

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO**  
CL in VITICOLTURA ED ENOLOGIA  
*Anno Accademico 2021/2022*

**ESTRAZIONE E VALIDAZIONE**

---

---

---

---

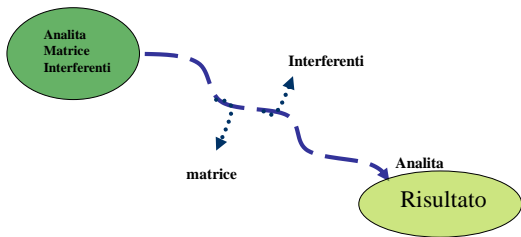
---

---

---

---

Il processo analitico:  
dal campione al risultato



---

---

---

---

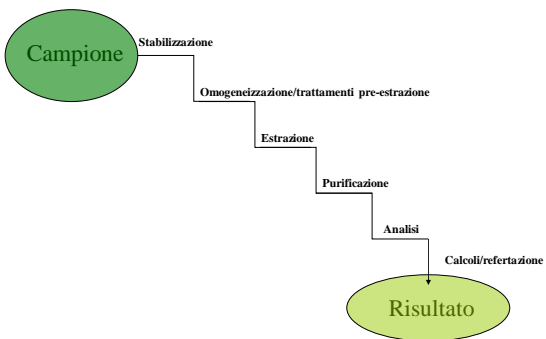
---

---

---

---

Il processo analitico: dal campione al risultato



---

---

---

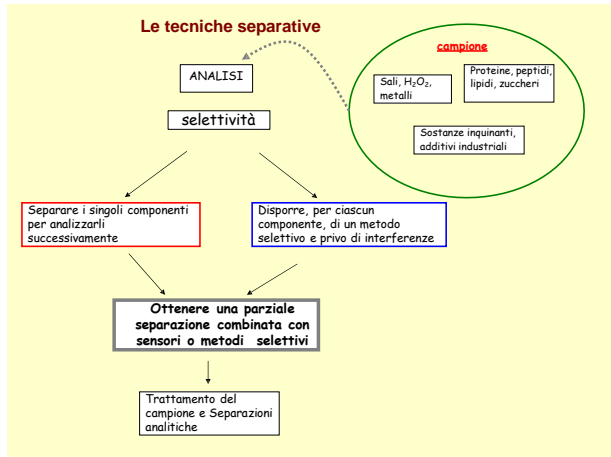
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**IL CAMPIONE**

*Classificazione fisica*

Campione omogeneo (es. soluzione)

Campione eterogeneo (sospensione, solido + liquido, gas disciolti in spazi fisicamente definiti)

*Classificazione chimica*

Campione omogeneo (es. costituito da tutte sostanze idrofile)

Campione eterogeneo (es. costituito sostanze idrofile e idrofobiche)

Caratteristiche su cui si basano le TS

→ Caratteristiche fisiche

→ Caratteristiche chimiche

---

---

---

---

---

---

---

---

**Vantaggi della preparazione del campione:**

- selettività, riduzione delle interferenze
- possibilità di utilizzare detector sempre più sensibili
- aumentare il numero di campioni misurabili per unità di tempo
- ridurre il tempo di analisi strumentale e di interpretazione dei risultati
- incrementare la vita delle colonne per cromatografia (HPLC e GC) (adsorbimento di molecole sulle pareti della colonna)
- possibilità di arricchire il campione (preconcentrazione) (aumentare la sensibilità del metodo)
- automazione delle analisi

**Svantaggi**

- trattamento chimico-fisico del campione (l'analisi non avviene sul campione, ma su un estratto)

---

---

---

---

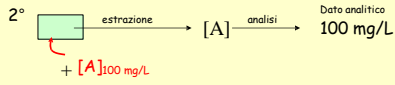
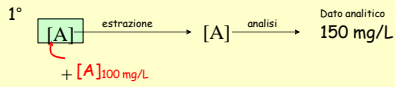
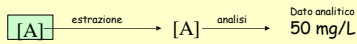
---

---

---

---

Il metodo di estrazione deve essere **quantitativo** (o quasi..)



**RECUPERO:** quantità di analita, espressa in %, ottenuta da una matrice con un metodo metodo di estrazione.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

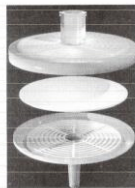
---

---

**Cristallizzazione (precipitazione)**

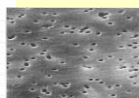
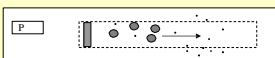
Tecnica basata sulla possibilità di ottenere cristalli insolubili in soluzione mediante: aggiunta di opportuno reagente, variazione delle condizioni della soluzione (pH, temperatura).

**FILTRAZIONE**



**Ultrafiltrazione**

Tecnica basata sull'uso di membrane semipermeabili. Il passaggio è guidato da un **gradiente di pressione.**




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

**Ultrafiltrazione per l'industria delle bevande**

Rimozione tramite uso di fibre per ultrafiltrazione di **materiale colloidale e organico** dall'acqua di processo nell'industria delle bevande. Ad esempio, acqua della rete pubblica appare avere **turbidità**, e contenere **acidi fulvici e umici** che conferiscono **colore giallastro**.

Studio su scala pilota di membrana G50 - ultrafiltrazione.

Constituent	Raw Water	6-50 Permeate	% Reduction
Bacteria, No/ml	0.00	0.00	NA
Yeast, No/ml	43.00	0.00	100
Turbidity (NTU)	0.52	0.09	83
Color	Highly Colored	No Color	100
Iron, ppm	0.15	< 0.01	> 93
TOC, ppm	3.00	< 1.00	> 67

---

---

---

---

---

---

---

---

---

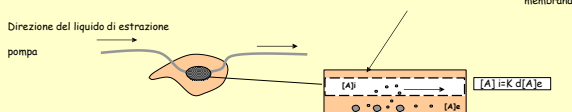
---

---

---

**separazione tramite l'utilizzo di fibre da microdialisi**

La diffusione all'interno della fibra dipende dalle dimensioni dei pori della fibra e dal coefficiente di diffusione della molecola.



• Estrazione

– Separazione dell'analita da matrice e interferenti:

- Obiettivo:
  - Recupero quantitativo dell'analita in assenza di interferenti

- Metodi
  - Liquido Liquido
  - Liquido Solido
  - SPE

Estrazione liquido-liquido

Separazione dei costituenti di una miscela tra 2 solventi non miscibili tra di loro.

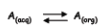
- o La tecnica si basa sulle caratteristiche chimiche delle sostanze da separare.
- o Può separare sostanze con punti di ebollizione vicini (non separabili per distillazione).

il grado al quale i composti (organici o inorganici) si distribuiscono tra 2 liquidi non miscibili tra loro differisce enormemente.

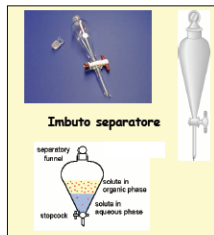
Queste differenze possono essere sfruttate per scopi analitici per separare interferenti.

Coefficiente di distribuzione

Costante di equilibrio che descrive la distribuzione di un soluto tra due solventi non miscibili



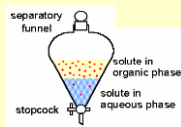
$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}}$$



Il solvente più pesante si ripartisce nella parte inferiore dell'imbuto separatore

Rapporto di distribuzione D = rapporto di tutte le specie del soluto in ciascuna fase es. se A è un acido debole

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{aq}} \quad D = \frac{[AH]_{(org)}}{[AH]_{(aq)} + [A]_{(aq)}}$$



$$K_D = \frac{[H^+]_{(aq)} + [A^-]_{(aq)}}{[AH]_{(aq)}} \quad [A^-]_{(aq)} = \frac{K_a [AH]_{(aq)}}{[H^+]_{(aq)}}$$

$$[AH]_{(org)} = K_D [AH]_{(aq)} \quad D = \frac{K_D [AH]_{(aq)}}{[AH]_{(aq)} + K_a [AH]_{(aq)} / [H^+]_{(aq)}} = \frac{K_D}{1 + K_a/[H^+]_{(aq)}}$$

Se  $[H^+] \gg K_a$ ,  $D \approx K_D$  e AH viene estratto nello strato organico

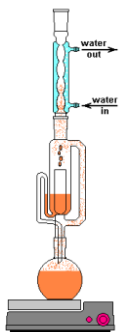
Se  $[H^+] \ll K_a$ ,  $D = K_D [H^+] / K_a$  è più piccolo e AH rimane nello strato acquoso, in soluzione alcalina l'acido non può essere estratto!

Se si usano volumi diversi bisogna correggere per la variazione

L'efficienza di estrazione è indipendente dalla concentrazione di soluto!



FUNZIONAMENTO SOXHLET



1. Il solvente è riscaldato nella caldaia in basso ed il vapore puro sale attraverso il tubo di bypass, unico percorso possibile, e raggiunge la parte superiore del Soxhlet.
2. Il vapore continua ad salire fino al condensatore, allora il liquido gocciola giù nel ditale che contiene il materiale dal quale desideriamo estrarre le sostanze.
3. Questo ditale è poroso, in modo che trattiene non solo il prodotto solido, ma agisce anche da filtro evitando che il materiale blocchi il tubo del sifone.
4. Quando il livello del liquido nel contenitore di Soxhlet raggiunge lo stesso livello della parte superiore del sifone, il liquido contenente i residui dissolti è travasato nuovamente dentro la caldaia.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Estrazione: SPE

ANALITA MATRICE INTERFERENTI

ANALITA MATRICE INTERFERENTI

interferenti analita

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

Estrazione SPE (solid phase extraction)

Vantaggi: YSemplicità YEfficienza YVersatilità YDisponibilità commerciale di colonne pre-impaccate

**Materiale:**  
 Y Colonna impaccata con materiale adsorbente  
 Y Eluente

---

---

---

---

---

---

---

---

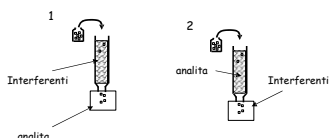
---

---

In SPE si utilizzano 2 strategie alternative:

1. Ritenzione degli interferenti
2. Ritenzione dell'analita

Le 2 strategie si basano sul diverso grado di affinità di analita e interferenti per il materiale di impaccamento e per il solvente di eluizione



1. Si usa quando [A] è elevata
2. Si usa quando [A] è bassa -> **ARRICCHIMENTO**







## Limiti di Rivelabilità e Quantificazione

LOQ (Lowest Limit Of Quantitation): punto più basso della retta.  
 Segnale 5 volte maggiore del bianco e riproducibilità minore del 20 %

LOD e LOQ concentrazioni relative ad un segnale pari alla media del bianco più 3 e 10 volte la SD del bianco.  
 Verificare quando possibile che S/N sia almeno rispettivamente 3 e 10 (evitare sovrastima)

## Calcolo dei LOD e LOQ

**ANALISI DI 10 BIANCHI** (cui aggiunto lo std interno):  
 calcolo della media del segnale e della SD

- \* segnale critico ( $S_c$ )  $\rightarrow S_c = \mu_B + k \sigma_B$
- \* Il LOD si calcola come concentrazione relativa al minimo segnale significativo dall'equazione della retta  

$$S_R = \mu_B + 3 \sigma_B$$
- \* Il LOQ come concentrazione relativa al minimo segnale quantificabile ( $S_Q$ )  

$$S_Q = \mu_B + 10 \sigma_B$$

### SELETTIVITA'

La selettività è un parametro che non può essere stimato numericamente, ma viene valutato sulla base della probabilità che il risultato della prova possa subire interferenze di diversa origine; bisogna stabilire che il segnale prodotto nella fase di misura sia attribuibile in maniera univoca all'analita di interesse.

E' necessario indicare quali accorgimenti vengono presi per evitare falsi positivi o falsi negativi. Tali accorgimenti devono essere descritti nei metodi di prova o nelle istruzioni di dettaglio ad essi allegate.

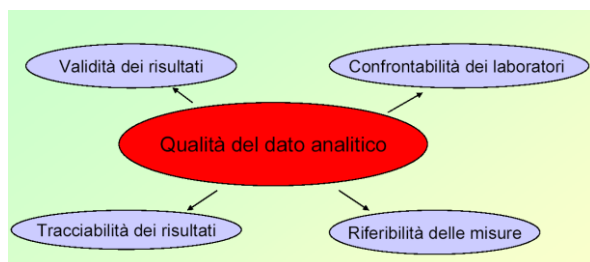
In cromatografia per migliorare la selettività si può utilizzare una fase stazionaria a diversa polarità o cambiare il sistema di rivelazione oppure accoppiare il sistema con uno spettrometro di massa.

## ROBUSTEZZA

La robustezza è la capacità del metodo di non essere significativamente influenzato da possibili variazioni deliberate introdotte in almeno una delle sue fasi di realizzazione. La valutazione della robustezza deve partire da un esame complessivo del metodo che deve portare alla eventuale individuazione delle fasi o dei parametri la cui variazione possa ragionevolmente incidere sul risultato finale. La valutazione della robustezza avviene attraverso deliberate variazioni al metodo che possono effettivamente avvenire, anche se con probabilità ridotta, durante la esecuzione routinaria del metodo di prova.

**-METODI DI SCREENING:** si tratta di metodi usati per rivelare la presenza di un analita o di una classe di analiti alla concentrazione che interessa. Questi metodi hanno un'elevata produttività e vengono usati per selezionare ampi quantitativi di campioni potenzialmente positivi. Il loro scopo è quello di evitare risultati erroneamente negativi.

**- METODI DI CONFERMA:** si tratta di metodi che forniscono informazioni complete o complementari che consentono l'identificazione dell'analita con certezza, alla concentrazione che interessa. Questi metodi sono intesi ad evitare risultati erroneamente positivi, nonché ridurre il più possibile risultati erroneamente negativi.



Riferibilità: "proprietà del risultato di una misura che attesta una relazione con riferimenti stabiliti, generalmente campioni nazionali o internazionali, attraverso una catena ininterrotta di confronti, ognuno dei quali presenta un'incertezza definita"

Validazione: "conferma sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi ad una specifica utilizzazione o applicazione prevista, sono stati soddisfatti"

## Valutazione dei dati

A qualsiasi tipo di misura di una grandezza fisica è associato un errore.

E' necessario conoscere:

- il grado di incertezza del risultato della misura e quindi la sua attendibilità;
- le relazioni tra l'incertezza della singola misura effettuata durante un esperimento e l'affidabilità del risultato finale.

Nessun risultato quantitativo ha significato se non è accompagnato da una stima dell'errore inerente alla misura effettuata.

## Precisione e Accuratezza

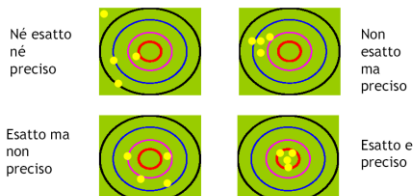
I termini *precisione* e *accuratezza* sono messi in relazione con gli errori casuali e sistematici.

- Una misura è tanto più *precisa* quanto più i singoli valori misurati in condizioni di *ripetibilità* si concentrano intorno alla media della serie di misure effettuate.
  - La variabilità dei risultati viene quantificata nella deviazione standard.
  - Si preferisce quantificare la precisione con il coefficiente di variazione, in genere espresso in percentuale.
- L'*accuratezza* esprime invece l'assenza di errori sistematici nella misura:
  - una misura è tanto più accurata quanto più la media delle misure si approssima al valore vero della grandezza.
  - Anche l'accuratezza è spesso espressa come rapporto fra l'errore sistematico e il valore della grandezza.

**Precisione:** bontà dell'accordo tra i risultati di misurazioni successive.

**Esattezza\***: bontà dell'accordo tra il risultato,  $x_i$ , o il valore medio dei risultati di un'analisi, ed il valore vero o supposto tale,  $x_i$ .

Gli errori possono essere **errori casuali** o **errori sistematici**. Quelli casuali influenzano la precisione, quelli sistematici l'esattezza. Gli errori casuali influenzano la precisione, quelli sistematici l'esattezza.







## ERRORI CASUALI

Gli **errori casuali** (detti anche **indeterminati** o "random" in lingua inglese), causano una dispersione più o meno simmetrica dei dati intorno al valore medio.

Essi sono legati a fluttuazioni indefinite di una miriade di parametri sperimentali, quali temperatura, pH, pressione, umidità, punto d'arresto di una titolazione, forza ionica, ecc. oltre che alle tolleranze dei pesi delle bilance e della vetreria utilizzata per la misurazione di volumi e alle incertezze dei valori desunti dagli strumenti di misura.

Queste fluttuazioni avvengono anche cercando di lavorare con la massima cura.

Gli errori casuali non possono essere eliminati, anche se possono essere ridotti operando con cura.

### Si definiscono:

**campione** = l'insieme delle misure in esame

**popolazione** = l'insieme di tutte le possibili misure

$\bar{x}$  = la media del campione

$\mu$  = la media della popolazione

$s$  = la deviazione standard del campione

$\sigma$  = la deviazione standard della popolazione

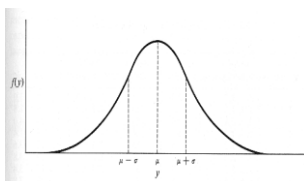
La distribuzione del campione è rappresentabile in modo discreto (istogramma).

La distribuzione della popolazione è rappresentabile con una curva continua (curva normale o Gaussiana).

## La Funzione Gaussiana

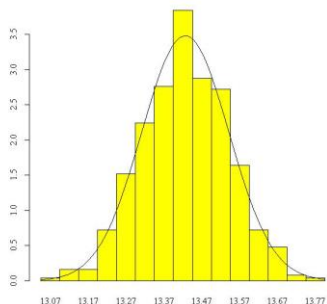
- Una **funzione gaussiana** è una **funzione** della seguente forma:

$$f(x) = ae^{-(x-b)^2/c^2} \quad f(y) = \frac{e^{-\frac{(y-\mu)^2}{2\sigma^2}}}{\sqrt{2\pi}\sigma}, \quad (-\infty < y < \infty),$$



dove  $\mu$  e  $\sigma$  rappresentano la popolazione media e lo scarto quadratico medio (o deviazione standard). L'equazione della funzione di densità è costruita in modo tale che l'area sottesa alla curva rappresenti la probabilità. Perciò, l'area totale è uguale a 1.

## La distribuzione normale




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## La deviazione standard

La **deviazione standard** o **scarto quadratico medio** è una misura della variabilità di una [variabile casuale](#) ed ha la stessa unità di misura dei valori osservati.

In pratica misura la dispersione dei dati intorno al valore atteso.

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

dove  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$  è la [media aritmetica](#).

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## La deviazione standard

- Se si conosce solo un campione della popolazione, si sostituisce il fattore  $1/n$  con  $1/(n-1)$ , ottenendo come nuova definizione:

$$\sigma_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

A partire dalla deviazione standard si definisce anche la **deviazione standard relativa** come il rapporto tra  $\sigma_x$  e la media aritmetica dei valori:

$$\text{RSD} = \sigma_r = \frac{\sigma_x}{\bar{x}}$$

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

### Fonti di incertezza

- Incertezza di ripetibilità espressa come precisione del metodo (Contributo di Categoria A)
- Incertezza di taratura strumentale (Contr. Cat B)
- Incertezza di pesata (Contr. Cat B)
- Incertezza del volume finale (Contr. Cat B)
- Incertezza di preparazione standard interno (Contr. Cat B)
- Incertezza della soluzione di taratura (Contr. Cat B)

---

---

---

---

---

---

---

---

### Intervallo di Fiducia

Il limite fiduciale ( o intervallo fiduciale) è molto utile per avere un'idea della vera caratteristica della popolazione che stimiamo attraverso lo studio di un campione. Per campioni ragionevolmente ampi (almeno 50-60 osservazioni), valgono le seguenti relazioni fondamentali:

indica che questo intervallo include con probabilità 95% la VERA caratteristica della popolazione

**Intervallo fiduciale 95% = valore statistico ± 2 errore standard**  
**Intervallo fiduciale 99% = valore statistico ± 3 errore standard**

indica che questo intervallo include con probabilità 99% la VERA caratteristica della popolazione

---

---

---

---

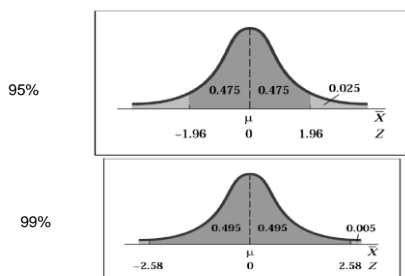
---

---

---

---

### Intervallo di Fiducia




---

---

---

---

---

---

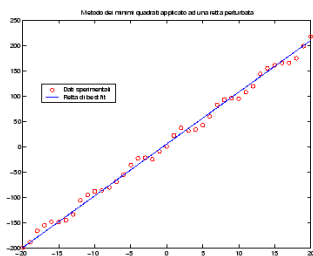
---

---



## Il Metodo dei Minimi Quadrati

Il metodo dei minimi quadrati consente di approssimare mediante una serie di funzioni una serie di dati con errore quadratico minimo; quando la serie di funzioni utilizzata impiega polinomi di grado non superiore al primo si afferma che la curva di regressione è *lineare*.



Applicazione del metodo dei minimi quadrati a dati sperimentali che crescono linearmente

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Il Metodo dei Minimi Quadrati

In termini più formali, avendo a disposizione la serie di  $n$  punti vogliamo determinare la retta  $y=mx+q$  tale che la somma degli scarti quadratici dai punti della serie sia minima.

Lo *scarto quadratico* è definito pari a  $(y_i - y(x_i))^2$ , ovvero la *differenza tra il valore reale della serie e quello stimato dalla retta di regressione*.

$$E = \sum_{i=1}^n (y_i - y(x_i))^2 = (y_1 - (mx_1 - q))^2 + \dots + (y_n - (mx_n - q))^2$$

---

---

---

---

---

---

---

---

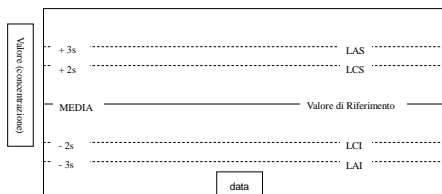
---

---

## Carte di controllo

- Media +3s = Limite di allarme superiore (LAS)
- Media +2s = Limite di controllo superiore (LCS)
- Media -2s = Limite di controllo inferiore (LCI)
- Media -3s = Limite di allarme inferiore (LAI)

disposizione delle linee di riferimento in una carta di controllo




---

---

---

---

---

---

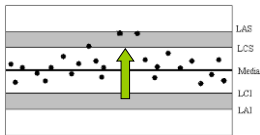
---

---

---

---

### Carte di controllo (possibili criteri interpretativi)



Due (2) risultati consecutivi al di fuori dei limiti di controllo (dallo stesso lato) ma compresi nei limiti di allarme

---

---

---

---

---

---

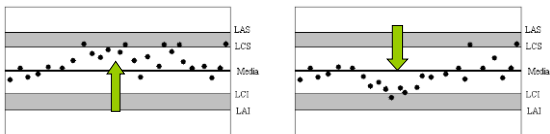
---

---

---

---

### Carte di controllo (possibili criteri interpretativi)



Sette (7) risultati consecutivi superiori o inferiori al valore medio

---

---

---

---

---

---

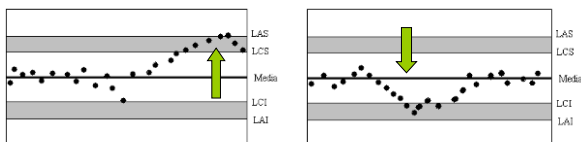
---

---

---

---

### Carte di controllo (possibili criteri interpretativi)



Sette (7) risultati consecutivi in tendenza crescente o decrescente

---

---

---

---

---

---

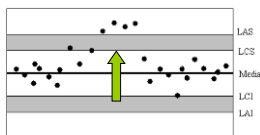
---

---

---

---

## Carte di controllo (possibili criteri interpretativi)



Risultati al di fuori dei limiti di controllo

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Materiali di riferimento

- **Materiale di riferimento**
  - Materiale di cui i valori di una o più proprietà sono sufficientemente omogenei e confermati con un metodo validato, così da poter essere usato per calibrare uno strumento, per verificare un metodo di misura o per assegnare un valore al materiale [ISO Guide 30:1992]
- **Materiale di riferimento certificato**
  - Materiale di riferimento a cui è stato assegnato il contenuto di uno specifico analita, preferibilmente come risultato di uno studio cooperativo

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Materiali di riferimento certificati

- Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
  - CRM
  - <http://www.irmm.jrc.be/mrm.htm>
- Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM)
  - SRM
  - <http://www.nist.gov>
- RIVM
  - [http://www.rivm.nl/crl/residues/ref\\_standard/list/htm](http://www.rivm.nl/crl/residues/ref_standard/list/htm)

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## Alcune definizioni...

- **TECNICA** insieme di principi teorici ed accorgimenti sperimentali che permettono di utilizzare un principio fondamentale per ottenere informazioni sulla natura di un campione
- **METODO (ANALITICO)** applicazione di una tecnica ad un problema specifico. Ve ne sono di standard (ASTM, NIST, IUPAC, NBS, UNICHIM...)
- **PROCEDURA** insieme di istruzioni di base necessarie per utilizzare il metodo
- **PROTOCOLLO** insieme di istruzioni dettagliate da seguire rigidamente perché il risultato possa essere accettato
- **MISURA** informazione data da NUMERO+INCERTEZZA+UNITÀ DI MISURA
- **MISURAZIONE** insieme di operazioni materiali e di calcolo per assegnare la misura al sistema misurato

## Nuove definizioni di parametri di qualità secondo la Decisione 2002/657/EC; metodi di conferma e metodi di analisi quantitativa

- Accuratezza
- Range dinamico e lineare
- Selettività/specificità
- Limite di rivelazione
- Limite di quantificazione
- Robustezza
- Recupero

### Annex

#### Performance criteria, other requirements and procedures for analytical methods

**Validazione** = conferma, mediante esame ed evidenze oggettive, che i requisiti particolari per l'uso per il quale il metodo è progettato sono soddisfatti

**Accuratezza** = grado di accordo tra il risultato di un procedimento analitico e un valore di riferimento accettato. E' determinata dal calcolo dell'**esattezza** e della **precisione**

**Esattezza (trueness)** = grado di accordo tra il valor medio ottenuto da un numero ampio di risultati e un valore di riferimento accettato. E' espressa in termini di bias

**Bias** = differenza tra la media di un numero ampio di risultati e un valore di riferimento accettato.

**Precisione** = grado di accordo tra risultati indipendenti ottenuti in condizioni definite

**Ripetibilità** = precisione misurata in condizioni di **ripetibilità** → risultati indipendenti ottenuti da un operatore applicando lo stesso metodo su identici campioni test, nello stesso laboratorio ed utilizzando lo stesso strumento

**Riproducibilità** = precisione misurata in condizioni di **riproducibilità** → risultati indipendenti ottenuti da diversi operatori applicando lo stesso metodo su identici campioni test, in diversi laboratori ed utilizzando diversi strumenti

**Within-laboratory reproducibility** = precisione misurata nello stesso laboratorio in condizioni definite (es. riguardanti il metodo, gli operatori, gli strumenti) in un arco di tempo lungo

*Annex***Performance criteria, other requirements and procedures for analytical methods**

**Recupero** = percentuale di concentrazione di una sostanza recuperata nel corso di una procedura analitica. E' determinata durante la fase di validazione se non è disponibile alcun materiale di riferimento certificato

**Robustezza** = sensibilità di un metodo analitico a variazioni nelle condizioni sperimentali (condizioni ambientali e/o di preparazione del campione) nelle quali il metodo può essere applicato come descritto o con piccole modifiche.

A seguito dello studio di robustezza, dovrebbe essere indicata ogni variazione dalle condizioni sperimentali soggette a fluttuazioni (es. stabilità dei reagenti, pH, temperatura) che potrebbe influenzare il risultato analitico.

**Specificità** = capacità di un metodo analitico di distinguere l'analita da altre sostanze. Questa caratteristica è funzione della tecnica di misura, ma può variare a seconda della classe di composti o della matrice.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---