Il procedimento analitico e l'espressione del dato analitico

Unità didattica 1 · Teoria ed Esercitazioni di Chimica Analitica · Prof. Michele Del Carlo · Università degli Studi di Teramo

Dispensa di supporto allo studio: integra gli appunti personali, le slide della lezione e il testo di riferimento Skoog, West, Holler, Crouch, Fondamenti di Chimica Analitica (EdiSES). La sequenza degli argomenti segue quella della lezione.

1. Il segnale analitico e la relazione con la concentrazione

Ogni determinazione quantitativa si fonda su un principio semplice ma vincolante: il metodo deve generare un segnale misurabile la cui intensità sia legata alla concentrazione dell'analita da una relazione matematica nota e riproducibile, tipicamente lineare. Questa condizione non è un dettaglio tecnico: è il criterio fondamentale che decide se un metodo è idoneo o meno a misurare la concentrazione di una specie. Alla base della proporzionalità tra segnale e concentrazione deve esistere una relazione stechiometrica (o, per i metodi fisici, una relazione fisica ben definita) tra l'analita e la sorgente che genera il segnale: nella titolazione la stechiometria della reazione, nella spettrofotometria l'assorbimento dei fotoni da parte delle molecole, in potenziometria l'equilibrio elettrochimico all'elettrodo.

Quando questa relazione esiste, è possibile costruire un modello matematico, di norma una retta $y = ax + b$, che descrive la dipendenza del segnale y dalla concentrazione x: è la curva di calibrazione, lo strumento con cui il segnale strumentale viene tradotto in una concentrazione. Prima di discutere come si costruisce e si usa una curva di calibrazione, occorre però affrontare il tema che attraversa tutta la chimica analitica: l'errore.

2. Errori e incertezza nelle analisi chimiche

Le misure implicano sempre errori e incertezze. L'errore è la differenza fra il valore misurato e il valore vero (o valore accettato come tale); l'incertezza è invece il parametro, stimato dallo sperimentatore, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando: in pratica definisce l'intervallo entro il quale il valore vero si colloca con una determinata probabilità. I due concetti non vanno confusi: l'errore, in senso stretto, è conoscibile solo quando si analizza un materiale di riferimento dal valore noto, mentre l'incertezza può e deve essere stimata per ogni risultato. È impossibile eseguire un'analisi priva di errori: ciò che il chimico analitico può fare è minimizzarli, stimarne l'entità con un'accuratezza accettabile e dichiarare l'incertezza associata al risultato. Un dato analitico privo della sua incertezza è, dal punto di vista metrologico, un dato incompleto: non consente né il confronto con un limite di legge né il confronto con altri risultati.

3. Le misure replicate: media e mediana

Per migliorare l'affidabilità del risultato e ottenere informazioni sulla sua variabilità, la procedura analitica viene di norma ripetuta su più porzioni indipendenti dello stesso campione (replicati). I risultati individuali di una serie di repliche sono raramente identici: come stima migliore si adotta un valore centrale, giustificato da due considerazioni. In primo luogo il valore centrale di un insieme è più affidabile di ciascun risultato individuale, perché gli errori casuali tendono a compensarsi; in secondo luogo la dispersione dei dati attorno al valore centrale fornisce la misura sperimentale dell'incertezza casuale. La statistica mostra che la deviazione standard della media diminuisce con la radice quadrata del numero di repliche: raddoppiare le repliche non dimezza l'incertezza, e oltre le 4-5 repliche il guadagno diventa marginale rispetto al costo.

La media aritmetica si ottiene dividendo la somma delle misure replicate per il loro numero. La mediana è il risultato centrale quando i dati sono ordinati in senso crescente o decrescente: per un numero dispari di dati è il valore centrale, per un numero pari è la media della coppia centrale. La mediana ha il pregio della robustezza: un singolo dato grossolanamente errato (outlier) sposta sensibilmente la media, ma lascia pressoché invariata la mediana. Nella pratica, di fronte a un dato sospetto in una piccola serie, lo Skoog raccomanda di applicare un test statistico di scarto (il test Q di Dixon) prima di decidere se eliminarlo.

Esempio guida della lezione: cinque misure ripetute dell'acidità di un olio forniscono 0,65 - 0,66 - 0,62 - 0,64 - 0,62 % di acidi grassi liberi espressi come acido oleico. La media vale 0,638 ≈ 0,64; ordinando i dati (0,62 - 0,62 - 0,64 - 0,65 - 0,66) la mediana è 0,64.

4. La precisione

La precisione descrive la ripetibilità delle misure, cioè la vicinanza tra risultati ottenuti sullo stesso campione nello stesso identico modo. Si determina semplicemente ripetendo la misura ed è quantificata da tre grandezze tra loro legate: la deviazione standard s, la varianza s^2 e la deviazione standard relativa RSD = s/x̄, che espressa in percento prende il nome di coefficiente di variazione (CV). Tutte e tre sono funzione della deviazione dei singoli risultati dalla media, $d_i = x_i - \bar{x}$. Dalla deviazione standard dei singoli risultati si ricava infine la deviazione standard della media s_m, che decresce con la radice quadrata del numero N di repliche.

$$s = \sqrt{[\,\Sigma(x_i - \bar{x})^2 / (N - 1)\,]}$$

$$CV\% = (s / \bar{x}) \times 100 \qquad s_m = s / \sqrt{N}$$

Il denominatore N − 1 (numero di gradi di libertà) tiene conto del fatto che la media stessa è stimata dagli stessi dati. Il coefficiente di variazione, essendo adimensionale, permette di confrontare la precisione di misure espresse in unità diverse o su livelli di concentrazione diversi. Nei metodi ufficiali la precisione è dichiarata di norma come deviazione standard relativa di ripetibilità e di riproducibilità (RSD_r, RSD_R) e come limiti di ripetibilità r e di riproducibilità R ($r = 2{,}8 \cdot s_r$: la differenza massima attesa, con probabilità del 95%, tra due risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità). È importante distinguere la ripetibilità (stesso operatore, stesso strumento, stessa sessione) dalla precisione intermedia (stesso laboratorio, ma giorni, operatori o strumenti diversi) e dalla riproducibilità (laboratori diversi): la dispersione cresce di norma passando dall'una all'altra, e la riproducibilità è quella rilevante nei confronti interlaboratorio.

Esempio numerico · Deviazione standard, varianza e coefficiente di variazione

Si riprendono le cinque misure di acidità dell'olio del paragrafo 3 (x̄ = 0,638%) e si calcolano gli scarti dalla media e i loro quadrati:

x_i (%)	$d_i = x_i - \bar{x}$	d_i^2
0,65	+0,012	0,000144
0,66	+0,022	0,000484
0,62	−0,018	0,000324
0,64	+0,002	0,000004
0,62	−0,018	0,000324
Σ	0,000	0,001280

La somma degli scarti è nulla, utile verifica dei calcoli. Dividendo la somma dei quadrati per i gradi di libertà (N − 1 = 4) si ottengono varianza e deviazione standard:

$$s^2 = 0{,}001280 / 4 = 0{,}000320 \qquad s = \sqrt{0{,}000320} = 0{,}0179\%$$

Il coefficiente di variazione vale CV = 0,0179/0,638 × 100 = 2,8% e la deviazione standard della media s_m = 0,0179/√5 = 0,0080%. Raddoppiando le repliche (N = 10), a parità di s, s_m scenderebbe a 0,0179/√10 = 0,0057%: una riduzione del 29%, non del 50%.

5. L'accuratezza: errore assoluto ed errore relativo

L'accuratezza indica la vicinanza della misura al valore vero o accettato, e si esprime attraverso l'errore. L'errore assoluto è la differenza fra il valore misurato e il valore vero: il suo segno indica se la misura è sovrastimata (segno positivo) o sottostimata (segno negativo). L'errore relativo è l'errore assoluto diviso per il valore vero, e può essere espresso in percento, in parti per mille o in parti per milione a seconda della grandezza del risultato: la sua utilità sta nel permettere il confronto immediato dell'accuratezza di metodi diversi o di misure su livelli diversi.

Riprendendo l'esempio dell'acidità dell'olio: con media osservata 0,638 e valore accettato 0,65, l'errore assoluto vale 0,638 − 0,65 = −0,012 (sottostima) e l'errore relativo −0,012/0,65 × 100 ≈ −1,8%; arrotondando prima la media a 0,64 si otterrebbe −1,5%, perché gli arrotondamenti intermedi alterano il risultato: si arrotonda solo il valore finale. Nella terminologia ISO (ISO 5725) la vicinanza della media al valore di riferimento si chiama più propriamente esattezza (trueness) ed è legata all'errore sistematico, mentre l'accuratezza di un singolo risultato dipende sia dall'esattezza sia dalla precisione. Precisione ed esattezza sono proprietà indipendenti: una serie di misure può essere molto precisa e al tempo stesso poco esatta, se un errore sistematico sposta tutti i risultati nella stessa direzione; viceversa, misure poco precise possono avere una media esatta. Per questo la precisione si valuta con i replicati, mentre l'esattezza richiede un riferimento esterno: un materiale certificato, un metodo indipendente o una prova di recupero.

6. La classificazione degli errori

Nelle analisi sperimentali si distinguono tre tipi di errore. L'errore casuale (o indeterminato) influenza la precisione: dipende da cause che non possono essere eliminate e spesso nemmeno identificate, e produce la fluttuazione dei singoli dati attorno al valore medio. L'errore sistematico (o determinato) influenza l'accuratezza: ha un valore definito e una causa determinabile, e introduce un bias che sposta la misura sempre nello stesso verso, positivo (sovrastima) o negativo (sottostima). L'errore grossolano, infine, si presenta occasionalmente, è tipicamente legato a una manovra errata dell'operatore e determina un dato fortemente discordante dalla media delle osservazioni, cioè un outlier.

7. L'errore sistematico: cause e comportamento

7.1 Le tre sorgenti

Le cause dell'errore sistematico si raggruppano in tre categorie. L'errore strumentale deriva dal comportamento non ideale della strumentazione e della vetreria: una pipetta, un matraccio tarato o una buretta che erogano volumi diversi da quelli nominali, oppure usati in condizioni (di temperatura, ad esempio) diverse da quelle di taratura. Il rimedio è la taratura frequente. L'errore di metodo deriva dal comportamento chimico o fisico non ideale dei reagenti e delle reazioni: reazioni lente che inducono un eccesso di titolante, reazioni non quantitative il cui equilibrio non è completamente spostato verso i prodotti, analiti o reagenti con carattere di acido o base debole la cui speciazione dipende dal pH. È l'errore più insidioso, perché non si elimina cambiando operatore o strumento: richiede la revisione del metodo stesso. L'errore personale, infine, deriva dai limiti e dalle abitudini dell'operatore: l'esempio classico è la stima errata del punto di viraggio di un indicatore in una titolazione. I metodi strumentali sono in generale meno soggetti a questo tipo di errore rispetto ai metodi che richiedono valutazioni visive.

7.2 Errori costanti ed errori proporzionali

Gli errori sistematici possono inoltre essere costanti o proporzionali, e la distinzione ha conseguenze pratiche importanti. Nel caso di un errore costante, l'errore assoluto non dipende dalla grandezza del campione, per cui l'errore relativo cresce al diminuire del campione: un errore di 0,3 ppm pesa il 9,4% su un valore vero di 3,2 ppm, ma il 18,8% su un valore di 1,6 ppm. Ne discende la regola pratica di usare campioni il più possibile grandi. Nel caso di un errore proporzionale, tipicamente dovuto alla presenza di un interferente nella matrice, l'errore assoluto cresce con la grandezza del campione mentre l'errore relativo resta costante: aumentare il campione non serve, occorre eliminare o compensare l'interferenza. In termini di curva di calibrazione, un errore costante (ad esempio un effetto matrice additivo) trasla la retta parallelamente a sé stessa, mentre un errore proporzionale ne modifica la pendenza.

7.3 Come si riconosce e si minimizza

Per minimizzare l'errore sistematico si procede a frequenti calibrazioni e verifiche del metodo, complessivamente indicate come standardizzazione: analisi di campioni standard e di materiali standard di riferimento certificati (SRM), che consentono di misurare direttamente il bias; determinazione del bianco, che rivela contaminazioni dei reagenti e contributi di fondo al segnale; costruzione di matrici bianche fortificate (calibranti) per riprodurre nella calibrazione le condizioni reali del campione. A queste strategie si aggiungono il confronto con un metodo indipendente e la variazione sistematica della quantità di campione, che permette di distinguere gli errori costanti da quelli proporzionali.

8. L'errore casuale e la curva normale

Tutte le misure contengono errori casuali, che dipendono da cause non eliminabili e spesso non identificabili; la loro somma provoca la fluttuazione dei dati attorno alla media. Il comportamento statistico degli errori casuali si comprende con un modello semplice: si immagini che l'errore complessivo di una misura risulti dalla combinazione di quattro piccole incertezze elementari di uguale entità U, ciascuna delle quali può presentarsi con segno positivo o negativo con uguale probabilità. Le combinazioni possibili producono errori totali di +4U, +2U, 0, −2U e −4U con frequenze relative 1, 4, 6, 4, 1: già con quattro sorgenti l'esito più probabile è l'errore nullo, e gli errori estremi sono rari. Aumentando il numero di incertezze elementari (dieci, cento, mille…) la distribuzione delle frequenze tende a una curva continua a campana: la gaussiana, detta curva normale dell'errore. È il contenuto del teorema del limite centrale, e spiega perché la distribuzione normale descriva così bene i dati sperimentali reali: l'errore di una misura analitica è sempre la somma di moltissimi piccoli contributi indipendenti.

Dalla curva normale discendono le proprietà quantitative usate in tutta la statistica analitica: circa il 68% delle osservazioni cade entro una deviazione standard dalla media, circa il 95% entro due (95,4%; esattamente il 95% entro 1,96 deviazioni standard), il 99,7% entro tre. Su queste percentuali si costruiscono i limiti di confidenza del risultato e i limiti delle carte di controllo.

Esempio numerico · Intervallo di confidenza della media

Le percentuali della curva normale valgono quando la deviazione standard della popolazione (σ) è nota. Con pochi replicati s è solo una stima, e l'intervallo di confidenza della media si calcola con il t di Student, che dipende dai gradi di libertà N − 1 e dal livello di confidenza scelto:

$$IC = \bar{x} \pm t \cdot s / \sqrt{N}$$

Per l'acidità dell'olio ($\bar{x}$ = 0,638%, s = 0,0179%, N = 5) il valore di t al 95% con 4 gradi di libertà è 2,78: $IC_{95\%}$ = 0,638 ± 2,78 × 0,0179/√5 = 0,638 ± 0,022%. Con il 95% di confidenza la media vera è compresa tra 0,616% e 0,660%: il valore accettato 0,65% cade dentro l'intervallo, per cui lo scarto di −0,012 calcolato al paragrafo 5 non è statisticamente significativo.

9. La stima dell'incertezza: l'equazione di Horwitz

Quando non si dispone di uno studio completo di validazione, l'incertezza di una misura può essere stimata con un metodo empirico basato sull'equazione di Horwitz, che descrive come la deviazione standard relativa della riproducibilità (ricavata da prove interlaboratorio) cresca al diminuire della concentrazione dell'analita: in forma approssimata $RSD\% = 2^{(1 - 0{,}5 \log C)}$, con C espressa come frazione in massa. In pratica la RSD interlaboratorio attesa raddoppia ogni volta che la concentrazione diminuisce di due ordini di grandezza: 2% per una sostanza pura (C = 1), 4% per un analita all'1%, 16% a livello di ppm, oltre il 30% a livello di ppb. Al di sotto di circa 120 ppb ($C < 1{,}2\times10^{-7}$) l'equazione sovrastima la dispersione osservata e si adotta, secondo la modifica proposta da Thompson, un valore costante di circa il 22%. Il rapporto tra la RSD osservata e quella prevista da Horwitz (HorRat) è usato dagli organismi di controllo come criterio di accettabilità della precisione di un metodo: sono considerati accettabili valori compresi tra 0,5 e 2.

Esempio numerico · Equazione di Horwitz

Per un contaminante presente a 10 mg/kg la frazione in massa è $C = 10 \times 10^{-6} = 10^{-5}$, quindi log C = −5:

$$RSD_R\% = 2^{(1 - 0{,}5 \times (-5))} = 2^{3{,}5} = 11{,}3\%$$

Se in una prova interlaboratorio sullo stesso analita si osserva RSD_R = 15%, HorRat = 15/11,3 = 1,3: precisione accettabile. Per l'acidità dell'olio (0,64 g/100 g, cioè C = 0,0064 e log C = −2,19) la RSD_R prevista è $2^{2,10}$ ≈ 4,3%.

10. Incertezza di misura e confronto con i limiti di legge

Quando il risultato analitico è prossimo a un limite massimo di residui (LMR), non basta confrontare il valore medio con il limite: bisogna considerare l'incertezza di misura, stimata e dichiarata dal laboratorio, per evitare di dichiarare non conforme un campione solo per differenze che rientrano nel margine analitico. I casi sono tre. Se anche l'estremo superiore dell'intervallo di incertezza (X + U) non supera l'LMR, il campione è conforme senza ambiguità. Se anche l'estremo inferiore (X − U) supera il limite, il campione è non conforme: il superamento è dimostrato oltre il ragionevole dubbio analitico. Se infine il limite cade all'interno dell'intervallo X ± U (X − U ≤ LMR < X + U), la situazione non è decidibile con sufficiente confidenza: a seconda del contesto si richiede la ripetizione dell'analisi o un campione di conferma, oppure, nei controlli ufficiali, non si dichiara la non conformità, poiché il superamento non può essere dimostrato con sufficiente certezza legale; in questo ambito, quindi, un campione con X − U ≤ LMR viene accettato. L'incertezza usata in questi confronti è di norma l'incertezza espansa U = k·u con fattore di copertura k = 2, corrispondente a un livello di confidenza di circa il 95%.

Esempio numerico · Confronto con un limite di legge

Per un residuo con LMR = 0,50 mg/kg il laboratorio ha stimato un'incertezza tipo composta u = 0,05 mg/kg, da cui U = 2 × 0,05 = 0,10 mg/kg. Tre campioni danno:

Risultato X (mg/kg)	Intervallo X ± U	Esito
0,38	0,28 - 0,48	conforme: X + U ≤ LMR
0,55	0,45 - 0,65	non decidibile: la non conformità non si dichiara
0,66	0,56 - 0,76	non conforme: X − U > LMR

Il secondo campione supera il limite come valore puntuale, ma il superamento non è dimostrato, perché X − U = 0,45 mg/kg è inferiore all'LMR.

11. Standardizzazione e calibrazione

La calibrazione permette di conoscere la relazione tra la risposta analitica e la concentrazione di analita. Per stabilirla si utilizzano standard chimici, preparati da sostanze pure per pesata e diluizione oppure standardizzati contro standard primari. Alcuni metodi si accontentano di una comparazione visiva diretta con una scala di riferimento (la cartina indicatrice universale per il pH, i test immunocromatografici come il test di gravidanza), ma la quantificazione vera e propria richiede una curva di calibrazione.

11.1 La curva di calibrazione esterna

La procedura è la seguente: si prepara una serie di soluzioni standard (soluto più solvente) a concentrazioni note e crescenti; si misura la risposta di ciascuna; si interpolano i punti con la regressione lineare ottenendo l'equazione y = ax + b e il coefficiente di correlazione r. Per l'uso quantitativo la relazione si inverte: x = (y − b)/a. Alcune buone pratiche, raccomandate dallo Skoog, meritano attenzione: gli standard vanno preparati per pesata e diluizione indipendenti (le diluizioni seriali propagano gli errori); i livelli devono coprire l'intervallo di concentrazione atteso nei campioni, che vanno interpolati e mai estrapolati; la qualità della retta si giudica con l'esame dei residui e non con il solo coefficiente di correlazione, perché un valore di r (o di r^2) prossimo a 1 non dimostra, da solo, la linearità; per la massima affidabilità occorrono almeno 4-6 livelli oltre al bianco.

Alla risposta del campione va sottratta la risposta del bianco, cioè di una soluzione identica al campione ma priva di analita: il bianco corregge i contributi di solvente e reagenti al segnale. Le principali fonti di errore sistematico nella calibrazione esterna sono gli errori di pesata e di misura dei volumi, l'instabilità chimica o fisica dell'analita nelle soluzioni standard, un numero insufficiente di standard con linearità solo apparente, e l'estensione della retta a un intervallo di concentrazione non più lineare.

Esempio numerico · Retta di calibrazione e concentrazione del campione

Sei soluzioni standard, bianco compreso, misurate in spettrofotometria danno:

C (mg/L)	0,00	1,00	2,00	4,00	6,00	8,00
Assorbanza	0,002	0,127	0,248	0,503	0,742	0,996

Con il metodo dei minimi quadrati ($\bar{x}$ = 3,50 mg/L; $\bar{y}$ = 0,4363; $S_{xx} = \Sigma(x_i - \bar{x})^2$ = 47,50; $S_{xy} = \Sigma(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$ = 5,892) si ottengono pendenza, intercetta e coefficiente di correlazione:

$$a = S_{xy} / S_{xx} = 0{,}1240\ L/mg \qquad b = \bar{y} - a\cdot\bar{x} = 0{,}0022 \qquad r = 0{,}99997$$

Un campione preparato e misurato nelle stesse condizioni dà A = 0,412, da cui x = (0,412 − 0,0022)/0,1240 = 3,30 mg/L, valore interno all'intervallo di calibrazione. I residui (tra −0,0044 e +0,0046) sono piccoli e privi di andamento sistematico, a conferma della linearità.

La calibrazione esterna è facile, veloce ed economica, ma ha limiti precisi: non tiene conto della complessità del campione reale, soffre dell'effetto matrice e richiede di conoscere l'efficienza (recupero) dell'eventuale tecnica di estrazione. Quando la matrice pesa, si ricorre alle strategie descritte nei paragrafi successivi.

11.2 Le figure di merito del metodo

Dalla curva di calibrazione discendono le figure di merito che caratterizzano un metodo. La sensibilità è la pendenza a della curva: esprime la variazione di segnale per unità di concentrazione, cioè la capacità di discriminare tra concentrazioni vicine. La sensibilità analitica è il rapporto tra la pendenza e la deviazione standard del segnale a una data concentrazione: tiene conto anche del rumore, ed è quindi più rappresentativa della reale capacità discriminante.

Il limite di rilevabilità (LOD) è la più piccola concentrazione (o quantità) rilevabile, cioè distinguibile dal bianco con un certo livello di fiducia: LOD = $K\cdot S_b/m$, dove S_b è la deviazione standard del bianco, m la pendenza della curva e K vale 2 o 3 (con K = 3, se la distribuzione del bianco è normale e la sua deviazione standard è ben stimata, il rischio di dichiarare presente un analita assente è di circa lo 0,1%; con pochi replicati del bianco il rischio è maggiore). Il limite di quantificazione (LOQ) è la più piccola quantità quantificabile con fiducia superiore: stessa formula con K = 10 (talvolta 5); con K = 10 la precisione relativa attesa al LOQ è dell'ordine del 10%. Tra LOD e LOQ l'analita si

dichiara rilevato ma non quantificabile.

Esempio numerico · Limite di rilevabilità e di quantificazione

Dieci misure del bianco del metodo dell'esempio precedente danno una deviazione standard S_b = 0,0020; la pendenza della retta è m = 0,1240 L/mg:

$$LOD = 3 \times 0{,}0020 / 0{,}1240 = 0{,}048\ mg/L \qquad LOQ = 10 \times 0{,}0020 / 0{,}1240 = 0{,}16\ mg/L$$

Un campione che desse 0,10 mg/L andrebbe dichiarato «rilevato, non quantificabile»; il primo standard della retta (1,00 mg/L) è ben al di sopra del LOQ.

L'intervallo dinamico lineare è l'intervallo di concentrazione entro cui vale la relazione lineare; l'intervallo utile per l'analisi quantitativa va dal limite di quantificazione al limite di linearità (LOL), cioè alla concentrazione alla quale la curva devia dalla linearità (valutata con l'esame dei residui). L'intervallo dinamico, più ampio, è l'intervallo in cui si ha comunque una variazione del segnale con la concentrazione, indipendentemente dalla forma della relazione.

11.3 Le carte di controllo

La stabilità nel tempo del sistema di misura si sorveglia con le carte di controllo: diagrammi che riportano i risultati periodici di un campione di controllo rispetto a tre valori di riferimento: il valore accettato come vero, il limite di controllo superiore e il limite di controllo inferiore (posti di norma a ±3 deviazioni standard, con limiti di avvertimento a ±2). Finché i punti fluttuano casualmente entro i limiti, il metodo è sotto controllo statistico; un punto fuori dai limiti, o una deriva sistematica dei punti, segnala che qualcosa è cambiato (reagenti, strumento, operatore) e impone di sospendere le analisi e individuare la causa.

11.4 La curva di calibrazione in matrice

Quando l'effetto matrice è rilevante si costruisce la curva di calibrazione in matrice (matrix-matched): gli standard si preparano aggiungendo l'analita a una matrice bianca (una matrice reale priva di analita), si applica l'intero metodo analitico e si interpolano i punti come di consueto. Il vantaggio è duplice: la curva incorpora l'effetto matrice medio e, se l'analita viene aggiunto alla matrice bianca prima dell'estrazione, tiene automaticamente conto anche del recupero, che non deve più essere determinato separatamente (aggiungendolo invece all'estratto finale si compensa il solo effetto matrice sulla misura). Il limite è che la matrice bianca deve essere davvero rappresentativa: l'effetto matrice può variare grandemente da campione a campione, e in tal caso nemmeno la calibrazione in matrice è sufficiente.

11.5 Il metodo dell'aggiunta standard

Il metodo dell'aggiunta standard affronta il caso in cui ogni campione fa storia a sé. Il campione viene diviso in tante aliquote quante sono le aggiunte previste, più una: un'aliquota resta nel suo stato naturale, alle altre si aggiungono quantità note e crescenti di analita, e si misura la risposta di tutte. Con una singola aggiunta la concentrazione incognita si ricava dalla proporzione $S_x : C_x = S_{x+std} : (C_x + C_{std})$, da cui $C_x = S_x \cdot C_{std} / (S_{x+std} - S_x)$, con tutte le concentrazioni riferite alla soluzione misurata; con aggiunte multiple si riporta il segnale in funzione della concentrazione aggiunta e si estrapola la retta fino all'asse delle concentrazioni: l'intercetta cade a $-C_x$, per cui $C_x = b/a$ (rapporto tra intercetta e pendenza della retta), da correggere infine per le diluizioni. Il metodo compensa l'effetto matrice di tipo proporzionale, perché la calibrazione avviene nella matrice del singolo campione, ma non corregge le interferenze additive, che vanno eliminate o sottratte con un bianco adeguato; il prezzo è che ogni campione deve essere trattato singolarmente, con evidente aggravio di lavoro. L'estrapolazione, inoltre, amplifica gli errori: la linearità della risposta deve essere rigorosa e il bianco correttamente sottratto.

Esempio numerico · Aggiunta standard

Cinque aliquote da 10,0 mL di un campione vengono portate a 50,0 mL, aggiungendo quantità di standard tali da dare nella soluzione finale concentrazioni aggiunte di 0; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00 mg/L. I segnali sono:

C aggiunta (mg/L)	0	0,50	1,00	1,50	2,00
Segnale	0,235	0,326	0,414	0,505	0,593

La regressione dà a = 0,1790 L/mg e b = 0,2356, quindi nella soluzione misurata C_x = b/a = 0,2356/0,1790 = 1,316 mg/L e nel campione originario 1,316 × 50,0/10,0 = 6,58 mg/L. Usando la sola aggiunta da 1,00 mg/L: C_x = 0,235 × 1,00/(0,414 − 0,235) = 1,313 mg/L, cioè 6,56 mg/L nel campione: un valore coerente, ma basato su un solo punto e quindi meno robusto.

11.6 Lo standard interno

Lo standard interno (SI) è un composto con struttura simile a quella dell'analita, idealmente un suo analogo strutturale o un suo isotopo stabile, che viene aggiunto in quantità nota al campione il prima possibile durante la preparazione. La misura si esegue sul campione contenente lo SI e il segnale analitico diventa il rapporto tra il segnale dell'analita e quello dello SI. Poiché ogni fenomeno che altera il segnale dell'analita (perdite nell'estrazione, variazioni del volume iniettato, effetti della matrice, fluttuazioni di temperatura) altera in ugual misura il segnale dello SI, il rapporto resta costante: lo SI compensa gli effetti della matrice e le variazioni di concentrazione lungo l'intero processo di preparazione e analisi.

I requisiti di un buono standard interno sono precisi: deve essere assente dal campione (o presente in quantità trascurabile, molto minore dell'1% dell'analita); deve essere aggiunto il prima possibile, perché compensa solo le perdite successive alla sua aggiunta; la quantità aggiunta deve stare in un rapporto appropriato con l'analita, tenuto conto dell'intervallo dinamico del metodo. La quantificazione richiede il fattore di risposta, che corregge la diversa risposta del rivelatore alle due specie: si misura una soluzione con analita e SI a concentrazioni uguali e si calcola F = (area analita)/(area SI). Nell'esempio della lezione, con entrambi a 100 ppm le aree valgono 1200 e 1000, da cui F = 1,2. Sul campione incognito, con 100 ppm di SI aggiunto, le aree valgono 700 e 1000: il rapporto 0,7 diviso per F = 1,2 e moltiplicato per 100 ppm fornisce CA ≈ 58 ppm. Il limite del metodo sta nella scelta dello standard idoneo, che per alcuni analiti può essere difficile: in spettrometria di massa il problema si risolve con gli standard marcati isotopicamente (ad esempio deuterati), che rappresentano il caso ideale di standard interno (diluizione isotopica).

12. Quadro riassuntivo delle strategie di calibrazione

Le quattro strategie di calibrazione rispondono a esigenze diverse e vanno scelte in base alla natura del campione. La calibrazione esterna è la scelta di base per matrici semplici e costanti: rapida ed economica, ma cieca all'effetto matrice. La calibrazione in matrice corregge l'effetto matrice medio e ingloba il recupero, al prezzo di disporre di una matrice bianca rappresentativa. L'aggiunta standard corregge l'effetto matrice del singolo campione ed è la scelta obbligata quando la matrice varia da campione a campione, ma richiede di trattare ogni campione individualmente. Lo standard interno, infine, compensa le perdite e le fluttuazioni lungo tutto il processo ed è lo standard di fatto nelle tecniche separative accoppiate alla spettrometria di massa; la sua efficacia dipende interamente dalla qualità dello standard scelto.

13. Esercizi: deviazione standard e precisione

Gli esercizi applicano le formule dei paragrafi 3, 4 e 8. Conviene organizzare i calcoli in tabella (x_i, d_i, d_i^2) come nell'esempio del paragrafo 4, verificando che la somma degli scarti sia nulla, e arrotondare solo i risultati finali. Le soluzioni sono riportate in fondo.

Esercizio 1. Cinque determinazioni del calcio in un'acqua minerale forniscono (mg/L): 52,3 - 52,8 - 51,9 - 52,5 - 52,1. Calcolare media, mediana, deviazione standard, varianza e coefficiente di variazione.

Esercizio 2. Nella standardizzazione di una soluzione di NaOH quattro titolazioni replicate richiedono 24,12 - 24,18 - 24,09 - 24,15 mL. Calcolare il volume medio, la deviazione standard, la deviazione standard relativa in parti per mille e la deviazione standard della media.

Esercizio 3. Il laboratorio A determina l'acidità di un olio extravergine ottenendo 0,32% con s = 0,012%; il laboratorio B determina l'acidità totale di un vino ottenendo 6,45 g/L con s = 0,08 g/L. Quale dei due risultati è più preciso? Motivare la risposta.

Esercizio 4. Cinque determinazioni del piombo in un'acqua forniscono (µg/L): 12,4 - 12,7 - 12,5 - 14,1 - 12,6. Verificare con il test Q di Dixon se il valore 14,1 può essere scartato (Q = |valore sospetto − valore più vicino| / (valore massimo − valore minimo); $Q_{critico}$ al 95% per N = 5: 0,710), quindi calcolare media, mediana e deviazione standard con e senza il dato sospetto e commentare il risultato.

Esercizio 5. Un metodo ha una deviazione standard di 0,020% sulla singola determinazione. Quante repliche servono perché la deviazione standard della media non superi 0,010%? E quante per scendere a 0,005%?

Esercizio 6. Con i dati dell'esercizio 1 calcolare l'intervallo di confidenza al 95% della media (t = 2,78 per 4 gradi di libertà). Il valore riportato in etichetta, 53,0 mg/L, è compatibile con i risultati?

Soluzioni

1. $\bar{x}$ = 52,32 mg/L; mediana = 52,3 mg/L. Scarti: −0,02; +0,48; −0,42; +0,18; −0,22 (somma nulla); Σd_i^2 = 0,4880. s^2 = 0,4880/4 = 0,122 $(mg/L)^2$; s = 0,35 mg/L; CV = 0,35/52,32 × 100 = 0,67%.

2. $\bar{x}$ = 24,135 mL. Scarti: −0,015; +0,045; −0,045; +0,015; Σd_i^2 = 0,004500. s = √(0,004500/3) = 0,039 mL; RSD = 0,039/24,135 × 1000 = 1,6 parti per mille; s_m = 0,039/√4 = 0,019 mL.

3. CV_A = 0,012/0,32 × 100 = 3,8%; CV_B = 0,08/6,45 × 100 = 1,2%. Le deviazioni standard assolute non sono confrontabili, perché riferite a grandezze e livelli diversi: in termini relativi il risultato B è circa tre volte più preciso.

4. Dati ordinati: 12,4 - 12,5 - 12,6 - 12,7 - 14,1. Q = (14,1 − 12,7)/(14,1 − 12,4) = 1,4/1,7 = 0,82 > 0,710: il dato si scarta con il 95% di confidenza. Con tutti i dati $\bar{x}$ = 12,86 µg/L, mediana 12,6 µg/L, s = 0,70 µg/L (CV 5,5%); senza il dato sospetto $\bar{x}$ = 12,55 µg/L, mediana 12,55 µg/L, s = 0,13 µg/L (CV 1,0%). Il valore anomalo sposta la media di 0,31 µg/L e aumenta la deviazione standard di oltre cinque volte, mentre la mediana cambia appena: è la robustezza della mediana descritta al paragrafo 3.

5. $s_m = s/\sqrt{N} \le 0{,}010$ richiede $\sqrt{N} \ge 0{,}020/0{,}010 = 2$, cioè $N \ge 4$. Per $s_m \le 0{,}005$ serve $\sqrt{N} \ge 4$, cioè $N \ge 16$: per dimezzare ancora l'incertezza della media occorre quadruplicare le repliche.

6. $IC_{95\%}$ = 52,32 ± 2,78 × 0,349/√5 = 52,32 ± 0,43 mg/L, cioè 51,89-52,75 mg/L. Il valore di etichetta (53,0 mg/L) è esterno all'intervallo: la differenza di −0,68 mg/L è statisticamente significativa al 95% e non si spiega con il solo errore casuale; occorre cercarne la causa (errore sistematico del metodo oppure differenza reale tra il campione e il valore dichiarato).