

Il risultato di un'analisi chimica è un'informazione costituita da:

- un numero
- un'incertezza
- un'unità di misura

Conversione del risultato in informazione utile

È necessario fare alcune considerazioni sul metodo analitico utilizzato.

I metodi in chimica analitica possono essere suddivisi in:

ASSOLUTI permettono di ricavare direttamente il dato senza dover eseguire operazioni di calibrazione. Tali metodi comportano una reazione chimica con equilibrio completamente spostato a destra.

I metodi assoluti sono relativamente pochi: metodi gravimetrici, volumetrici, elettrogravimetrici, coulombometrici.

COMPARATIVI che richiedono la **calibrazione** mediante soluzioni standard.

In genere la maggior parte dei metodi strumentali è di tipo comparativo. Viene misurata una proprietà fisica (es. assorbimento o emissione di luce, conducibilità, corrente) o chimica (ossidabilità o riducibilità) che dipende dalla **NATURA** (analisi qualitativa) e dalla **CONCENTRAZIONE** (analisi quantitativa).

I metodi comparativi si basano su una relazione matematica tra il parametro misurato (**RISPOSTA o SEGNALE**) e la **CONCENTRAZIONE** dell'analita.

I metodi per la calibrazione possono essere suddivisi in due gruppi: quelli in cui si usano **standard esterni** e quelli in cui gli standard vengono addizionati ad ogni campione, da cui il nome **standard aggiunti**

Gli **standard esterni** vengono analizzati separatamente dal campione.

Una serie di standard di questo tipo è costituita da unità che contengono quantità note e differenti di analita.

Gli standard esterni vengono utilizzati per costruire le curve di calibrazione o di standardizzazione che si ottengono riportando in grafico la grandezza misurata (segnale strumentale) per una serie di soluzioni di standard a concentrazione nota.

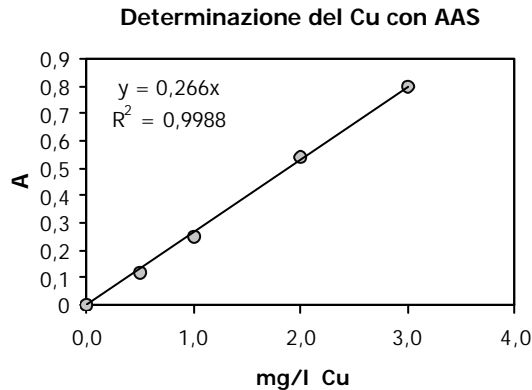
Il metodo della curva di calibrazione con standard esterni può essere utilizzato quando:

- * i componenti della matrice del campione, inclusi tutti i reagenti necessari per la preparazione del campione, non causano interferenza,
- * si conosce la composizione della matrice; in questo caso si possono preparare le soluzioni standard in matrici del tutto simili a quelle da analizzare.

Quando la matrice solida o liquida del campione è incognita o molto complessa è utile ricorrere ai metodi che sfruttano standard aggiunti.

Esempio: determinazione del Cu in un campione mediante assorbimento atomico in fiamma: vengono preparate 4 soluzioni standard con concentrazioni crescenti di Cu (0.5 ppm, 1.0 ppm, 2.0 ppm, 3.0 ppm). Si legge l'assorbanza (**segnale strumentale**) per ogni standard e si ottiene la retta di calibrazione.

Si effettua la misura sul campione e si ottiene ad esempio $A = 0.120$, dall'equazione della retta si ricava perciò la concentrazione di Cu che risulta pari a: $0.120/0.266 = 0.45 \text{ ppm}$ (**Ricorda: ppm = mg/l**)



Gli **standard aggiunti** sono, a loro volta suddivisi in due categorie; entrambe richiedono che una quantità nota di standard (*spike*) venga addizionata ad ognuno dei campioni da analizzare.

1) Standard interno

Caratteristiche dello standard interno:

- dal punto di vista chimico deve essere sufficientemente diverso dall'analita, in modo da poter essere determinato, nel medesimo esperimento, senza interferire nella misura dell'analita;
- deve avere però un comportamento analogo all'analita, in modo che il suo recupero rifletta quello dell'analita stesso

Il metodo dello standard interno viene utilizzato prevalentemente in cromatografia.

Innanzitutto viene effettuata una curva di calibrazione su soluzioni a contenuto noto di analita a cui viene aggiunta la stessa quantità di standard interno.

Si costruisce il grafico riportando in ascissa la concentrazione di analita e in ordinata il rapporto tra il segnale misurato per l'analita rispetto a quello dello standard interno (ad esempio nel caso della cromatografia si fa il rapporto tra le aree dei picchi).

Quindi si aggiunge la stessa quantità di standard interno al campione e si effettua la misura.

Dal rapporto segnale_{analita nel campione} / segnale_{std interno}, tramite l'equazione della curva di calibrazione, si determina la concentrazione della specie in esame nel campione stesso.

2) Metodo delle aggiunte standard

Il campione viene suddiviso in più aliquote dello stesso volume (almeno 3).

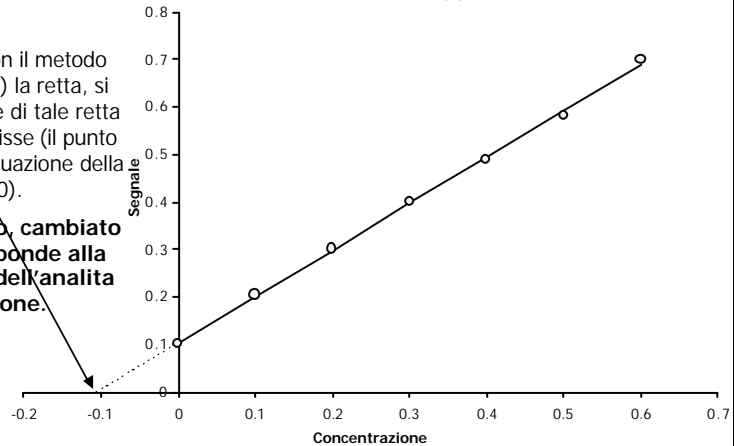
Un'aliquota viene lasciata inalterata, agli altri sub-campioni si aggiungono quantità crescenti dell'analita, aggiungendo piccoli volumi di una soluzione standard della specie in esame a concentrazione nota e portando a volume in recipiente tarato.

Si effettua la misura su ciascuna soluzione e si costruisce il grafico:

risposta strumentale vs concentrazione aggiunta.

Una volta ottenuta (graficamente o con il metodo dei minimi quadrati) la retta, si valuta l'intersezione di tale retta con l'asse delle ascisse (il punto che si ricava dall'equazione della retta ponendo $y = 0$).

Il valore ottenuto, cambiato di segno corrisponde alla concentrazione dell'analita nel campione.



Metodo delle aggiunte standard: Vantaggi e Svantaggi

- ☺ Permette di effettuare l'analisi quantitativa per analiti in matrici complesse o incognite.
- ☺ Si può applicare in tutte le tecniche analitiche strumentali sia spettrofotometriche che elettrochimiche o cromatografiche.
- ☹ È necessario un grafico di calibrazione per ogni campione.
- ☹ È necessario un volume maggiore di campione rispetto alla quantità che si utilizza con la retta di calibrazione.
- ☹ È un metodo per estrapolazione, teoricamente meno preciso rispetto al metodo di interpolazione della retta di calibrazione. In pratica le differenze nella precisione sul risultato finale non sono così significative.

N.B. Prima di effettuare la curva di calibrazione o di applicare il metodo delle aggiunte è necessario analizzare il **BIANCO**

Soluzione contenente tutti i componenti presenti nel campione tranne l'analita d'interesse.

Il bianco ideale è costituito dalla stessa matrice in cui è contenuto l'analita di interesse. In questo modo si può ottenere il segnale relativo alla "concentrazione zero" di analita.

Diagramma di calibrazione

Il diagramma è rappresentabile mediante una retta o mediante una curva?

- Dato che ogni punto è soggetto a errori, ammesso che il diagramma sia lineare, qual è la migliore retta che passa per i punti sperimentali?
- Nel caso di grafici lineari, quali sono gli errori su pendenza e intercetta?
- Quando si usa un grafico per determinare la concentrazione incognita qual è l'errore associato al valore di concentrazione interpolato?
- Qual è il limite di rilevabilità offerto dal metodo analitico?

Per rispondere a questi quesiti è indispensabile:

- ❖ Analizzare il bianco.
- ❖ Scegliere gli standard in modo che la concentrazione incognita cada nell'intervallo di concentrazione degli standard utilizzati (**interpolare non estrapolare**).
- ❖ Riportare il segnale sulla scala Y in quanto molti metodi assumono implicitamente che gli errori siano commessi sull'asse Y e non sull'asse X.

Tipicamente i grafici dose/risposta approssimano una linea retta, come è auspicabile. Comunque, a causa degli errori associati al processo di misurazione, non tutti i dati si trovano esattamente su una retta.

È necessario trovare la retta "migliore" che interpola i punti sperimentali attraverso le *analisi di regressione*.

Assumendo che il grafico sia una retta:

$$y = bx + a$$

Ogni punto usato per costruire il grafico è definito da una coppia di coordinate (x_i, y_i) .

La coppia (x_i, y_i) normalmente è quella relativa al bianco.

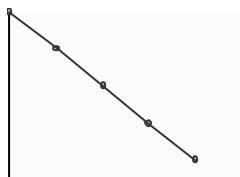
La media dei valori di x (\bar{x}) e la media dei valori di y (\bar{y}) è definito come **CENTROIDE** di tutti i punti della retta.

... ma il diagramma di calibrazione è proprio una retta?

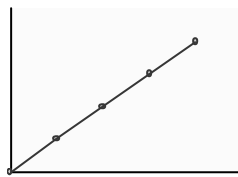
Uno dei modi più usati per verificarlo è il coefficiente di correlazione lineare r detto anche coefficiente di Pearson.

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\left\{ \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

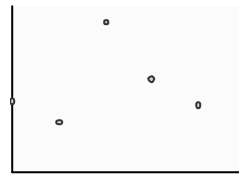
r può assumere valori da -1 a $+1$: un valore di $r = -1$ descrive una correlazione perfettamente negativa, cioè tutti i punti stanno su una retta che ha una pendenza negativa, analogamente $r = +1$ indica una perfetta correlazione positiva, cioè i punti sono esattamente su una retta di pendenza positiva. Quando non c'è correlazione tra x e y il valore di r si avvicina a 0.



$r = -1$



$r = +1$

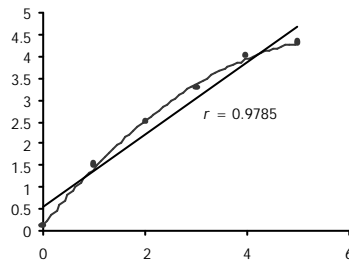


$r = 0$

Bisogna essere molto cauti a fidarsi del solo coefficiente di linearità per valutare la relazione che esiste fra x e y .

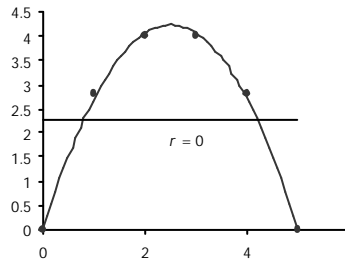
Alti valori di r (> 0.9) non garantiscono che sia una retta la curva più appropriata per un certo grafico.

Spesso è meglio **GUARDARE IL GRAFICO** per accorgersi se i dati stanno o meno su una retta.



Un valore di $r = 0$ non significa che non c'è una correlazione tra y ed x , ma solo che non c'è una relazione lineare.

Anche in tal caso **GUARDANDO IL GRAFICO** ci si accorge che i dati non stanno su una retta, ma sono comunque correlati.



Per trovare la retta "migliore" che interpola i punti sperimentali la procedura di regressione più semplice è la **Regressione lineare attraverso il metodo dei minimi quadrati**

principio: la somma dei quadrati dei residui deve essere minima.

residuo: distanza verticale tra un punto sperimentale (y_i, x_i) e (\hat{y}_i, x_i) , dove \hat{y}_i è il valore di y sulla curva calcolata corrispondente a x_i .

assunzioni: i valori di x_i sono noti con precisione assai superiore a quelli di y_i
i valori di y_i sono indipendenti l'uno dall'altro
la retta migliore passa al punto (\bar{x}, \bar{y}) , detto centroide o centro di gravità (valor medio dei valori di x_i e y_i).

La retta così determinata servirà per stimare la concentrazione dell'analita nel campione in esame mediante interpolazione. Pertanto per poter valutare l'incertezza correlata a tale concentrazione è necessario conoscere gli errori associati alla pendenza e alla intercetta della retta.

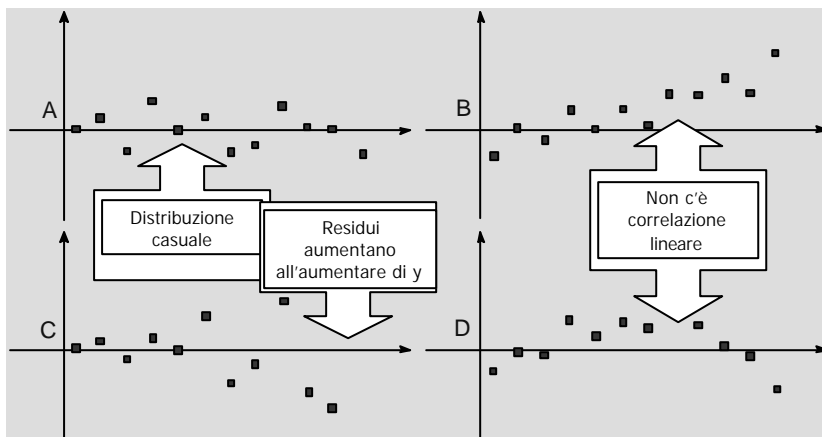
Outliers nelle calibrazioni

Come è possibile identificare la presenza di outliers in una retta di calibrazione?

- 1- verificare che non ci siano errori grossolani dovuti ad esempio ad erronca trascrizione dei dati o al malfunzionamento dello strumento
- 2- nel caso in cui ci siano dati sospetti per i quali non ci sono ovvie o evidenti cause d'errore, si possono studiare i **GRAFICI DEI RESIDUI**

I più semplici grafici dei residui si costruiscono riportando in ordinata i residui ($y_i - y_{\text{calc}}$) e in ascissa i valori di y_{calc} corrispondenti

Il test più semplice per la verifica della linearità è quello che sfrutta l'analisi grafica dei residui della regressione.



L'analisi è più significativa se vengono eseguite più repliche degli standard usati per costruire il diagramma di calibrazione.

SELETTIVITÀ

La **selettività** è la capacità di un metodo analitico di non risentire della presenza di interferenti o di altri componenti diversi dall'analita in esame. Essa può essere valutata analizzando campioni reali e, se possibile, materiali di riferimento (aventi una composizione il più possibile simile a quella dei campioni reali) con il metodo in esame e con un altro metodo indipendente.

Procedura:

analizzare almeno una volta campioni e materiali di riferimento mediante il metodo in esame e mediante un metodo basato su di un principio fisico indipendente: confrontando i risultati, valutare la capacità del metodo in esame di identificare l'analita e la sua abilità nel determinarlo in presenza di interferenti.

Alternativamente, la selettività può essere valutata analizzando, con lo stesso metodo di analisi, campioni reali prima e dopo fortificazione con i sospetti interferenti.

Procedura:

analizzare almeno una volta campioni reali prima e dopo fortificazione con i sospetti interferenti (possibilmente a diversi livelli di concentrazione): valutare se gli interferenti portano a risultati significativamente differenti.

SENSIBILITÀ

La definizione più semplice di sensibilità, accettata dalla IUPAC, è la sensibilità di calibrazione, cioè **la pendenza della curva di calibrazione** in corrispondenza della concentrazione a cui si sta lavorando.

La maggior parte delle curve di calibrazione in chimica è lineare, ed è descritta dall'equazione

$$S = mc + S_b$$

dove S rappresenta il segnale misurato, c la concentrazione dell'analita, S_b il segnale dello strumento per un bianco e m la pendenza della retta di calibrazione.

In questi casi la sensibilità risulta uguale a m , ed è indipendente dalla concentrazione c .

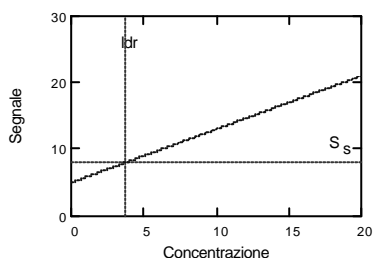
LIMITE DI RIVELABILITÀ E DI QUANTIFICAZIONE

Il **limite di rivelabilità**, o minima quantità rivelabile, **LDR (o LOD)**, è la concentrazione di analita che produce un segnale significativamente diverso da quello del bianco, ovvero la concentrazione corrispondente al minimo segnale significativo, S_s .

S_s è un segnale *vicino* a quello del *bianco* (soluzione in cui l'analita è *virtualmente assente*), ma da esso *significativamente* differente, e quindi assegnabile all'analita sulla base di un criterio specifico.

La definizione del LDR dipenderà dal criterio usato per accertarsi che il segnale sia *significativamente* diverso da quello del bianco.

Il **LDR** espresso in unità di concentrazione si ricava da S_s tramite la curva di calibrazione.

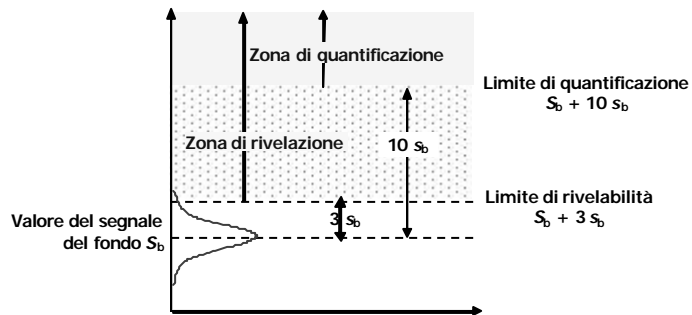


Il **limite di rilevabilità**, in lingua inglese è espresso come **LOD** (*limit of detection*), da alcuni tradotto, in un brutto adattamento, limite di detezione.

Quando un segnale è maggiore del limite di rilevabilità possiamo dire che l'analita è presente nel campione, ma per stabilire il limite oltre il quale è legittimo eseguire *misure quantitative* è necessario definire il **limite di quantificazione**.

Un'analisi si può definire quantitativa solo se il segnale è maggiore di 10 o, secondo alcuni autori, 20 volte la deviazione standard del bianco.

Il **limite di quantificazione**, in inglese è espresso come **LOQ** (*limit of quantification*).



Una prima procedura per la valutazione del LOD e del LOQ è dettagliata qui di seguito:

- analizzare **10 campioni indipendenti di bianco** o, alternativamente, 10 campioni indipendenti di bianco fortificato con la minima concentrazione accettabile (che produce un segnale misurabile, ma diverso da zero, determinata in base a prove preliminari);
- **valutare la deviazione standard** dei campioni analizzati;
- se non è già stata valutata, **stimare la pendenza della curva di calibrazione** analizzando almeno 4÷6 soluzioni standard;
- calcolare il LOD e il LOQ.

ESEMPIO - *Determinazione del limite di rivelabilità per la quantificazione del nitrito nelle acque mediante spettrofotometria VIS (metodo di Griess).*
 Allo scopo viene misurata l'assorbanza a 534 nm di 10 campioni indipendenti del bianco.

I valori di assorbanza sono:

$$A_1 = 0,005; A_2 = 0,004; A_3 = 0,006; A_4 = 0,011; A_5 = 0,008; \\ A_6 = 0,007; A_7 = 0,013; A_8 = 0,012; A_9 = 0,005; A_{10} = 0,007;$$

Pendenza ed intercetta della retta di calibrazione, ottenuta mediante regressione lineare dei minimi quadrati dei risultati dell'analisi di 11 soluzioni standard (intervallo di concentrazione: $7,7 \cdot 10^{-7}$ M – $5,8 \cdot 10^{-5}$ M), sono risultate uguali a $4,7923 \cdot 10^4$ L/mol e 0,0625. Le corrispondenti deviazioni standard sono risultate uguali a 1634 L/mol e 0,0391, rispettivamente. Valutare LDR e LDQ.

1) Calcolo dell'assorbanza media del bianco e della deviazione standard del bianco

$$\bar{A} = \frac{\sum_{i=1}^{10} A_i}{10} = 7,800 \cdot 10^{-3} \quad s_B = \sigma_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{10} (A_i - \bar{A})^2}{9}} = 3,155 \cdot 10^{-3}$$

2) Calcolo del LOD:

$$\boxed{\text{LDR}} = \frac{3 \cdot 3,155 \cdot 10^{-3}}{4,792 \cdot 10^4} = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$$

3) Calcolo del LOQ:

$$\boxed{\text{LOQ}} = \frac{10 \cdot \sigma_B}{b} = \frac{10 \cdot 3,155 \cdot 10^{-3}}{4,792 \cdot 10^4} = 6,58 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$$

RANGE DINAMICO E LINEARE

Il **range** è l'intervallo di concentrazione esplorato nel corso delle misurazioni.

Il **range dinamico** è l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia con la concentrazione: i limiti inferiore e superiore del range dinamico corrispondono, rispettivamente, al limite di rivelabilità ed alla più alta concentrazione alla quale un incremento di concentrazione produce ancora un incremento di segnale.

Il **range lineare** esprime l'intervallo di concentrazione nel quale il segnale varia linearmente con la concentrazione.