  $\text{AgNO}_3$  a titolo noto:



In questo caso al PE vi è una netta variazione della concentrazione dell'alogenuro in soluzione e quindi di  $[\text{Ag}^+]$ , che può essere rilevata con adatti sistemi indicatori strumentali (potenziometria con elettrodo indicatore ad  $\text{Ag}/\text{Ag}^+$  oppure con metodi amperometrici) costruendo la curva di titolazione, oppure con tecniche classiche (Mohr, Volhard).

La titolazione secondo **Mohr** utilizza come indicatore  $\text{K}_2\text{CrO}_4$  (giallo). Prima del PE precipita  $\text{AgX}$  e la soluzione è colorata in giallo; al PE inizia la precipitazione di  $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$  (rosso arancio) che causa il viraggio. Ciò avviene perché i relativi prodotti di solubilità sono tali da rendere meno solubile  $\text{AgX}$  rispetto al cromato di argento, che quindi precipita solo quando l'alogenuro in soluzione è esaurito. Ad esempio nel caso della titolazione dei cloruri:

$$K_{ps} \text{AgCl} = 1,82 \cdot 10^{-10} \quad \text{da cui la solubilità risulta } 1,35 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l}$$

$$K_{ps} \text{Ag}_2\text{CrO}_4 = 1,29 \cdot 10^{-12} \quad \text{da cui la solubilità risulta } 6,86 \cdot 10^{-5} \text{ mol/l e quindi più solubile}$$

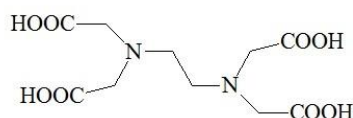
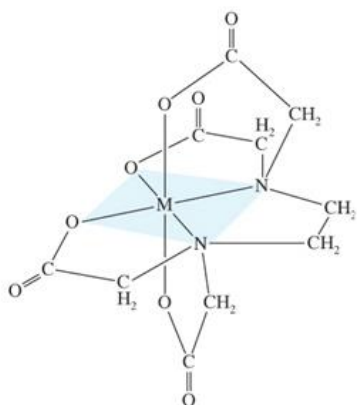
Non è possibile dedurre la solubilità dal confronto tra i  $K_{ps}$  perchè la stechiometria dei due sali è diversa!

Mentre il metodo di Mohr è un metodo diretto, la titolazione secondo **Volhard** è una titolazione di ritorno: nel campione si aggiunge un eccesso noto a titolo noto di  $\text{AgNO}_3$  che viene retrotitolato con  $\text{KSCN}$  a titolo noto in presenza di un sale ferrico, di solito allume ferrico  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ , formando un precipitato di  $\text{AgSCN}$ : al primo eccesso di  $\text{SCN}^-$  si forma il complesso  $\text{Fe}(\text{SCN})^+$  intensamente colorato in rosso. Dalla differenza dei due volumi di titolante si risale alla concentrazione dell'alogenuro sottoposto a titolazione.

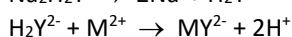
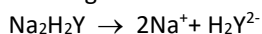
### 5.2.4. Complessometria

E' basata sulla reazione tra l'analita, in genere uno ione metallico, con un legante, cioè un reattivo in grado di formare complessi chelati. Si tratta di molecole organiche in grado di dare legami ionici (con gruppi acidi) e legami di coordinazione o dativi (con gruppi dotati di doppietti solitari, come N e O).

Il titolante più usato è il sale bisodico dell'acido etilendiamminotetracetico (**EDTA**) indicato con  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{Y}$ , più solubile rispetto all'acido  $\text{H}_4\text{Y}$ : si tratta di un legante esadentato in grado di formare 4 legami ionici e 2 legami dativi e pertanto può dare luogo a complessi del tipo 1:1 con quasi tutti i metalli, a condizione di lavorare a pH circa 10, al quale prevale la forma complessante  $\text{Y}^{4-}$ :



Per un generico ione metallico  $\text{M}^{2+}$  si ha che:

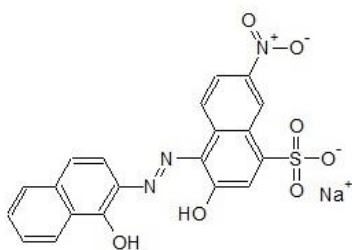
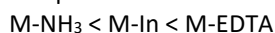


Dato che nella titolazione si liberano  $\text{H}^+$  il pH tenderebbe a diminuire e ciò renderebbe il complesso meno stabile, per cui si lavora con tamponi a pH 10 nella maggior parte dei casi, in presenza di un complessante ausiliario come  $\text{NH}_3$  per impedire la precipitazione del metallo che tenderebbe a idrolizzarsi e formare il relativo idrossido

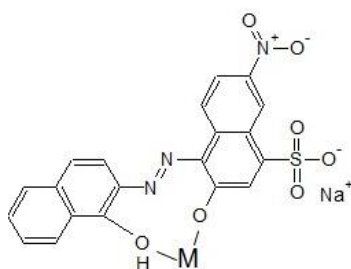
Si formano complessi ottaedrici molto stabili e quindi utilizzabili per dosaggi analitici, tuttavia l'EDTA è poco selettivo perché reagisce con quasi tutti gli ioni metallici. Per la rilevazione del PE si usano **indicatori metallocromici**, a loro volta in grado di complessare l'analita metallico, con un colore diverso nella forma libera o complessata.

Ad esempio nella determinazione della durezza dell'acqua, cioè del contenuto totale di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  si utilizza come indicatore il Nero Eriocromo T (NET): si tratta di un colorante azoico con un gruppo solfonico salificato che lo rende solubile e due gruppi fenolici acidi, con i quali può formare un complesso di coordinazione con ioni metallici. Nella forma non complessata il NET è blu, mentre nella forma complessata con il metallo M è rosso.

E' importante perché la titolazione avvenga in modo corretto, che sia verificata la seguente sequenza di stabilità dei complessi:



H<sub>2</sub>In<sup>-</sup> blu (non complessato)



MIn<sup>-</sup> rosso (complessato)

Dato che si lavora a pH circa 10 tamponato con tampone ammoniacale, all'inizio deve formarsi il complesso tra il metallo M e il complessante ausiliario NH<sub>3</sub> per impedire la precipitazione dell'idrossido metallico dovuta alla sua idrolisi; quindi, dopo l'aggiunta dell'indicatore, una parte degli ioni metallici viene complessata dall'indicatore metallocromico In, che assume il colore della forma complessata (rosso per il NET); infine durante la titolazione l'EDTA, che deve formare il complesso più stabile, sottrae gli ioni del metallo M all'indicatore: al PE li ha sottratti tutti per cui l'indicatore vira assumendo il colore della forma non complessata (blu per il NET).

### 5.2.5. Tecniche di titolazione

Facendo riferimento al modo con il quale viene effettuata la titolazione, si hanno diverse possibilità.

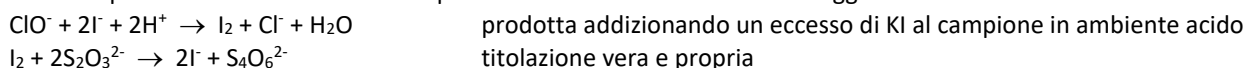
**Titolazione diretta:** è il modo più semplice, nel quale il titolante viene fatto reagire direttamente con l'analita, facendolo scendere goccia a goccia dalla buretta nella soluzione analitica che contiene tutti i reagenti necessari per la reazione. Un esempio è la titolazione diretta di un acido forte con una base forte:  $H^+ + OH^- \rightarrow H_2O$   
In questo caso deve essere disponibile un adatto sistema indicatore, ottico o strumentale

**Titolazione inversa (di ritorno o retrotitolazione):** in questo caso l'analita viene esaurito da un eccesso noto di titolante; l'eccesso viene in seguito titolato con un secondo titolante specifico. Ad esempio i Cl<sup>-</sup> possono essere titolati anche in modo indiretto:

$Cl^- + Ag^+ \rightarrow AgCl_{(s)}$  si aggiunge un eccesso noto a titolo noto di AgNO<sub>3</sub> che precipita tutti i cloruri  
 $Ag^+ + SCN^- \rightarrow AgSCN_{(s)}$  l'eccesso di Ag<sup>+</sup> viene retrotitolato con tiocianato di potassio KSCN a titolo noto  
 Dall'eccesso noto di AgNO<sub>3</sub> e dal volume e dal titolo del KSCN utilizzato nella titolazione, si risale con il calcolo stechiometrico alla concentrazione iniziale di Cl<sup>-</sup>.

**Titolazione indiretta:** si utilizza quando analita e titolante non reagiscono tra loro secondo una reazione stechiometrica e riproducibile. Anche in questo caso si opera in due fasi successive. Inizialmente l'analita viene fatto reagire con un eccesso di un opportuno reattivo che, attraverso una reazione stechiometrica e riproducibile, porta alla formazione di una specie chimica, titolata in una seconda fase con il titolante vero e proprio. Un esempio è la **iodometria** in cui l'analita è l'ossidante che con KI in eccesso genera I<sub>2</sub>, titolato in seguito con il riducente tiosolfato sodico.

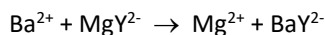
Per esempio nella determinazione dell'ipoclorito ClO<sup>-</sup> contenuto nella candeggina:



Il titolante è il tiosolfato sodico Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a titolo noto con indicatore specifico salda d'amido, che contiene le catene a spirale del β-amilosio all'interno delle quali viene adsorbito lo iodio, dando una colorazione blu scura che vira al bianco quando tutto I<sub>2</sub> viene ridotto al PE della titolazione.

Esiste anche un'altra tecnica in cui è presente la coppia I<sub>2</sub>/I<sup>-</sup> detta **iodimetria**, che è però una tecnica diretta in cui il titolante è una soluzione di I<sub>2</sub> a titolo noto con la quale, sempre con la salda d'amido come indicatore, si titolano direttamente analiti riducenti. Si utilizza questa tecnica quando non è disponibile un indicatore specifico per l'analita

**Titolazione di spostamento:** si utilizza quando non è possibile trovare le condizioni adatte per una titolazione diretta o di ritorno. Un esempio è la titolazione complessometrica di uno ione metallico con EDTA in assenza di un adatto indicatore metallocromico, come ad esempio il  $Ba^{2+}$ . Si aggiunge al campione un eccesso noto di una soluzione di un metallo complessato con EDTA con un complesso a bassa stabilità, come Mg-EDTA: l'analita sposta il Mg secondo la reazione:



In seguito si titola  $Mg^{2+}$  liberato con EDTA a titolo noto e NET. Dal volume di titolante utilizzato e noto l'eccesso iniziale, si risale con il calcolo stechiometrico alla quantità di analita, in questo caso il  $Ba^{2+}$ .

**Tecniche strumentali:** se la soluzione analitica è colorata o non sono disponibili indicatori ottici è possibile seguire la titolazione con tecniche strumentali, costruendo in vari casi una vera e propria **curva di titolazione**:

- titolazione potenziometrica: si misura il potenziale elettrochimico, ovvero direttamente il pH nelle titolazioni acido/base;
- titolazione conduttimetrica: si misura la conducibilità elettrica della soluzione;
- titolazione coulombometrica o amperometrica: si misura la corrente elettrica che attraversa il campione;
- titolazione colorimetrica: si misura l'assorbanza del campione nel VIS.

Dalla curva di titolazione, mediante metodi grafici (tangenti, prolungamenti) o di elaborazione numerica dei dati (derivazione o linearizzazione della curva), è possibile determinare il PF e quindi risalire con il calcolo stechiometrico alla concentrazione iniziale di analita.

I **vantaggi** della costruzione della curva di titolazione con le tecniche strumentali sono numerosi:

- sono metodi oggettivi e non soggettivi come quelli basati sul viraggio di un indicatore ottico e quindi più precisi;
- utilizzando tecniche di elaborazione dei dati come derivazione (prima e seconda) della curva o il metodo di Gran è possibile effettuare titolazioni ad alta precisione, riducendo gli errori commessi;
- è possibile automatizzare la titolazione, utilizzando ad esempio un potenziometro automatico dotato di buretta motorizzata e interfacciato con un PC, che conduce l'intera titolazione senza l'intervento dell'operatore.

## 6. Analisi strumentale

### 6.1. Gli standard

La maggior parte delle analisi chimiche sono oggi condotte con **metodi strumentali**, attraverso un gran numero di tecniche analitiche, che in sintesi si possono riassumere nel seguente modo:

- spettroscopia molecolare ed atomica di assorbimento e di emissione di radiazioni elettromagnetiche a diverse lunghezze d'onda
- metodi elettrochimici (potenziometria, conduttimetrica, elettrolisi, voltammetria)
- metodi cromatografici di separazione (gascromatografia, HPLC, cromatografia ionica)
- metodi di separazione massa/carica (spettrometria di massa e tecniche di massa accoppiata)

I metodi strumentali presentano diversi vantaggi rispetto alle tecniche tradizionali:

- maggiore sensibilità e minore limite di dosabilità
- maggiore velocità, possibilità di automazione (anche mediante veri e propri robot!)
- acquisizione, elaborazione e gestione dei dati analitici mediante interfacciamento con PC

In qualsiasi metodo analitico è necessario preparare una o più soluzioni di riferimento, dette **soluzioni standard** o semplicemente standard, contenenti l'analita a concentrazione nota e incertezza nota.

Gli standard possono essere:

- **standard primari** - PS (Primary Standard)
- **materiali di riferimento** - RM (Reference Material)
- **materiali di riferimento certificati** - CRM (Certified Reference Material)

I materiali di riferimento **RM** sono materiali o sostanze che possiedono determinati requisiti che li rendono idonei per la taratura di un apparecchio o la valutazione di un metodo di misura.

I materiali di riferimento certificati **CRM** sono materiali in cui uno o più valori delle loro proprietà sono certificati da una procedura valida e accompagnati da un certificato che li qualifica. Sono prodotti da vari enti internazionali (ISO, UNICHIM, ecc.) e in genere riproducono la matrice di determinati campioni. Ad esempio nell'analisi in assorbimento atomico di leghe metalliche si possono utilizzare per la costruzione della retta di lavoro, invece di analiti puri, apposite leghe metalliche a composizione nota e simile ai campioni, che costituiscono dei CRM.

Tutte le sostanze che non hanno tutti i requisiti richiesti ma che vengono utilizzate nella pratica analitica, sono dette **standard secondari**. Ovviamente gli standard primari hanno le migliori caratteristiche metrologiche e sono accettati come riferimento senza confronto con altri campioni della stessa qualità, in quanto sono i PS a costituire il riferimento analitico.

Uno **standard primario** PS deve avere i seguenti **requisiti**:

- deve avere un grado di purezza superiore al 99,5%
- deve essere stabile, così come le sue soluzioni
- non deve essere igroscopico (cioè assorbire acqua), deliquescente (sciogliersi nell'acqua assorbita come umidità) o efflorescente (dare cristallizzazione in presenza di umidità)
- non deve subire cambiamenti fisici o chimici quando viene essiccato
- deve essere solubile in acqua o negli acidi o nelle basi più comuni
- deve avere la minima tossicità possibile e deve essere smaltibile facilmente dopo l'uso
- deve essere facile da pesare, maneggiare e reperire
- non deve essere eccessivamente costoso
- deve avere una massa molare elevata per assicurare una pesata più accurata
- se si tratta di una standard primario per titolazioni volumetriche deve avere una stechiometria di reazione ben definita

Solo le pochissime sostanze che possiedono tutti questi requisiti; alcuni esempi:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ftalato acido di potassio (KHP),  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$

**Una soluzione a titolo noto di standard primario PS o CRM** può essere preparata direttamente per pesata, con le seguenti avvertenze:

- usare una bilancia analitica, con una precisione di 0,1 mg o migliore
- per la pesata usare un recipiente pulito ed il più possibile leggero per ridurre gli errori di pesata
- solubilizzare direttamente nel matraccio tarato di classe A in cui si porterà a volume se la sostanza è solubile in acqua; se bisogna solubilizzare in acidi o basi utilizzare un becher e quindi, dopo completa solubilizzazione, travasare quantitativamente nel matraccio tarato
- portare a volume con la massima precisione ed attenzione, inizialmente con una spruzzetta e, se è il caso, aggiungere gli ultimi volumi con un contagocce
- è inutile cercare di pesare esattamente la quantità necessaria di standard primario; è fondamentale invece pesare accuratamente una quantità circa simile e poi calcolare il titolo esatto della soluzione ottenuta. Ciò rende più rapida e sicura la pesata
- la soluzione prodotta deve essere conservata in recipienti adatti (vetro chiaro o scuro, polietilene, ecc.) preventivamente condizionati cioè sciacquati con piccole quantità di soluzione standard per eliminare le tracce di acqua di lavaggio che, se non allontanate, altererebbero il titolo
- prelevare la soluzione per l'uso con pipette tarate o burette accuratamente pulite e condizionate; evitare di prelevare direttamente dal recipiente che conserva tutta la soluzione, per evitare contaminazioni: versare una piccola quantità in un becher pulito e quindi procedere al prelievo
- riportare su un'etichetta da applicare al recipiente di conservazione della soluzione: formula, concentrazione di tutti i componenti, data di preparazione, eventuale scadenza, nome di chi ha preparato la soluzione
- le soluzioni standard si possono preparare anche utilizzando fiale acquistate a titolo noto da diluire

Le sostanze che non possono essere considerate standard primari sono dette **standard secondari**: le loro soluzioni preparate per pesata sono a titolo approssimativo e devono essere standardizzate con una soluzione di standard primario. La pesata richiede una bilancia tecnica e per il prelievo di liquidi è sufficiente una pipetta graduata o addirittura un cilindro.

A questo proposito si rammenta che **l'errore commesso nella valutazione dei volumi** varia a seconda dello strumento utilizzato; indicativamente:

- buretta o matraccio tarato: errore 0,1-0,5%
- pipetta tarata o graduata: errore 0,5-1%
- cilindro graduato: errore 1-5%
- becher graduato: errore 5-10%

È evidente che ogni operazione di lettura del volume richiederà lo strumento più adatto. Per esempio se è necessario preparare una soluzione di HCl 1,5 M da utilizzare come reattivo in una metodica analitica e non come reattivo titolante in una volumetria, il prelievo di HCl concentrato potrà essere effettuato con una pipetta o un cilindro e la sua diluizione anche in un becher. La preparazione di HCl 0,1000 M da utilizzare come titolante richiederà l'uso di matracci e burette per la diluizione e la standardizzazione.

Di solito per le analisi strumentali sono necessarie soluzioni standard molto diluite, che non possono essere preparate direttamente per pesata perché si dovrebbero pesare quantità molto piccole, vicine al limite di sensibilità della

bilancia analitica, commettendo errori rilevanti. Durante il processo analitico, in genere, si prepara inizialmente per pesata una soluzione di standard primario a concentrazione elevata, in modo da pesare quantità apprezzabili e quindi ridurre l'errore di pesata. Questa soluzione è detta **soluzione standard concentrata** (SSC), ovvero soluzione madre.

Si procede in seguito a una o più diluizioni, prelevando accuratamente con una buretta precedentemente lavata e normalizzata volumi calcolati di SSC e portando a volume in matraccio tarato. In tal modo si ottiene la **soluzione standard diluita** (SSD).

Infine, si preparano gli **standard di lavoro** (ST), cioè le soluzioni a diversa concentrazione che vengono utilizzate per costruire la retta di lavoro, prelevando accuratamente con una buretta volumi calcolati di SSD e portando a volume in altrettanti matracci tarati. In questo modo si possono preparare soluzioni standard molto diluite senza commettere errori apprezzabili durante la loro preparazione. Ovviamente l'intera procedura va eseguita con la massima precisione e accuratezza, perché costruire una retta di lavoro errata significa compromettere i risultati delle successive analisi.

## 6.2. La calibrazione (o taratura)

Dopo aver preparato il campione di laboratorio è finalmente possibile effettuare l'analisi vera e propria che, pertanto, può essere preceduta da numerose altre fasi del processo analitico; ad esempio la determinazione dell'indice di rifrazione di un olio di oliva è immediata, la determinazione della caffeina nel cioccolato richiede complesse estrazioni e separazioni preliminari.

Dopo l'eventuale determinazione qualitativa, l'analisi del campione procede con la **determinazione quantitativa** dell'analita, che può essere effettuata in due diversi modi:

1. **Metodi analitici assoluti**: la correlazione fra la grandezza misurata e la quantità di analita è univocamente determinata da leggi fisiche (esempio tecniche gravimetriche). A tale categoria appartengono anche le titolazioni, nelle quali la quantità di analita viene determinata sfruttando una reazione chimica con un reagente a concentrazione nota aggiunto fino all'equivalenza stechiometrica con l'analita presente nel campione.
2. **Metodi analitici relativi**: richiedono la costruzione di una curva/retta di calibrazione, che descrive la relazione fra il segnale misurato e la concentrazione dell'analita. A questa categoria appartiene la maggior parte dei metodi analitici strumentali. La curva/retta di calibrazione si ricava attraverso la misura di standard chimici (campioni a concentrazione nota di analita) e permette di tradurre il segnale fornito dall'apparecchio di misura in un valore di concentrazione.

Il segnale misurato in un metodo strumentale può avere varia natura, e talvolta è possibile scegliere fra diverse possibilità: ad esempio in un'analisi cromatografica si possono utilizzare sia le altezze che le aree dei picchi cromatografici. Solitamente in un'analisi strumentale non si utilizza direttamente il segnale misurato, ma si corregge il segnale sottraendogli il segnale del "bianco", misurato in genere prima di tutti gli altri campioni, in modo da tenere conto di tutti i fattori (chimici, strumentali, ecc.) che influenzano la risposta in modo indipendente dalla concentrazione dell'analita, cioè dell'effetto della matrice. Il termine "bianco" è una italianizzazione del termine inglese "blank"

Il **bianco** dovrebbe essere idealmente identico al campione in analisi, ma non contenere l'analita, ed essere misurato utilizzando esattamente la stessa procedura impiegata per i campioni. In pratica, in particolare per campioni complessi, non è possibile ottenere un vero e proprio bianco poiché non è possibile simulare esattamente la composizione del campione. In tal caso si usano spesso:

- **bianco del solvente**: contiene semplicemente lo stesso solvente nel quale è disciolto il campione;
- **bianco dei reagenti**: contiene il solvente più tutti i reagenti utilizzati nella preparazione del campione o necessari alla produzione del segnale che viene misurato.

La calibrazione o taratura consiste nella realizzazione sperimentale, mediante standard a concentrazione nota, della **retta di taratura o calibrazione**, che permetterà di tradurre il segnale prodotto dall'apparecchio di misura nel valore chimico cercato, di solito la concentrazione dell'analita. La costruzione della retta di lavoro può essere fatta con diversi **metodi di calibrazione**:

- calibrazione esterna o standard esterno SE;
- calibrazione interna o standard interno SI;
- aggiunte multiple.

### 6.2.1 Calibrazione con standard esterni (SE)

Nella calibrazione con standard esterno (SE) la retta di calibrazione (o di taratura o di lavoro) viene ricavata dall'analisi di una serie di standard esterni a concentrazione nota di analita preparati separatamente dal campione. La



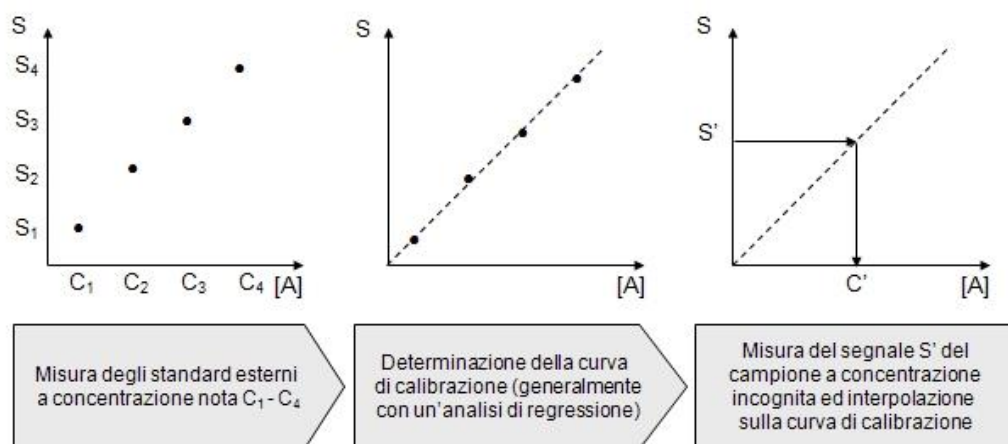
concentrazione dei campioni incogniti, trattati nello stesso modo degli standard esterni, viene poi determinata per interpolazione del segnale misurato sulla retta di calibrazione. La calibrazione con standard esterno è la procedura di calibrazione più comunemente usata se si ha a disposizione uno standard con caratteristiche adeguate (stabilità, purezza, ecc.) poiché ha le seguenti caratteristiche:

- semplice;
- rapida (una singola curva di calibrazione può essere utilizzata per tutte le analisi);
- richiede un piccolo numero di standard.

Nella **costruzione della retta di lavoro** occorre considerare i seguenti aspetti:

- preparare un minimo di 3 standard, meglio anche 5 o 6, a concentrazioni non troppo diverse, oltre al bianco quando previsto, cercando di coprire tutto il campo di concentrazione indicato dalla metodica analitica, dal valore minimo del limite di dosabilità LdD al valore massimo del limite di linearità
- calcolare l'equazione della retta di regressione (minimi quadrati) tramite la pendenza e l'intercetta. Calcolare inoltre il coefficiente di correlazione  $R^2$ , che dovrebbe essere molto vicino ad 1 se il modello di regressione adottato è corretto
- se l'intercetta della retta è nettamente diversa da 0 occorre valutare se ciò è possibile, altrimenti rivedere la procedura analitica. Se è vicina a 0 è meglio non forzare il passaggio della retta per l'origine degli assi (0,0)
- prima di tracciare la retta scartare gli eventuali punti aberranti mediante opportuni test statistici (ad esempio Dixon). Tracciare in seguito la retta di taratura
- i valori della pendenza della retta (sensibilità), del segnale del bianco e del segnale di un campione di controllo preparato per tale scopo, dovrebbero rimanere costanti. Il loro monitoraggio permette di verificare l'efficienza della procedura analitica, dell'apparecchio di misura, degli operatori e del laboratorio in generale
- la retta di lavoro può essere utilizzata fino all'esaurimento dei reattivi utilizzati per costruirla e per analizzare i campioni. Per sicurezza con nuovi reattivi è possibile verificare la correttezza della retta, senza costruirla una nuova, utilizzando solo 1 o 2 ulteriori standard

Questo metodo presuppone però che **la risposta all'analita nello standard e nel campione sia identica**: la forma chimica dell'analita negli standard deve essere identica a quella dell'analita presente nel campione e non si devono avere interferenze da parte della matrice del campione. Questa condizione può essere difficile da soddisfare, soprattutto per campioni a composizione complessa (leghe metalliche, materiali biologici, ecc.)



### 6.2.2 Calibrazione con standard interno (SI)

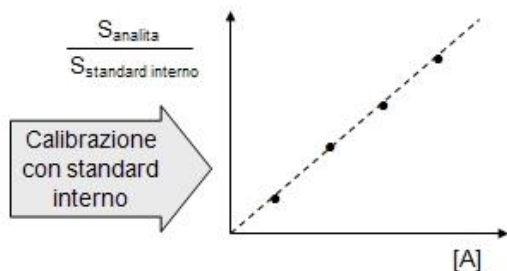
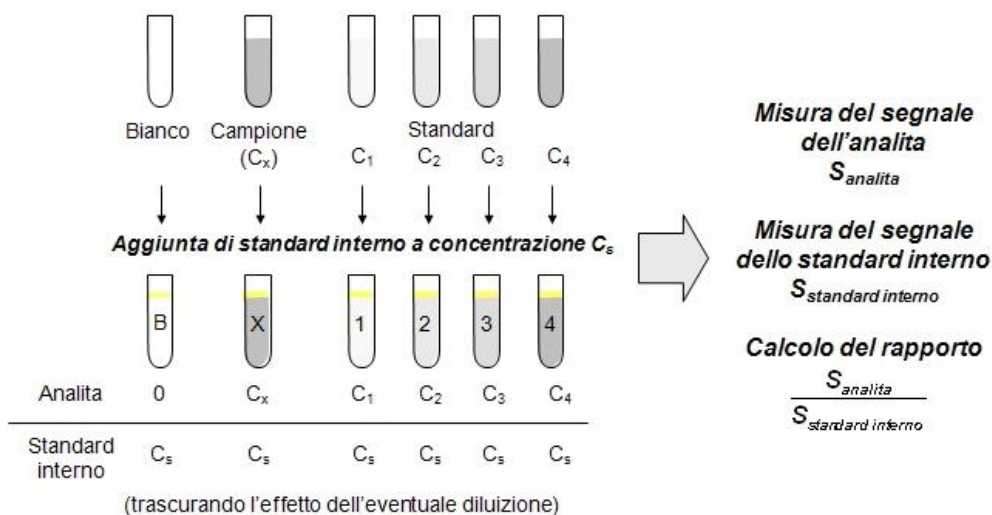
Vi sono casi in cui la matrice del campione non è facilmente riproducibile negli standard, sia perché incognita, sia perché troppo complessa. In altri casi non è possibile ottenere una adeguata riproducibilità delle misure, come nel caso dell'iniezione di standard e campione in un gascromatografo mediante una microsiringa; dato che si iniettano volumi dell'ordine dei microlitri, la riproducibilità dipende dall'efficienza della siringa e dall'abilità dell'operatore. Infine vi sono casi come l'assorbimento atomico e l'emissione atomica in cui la sorgente del segnale analitico, fiamma o plasma, è intrinsecamente instabile e variabile nel tempo.

Per risolvere questi problemi si può ricorrere al metodo dello **standard interno (SI)**. Nella calibrazione con standard interno una quantità nota di una specie di riferimento (standard interno - SI) che può essere determinata

separatamente dall'analita viene aggiunta alla stessa concentrazione prima dell'analisi agli standard, ai campioni ed al bianco. Quindi si effettuano **2 serie di misure**: una che rilevi il segnale dell'analita, l'altra che rilevi il segnale dello SI. Il segnale di risposta, utilizzato per la costruzione della curva di calibrazione, è il rapporto fra il segnale dell'analita e quello della specie di riferimento: in questo modo si eliminano i segnali provenienti dalla matrice.

Lo SI deve avere le seguenti **caratteristiche**:

- deve essere sicuramente assente dal campione
- non deve reagire con l'analita o gli altri componenti del campione
- deve fornire un segnale ben distinto da tutti gli altri segnali



Il metodo della standard interno può compensare diversi tipi di errori a condizione che essi influenzino nello stesso modo sia l'analita che la specie di riferimento, in questo modo si può limitare fortemente l'effetto della matrice. Perché ciò avvenga, la specie di riferimento deve avere caratteristiche chimico-fisiche quanto più possibile simili a quelle dell'analita.

Dato che lo SI viene aggiunto alla stessa concentrazione a tutte le soluzioni misurate, eventuali instabilità del sistema di misura e interferenze della matrice influenzeranno allo stesso modo i due diversi segnali misurati e quindi il loro rapporto rimarrà costante, dando luogo alla consueta retta di calibrazione.

### 6.2.3 Calibrazione con aggiunte multiple

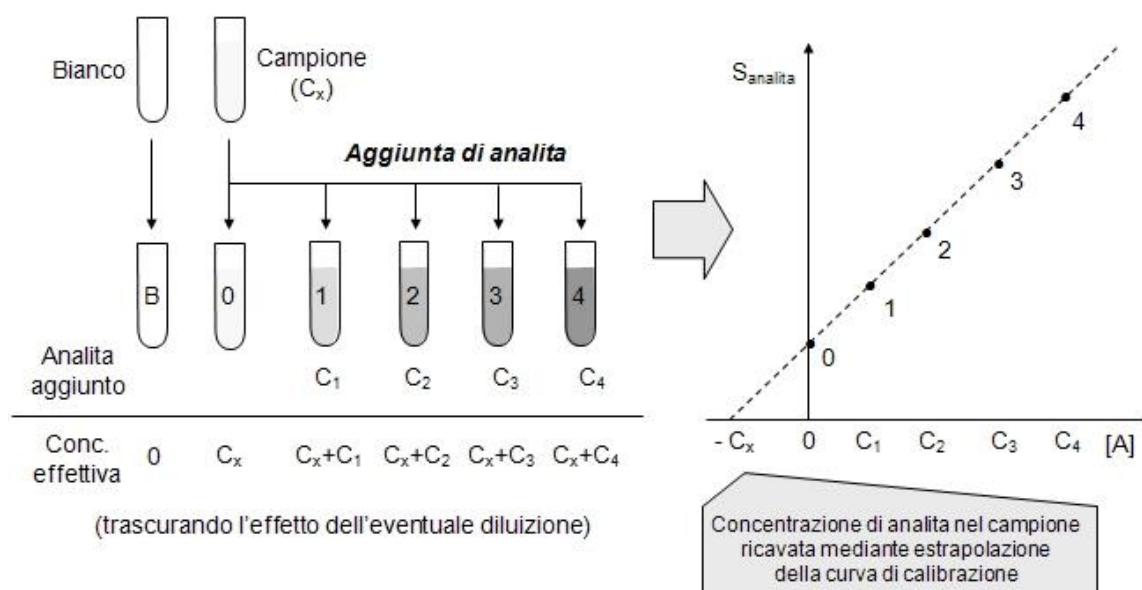
Quando vi sono molte interferenze e non è possibile eliminare l'effetto della matrice riproducendola negli standard, si può ricorrere al metodo delle **aggiunte multiple**. Questo metodo di calibrazione prevede le seguenti fasi:

- si produce la soluzione analitica, a concentrazione incognita, mediante trattamento opportuno del campione
- si produce una soluzione standard a concentrazione nota, che deve essere 10-100 volte più concentrata della soluzione analitica, partendo dall'analita puro più semplice acqua distillata
- si misura il segnale del campione a concentrazione aggiunta C<sub>0</sub> = 0 con l'opportuno strumento di misura
- in altrettanti matracci si aggiungono quantità note e crescenti di soluzione standard concentrata portando infine a volume con la stessa soluzione analitica a concentrazione incognita (e non con acqua!). In questo modo nei matracci vi sarà un'aliquota di soluzione a concentrazione nota (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, ecc.) ed una a concentrazione incognita (C<sub>x</sub>) uguale in tutti; la concentrazione totale per ognuno sarà: (C<sub>1</sub>+C<sub>x</sub>), (C<sub>2</sub>+C<sub>x</sub>), ecc. Utilizzando tale procedura si ha la certezza di avere la stessa matrice sia negli standard che nella soluzione analitica poiché si è portato a volume con la soluzione analitica stessa ed il volume aggiunto di soluzione standard, essendo molto più concentrata, è trascurabile e quindi tale da non alterare la matrice iniziale, ma sufficiente da aumentare il segnale negli ST

- per ogni campione così prodotto si misura il segnale con l'opportuno strumento di misura
- si traccia la retta di taratura col metodo dei minimi quadrati, riportando sugli assi i dati sperimentali ottenuti in un diagramma (segnale  $S$ ,  $C_{aggiunte}$ ), in cui l'origine degli assi avrà  $C_{aggiunte} = C_0 = 0$  che corrisponde al campione iniziale, al quale non è stata fatta alcuna aggiunta

Ovviamente, la retta non partirà dall'origine, in quanto la concentrazione  $C_0 = 0$  (si tratta della concentrazione aggiunta e non quella effettiva) corrisponde in realtà alla soluzione analitica priva di aggiunte e quindi con concentrazione  $C_x$ , per cui l'intercetta dovrà essere significativamente diversa da zero.

Estrapolando la retta di taratura ottenuta fino all'intersezione con l'asse orizzontale si potrà facilmente individuare la concentrazione incognita  $C_x$ . Il tratto posto tra l'origine degli assi e l'intersezione con la retta estrapolata corrisponde infatti alla concentrazione incognita  $C_x$ . Utilizzando questa tecnica è possibile analizzare campioni complessi con una matrice difficilmente riproducibile negli standard, che produrrebbero risultati imprecisi utilizzando il metodo della retta di lavoro.



### 6.3 Caratteristiche generali di un metodo analitico

Le prestazioni di un metodo analitico possono essere definite attraverso una serie di grandezze:

1. Accuratezza
2. Precisione
3. Sensibilità
4. Specificità/selettività
5. Limite di rilevabilità (LOD), limite di quantificazione (LOQ)
6. Intervallo dinamico di linearità
7. Robustezza (Robustness)
8. Solidità (Ruggedness)

La definizione esatta di questi parametri, anche in funzione delle differenti tecniche analitiche utilizzate, è stata stabilita da varie istituzioni (es. IUPAC) nell'ambito delle linee guida generali per la validazione di una metodica analitica. Esistono anche variabili più direttamente connesse all'applicazione pratica del metodo, quali ad esempio la definizione dei costi e dei tempi richiesti per l'analisi o lo studio della stabilità dei reattivi.

#### 6.3.1 Accuratezza

L'accuratezza è definita come la concordanza del risultato ottenuto in un'analisi con il valore accettato come "vero" (valore di riferimento  $\mu$ ). L'accuratezza viene espressa dall'errore relativo (detto anche bias) o l'errore relativo %:

$$E_{rel} = x_i - \mu \quad E_{rel\%} = \frac{x_i - \mu}{\mu} \cdot 100$$

Le caratteristiche di accuratezza e precisione minime richieste per un metodo analitico variano con l'importanza relativa del componente da analizzare. Per componenti in tracce sono tollerate accuratezze e precisioni minori rispetto a quelle richieste per componenti presenti in grandi quantità.

### 6.3.2 Precisione

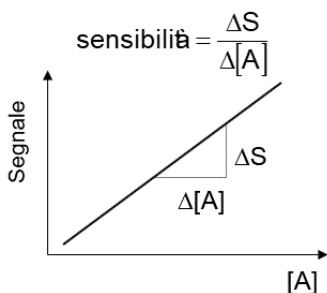
La precisione esprime la riproducibilità dei risultati ottenuti da una serie di misure ripetute dello stesso campione. E' definita in termini di errore assoluto casuale ( $x_i - \bar{x}$ ) dove  $\bar{x}$  è il valore medio della serie di dati ottenuta dalle misure. E' evidente che un'analisi sarà accettabilmente precisa e accurata quanto più i valori di  $\mu$  e di  $\bar{x}$  sono vicini.

In modo operativo, la precisione viene usualmente espressa attraverso la deviazione standard  $\sigma$  o la deviazione standard stimata  $s$ .

La precisione è collegata alla ripetibilità: riproducibilità di una serie di analisi effettuate in un breve periodo di tempo (replicati o repliche).

### 6.3.3 Sensibilità

La sensibilità rappresenta una misura della capacità del metodo analitico di discriminare fra campioni con concentrazioni simili fra di loro.



La sensibilità della calibrazione è la pendenza della retta/curva di calibrazione ed esprime la variazione della risposta per unità di variazione della concentrazione dell'analita. In funzione della forma della curva di calibrazione, un metodo analitico può avere sensibilità della calibrazione costante oppure no all'interno dell'intervallo di concentrazioni nel quale esso è applicabile: è costante nel caso comune della retta.

La minima differenza di concentrazione rilevabile dipende però sia dalla pendenza della curva di calibrazione che dalla precisione della determinazione. La sensibilità di un metodo è quindi definita mediante la sensibilità analitica, cioè il rapporto fra la sensibilità della calibrazione e la deviazione standard del segnale analitico misurato. Siccome quest'ultima solitamente dipende dall'entità del segnale (e quindi dalla concentrazione di analita) la sensibilità analitica è in genere funzione della concentrazione, anche per curve di calibrazione lineari.

### 6.3.4 Specificità e selettività

La **specificità** è la capacità di un metodo analitico di rispondere soltanto all'analita in esame anche in presenza degli altri componenti del campione; pertanto in un metodo specifico il segnale è prodotto solo dall'analita.

Pochi metodi in realtà sono realmente specifici, soprattutto in presenza di altri composti con caratteristiche chimico-fisiche simili a quelle dell'analita (da questo punto di vista le tecniche bioanalitiche, basate su anticorpi od enzimi, danno maggiori garanzie). In generale i metodi analitici mostrano soltanto un certo grado di preferenza, detto **selettività**, per la sostanza che interessa nei confronti delle altre specie presenti.

La selettività di un metodo nei confronti di un determinato interferente è espressa mediante:

$$selettività = \frac{[X]}{[A]}$$

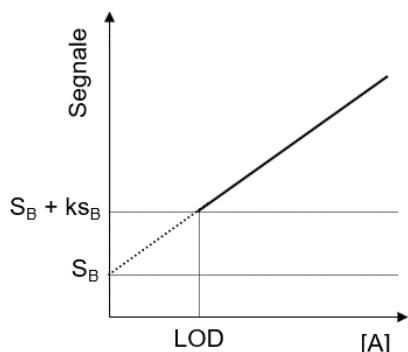
[X]: concentrazione di interferente

[A]: concentrazione di analita

Tanto più la selettività del metodo è elevata, tanto più grandi sono le concentrazioni della specie interferente che possono essere presenti durante l'analisi senza interferire nella determinazione dell'analita.

### 6.3.5 Limite di rivelabilità e limite di quantificazione

Il limite di rivelabilità **LDR (LOD – Limit Of Detection)** di un metodo analitico è definito come la minima massa o concentrazione di analita rivelabile ad un determinato livello di fiducia (ovvero che dà un segnale significativamente diverso dal bianco). In genere in corrispondenza del LOD la precisione del metodo analitico è relativamente bassa e non permette di ottenere dati quantitativi affidabili: il LOD viene quindi utilizzato a fini qualitativi, ad esempio come concentrazione limite  $C_L$  per definire la presenza o l'assenza dell'analita.



Per i metodi che ammettono una curva di calibrazione, il LOD viene definito come la concentrazione di analita che produce un segnale pari al segnale del bianco  $S_B$  più  $k$  volte la sua deviazione standard  $s_B$ :  $LOD = S_B + k \cdot s_B$  Si dimostra che:

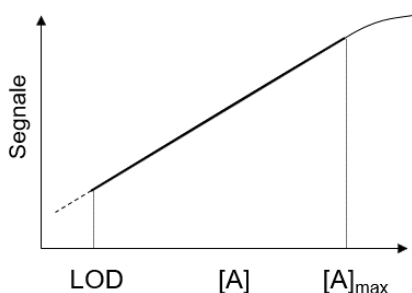
$$LOD = C_L = \frac{k \cdot s_B}{m} \quad C_L = \frac{3 \cdot s_B}{m} \quad \text{dove } m: \text{ sensibilità metodo e } C_L: \text{ concentrazione limite analita (LOD espresso come C).}$$

Il valore di  $k$  dipende dal livello di fiducia prescelto; in genere si assume  $k = 3$ , in cui il livello di fiducia è del 98,3%.

A fini quantitativi si usa il limite di dosabilità LDD o limite di quantificazione **LDQ (LOQ – Limit Of Quantification)**, definito come la concentrazione alla quale l'analita è determinabile con precisione ed accuratezza accettabili. Può essere espresso come il LOD, ma con valori di  $k$  più elevati (esempio  $k = 10$ ). Ciò corrisponde al rapporto segnale/rumore  $S/N$  almeno pari a 10.

### 6.3.6 Intervallo dinamico di linearità

L'intervallo dinamico di linearità rappresenta l'intervallo di concentrazioni dell'analita che può essere determinato con una curva di calibrazione lineare.



Nelle tecniche analitiche vengono preferite le curve di calibrazione lineari, poiché possono essere trattate in modo semplice e la loro costruzione richiede un numero limitato di standards. L'intervallo dinamico di linearità è delimitato dal limite di rivelabilità LOD e dalla concentrazione alla quale diventano rilevanti le deviazioni dalla linearità  $[A]_{max}$  (dovute a comportamento non ideale del sistema o a limitazioni del rivelatore), diverso per ogni specie chimica. Ogni analita ha il suo intervallo di linearità.

L'ampiezza dell'intervallo dinamico di linearità dipende anche dalla tecnica di rivelazione utilizzata. Se le variazioni della concentrazione dell'analita nei diversi campioni sono relativamente piccole non è comunque necessario un intervallo dinamico di linearità molto ampio.

### 6.3.4 Robustezza (Robustness)

La robustezza di un metodo analitico misura la sua capacità di non essere influenzato da piccole variazioni dei parametri sperimentali nell'intorno dei loro valori ottimali. Un metodo analitico "robusto" fornisce quindi risultati riproducibili anche senza un controllo rigoroso delle condizioni sperimentali. Questo parametro può essere valutato variando deliberatamente le condizioni sperimentali in un ristretto intervallo e verificando se il risultato analitico risulta soggetto, oltre che alle fluttuazioni casuali, anche a variazioni sistematiche legate ai parametri modificati.

### 6.3.5 Solidità (Ruggedness)

La solidità è una valutazione del grado di riproducibilità del metodo analitico, espressa attraverso il rapporto fra la deviazione standard ottenuta da studi di riproducibilità e la deviazione standard ottenuta da studi di ripetibilità. In modo simile alla grandezza precedente, descrive la suscettibilità del metodo alle variazioni incontrollate dei parametri

sperimentali. Per un metodo analitico la deviazione standard ottenuta da studi di riproducibilità dovrebbe essere al massimo 2-3 volte maggiore di quella ottenuta da studi di ripetibilità.

## 7. Controllo di qualità

In un laboratorio chimico si devono ottenere **risultati di qualità**, cioè risultati:

- **accurati**, con minima differenza ( $x_i - \mu$ ) tra il valore  $x_i$  di ogni singola misura della serie di misure effettuate sulle repliche che costituiscono l'intera serie analitica e il valore vero  $\mu$ , il che implica anche un miglioramento dell'esattezza ( $\bar{x} - \mu$ ) ovvero la riduzione dell'errore assoluto compiuto nell'analisi
- **riproducibili**, che possono dare risultati molto simili se ripetuti nel tempo
- **rappresentativi**, che rappresentano in modo adeguato tutto il materiale da analizzare

Si ottengono risultati di qualità quando l'intero **sistema analitico** funziona in modo corretto, in particolare quando:

- lo strumento di misura è in perfetta efficienza
- il procedimento analitico è adeguato allo scopo dell'analisi
- l'analista possiede una adeguata preparazione che lo mette in grado di utilizzare il procedimento analitico e lo strumento, di accorgersi se tutto funziona bene, di valutare i risultati ottenuti in modo critico

Per ottenere questi obiettivi si devono utilizzare gli strumenti del **controllo di qualità**:



Molti laboratori sono **certificati**, cioè hanno conseguito un riconoscimento, normato da leggi, che assegna loro un certificato di qualità e quindi sono obbligati a seguire procedure e norme rigide per mantenere la qualità nel tempo. In ogni caso in tutti i laboratori di analisi, anche in quelli non certificati, è opportuno utilizzare accorgimenti opportuni in grado di garantire la qualità dei risultati prodotti.

Il controllo di qualità comprende la Buona Pratica di Laboratorio e la validazione.

La **Buona Pratica di Laboratorio GLP** (Good Laboratory Practice) è un insieme di regole e di comportamenti che si devono utilizzare per controllare nel tempo il buon funzionamento del laboratorio e la qualità delle analisi effettuate. In alcuni campi, come gli studi tossicologici e farmaceutici, esistono protocolli molto rigidi codificati da enti internazionali ai quali i laboratori di analisi, che lavorano in regime di qualità controllata, devono attenersi in modo assoluto perché i loro risultati siano riconosciuti validi.

La GLP comprende vari fattori quali: sicurezza, ordine, pulizia, organizzazione, documentazione, ecc. e, se rispettata quotidianamente dagli analisti, consente loro di ottenere risultati più precisi e affidabili.

La **validazione** è invece un processo di verifica che controlla se il metodo analitico adottato permette di raggiungere i risultati prefissati; la validazione di una procedura analitica viene utilizzata sia prima del suo primo impiego, sia durante tutta la sua vita, allo scopo di monitorare costantemente le sue prestazioni e le eventuali criticità.

Nella normale attività di un laboratorio, sia certificato sia non certificato, è opportuno controllare e validare periodicamente numerosi fattori.

Nelle **attività di controllo** si devono controllare:

- uno strumento o suoi moduli: dopo l'installazione, dopo una riparazione e comunque a intervalli regolari
- un sistema di gestione dei dati o di controllo delle apparecchiature
- una procedura analitica: prima dell'utilizzo di routine, dopo la modifica di qualche parametro operativo, dopo il cambio dello strumento di misura utilizzato
- un metodo di conservazione e trattamento dei campioni: periodicamente
- un analista: periodicamente
- un sistema analitico (strumento + procedimento + analista): giornalmente o periodicamente

Nelle **attività di validazione** si devono controllare:

- taratura degli strumenti con PS o CRM
- confronti dei risultati ottenuti con altri metodi
- confronti tra laboratori diversi

- valutazione dei fattori che influenzano le misure e i risultati finali
- stima dell'incertezza sui dati ottenuti

### 7.1. Controllo statistico della qualità dei dati (CSQ)

In un laboratorio di analisi in genere si effettuano molte **analisi di routine**, cioè lo stesso tipo di analisi ripetuta su campioni diversi in tempi successivi, più o meno ravvicinati. Ad esempio l'acqua potabile di una città è controllata giornalmente nei suoi parametri essenziali, stabiliti per legge, tramite l'analisi a campione dei numerosi pozzi di alimentazione della rete idrica urbana. E' importante accertarsi che le inevitabili fluttuazioni dei dati siano frutto di errori casuali e non sistematici o di alterazioni nel tempo del sistema analitico di misura (strumento, metodica, analista, ecc.) e individuare tempestivamente eventuali errori nei dati sperimentali.

A tale scopo si usano le **carte di controllo**, che permettono di valutare graficamente se un processo analitico è o no sotto controllo. Uno dei possibili metodi è la costruzione di carte di controllo col **metodo del campione di controllo (carta di Shewart)**.

Si produce un campione di controllo (CC) mediante uno standard primario o un materiale certificato a concentrazione nota, in quantità sufficiente per 5-6 mesi.

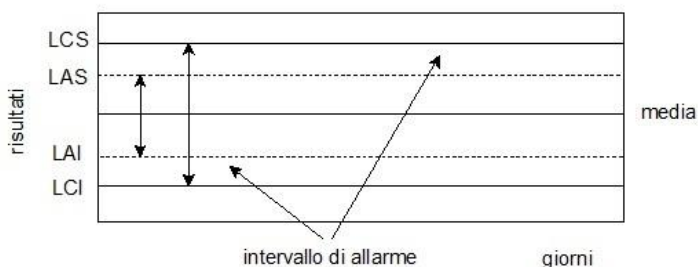
In un **periodo preliminare si costruisce la carta di controllo**. Quindi tale campione è inserito casualmente, senza alcun privilegio, nella serie analitica di routine dei campioni almeno una volta al giorno, per un periodo di almeno 20 giorni. Si misura la concentrazione del campione con il sistema analitico sottoposto a CSQ e si raccolgono i dati per il periodo di osservazione. Quindi si calcola la media dei valori ottenuti  $\bar{x}$ , le deviazioni  $d$  dei dati dal valor medio e la stima della deviazione standard  $s$  della serie:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_1^n d_i^2}{n}} \quad s = \sqrt{\frac{\sum_1^n d_i^2}{n-1}}$$

La deviazione standard  $\sigma$  è la semilarghezza della curva di Gauss relativa all'errore casuale misurata nei punti di flesso ed è riferita all'intera popolazione di dati (serie infinita), pertanto non è calcolabile. In pratica si valuta la sua stima  $s$ , riferita al campione, cioè a una serie limitata di  $n$  dati.

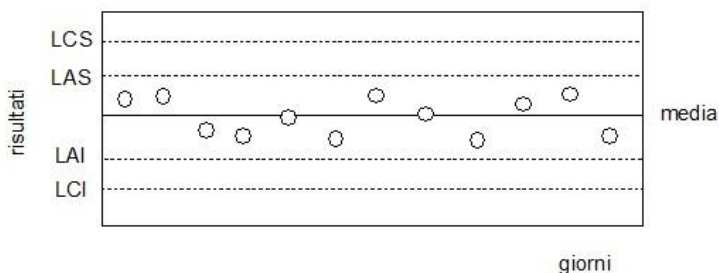
Si riportano in grafico i valori:

- sull'asse orizzontale si riportano i giorni di analisi del CC
- sull'asse verticale il valore calcolato per il valore medio  $\bar{x}$ , ponendolo circa al centro dell'asse verticale e indicandolo con una linea orizzontale
- si tracciano quindi ulteriori quattro linee orizzontali in corrispondenza dei valori  $\bar{x} \pm 2s$  (intervallo LAS - LAI) e  $\bar{x} \pm 3s$  (intervallo LCS - LCI) delimitando l'**intervallo di controllo**, compreso tra il limite di controllo superiore LCS e inferiore LCI e l'**intervallo di allarme**, rappresentato dalle aree tra LCS - LAS e LAI - LCI.

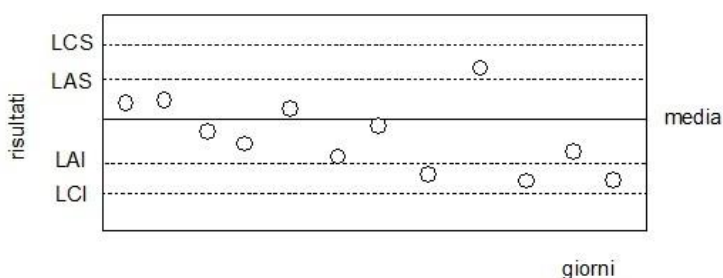


Dopo queste operazioni la carta è ancora bianca. Costruita la carta di controllo si procede al **periodo di controllo statistico di qualità (CSC)** vero e proprio, inserendo nuovamente almeno una volta al giorno in ogni serie analitica di routine il campione di controllo CC e misurando la risposta del sistema analitico. Anche in questo caso l'inserimento deve essere casuale. Si raccolgono i dati e, per ogni giorno, si segnano sulla carta i valori ottenuti.





La dispersione dei dati deve essere provocata solo da errori casuali e compresi entro l'intervallo di controllo, ovvero  $\bar{x} \pm 2s$ . Se ciò si verifica significa che il sistema analitico funziona bene e fornisce risultati di qualità. Se alcune letture del CC si collocano invece all'interno dell'intervallo di allarme, ovvero all'interno di  $\bar{x} \pm 3s$  si ha una perdita di precisione mostrata dalla carta di controllo e quindi è necessario intervenire per individuare la causa che provoca la perdita di qualità dei dati ottenuti.



Se la carta evidenzia invece una deriva dei dati e un significativo aumento della loro dispersione, ciò è indice di una diminuzione contemporanea di accuratezza e precisione. Dati che si collocano al di fuori dell'intervallo  $\bar{x} \pm 3s$  sono aberranti, in quanto non coerenti con una distribuzione di Gauss dell'errore casuale.

I problemi evidenziati dalle carte di controllo possono derivare da diversi fattori: il più comune è la perdita di efficienza da parte degli strumenti di misura utilizzati. Ad esempio la misura del pH mediante un elettrodo a vetro richiede un controllo periodico mediante opportuni tamponi a causa di modifiche nel tempo delle proprietà di scambio ionico della membrana di vetro dell'elettrodo.

E' quindi indispensabile una **periodica manutenzione delle apparecchiature**, ricordando che:

- **taratura**: permette di definire le caratteristiche metrologiche dello strumento. Si effettua mediante confronto con misure di riferimento ottenute mediante uno strumento campione o specifici RM
- **calibrazione**: operazione in cui mediante PS o CRM si stabilisce una relazione tra il valore di una grandezza (ad esempio la concentrazione) di una serie di campioni di riferimento (standard) e i relativi segnali, che si traduce di solito nella costruzione di un grafico di correlazione (retta di lavoro). Dal grafico costruito sperimentalmente si risale, utilizzando il segnale prodotto nell'analisi dei campioni incogniti, alla variabile chimica di interesse, cioè alla loro concentrazione incognita

La tipologia e la tempistica dei controlli sugli apparecchi è stabilita sia dai costruttori sia dai protocolli analitici utilizzati nel laboratorio.

## 8. Confronto tra metodi analitici

Nella seguente tabella sono comparate, in modo del tutto indicativo, alcune caratteristiche generali delle diverse tecniche analitiche, allo scopo di valutare le specifiche dei singoli metodi ed il loro campo di applicazione:



METODO	INTERVALLO mol/litro	PRECISIONE	SELETTIVITÀ	VELOCITÀ	COSTO	UTILIZZI PRINCIPALI
GRAVIMETRIA	$10^{-1} - 10^{-2}$	0,1%	Scarsa Moderata	Lenta	Basso	Inorganica
VOLUMETRIA	$10^{-1} - 10^{-4}$	0,1 - 2%	Scarsa moderata	Moderata	Basso	Inorganica, Organica
POTENZIOMETRIA	$10^{-1} - 10^{-6}$	2%	Buona	Veloce	Basso	Inorganica
ELETTROLISI	$10^{-1} - 10^{-4}$	0,01 - 2%	Moderata	Lenta Moderata	Moderato	Inorganica, Organica
VOLTAMMETRIA	$10^{-3} - 10^{-10}$	2 - 5%	Buona	Moderata	Moderato	Inorganica, Organica
SPETTROFOTOMETRIA	$10^{-3} - 10^{-6}$	2%	Buona Moderata	Veloce Moderata	Basso Moderato	Inorganica, Organica
SPETTROSCOPIA ATOMICA	$10^{-3} - 10^{-9}$	2 - 10%	Buona	Veloce	Moderato Alto	Inorganica, multielemento
CROMATOGRAFIA	$10^{-3} - 10^{-9}$	2 - 5%	Buona	Veloce Moderata	Moderato Alto	Organica, multicompo- nenti