



APAT

Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici



Proposta di guida tecnica sui metodi di analisi dei suoli contaminati

Informazioni legali

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici o le persone che agiscono per conto dell'Agenzia stessa non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

APAT – Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.apat.it

© APAT, Rapporti 37/2003

ISBN 88-448-0117-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: ARPA Piemonte

Coordinamento tipografico

APAT - Servizio di Supporto alla Direzione Generale
Settore Editoria, Divulgazione e Grafica

Impaginazione e stampa

I.G.E.R. srl - Viale C. T. Odiscalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare Aprile 2004

Autori e ringraziamenti

Il presente documento è stato predisposto dal Centro Tematico Nazionale Suolo e Siti Contaminati (CTN SSC) ed è stato rivisto, integrato e ultimato dal Centro Tematico Nazionale Territorio e Suolo (CTN TES) nell'aprile 2003.

La realizzazione è stata curata da:

Ornella ABOLLINO	(Dipartimento di Chimica Analitica – Università di Torino),
Edoardo MENTASTI	(Dipartimento di Chimica Analitica – Università di Torino),
Corrado SARZANINI	(Dipartimento di Chimica Analitica – Università di Torino),
Renzo BARBERIS	(ARPA Piemonte)

con la collaborazione di:

Daniela BALLARDINI	(ARPA Emilia Romagna)
Meri BARBAFIERI	(CNR ISE – Sezione di Chimica del Suolo - Pisa)
Danila BEVILACQUA	(ARPA Emilia Romagna)
Luca DI PIERRO	(ARPA - Piemonte)
Nicoletta DOTTI	(ARPAL Liguria)
Gabriele FABIETTI	(ARPA - Piemonte)
Rosa FRANCAVIGLIA	(Istituto Sperimentale Nutrizione Piante – Roma)
Paolo GIANDON	(ARPAV - Veneto)
Carlo JACOMINI	(Consulente APAT)
Monica LAZZARI	(ARPAL Liguria)
Marcello PAGLIAI	(Istituto Sperimentale Studio e la Difesa del Suolo – Firenze)
Gianniantonio PETRUZZELLI	(CNR ISE - Sezione di Chimica del Suolo - Pisa)
Antonio PUGLIESE	(APAT)
Carlo RIGHINI	(ARPAT Toscana)
Paolo SEQUI	(Istituto Sperimentale Nutrizione Piante – Roma)
Eliana TASSI	(CNR ISE – Sezione di Chimica del Suolo - Pisa)
Marinella VITO	(ARPA Campania)

Si ringraziano per la collaborazione tutti i ricercatori e i tecnici delle Agenzie regionali, con particolare riferimento all'ARPA Piemonte, che hanno contribuito a valutare e implementare i contenuti del documento.

SOMMARIO

La proposta di guida tecnica sui metodi di analisi dei suoli contaminati è una raccolta guidata, riportata principalmente sul CD allegato, con commenti e valutazioni critiche. Partendo dalla legislazione sulle bonifiche, ed in particolare dal D.M. 471/99, si riportano i limiti previsti dalla legislazione nazionale ed i metodi di analisi disponibili sia come metodi ufficiali nazionali, che riguardano pochi parametri, sia come metodi normalmente utilizzati per i suoli contaminati, anche se nati per l'analisi di rifiuti, sia ancora come metodi internazionali, soprattutto U.S.EPA, che hanno un'ampia diffusione in Italia. I capitoli introduttivi riguardano il trattamento statistico dei dati, la buona pratica di laboratorio e i principi di funzionamento, le caratteristiche e le interferenze di ciascuna delle tecniche strumentali utilizzate per l'esecuzione delle analisi dei contaminanti contemplati nel DM 471/99 con i metodi riportati nel CD. I commenti guidano alla scelta del metodo più opportuno, con un approfondito esame della possibile applicazione delle diverse metodologie analitiche in funzione dei limiti di rivelabilità e dei limiti tabellari del DM 471/99. La pubblicazione contiene inoltre una ricca appendice legislativa e altre informazioni di supporto.

SUMMARY

The proposal of technical guide on the methods of analysis of contaminated soils is a guided collection, mainly reported on the enclosed CD, with comments and critical evaluations. Starting from the legislation on reclamations, and in particular from the M.D. 471/99, the limits considered in the national legislation are reported together with the methods of analysis available either as national official methods, which concern few parameters, or as methods usually applied to contaminated soils, even if developed for the analysis of wastes, or else as international methods, mainly U.S.EPA, which have a large diffusion in Italy. The introductory chapters regard the statistical treatment of the data, the good laboratory practice and the operation principles, the features and interferences for each of the instrumental techniques employed for the execution of the analyses of the contaminants considered in the M.D. 471/99 with the methods reported in the CD. The comments guide towards the choice of the more appropriate method, with a thorough examination of the possible application of the various analytical procedures as a function of the detection limits and of the tabular limits of the M.D. 471/99. In addition, the publication contains an abundant appendix on the current legislation and other supporting information.

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	9
CAPITOLO 1 - Qualità e trattamento del dato analitico	»	11
La qualità dal dato analitico	»	11
L'espressione dei risultati	»	18
Altre grandezze statistiche	»	21
Test statistici	»	23
Cifre significative ed arrotondamento	»	46
CAPITOLO 2 - OTTENERE DATI DI QUALITÀ	»	47
Introduzione	»	47
Operare in laboratorio	»	48
La strumentazione	»	62
L'esecuzione dell'analisi	»	81
Il controllo di qualità	»	84
La validazione di un metodo analitico	»	89
Bibliografia	»	92
CAPITOLO 3 - METODI DI ANALISI	»	93
Le tecniche analitiche	»	93
Esempio di descrizione di tecnica strumentale: la spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite (GFAAS)	»	95
Le condizioni di analisi	»	101
Esempio di descrizione delle condizioni di misura (determinazione del cadmio)	»	102
CAPITOLO 4 - Condizioni di analisi per i singoli analiti	»	107
Esempio di commento ai metodi di analisi (composti alifatici clorurati cancerogeni)	»	108

CAPITOLO 5 - CONCENTRAZIONI LIMITE E LIMITI DI RIVELABILITÀ	pag. 111
Normativa di riferimento	» 121
Bibliografia	» 122
Glossario	» 123
Il CTN TES nell'ambito della rete SINAnet	» 124

INTRODUZIONE

L'ANPA, attraverso il CTN SSC, aveva pubblicato nel 2000 un CD contenente la raccolta dei metodi di analisi del suolo.

Si trattava di una raccolta guidata dei metodi di analisi dei suoli contaminati, con commenti e valutazioni critiche. Partendo dalla legislazione sulle bonifiche, ed in particolare dal D.M. 471/99, si riportavano i limiti previsti dalla legislazione nazionale ed i metodi di analisi disponibili sia come metodi ufficiali nazionali, che riguardavano pochi parametri, sia come metodi normalmente utilizzati per i suoli contaminati, anche se nati per l'analisi di rifiuti, sia ancora come metodi internazionali, soprattutto U.S.EPA, che hanno un'ampia diffusione in Italia. I commenti guidavano alla scelta del metodo più opportuno e ponevano a confronto i limiti di rivelabilità con i limiti di legge. La pubblicazione conteneva inoltre una ricca appendice legislativa e altre informazioni di supporto.

Nel 2001 e nel 2002 è continuato il lavoro di studio e valutazione delle metodologie analitiche relative al suolo, con l'intento principale di arrivare ad una proposta di guida tecnica da proporre all'ANPA.

Partendo dalla struttura di base del CD precedentemente citato, si sono approfonditi diversi temi, sempre nell'ottica di poter fornire agli operatori del settore una raccolta guidata dei metodi di analisi con precisi riferimenti in merito all'applicabilità degli stessi per i suoli contaminati normati dal D.M. 471/99.

Le integrazioni hanno riguardato:

- un più approfondito esame della possibile applicazione delle diverse metodologie analitiche in funzione dei limiti di rivelabilità strumentale e dei limiti tabellari del DM 471/99;
- un capitolo sul trattamento statistico dei dati;
- un capitolo sulla buona pratica di laboratorio;
- un capitolo sui principi di funzionamento, le caratteristiche e le interferenze di ciascuna delle tecniche strumentali utilizzate per l'esecuzione delle analisi dei contaminanti contemplati nel DM 471/99 con i metodi riportati nel CD;
- una revisione e ricca integrazione del capitolo descrittivo sulle metodologie di analisi, con l'indicazione delle condizioni e delle principali interferenze analitiche sia riferite in generale alla metodologia, sia allo specifico parametrometodo;
- una integrazione della legislazione ambientale.

Il lavoro, ultimato nell'aprile 2003 dal CTN TES, ha portato alla realizzazione di un nuovo CD, accompagnato da un sintetico testo stampato.

Il CD è organizzato sotto forma di ipertesto, che consente di raggiungere le informazioni ricercate seguendo percorsi diversi.

Nel presente testo si riportano il capitolo sulla qualità e trattamento del dato analitico e un estratto delle diverse sezioni in cui è diviso il CD. Viene inoltre illustrata la struttura di ciascuna sezione e se ne riporta, a titolo di esempio, un argomento (ad esempio la descrizione di una tecnica strumentale, od i commenti ad un gruppo di parametri).

CAPITOLO 1 - Qualità e trattamento del dato analitico

LA QUALITÀ DEL DATO ANALITICO

La qualità di un dato analitico è dettata principalmente dalla sua accuratezza, precisione e rappresentatività. Come vedremo nei prossimi capitoli, per ottenere dati di buona qualità, e quindi validi e significativi, è necessario utilizzare metodi analitici affidabili, eseguire oculatamente le operazioni necessarie per l'analisi ed affiancarle a tecniche di controllo di qualità.

La figura 1 rappresenta graficamente i due concetti di accuratezza e precisione, che vengono di seguito definiti.

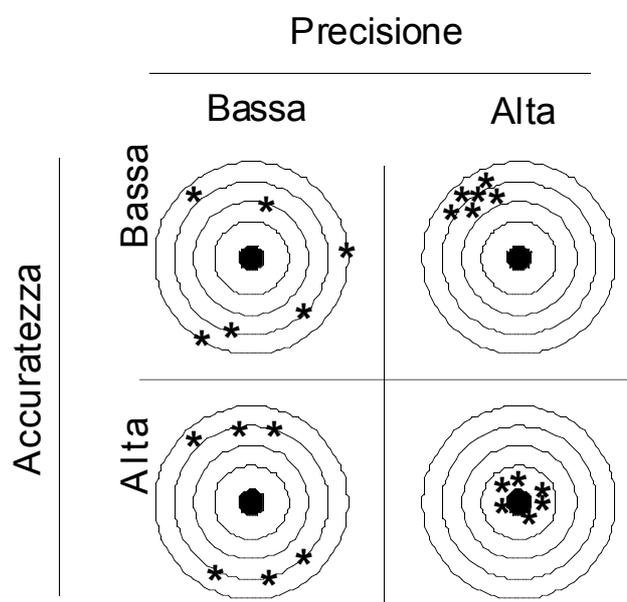


Figura 1: Rappresentazione dei concetti di accuratezza e precisione.

L'accuratezza

Nella letteratura chimica il termine "accuratezza" è inteso con due accezioni diverse.

Secondo la prima accezione, l'accuratezza rappresenta la differenza (errore o scarto) tra il valore della media dei risultati e il valore vero o ritenuto tale della quantità misurata. L'accuratezza è una misura dell'errore sistematico di una misura ed è legata a due fattori: il metodo di analisi e le modalità di utilizzo del metodo stesso nel laboratorio.

L'accuratezza di un metodo di analisi può essere valutata con prove interlaboratorio e quella delle sue modalità di utilizzo con tecniche di controllo di qualità.

Secondo altri autori, soprattutto americani, l'accuratezza è la vicinanza tra il valore osservato ed il valore vero, o comunque accettato come tale, e deriva dalla combinazione di una componente casuale (errori casuali, che determinano precisione) e di una componente sistematica (errori sistematici, in inglese *bias*).

La precisione

La precisione è connessa all'errore indeterminato e rappresenta la vicinanza o dispersione dei risultati ottenuti per uno stesso campione.

La precisione è rappresentata dalla deviazione standard dei risultati o dalla stima della medesima.

Essa è valutata attraverso l'esecuzione di analisi replicate.

Si distingue inoltre tra:

- ripetibilità: grado di accordo tra le misure nella stessa matrice ottenute con lo stesso metodo dallo stesso analista nello stesso laboratorio in un tempo ragionevolmente breve;
- riproducibilità: grado di accordo tra misure della stessa grandezza nella stessa matrice, ottenute con lo stesso metodo in laboratori diversi.

La rappresentatività

Un metodo di analisi può essere molto accurato, ma i risultati non sono utilizzabili se non riflettono la composizione del campione o se il campione non rappresenta la popolazione (ad esempio la zona di suolo) da cui è stato prelevato.

Spesso il campionamento è lo stadio più critico nell'intero processo analitico ed è lo stadio che limita l'accuratezza dell'analisi. Questo è particolarmente vero quando il campione da analizzare sia un sistema di grandi dimensioni e non omogeneo, come ad esempio un lago, un suolo, un pezzo di tessuto animale.

Il prodotto finale dello stadio di campionamento è costituito da pochi grammi o chilogrammi e può costituire una parte rispetto a 10^7 o 10^8 del materiale di partenza. Comunque il campione deve avere, nei limiti del possibile, una composizione identica alla composizione media della massa totale.

Esistono in letteratura numerose procedure da seguire, spesso basate su considerazioni statistiche, per stabilire il numero, la dimensione e l'ubicazione dei punti di prelievo dei campioni, a seconda della natura del materiale da analizzare. In generale si può affermare che la rappresentatività del risultato analitico aumenta all'aumentare del numero di campioni prelevati ed analizzati, in particolare se tali campioni derivano da punti diversi del materiale di partenza. Per quanto riguarda i suoli contaminati, l'allegato 2 del D.M. 471/99 indica le procedure di riferimento per il prelievo e l'analisi dei campioni. Anche i capitoli introduttivi ai metodi EPA contengono indicazioni sulle corrette procedure di campionamento.

Le caratteristiche di un metodo di analisi

Un metodo di analisi affidabile deve in primo luogo fornire risultati accurati e precisi. L'affidabilità e le caratteristiche del metodo sono inoltre definite attraverso i seguenti parametri:

- la sensibilità
- il limite di rivelabilità
- l'intervallo dinamico (lineare)
- la specificità e la selettività
- la robustezza.

La sensibilità

La sensibilità di un metodo è data dal rapporto

$$S = \frac{\Delta y}{\Delta C}$$

Dove Δy è la variazione della risposta per una variazione di concentrazione ΔC . Essa rappresenta quindi il segnale misurato per una concentrazione unitaria.

La sensibilità corrisponde alla pendenza della curva di calibrazione (vedi figura 2).

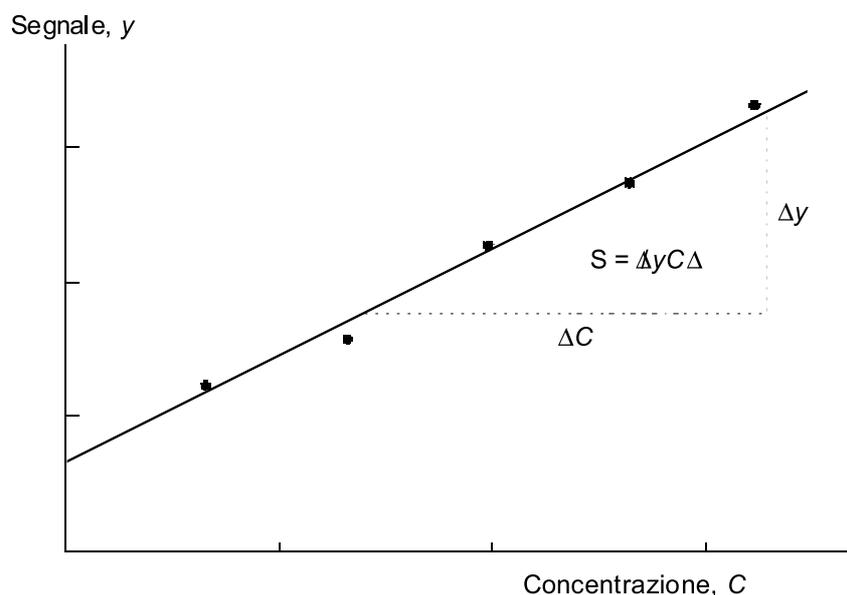


Figura 2: Pendenza della curva di calibrazione e sensibilità.

Il limite di rivelabilità

Il concetto di limite di rivelabilità non è ancora stato definito in modo univoco.

L'IRSA (Istituto di Ricerca sulle Acque) nel manuale di "Metodi analitici per le acque" propone la seguente definizione: il limite di rivelabilità di un metodo di analisi è il valore minimo delle grandezze da misurare (quantità o concentrazione) che dà luogo ad un risultato che ha una certa probabilità (generalmente il 95%) di essere valutato statisticamente maggiore del risultato che si sarebbe ottenuto se in quello stesso campione la grandezza avesse avuto valore zero (bianco, fondo).

Il limite di rivelabilità di un metodo secondo la precedente definizione si calcola con la formula

$$L_R = ts_0 + ts_L = t(s_0 + s_L)$$

dove t è il coefficiente di Student per un livello di probabilità del 95% (riportato in tabella 1), s_0 e s_L sono le stime delle deviazioni standard del risultato per un livello della grandezza pari a zero e a L_R rispettivamente. Poiché solitamente $s_0 = s_L$ la formula si semplifica in

$$L_R = 2ts_0$$

L'IRSA indica anche una seconda formula per il calcolo del limite di rivelabilità:

$$L_R = x_b + 3s_b$$

Dove x_b è il valore medio del bianco e s_b è la stima della deviazione standard della sua misura.

L'EPA (Environmental Protection Agency) definisce il "limite di rivelabilità del metodo" (MDL) come la minima concentrazione di sostanza che può essere misurata e riportata con livello di confidenza del 99% che la concentrazione di analita sia maggiore di zero.

Si calcola moltiplicando il coefficiente t (unilaterale, livello di confidenza del 99%) per la deviazione standard ottenuta da un minimo di tre analisi sulla matrice di interesse addizionata di una quantità di analita a concentrazione 3-5 volte superiore al limite di rivelabilità stimato. Per stimare il limite di rivelabilità, si considera la concentrazione corrispondente ad un rapporto segnale-rumore pari a 2,5 – 5 oppure alla regione della curva di calibrazione in cui c'è una variazione significativa di sensibilità (cioè un'interruzione nella pendenza della curva).

L'American Public Health Association (APHA), l'American Water Works Association (AWWA) e la Water Environment Federation (WEF), negli "Standard Methods for the Examination of Waters and Wastewaters" distinguono varie tipologie di limite di rivelabilità:

- limite di rivelabilità strumentale (IDL): la concentrazione di analita che produce un segnale maggiore di 3 volte la deviazione standard del rumore medio o quella di uno standard che produce un segnale pari a 5 volte il rapporto segnale-rumore. Uno strumento produce un segnale (rumore) anche in assenza di campione o quando si analizza un bianco. Poiché ogni programma di controllo di qualità richiede frequenti analisi del bianco, il suo valore medio e la sua deviazione standard diventano ben note;
- limite inferiore di rivelabilità (LLD o LOD): la concentrazione del costituente in acqua pura che per il 99% delle misure dia un segnale rivelabile. Si determina con misure ripetute di un campione a concentrazione molto bassa, non maggiore di 5 volte l'IDL. Il LLD è pari a $2 \times 1,645 \times s$, dove s è la deviazione standard di tale campione;
- limite di rivelabilità del metodo (MDL): la concentrazione di costituente che, trattata secondo l'intero metodo di analisi, produce un segnale con il 99% di probabilità di essere diverso dal bianco. Per determinare l'MDL si aggiunge il costituente all'acqua, od alla matrice di interesse, a concentrazione vicina all'MDL stimato. Per sette repliche di questo campione, l'MDL è pari a $3,14 \times s$, dove s è la deviazione standard delle sette repliche (il valore 3,14 corrisponde al coefficiente t per $7-1 = 6$ gradi di libertà). L'MDL può variare a seconda della matrice in gioco. Esso differisce dall'LLD perché i campioni sono sottoposti all'intero procedimento analitico;
- limite di quantificazione (LOQ): la concentrazione di costituente che produce un segnale sufficientemente maggiore del bianco in modo da poter essere rilevato da un buon laboratorio in condizioni di routine. Tipicamente è la concentrazione che produce un segnale $10 \times s$ volte superiore al segnale del bianco in acqua;
- limite pratico di quantificazione (PQL): il più basso livello ottenibile in più laboratori in condizioni di routine. Il PQL è significativo perché laboratori diversi produrranno MDL diversi anche usando la stessa procedura. Mentre l'LOQ è utile all'interno di un laboratorio, il PQL rappresenta un limite pratico e ottenibile di routine in laboratori diversi con una certezza relativamente elevata che ogni valore riportato sia affidabile. Il PQL è circa pari a 5 volte l'MDL.
- La relazione tra i vari limiti di rivelabilità è approssimativamente $IDL:LLD:MDL:LOQ:PQL = 1:2:4:10:20$. Infine, la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) definisce il limite di rivelabilità come la quantità di analita che produce un segnale uguale a tre volte la deviazione standard del fondo s_B , considerando una distribuzione normale e un livello di confidenza del 99,87%. Una concentrazione di analita inferiore a $3 \times s_B$ non può essere rilevata. Se la sua concentrazione è compresa tra $3 \times s_B$ e $10 \times s_B$ è possibile solo una rivelazione qualitativa. Una concentrazione superiore a $10 \times s_B$ può essere determinata quantitativamente. Il segnale del fondo viene misurato per una soluzione di bianco.

Vista la varietà (e spesso l'ambiguità) delle definizioni e dei metodi di calcolo, è importante, quando si riporta un limite di rivelabilità, indicare in che modo è stato calcolato.

La conoscenza del limite di rivelabilità di un metodo è utile sia per conoscere le potenzialità del metodo stesso, sia per esprimere un risultato di analisi non significativamente diverso da zero. In questo caso il risultato non viene riportato come zero ma viene indicato come inferiore al limite di rivelabilità.

Tabella 1: Valori del coefficiente *t* di Student per diversi gradi di libertà *f* e probabilità *P*

f	P = 0,90	P = 0,95	P = 0,975	P = 0,99	P = 0,995	P = 0,995
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	31,598
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460
120	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617	3,373
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291

L'intervallo dinamico

L'intervallo dinamico è l'intervallo di validità della dipendenza funzionale del segnale dalla concentrazione. Nella maggior parte dei casi si opera in condizioni di dipendenza lineare del segnale dalla concentrazione, e si parla quindi di intervallo dinamico lineare, che rappresenta l'intervallo di concentrazione entro il quale il segnale aumenta linearmente all'aumentare della concentrazione stessa. Si definisce inoltre un intervallo analitico o di lavoro, che rappresenta l'intervallo tra la concentrazione minima e massima nel quale si possono effettuare misure accurate.

La selettività e specificità

La selettività di un metodo di analisi indica in che misura la determinazione di un elemento è affetta da interferenze da parte di altri analiti o componenti della matrice.

Un metodo completamente selettivo è in grado di determinare l'analita senza interferenze e viene detto specifico.

Un esempio di segnale non selettivo è la sovrapposizione dei picchi di due o più analiti, ad esempio in un cromatogramma o in uno spettro ottico.

La robustezza

Un metodo viene definito robusto se la qualità dei risultati è indipendente da piccole variazioni nell'esecuzione della procedura.

A titolo di esempio, un metodo robusto è insensibile ad un aumento della temperatura di riscaldamento da 95 a 100°C, oppure ad un aumento di concentrazione di acido da 1,0 a 1,1 M, o infine ad una diminuzione di pH da 5,0 a 4,7.

L'errore

I risultati di qualunque analisi sono affetti da errore. Gli errori si possono suddividere in due categorie principali: errori sistematici ed errori casuali. Gli errori sistematici determinano l'accuratezza del risultato, mentre gli errori casuali determinano la sua precisione.

L'errore sistematico

L'errore sistematico (in inglese bias) o determinato è di entità costante, o variabile con una legge ben definita, ed ha cause ben definite ed individuabili. Ogni errore altera la grandezza misurata sempre nella stessa direzione (è cioè sempre positivo o negativo). Gli errori sistematici possono essere distinti in:

- errori dovuti al metodo. Dipendono dalle caratteristiche del metodo di analisi, e possono essere ad esempio dovuti a parziale solubilizzazione di un precipitato od alla presenza di reazioni collaterali;
- errori dovuti alle apparecchiature. Le apparecchiature possono essere non calibrate correttamente o non funzionare in modo adeguato: ad esempio una micropipetta non eroga volumi corretti;
- errori dovuti ai reagenti. Ad esempio un reagente può essere contaminato, oppure una soluzione standard può avere concentrazione inferiore a quella attesa a causa di perdite dell'analita per volatilizzazione o adsorbimento sulle pareti del contenitore;
- errori dovuti ai contenitori. I contenitori possono trattenere, rilasciare o far diffondere la specie di interesse;
- errori operativi. L'operatore può commettere errori durante l'esecuzione dell'analisi. Tali errori possono essere dovuti a negligenza (ad esempio scarsa accuratezza nel misurare pesi o volumi, mancato rispetto dei tempi di reazione) od incompetenza (ad esempio errata lettura di una buretta). Ci sono anche errori psicologici. Ad esempio per una determinazione in doppio, quando il risultato è compreso tra due successive tacche di una buretta o di uno strumento analogico, si tenderà a scegliere quello più in accordo

con quanto determinato nella prima analisi. Pertanto va sempre conservata molta oggettività nella valutazione dei dati sperimentali.

Gli errori sistematici possono essere minimizzati con la scelta di metodi di analisi validi, con la manutenzione delle apparecchiature, con l'utilizzo di reagenti di buona qualità e con la competenza dell'analista.

L'errore casuale

Gli errori casuali o indeterminati sono errori accidentali che possono portare a risultati sia in eccesso sia in difetto. Questi errori sono inevitabili: infatti ripetendo più volte la stessa analisi sullo stesso campione con lo stesso metodo, i risultati ottenuti saranno diversi e mostreranno fluttuazioni intorno al valore medio. Le cause di errori casuali sono dovute a tutti i fattori, noti ed ignoti, che influenzano la grandezza misurata e subiscono fluttuazioni nel corso del tempo. Si possono ad esempio avere fluttuazioni nell'alimentazione elettrica o nella temperatura. Tali fluttuazioni causano deviazioni positive o negative della grandezza misurata rispetto al valore medio. Nel caso più sfavorevole può accadere che in una singola misura tutti i fattori esercitino un'influenza nella stessa direzione, producendo un forte scostamento dal valore medio. Però è molto più probabile che gli effetti siano di segno in parte positivo e in parte negativo e quindi diano luogo ad una parziale cancellazione. Quindi gli errori indeterminati di piccola entità sono più probabili degli errori grandi.

Inoltre gli errori casuali, proprio perchè sono sia positivi sia negativi, tendono a compensarsi all'aumentare del numero di repliche.

Gli errori casuali non possono essere evitati, ma possono essere ridotti standardizzando le procedure di analisi ed operando con grande cura ed attenzione.

Tali errori possono essere trattati come dovuti a fluttuazioni statistiche.

L'ESPRESSIONE DEI RISULTATI

La distribuzione normale

Se si ripetono più misure sullo stesso campione nelle stesse condizioni, i risultati non saranno coincidenti, ma distribuiti casualmente intorno ad un valore medio a causa della presenza di errori sperimentali.

Se si effettuasse un numero infinito di misure, i valori sarebbero solitamente distribuiti secondo una distribuzione normale o gaussiana.

Ad esempio, si supponga di avere 16 valori di assorbanza di una soluzione (tabella 2), di dividerli in classi (risultati compresi in un intervallo prefissato detto ampiezza) e di calcolare la frequenza, cioè il numero di misure in ciascuna classe (tabella 3).

Tabella 2: Misure di assorbanza di una soluzione: 16 repliche

Misura	Valore	Misura	Valore
1	0,234	9	0,246
2	0,226	10	0,234
3	0,242	11	0,238
4	0,242	12	0,244
5	0,252	13	0,237
6	0,238	14	0,239
7	0,239	15	0,236
8	0,241	16	0,243

Tabella 3: Distribuzione di frequenza delle misure riportate in tabella 2

Classe	Frequenza
0,226-0,229	1
0,230-0,233	0
0,234-0,236	3
0,237-0,240	5
0,241-0,243	4
0,244-0,246	2
0,247-0,250	0
0,251-0,253	1

Si riporti in un istogramma la frequenza di ciascuna classe in funzione dell'ampiezza di classe (figura 3, parte A). Se il numero di repliche fosse aumentato all'infinito e contemporaneamente l'ampiezza di classe fosse ridotta, si otterrebbe una curva a forma di campana. La curva è chiamata distribuzione gaussiana o normale (figura 3, parte B). L'insieme di tutte le misure è chiamato popolazione.

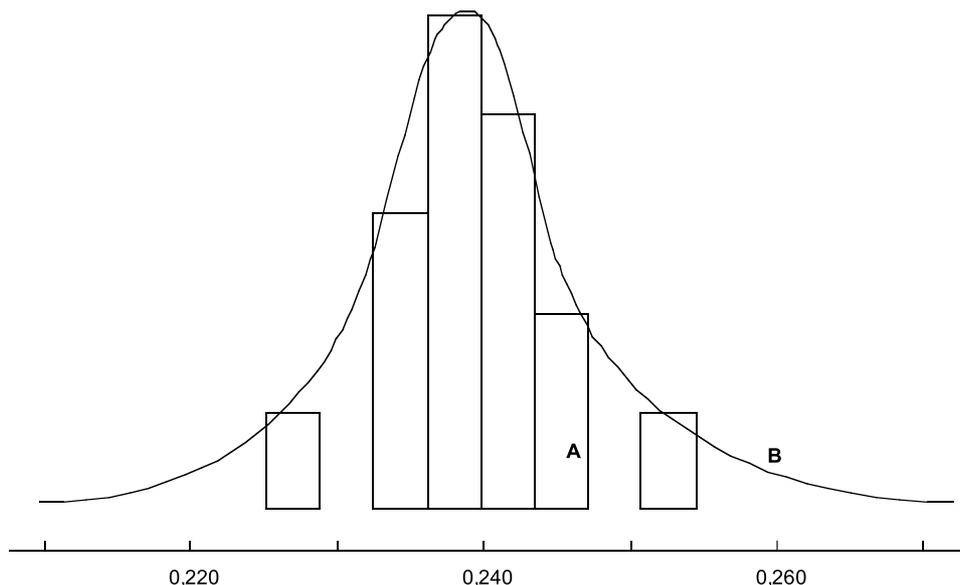


Figura 3: Variazione della frequenza di una misurazione replicata in funzione del numero di repliche. La porzione A si riferisce ai dati riportati in tabella 3, mentre la gaussiana B si riferisce ad un numero infinito di repliche.

Il massimo della curva rappresenta la media

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

dove x_i sono le singole misure e n è il loro numero.

In assenza di errori sistematici, μ rappresenta il valore vero della grandezza misurata.

Gli altri valori saranno distribuiti uniformemente intorno alla media: intuitivamente, infatti, ci sono molte cause che spingono in un senso o nell'altro il risultato sperimentale, per cui errori positivi o negativi sono ugualmente probabili. Inoltre gli scarti più grandi in valore assoluto si presentano con minor frequenza di quelli più piccoli: come indicato al punto 2.1.5.2, errori indeterminati di piccola entità sono più probabili degli errori grandi.

L'ampiezza della distribuzione normale, cioè la dispersione dei valori intorno alla media, è espressa mediante la deviazione standard

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \mu)^2}{n}}$$

Un altro parametro che esprime la dispersione dei valori è la varianza, pari a σ^2 .

In particolare, il 68,27% delle misure è compreso nell'intervallo $\mu \pm \sigma$, il 95,45% nell'intervallo $\mu \pm 2\sigma$, ed il 99,70% nell'intervallo $\mu \pm 3\sigma$.

La distribuzione gaussiana è espressa matematicamente dalla funzione:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

Esistono altri modelli di distribuzione di dati (ad esempio log-normale, di Poisson), che non verranno trattati in questa sede. Infatti nel caso in cui i dati della grandezza misurata diano luogo a valori di una serie continua, come avviene nella gran parte delle applicazioni della chimica analitica, si assume solitamente che essi seguano una distribuzione normale. Un esempio di grandezza che dà valori discontinui è il conteggio della radioattività, in cui lo strumento di misure fornisce un numero di impulsi, ossia solo numeri interi.

L'espressione dei risultati in un caso reale

Un analista non dispone di un numero infinito di misure e quindi non è possibile determinare il valore effettivo dei parametri statistici μ e σ .

Si immagina che i risultati dell'analisi rappresentino un campione statistico di una popolazione infinita di dati, le cui deviazioni dal valore medio sono regolate dalle leggi della statistica.

Si calcolano una stima della media e della deviazione standard. I valori veri dei due parametri sono espressi con lettere greche (μ e σ), mentre le loro stime sono indicate con lettere dell'alfabeto moderno (\bar{x} e s).

Il risultato dell'analisi verrà quindi espresso attraverso:

la stima della media

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

e la stima della deviazione standard

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

La stima della varianza avrà dunque valore s^2 .

Il valore medio che si ottiene è affetto da un'incertezza tanto maggiore quanto minore è il numero dei risultati.

ALTRE GRANDEZZE STATISTICHE

La (stima della) media e la (stima della) deviazione standard sono le due grandezze fondamentali per esprimere il risultato di un'analisi. Tuttavia sui dati si possono effettuare altre semplici, ma utili, elaborazioni statistiche.

La mediana

La mediana è il valore della variabile statistica tale che il numero delle osservazioni che presentano un valore inferiore sia uguale al numero di quelle che presentano un valore superiore.

Per il calcolo della mediana i risultati dell'analisi vanno disposti in ordine crescente. Per un numero dispari di valori la mediana è corrisponde al valore in posizione centrale, cioè quello in posizione $(n+1)/2$, dove n è il numero dei valori. Per un numero pari di valori la mediana viene calcolata dalla media aritmetica dei due valori centrali, nelle posizioni $n/2$ e $n/2 + 1$.

La mediana dà un'indicazione della posizione in cui si collocano i valori. Rispetto alla media, è meno sensibile alla presenza di un valore molto più piccolo o molto più grande degli altri. Per questo motivo è un parametro utile nelle analisi di tipo ambientale, nelle quali la presenza di un campione molto più (o meno) contaminato degli altri può influenzare fortemente il valore medio e le deduzioni che da esso si traggono.

La media ponderata

Talvolta a ciascuno dei valori da mediare viene assegnato un peso (w) che indica l'importanza da attribuire a ciascun valore nel calcolo della media.

La media ponderata è

$$\bar{x}_p = \frac{\sum_i x_i w_i}{\sum_i w_i}$$

Dove w_i è il peso assegnato al valore x_i .

La media ponderata non viene utilizzata per l'elaborazione di risultati di un'analisi chimica, ma può essere utile in altre applicazioni, ad esempio negli studi di analisi di rischio.

La deviazione standard relativa (RSD) o coefficiente di variazione (CV)

La deviazione standard relativa si esprime di solito in percentuale:

$$RSD\% = \frac{s}{x} * 100$$

Questo parametro è utile per confrontare direttamente la precisione di risultati di entità diversa. Ad esempio una concentrazione di 15 ± 1 ha una RSD del 6,7%, molto maggiore di una concentrazione 350 ± 1 (RSD 0,3%).

La deviazione standard della media

È rappresentata da

$$s_M = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Mentre la deviazione standard rappresenta l'incertezza relativa ad ogni singola determinazione, la deviazione della media esprime l'incertezza relativa alla medie aritmetica delle diverse determinazioni sperimentali.

L'intervallo di confidenza

L'intervallo di confidenza è l'intervallo intorno alla media entro il quale si deve trovare, con un certo grado di probabilità, il valore vero della grandezza misurata. Si valuta come

$$I.C. = \bar{x} \pm t \frac{s}{\sqrt{n}}$$

dove t è una variabile tabulata (tabella 1), detta coefficiente di Student, il cui valore dipende dal numero di gradi di libertà e dal livello di confidenza.

I gradi di libertà sono la differenza tra il numero di misure e il numero di vincoli a cui è sottoposto un parametro statistico. In chimica analitica l'unico vincolo è che la somma algebrica degli scarti dalla media sia uguale a zero. Pertanto i gradi di libertà sono n-1.

Il livello di confidenza esprime la probabilità che una certa affermazione sia vera. Ad esempio, in questo caso, per un livello di confidenza del 95% si ha il 95% di probabilità che il valore vero della grandezza sia

compreso tra $\bar{x} + t \frac{s}{\sqrt{n}}$ e $\bar{x} - t \frac{s}{\sqrt{n}}$.

Il livello di confidenza si indica spesso con P, che può essere espresso in valore assoluto od in percentuale. La probabilità totale è uguale a 1 (100%). Una grandezza complementare a P è il rischio α , pari a 1-P. Per P = 0,95 α vale 0.05.

Il valore di t da considerare nel calcolo corrisponde a n-1 gradi di libertà e $\alpha/2$ (infatti il rischio è diviso in due parti, cioè per P = 95% esiste il 2,5% di rischio che il valore vero sia inferiore all'intervallo e il 2,5% di rischio che sia superiore).

TEST STATISTICI

In molti casi è necessario trarre conclusioni statisticamente significative sui risultati di un'analisi e sul confronto di più dati analitici.

A questo scopo sono stati sviluppati test statistici che forniscono risposte a quesiti sull'accuratezza e riproducibilità dei risultati. I quesiti più comuni sono i seguenti:

- in una serie di misure sullo stesso campione, è lecito escludere dal calcolo della media e della deviazione standard un dato che si discosta dagli altri;
- nell'analisi di un campione a concentrazione nota, lo scarto rispetto al valore teorico può essere attribuito a fluttuazioni statistiche oppure alla presenza di errori determinati;
- i risultati dell'analisi di due campioni differiscono solo per la presenza di errori indeterminati, cioè si può affermare che i due campioni hanno la medesima concentrazione di analita, oppure le differenze sono indice di una diversa composizione dei campioni stessi.

In generale per rispondere a queste domande si definisce un'ipotesi e si valuta la sua significatività con un test. L'operazione si svolge in 5 stadi:

- definizione dell'ipotesi nulla e dell'ipotesi alternativa. L'ipotesi nulla prevede che le differenze riscontrate tra i valori che si confrontano non siano significative, cioè siano dovute solamente a fluttuazioni statistiche. Se si rifiuta l'ipotesi nulla, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa;
- scelta del test da adottare;
- decisione del livello di significatività, cioè della probabilità che l'ipotesi nulla sia falsa. A questo scopo si sceglie un livello di rischio α , di solito pari a 0,05 o 0,01 (cioè 5% o 1%). Ricordiamo che α è complementare a P , cioè $\alpha = 1 - P$;
- esecuzione dei calcoli previsti nel test;
- decisione se accettare o meno la validità dell'ipotesi nulla, in genere confrontando il valore ottenuto nel test con un valore tabulato.
- I test descritti di seguito sono validi per una distribuzione normale dei dati. Si riportano infine due test per valutare se i valori sperimentali seguano effettivamente questa distribuzione.

Lo scarto di un risultato

È possibile che in una serie di misure uno o più risultati siano molto più alti o molto più bassi del resto dei dati.

Per valutare se il risultato sia aberrante, e vada quindi scartato, o debba essere incluso nel calcolo della media, si possono eseguire i due test seguenti.

Il test di Grubbs

L'ipotesi nulla è: il valore sospetto non è da escludere dalle elaborazioni dei dati.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale il valore sospetto è da escludere.

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza T

$$T = \frac{|\bar{x} - x^*|}{s}$$

dove x^* è il valore sospetto.

La media e la deviazione standard sono calcolate considerando tutti i valori.

Si confronta il valore di T calcolato con il valore tabulato (per n dati e per $1-\alpha$). I valori di T sono riportati in tabella 4.

Se T calcolato è minore di T tabulato, l'ipotesi nulla deve essere accettata. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che x^* è un dato anomalo e deve essere scartato.

Ovviamente i risultati da confrontare devono provenire da un medesimo campione, o da campioni analoghi: in caso contrario, soprattutto negli studi ambientali, concentrazioni molto alte o molto basse di contaminante possono indicare la presenza di aree contaminate o incontaminate, quindi non possono essere scartati arbitrariamente.

Esempio

La determinazione della concentrazione di zinco in un suolo ha fornito i seguenti risultati (mg/kg):

280 277 270 285 330 276 291

Ipotesi nulla: il valore 330 non è un dato anomalo e non va escluso dalle elaborazioni.

Livello di significatività: 1%.

Media di tutti i valori: 287 Deviazione standard di tutti i valori: 20

Calcolo di T:

$$T = \frac{|287 - 330|}{20} = 2,15$$

Valore di T tabulato per $n=7$ e $1-\alpha=0,99$: 2,10

Il valore calcolato è maggiore del valore tabulato: pertanto si accetta l'ipotesi alternativa e il valore 330 viene considerato anomalo.

Tabella 4: Valori di T per il test di Grubbs (n= numero di misure)

n	T (0,95)	T (0,99)
3	1,15	1,16
4	1,46	1,49
5	1,67	1,75
6	1,82	1,94
7	1,94	2,10
8	2,03	2,22
9	2,11	2,32
10	2,18	2,41
12	2,29	2,55
15	2,41	2,71
20	2,56	2,88
30	2,75	3,10
40	2,87	3,24
50	2,96	3,34

Il test di Dixon

L'ipotesi nulla è: il dato sospetto non è da escludere dalle elaborazioni dei dati.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale il valore sospetto è da escludere.

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si riportano i dati in ordine crescente. Se il valore sospetto più basso è x_1 e quello più alto è x_n , si calcolano i valori di Q come

$$Q_1 = \frac{|x_2 - x_1|}{|x_n - x_1|} \quad \text{e} \quad Q_2 = \frac{|x_n - x_{n-1}|}{|x_n - x_1|}$$

Si confronta il valore di Q con il valore tabulato (per n dati e per $1-\alpha$). I valori di Q sono riportati in tabella 5.

Se Q calcolato è minore di Q tabulato (per n dati e $1-\alpha$), l'ipotesi nulla deve essere accettata. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che il valore sospetto è un dato anomalo e deve essere scartato.

Anche per questo test, come indicato nel test di Grubbs, i risultati da confrontare devono provenire da un medesimo campione, o da campioni analoghi.

Esempio

Si considerano gli stessi dati dell'esempio precedente (test di Grubbs) che vengono scritti in ordine crescente:

270 276 277 280 285 291 330

Ipotesi nulla: il valore 330 non è un dato anomalo e non va escluso dalle elaborazioni.

Livello di significatività: 1%.

Calcolo di Q:

$$Q = \frac{|330 - 291|}{|330 - 270|} = 0.65$$

Valore di Q tabulato per n=7 e 1- α =0,99: 0,64

Il valore calcolato è maggiore del valore tabulato: pertanto si accetta l'ipotesi alternativa e il valore 330 viene considerato anomalo.

Tabella 5: Valori di Q per il test di Dixon (n= numero di misure)

n	Q (0,95)	Q (0,99)
3	0.941	0.,988
4	0.,765	0.,889
5	0.,642	0.,780
6	0.,560	0.,698
7	0.,507	0.,637
8	0.,468	0.,590
9	0.,437	0.,555
10	0.,412	0.,527
11	0.,392	0.,502
12	0.,376	0.,482
13	0.,361	0.,465
14	0.,349	0.,450
15	0.,338	0.,438
20	0.,300	0.,391
25	0.,277	0.,362
30	0.,260	0.,341

Il confronto di un valore medio con un valore vero

Per valutare se il valore medio ottenuto da un'analisi di un campione a concentrazione nota differisce dal valore atteso solo a causa di fluttuazioni statistiche, o se invece esistono errori sistematici, si può applicare il test t.

L'ipotesi nulla è: la differenza tra i due valori non è significativa, cioè è dovuta solo a fluttuazioni statistiche. Quindi $\mu = \bar{x}$.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale $\mu \neq \bar{x}$.

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza t:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \sqrt{n}$$

Si confronta il valore di t calcolato con il valore tabulato (per $1 - \alpha/2$ e n-1 gradi di libertà). I valori di t sono riportati in tabella 1.

Se t calcolato è minore di t tabulato l'ipotesi nulla deve essere accettata. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che il valore medio è diverso dal valore atteso.

In questo caso si applica un test bilaterale, cioè non si ipotizza a priori se \bar{x} è maggiore o minore di μ . È importante rilevare come le tabelle numeriche che riportano i valori di t possono riferirsi a livelli di confidenza bilaterali o unilaterali. La tabella 1 è di tipo unilaterale, e per questo motivo il test sopra descritto prescrive di riferirsi, per un livello di significatività α , ad un valore di t corrispondente a $1 - \alpha/2$. Se si utilizza un testo che riporta tabelle con livelli di confidenza bilaterali, il valore da cercare corrisponde a $1 - \alpha$. Si può riconoscere il tipo di tabella, se non è indicato nel testo, ricordando che i valori indicati in tabella 1 per $P = 0,95$ e $P = 0,975$ sono invece riferiti a $P = 0,90$ e $0,95$ per una tabella bilaterale.

Esempio

La concentrazione di cadmio indicata per un campione di suolo certificato è 2,0 mg/kg. Il campione viene analizzato; si effettuano 3 determinazioni e si ottiene un valore medio di 1,7 mg/kg, con una deviazione standard di 0,2.

Ipotesi nulla: il valore di 1,7 non differisce significativamente dal valore certificato di 2,0.

Livello di significatività: 5%.

Calcolo di t

$$t = \frac{|1,7 - 2,0|}{0,2} \sqrt{3} = 2,598$$

Valore di t tabulato per $1 - \alpha/2 = 0,975$ e 2 gradi di libertà: 4,303.

Il valore calcolato è minore del valore tabulato: pertanto si accetta l'ipotesi nulla e si considera che la differenza tra la concentrazione misurata e quella certificata non siano significative.

Il test unilaterale

In certi casi è più conveniente effettuare un test unilaterale, ad esempio per valutare se un valore medio supera un determinato valore limite. In questo caso l'ipotesi nulla è $\bar{x} \leq \mu$ e l'ipotesi alternativa è $\bar{x} \geq \mu$. Il valore tabulato di t viene preso (in una tabella di tipo unilaterale come la tabella 1) in corrispondenza di $1-\alpha$ e $n-1$ gradi di libertà.

Il confronto tra risultati

Può essere interessante stabilire se i risultati dell'analisi di due campioni di suolo differiscano solo per la dispersione delle misure, e quindi possano essere considerati "uguali", oppure se i due campioni sono effettivamente diversi.

Per confrontare due valori medi si utilizza il cosiddetto test t esteso.

L'ipotesi nulla è: la differenza tra i due valori non è significativa, cioè è dovuta solo a fluttuazioni statistiche. Quindi $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza t (t di Student):

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_d} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}}$$

dove n_1, n_2 = numero di determinazioni per le medie \bar{x}_1 e \bar{x}_2 e s_d = deviazione standard pesata:

$$s_d = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Si confronta il valore di t calcolato con il valore tabulato per $(n_1 + n_2 - 2)$ gradi di libertà e $1-\alpha/2$.

I valori di t sono riportati in tabella 1.

Se t calcolato è minore di t tabulato l'ipotesi nulla deve essere accettata. Si ha quindi una certa probabilità (definita dal livello di significatività) che $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che le due medie sono diverse.

Questo test è applicabile solo quando si può assumere che s_1 e s_2 sono uguali per un certo livello di confidenza. L'uguaglianza delle varianze viene esaminata con il test F (v. 2.4.4).

Esempio

Viene determinato il contenuto di benzo(a)pirene in due campioni di suolo. Si ottengono i seguenti risultati:

campione 1: $0,685 \pm 0,033$ mg/kg numero di misure $n_1 = 5$

campione 2: $0,712 \pm 0,028$ mg/kg numero di misure $n_2 = 6$

Ipotesi nulla: le concentrazioni di benzo(a)pirene nei due campioni non differiscono significativamente.

Livello di significatività: 5%.

Calcolo di s_d :

$$\sqrt{\frac{(5-1) \cdot 0,033^2 + (6-1) \cdot 0,028^2}{5+6-2}} = 0,0303$$

Calcolo di t :

$$t = \frac{|0,685 - 0,712|}{0,0303} \sqrt{\frac{5 \cdot 6}{5+6}} = 1,472$$

Valore di t tabulato per $5 + 6 - 2 = 9$ gradi di libertà e $1 - \alpha/2 = 0,975$: 2,262.

Il valore calcolato è minore del valore tabulato: pertanto si accetta l'ipotesi nulla e si considera che la differenza di concentrazione tra i due campioni non è significativa. Questo non implica che i due campioni siano uguali: potrebbero avere diversa composizione ma soltanto uguale contenuto di benzo(a)pirene.

Il test t generale

Nel caso in cui la differenza tra le varianze non sia trascurabile, si applica il test t generale, che prevede la formula:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Il numero di gradi di libertà è calcolato come :

$$f = \frac{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}{\frac{(s_1^2/n_1)^2}{n_1-1} + \frac{(s_2^2/n_2)^2}{n_2-1}}$$

Il confronto tra varianze (test F di Fischer-Snedecor)

Il test F permette di stabilire se le varianze di due campioni differiscono solo per fluttuazioni statistiche o se invece sono significativamente diverse.

L'ipotesi nulla è: la differenza tra i due valori non è significativa, cioè è dovuta solo a fluttuazioni statistiche. Quindi $s_1^2 = s_2^2$.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale $s_1^2 \neq s_2^2$.

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si calcola la grandezza F:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

con $s_1^2 > s_2^2$.

Si confronta il valore di F calcolato con il valore tabulato (per α , $f_1 = n_1 - 1$, $f_2 = n_2 - 1$). I valori di F sono riportati in tabella 6.

Tabella 6: Valori F di Snedecor, rispettivamente per una probabilità di $P = 0,99, 0,975$ e $0,95$, in funzione dei gradi di libertà n_1 e n_2
 $P = 0,99$

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	5	8	12	20	40	120	∞
1	4052	4999,5	5403	5764	5982	6106	6209	6287	6339	6366
2	98,50	99,00	99,17	99,30	99,37	99,42	99,45	99,47	99,49	99,50
3	34,12	30,82	29,46	28,24	27,49	27,05	26,69	26,41	20,22	26,13
4	21,20	18,00	16,69	15,52	14,80	14,37	14,02	13,75	13,56	13,46
5	16,26	13,27	12,06	10,97	10,29	9,89	9,55	9,29	9,11	9,02
6	13,75	10,92	9,78	8,75	8,10	7,72	7,40	7,14	6,97	6,88
7	12,25	9,55	8,45	7,46	6,84	6,47	6,10	5,91	5,74	5,65
8	11,26	8,65	7,59	6,63	6,03	5,67	5,36	5,12	4,95	4,86
9	10,56	8,02	6,99	6,06	5,47	5,11	4,81	4,57	4,40	4,31
10	10,04	7,56	6,55	5,64	5,06	4,71	4,41	4,17	4,00	3,91
11	9,65	7,21	6,22	5,32	4,74	4,40	4,10	3,86	3,69	3,60
12	9,33	6,93	5,95	5,06	4,50	4,10	3,86	3,62	3,45	3,36
13	9,07	6,70	5,74	4,86	4,30	3,96	3,66	3,43	3,25	3,17
14	8,86	6,51	5,56	4,69	4,14	3,80	3,51	3,27	3,09	3,09
15	8,68	6,36	5,42	4,56	4,00	3,67	3,37	3,13	2,96	2,87
16	8,53	6,23	5,29	4,44	3,89	3,55	3,26	3,02	2,84	2,75
17	8,40	6,11	5,18	4,34	3,79	3,46	3,10	2,92	2,75	2,65
18	8,29	6,01	5,09	4,25	3,71	3,37	3,08	2,84	2,66	2,57
19	8,18	5,93	5,01	4,17	3,63	3,30	3,00	2,76	2,58	2,49
20	8,10	5,85	4,94	4,10	3,56	3,23	2,94	2,69	2,52	2,42
21	8,02	5,78	4,87	4,04	3,51	3,17	2,88	2,64	2,46	2,36
22	7,95	5,72	4,82	3,99	3,45	3,12	2,83	2,58	2,40	2,31
23	7,88	5,66	4,76	3,94	3,41	3,07	2,78	2,54	2,35	2,26
24	7,82	5,61	4,72	3,90	3,36	3,03	2,74	2,49	2,31	2,21
25	7,77	5,57	4,68	3,85	3,32	2,99	2,70	2,45	2,27	2,17
26	7,72	5,53	4,64	3,82	3,29	2,96	2,66	2,42	2,23	2,13
27	7,68	5,49	4,60	3,78	3,26	2,93	2,63	2,38	2,20	2,10
28	7,64	5,45	4,57	3,75	3,23	2,90	2,60	2,35	2,17	2,06
29	7,60	5,42	4,54	3,73	3,20	2,87	2,57	2,33	2,14	2,03
30	7,56	5,39	4,51	3,70	3,17	2,84	2,55	2,30	2,11	2,01
40	7,31	5,18	4,31	3,51	2,99					
60	7,08	4,98	4,13	3,34	2,82					
120	8,85	4,79	3,95	3,17	2,66					
∞	6,63	4,61	3,78	3,02	2,51					

P = 0,975

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	5	8	12	20	40	120	∞
1	647,8	799,5	864,2	921,8	956,7	976,7	993,0	1006	1014	1018
2	38,51	39,00	39,17	39,30	39,37	39,41	39,45	39,47	39,49	39,50
3	17,44	16,04	15,44	14,88	14,54	14,34	14,17	14,04	13,95	13,90
4	12,22	10,65	9,98	9,36	8,98	8,75	8,56	8,41	8,31	8,26
5	10,01	8,43	7,76	7,15	6,76	6,52	6,33	6,18	6,07	6,02
6	8,81	7,26	6,60	5,99	5,60	5,37	5,17	5,01	4,90	4,85
7	8,07	6,54	5,89	5,29	4,90	4,67	4,47	4,31	4,20	4,14
8	7,57	6,06	5,42	4,82	4,43	4,20	4,00	3,84	3,73	3,67
9	7,21	5,71	5,08	4,48	4,10	3,87	3,67	3,51	3,39	3,33
10	6,94	5,46	4,83	4,24	3,85	3,62	3,42	3,26	3,14	3,08
11	6,72	5,26	4,63	4,04	3,66	3,43	3,23	3,06	2,94	2,88
12	6,55	5,10	4,47	3,89	3,51	3,28	3,07	2,91	2,79	2,72
13	6,41	4,97	4,35	3,77	3,39	3,15	2,95	2,78	2,66	2,60
14	6,30	4,86	4,24	3,66	3,29	3,05	2,84	2,67	2,55	2,49
15	6,20	4,77	4,15	3,58	3,20	2,96	2,76	2,59	2,46	2,40
16	6,12	4,69	4,08	3,50	3,12	2,89	2,68	2,51	2,38	2,32
17	6,04	4,62	4,01	3,44	3,06	2,82	2,62	2,44	2,32	2,25
18	5,98	4,56	3,95	3,38	3,01	2,77	2,56	2,38	2,26	2,19
19	5,92	4,51	3,90	3,33	2,96	2,72	2,51	2,33	2,20	2,13
20	5,87	4,46	3,86	3,29	2,91	2,68	2,46	2,29	2,16	2,09
21	5,83	4,42	3,82	3,25	2,87	2,64	2,42	2,25	2,11	2,04
22	5,79	4,38	3,78	3,22	2,84	2,60	2,39	2,21	2,08	2,00
23	5,75	4,35	3,75	3,18	2,81	2,57	2,36	2,18	2,04	1,97
24	5,72	4,32	3,72	3,15	2,78	2,54	2,33	2,15	2,01	1,94
25	5,69	4,29	3,69	3,13	2,75	2,51	2,30	2,12	1,98	1,91
26	5,66	4,27	3,67	3,10	2,73	2,49	2,28	2,09	1,95	1,88
27	5,63	4,24	3,65	3,08	2,71	2,47	2,25	2,07	1,93	1,85
28	5,61	4,22	3,63	3,06	2,69	2,45	2,23	2,05	1,91	1,83
29	5,59	4,20	3,61	3,04	2,67	2,43	2,21	2,03	1,89	1,81
30	5,57	4,18	3,59	3,03	2,65	2,41	2,20	2,01	1,87	1,79
40	5,42	4,05	3,46	2,90	2,53					
60	5,29	3,93	3,34	2,79	2,41					
120	5,15	3,80	3,23	2,67	2,30					
∞	5,02	3,69	3,12	2,57	2,19					

P = 0,95

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	5	8	12	20	40	120	∞
1	161,4	199,5	215,7	230,2	238,9	243,9	248,0	251,1	253,3	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,41	19,45	19,47	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,74	8,66	8,59	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	5,91	5,80	5,72	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,68	4,56	4,46	4,40	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,00	3,87	3,77	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,58	3,44	3,34	3,27	3,23
8	5,34	4,46	4,07	3,84	3,69	3,28	3,15	3,04	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,07	2,94	2,83	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	2,91	2,77	2,66	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	2,79	2,65	2,53	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	2,69	2,54	2,43	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,60	2,46	2,34	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,53	2,39	2,27	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,48	2,33	2,20	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,42	2,28	2,15	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,38	2,23	2,10	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,34	2,19	2,06	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,31	2,16	2,03	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,28	2,12	1,99	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,25	2,10	1,96	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,23	2,07	1,94	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,20	2,05	1,91	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,18	2,03	1,89	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,16	2,01	1,87	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,15	1,99	1,85	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,13	1,97	1,84	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,12	1,96	1,82	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,10	1,94	1,81	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,09	1,93	1,79	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45					
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37					
120	3,99	3,07	2,68	2,45	2,29					
∞	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21					

Se F calcolato è minore di F tabulato l'ipotesi nulla deve essere accettata. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che le due varianze non differiscono significativamente.

Esempio

La concentrazione di policlorobifenili (PCB) in un campione di suolo viene determinata in due laboratori. Le stime delle deviazioni standard dei risultati ottenuti sono:

laboratorio 1: 0,14 numero di misure $n_1 = 4$

laboratorio 2: 0,08 numero di misure $n_2 = 5$

Ipotesi nulla: le varianze dei due gruppi di analisi non differiscono significativamente.

Calcolo di F

$$F = \frac{0,14^2}{0,08^2} = 3,06$$

Valore di F tabulato per $\alpha = 0,05$, $f_1 = 3$, $f_2 = 4$: 6,59

Il valore calcolato è minore del valore tabulato: pertanto si accetta l'ipotesi nulla e le due varianze sono considerate non significativamente differenti.

La distribuzione dei dati

I test sopra descritti sono validi nel caso di una distribuzione normale dei dati. Per valutare se i risultati sperimentali a disposizione seguono effettivamente tale distribuzione si può ricorrere ad appositi test. In questa sede si descriverà il test di Shapiro-Wilk. Un altro test molto noto che ha la stessa finalità è il test χ^2 , o test di Pearson, che però è applicabile solo se si dispone di un numero elevato di dati. Esiste anche il test di D'Agostino, che può essere utilizzato se il numero di dati è superiore a 50.

Il test di Shapiro-Wilk

L'ipotesi nulla è: i dati appartengono ad una popolazione avente una distribuzione normale.

Se l'ipotesi nulla verrà scartata, si dovrà accettare l'ipotesi alternativa, secondo la quale i dati appartengono ad una popolazione la cui distribuzione non è normale.

Si definisce un livello di significatività α (di solito del 5% o dell'1%).

Si dispongono i risultati in ordine crescente.

Si calcola la grandezza W

$$W = \frac{(\sum a_j d_j)^2}{D}$$

dove

$D = \sum (x_i - \bar{x})^2$, con x_i = valore della singola misura e \bar{x} = valore medio

$d_j = x_{(n-j+1)} - x_j$; cioè $d_1 = x_n - x_1$, $d_2 = x_{n-1} - x_2$, ecc.

$j = 1, 2, 3, \dots, n/2$ se n (numero di misure) è pari

$j = 1, 2, 3, \dots, (n-1)/2$ se n è dispari

a_j è un valore tabulato (tabella 7).

Tabella 7: Valori dei coefficienti a_j per il test di Shapiro-Wilk

$j \setminus n$	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0,7071	0,7071	0,6872	0,6646	0,6431	0,6233	0,6052	0,5858	0,5739
2	-	0,0000	0,1667	0,2413	0,2806	0,3031	0,3164	0,3244	0,3291
3	-	-	-	0,0000	0,0875	0,1401	0,1743	0,1976	0,2141
4	-	-	-	-	-	0,0000	0,0561	0,0947	0,1224
5	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0399

$j \setminus n$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	0,5601	0,5475	0,5359	0,5251	0,5150	0,5056	0,4968	0,4886	0,4808	0,4734
2	0,3315	0,3325	0,3325	0,3318	0,3306	0,3290	0,3273	0,3253	0,3232	0,3211
3	0,2260	0,2347	0,2412	0,2460	0,2495	0,2521	0,2540	0,2553	0,2561	0,2565
4	0,1429	0,1586	0,1707	0,1802	0,1878	0,1939	0,1988	0,2027	0,2059	0,2085
5	0,0695	0,0922	0,1099	0,1240	0,1353	0,1447	0,1524	0,1587	0,1641	0,1686
6	0,0000	0,0303	0,0539	0,0727	0,0880	0,1005	0,1109	0,1197	0,1271	0,1334
7	-	-	0,0000	0,0240	0,0433	0,0593	0,0725	0,0837	0,0932	0,1013
8	-	-	-	-	0,0000	0,0196	0,0359	0,0496	0,0612	0,0711
9	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0163	0,0303	0,0422
10	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0140

$j \setminus n$	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
1	0,4643	0,4590	0,4542	0,4493	0,4450	0,4407	0,4366	0,4328	0,4291	0,4254
2	0,3185	0,31576	0,3126	0,3098	0,3069	0,3043	0,3018	0,2992	0,2968	0,2944
3	0,2578	0,2571	0,2563	0,2554	0,2543	0,2533	0,2522	0,2510	0,2499	0,2487
4	0,2119	0,2131	0,2139	0,2145	0,2148	0,2151	0,2152	0,2151	0,2150	0,2148
5	0,1736	0,1764	0,1787	0,1807	0,1822	0,1836	0,1848	0,1857	0,1864	0,1870
6	0,1399	0,1443	0,1480	0,1512	0,1539	0,1563	0,1584	0,1601	0,1616	0,1630
7	0,1092	0,1150	0,1201	0,1245	0,1283	0,1316	0,1346	0,1372	0,1395	0,1415
8	0,0804	0,0978	0,0941	0,0997	0,1046	0,1089	0,1128	0,1162	0,1192	0,1219
9	0,0530	0,0618	0,0696	0,0764	0,0823	0,0876	0,0923	0,0965	0,1002	0,1036
10	0,0263	0,0368	0,0459	0,0539	0,0610	0,0672	0,0728	0,0778	0,0822	0,0862
11	0,0000	0,0122	0,0228	0,0321	0,0403	0,0476	0,0540	0,0598	0,0650	0,0697
12	-	-	0,0000	0,0107	0,0200	0,0284	0,0358	0,0424	0,0483	0,0537
13	-	-	-	-	0,0000	0,0094	0,0178	0,0253	0,0320	0,0381
14	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0084	0,0159	0,0227
15	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0076

j	n	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
1		0,4220	0,4188	0,4156	0,4127	0,4096	0,4068	0,4040	0,4015	0,3989	0,3964
2		0,2921	0,2898	0,2876	0,2854	0,2834	0,2813	0,2794	0,2774	0,2755	0,2737
3		0,2475	0,2462	0,2451	0,2439	0,2427	0,2415	0,2403	0,2391	0,2380	0,2368
4		0,2145	0,2141	0,2137	0,2132	0,2127	0,2121	0,2116	0,2110	0,2104	0,2098
5		0,1874	0,1878	0,1880	0,1882	0,1883	0,1883	0,1883	0,1881	0,1880	0,1878
6		0,1641	0,1651	0,1660	0,1667	0,1673	0,1678	0,1683	0,1686	0,1689	0,1691
7		0,1433	0,1449	0,1463	0,1475	0,1487	0,1496	0,1505	0,1513	0,1520	0,1526
8		0,1243	0,1265	0,1284	0,1301	0,1317	0,1331	0,1344	0,1356	0,1366	0,1376
9		0,1066	0,1093	0,1118	0,1140	0,1160	0,1179	0,1196	0,1211	0,1225	0,1237
10		0,0899	0,0931	0,0961	0,0988	0,1013	0,1036	0,1056	0,1075	0,1092	0,1108
11		0,0739	0,0777	0,0812	0,0844	0,0873	0,0900	0,0924	0,0947	0,0967	0,0986
12		0,0585	0,0629	0,0669	0,0706	0,0739	0,0770	0,0798	0,0824	0,0848	0,0870
13		0,0435	0,0485	0,0530	0,0572	0,0610	0,0645	0,0677	0,0706	0,0733	0,0759
14		0,0289	0,0344	0,0395	0,0441	0,0484	0,0523	0,0559	0,0592	0,0622	0,0651
15		0,0144	0,0206	0,0262	0,0314	0,0361	0,0404	0,0444	0,0481	0,0515	0,0546
16		0,0000	0,0068	0,0131	0,0187	0,0239	0,0287	0,0331	0,0372	0,0409	0,0444
17		-	-	0,0000	0,0062	0,0119	0,0172	0,0220	0,0264	0,0305	0,0343
18		-	-	-	-	0,0000	0,0057	0,0110	0,0158	0,0203	0,0244
19		-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0053	0,0101	0,0146
20		-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0049

j	n	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
1		0,3940	0,3917	0,3894	0,3872	0,3850	0,3830	0,3808	0,3789	0,3770	0,3751
2		0,2719	0,2701	0,2684	0,2667	0,2651	0,2635	0,2620	0,2604	0,2589	0,2574
3		0,2357	0,2345	0,2334	0,2323	0,2313	0,2302	0,2291	0,2281	0,2271	0,2260
4		0,2091	0,2085	0,2078	0,2072	0,2065	0,2058	0,2052	0,2045	0,2038	0,2032
5		0,1876	0,1874	0,1871	0,1868	0,1865	0,1862	0,1859	0,1855	0,1851	0,1847
6		0,1693	0,1694	0,1695	0,1695	0,1695	0,1695	0,1695	0,1693	0,1692	0,1691
7		0,1531	0,1535	0,1539	0,1542	0,1545	0,1548	0,1550	0,1551	0,1553	0,1554
8		0,1384	0,1392	0,1398	0,1405	0,1410	0,1415	0,1420	1,1423	0,1427	0,1430
9		0,1249	0,1259	0,1269	0,1278	0,1286	0,1293	0,1300	0,1306	0,1312	0,1317
10		0,1123	0,1136	0,1149	0,1160	0,1170	0,1180	0,1189	0,1197	0,1205	0,1212
11		0,1004	0,1020	0,1035	0,1049	0,1062	0,1073	0,1085	0,1095	0,1105	0,1113
12		0,0891	0,0909	0,0927	0,0943	0,0959	0,0972	0,0986	0,0998	0,1010	0,1020
13		0,0782	0,0804	0,0824	0,0842	0,0860	0,0876	0,0892	0,0906	0,0919	0,0932
14		0,0677	0,0701	0,0724	0,0745	0,0765	0,0783	0,0801	0,0817	0,0832	0,0846
15		0,0575	0,0602	0,0628	0,0651	0,0673	0,0694	0,0713	0,0731	0,0748	0,0764

16	0,0476	0,0506	0,0534	0,0560	0,0584	0,0607	0,0628	0,0648	0,0667	0,0685
17	0,0379	0,0411	0,0442	0,0471	0,0497	0,0522	0,0546	0,0568	0,0588	0,0608
18	0,0283	0,0318	0,0352	0,0383	0,0412	0,0439	0,0465	0,0489	0,0511	0,0532
19	0,0188	0,0227	0,0263	0,0296	0,0328	0,0357	0,0385	0,0411	0,0436	0,0459
20	0,0094	0,0136	0,0175	0,0211	0,0245	0,0277	0,0307	0,0335	0,0361	0,0386
21	0,0000	0,0045	0,0087	0,0126	0,0163	0,0197	0,0229	0,0259	0,0288	0,0314
22	-	-	0,0000	0,0042	0,0081	0,0118	0,0153	0,0185	0,0215	0,0244
23	-	-	-	-	0,0000	0,0039	0,0076	0,0111	0,0143	0,0174
24	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0037	0,01071	0,0104
25	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0000	0,0076

Si confronta il valore di W calcolato con il valore tabulato (per n dati e 1- α). I valori di W sono riportati in tabella 8.

Tabella 8: Valori di W in funzione di n e di α

n	α	0,01	0,02	0,05	0,10	0,50	0,90	0,95	0,98	0,99
3		0,753	0,756	0,767	0,789	0,959	0,998	0,999	1,000	1,000
4		0,687	0,707	0,748	0,792	0,935	0,987	0,992	0,996	0,997
5		0,686	0,715	0,762	0,806	0,927	0,979	0,986	0,993	0,993
6		0,713	0,743	0,788	0,826	0,927	0,974	0,981	0,986	0,989
7		0,730	0,760	0,803	0,838	0,928	0,972	0,979	0,985	0,988
8		0,749	0,778	0,818	0,851	0,932	0,972	0,978	0,984	0,987
9		0,764	0,791	0,829	0,859	0,935	0,972	0,978	0,984	0,986
10		0,781	0,806	0,842	0,869	0,938	0,972	0,978	0,983	0,986
11		0,792	0,817	0,850	0,876	0,940	0,973	0,979	0,984	0,986
12		0,805	0,828	0,859	0,883	0,943	0,973	0,979	0,984	0,986
13		0,814	0,837	0,866	0,889	0,945	0,974	0,979	0,984	0,986
14		0,825	0,846	0,874	0,895	0,947	0,975	0,980	0,984	0,986
15		0,835	0,855	0,881	0,901	0,950	0,975	0,980	0,984	0,987
16		0,844	0,863	0,887	0,906	0,952	0,976	0,981	0,985	0,987
17		0,851	0,869	0,892	0,910	0,954	0,977	0,981	0,985	0,987
18		0,858	0,874	0,897	0,914	0,956	0,978	0,982	0,986	0,988
19		0,863	0,879	0,901	0,917	0,957	0,978	0,982	0,986	0,988
20		0,868	0,884	0,905	0,920	0,959	0,979	0,983	0,986	0,988
21		0,873	0,888	0,908	0,923	0,960	0,980	0,983	0,987	0,989
22		0,878	0,892	0,911	0,926	0,961	0,980	0,984	0,987	0,989
23		0,881	0,895	0,914	0,928	0,962	0,981	0,984	0,987	0,989
24		0,884	0,898	0,916	0,930	0,963	0,981	0,984	0,987	0,989

25	0,888	0,901	0,918	0,931	0,964	0,981	0,985	0,988	0,989
26	0,891	0,904	0,920	0,933	0,965	0,982	0,985	0,988	0,989
27	0,894	0,906	0,923	0,935	0,965	0,982	0,985	0,988	0,990
28	0,896	0,908	0,924	0,936	0,966	0,982	0,985	0,988	0,990
29	0,898	0,910	0,926	0,937	0,966	0,982	0,985	0,988	0,990
30	0,900	0,912	0,927	0,939	0,967	0,983	0,985	0,988	0,990
31	0,902	0,914	0,929	0,940	0,967	0,983	0,986	0,988	0,990
32	0,904	0,915	0,930	0,941	0,968	0,983	0,986	0,988	0,990
33	0,906	0,917	0,931	0,942	0,968	0,983	0,986	0,989	0,990
34	0,908	0,919	0,933	0,943	0,969	0,983	0,986	0,989	0,990
35	0,910	0,920	0,934	0,944	0,969	0,984	0,986	0,989	0,990
36	0,912	0,922	0,935	0,945	0,970	0,984	0,986	0,989	0,990
37	0,914	0,924	0,936	0,946	0,970	0,984	0,987	0,989	0,990
38	0,916	0,925	0,938	0,947	0,971	0,984	0,987	0,989	0,990
39	0,917	0,927	0,939	0,948	0,971	0,984	0,987	0,989	0,991
40	0,919	0,928	0,940	0,949	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
41	0,920	0,929	0,941	0,950	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
42	0,922	0,930	0,942	0,951	0,972	0,985	0,987	0,989	0,991
43	0,923	0,932	0,943	0,951	0,973	0,985	0,987	0,990	0,991
44	0,924	0,933	0,944	0,952	0,973	0,985	0,987	0,990	0,991
45	0,926	0,934	0,945	0,953	0,973	0,985	0,988	0,990	0,991
46	0,927	0,935	0,945	0,953	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
47	0,928	0,936	0,946	0,954	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
48	0,929	0,937	0,947	0,954	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
49	0,929	0,937	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991
50	0,930	0,938	0,947	0,955	0,974	0,985	0,988	0,990	0,991

Se W calcolato è minore di W tabulato, l'ipotesi nulla deve essere accettata. In caso contrario, si accetta l'ipotesi alternativa, cioè si può affermare (con una certa probabilità determinata da α) che i dati non appartengono ad una popolazione con distribuzione normale.

Esempio

Sono state effettuate più determinazioni di piombo in un suolo e sono stati trovati i seguenti risultati (mg/kg):

89 101 95 98 85 103 100 88 90 83 99 105 104 88 92 97

Ipotesi nulla: i dati appartengono ad una popolazione con distribuzione normale.

Livello di significatività: 5%.

Si ordinano i dati in sequenza crescente:

83 85 88 88 89 90 92 95 97 98 99 100 101 103 104 105

Per calcolare $a_i d_i$ si può costruire una tabella:

i	x_i	i	x_i	d_i	a_i	$a_i d_i$
1	83	16	105	$105 - 83 = 22$	0,5056	11,123
2	85	15	104	$104 - 85 = 19$	0,3290	6,251
3	88	14	103	$103 - 88 = 15$	0,2521	3,782
4	88	13	101	$101 - 88 = 13$	0,1939	2,521
5	89	12	100	$100 - 89 = 11$	0,1447	1,592
6	90	11	99	$99 - 90 = 9$	0,1005	0,905
7	92	10	98	$98 - 92 = 6$	0,0593	0,356
8	95	9	97	$97 - 95 = 2$	0,0196	0,039

$$\Sigma a_i d_i = 26,569$$

Media di tutti i valori: 95

Si può dimostrare che $\Sigma(x_i - \bar{x})^2 = \Sigma x_i^2 - (\Sigma x_i)^2/n$

$$\Sigma x_i^2 = 144577$$

$$\Sigma x_i = 1517$$

$$D = 144577 - 1517^2/16 = 746$$

Calcolo di W:
$$W = \frac{26,569^2}{746} = 0,946$$

Valore di W calcolato per $n = 16$ e $\alpha = 0,05$: 0,981

Il valore calcolato è minore del valore tabulato: pertanto si accetta l'ipotesi nulla e si può affermare (con il 95% di probabilità) che i dati provengono da una popolazione normale.

L'analisi della varianza

L'analisi della varianza (ANOVA, ANalysis Of VAriance) è usata per esaminare misure che dipendono da uno o più effetti. Questi effetti sono causati da fattori (ad esempio laboratori diversi) i cui livelli sono chiamati gruppi. All'interno di ciascun gruppo sono presenti più misure (di uno stesso campione) caratterizzate da un valore medio \bar{x} .

L'analisi della varianza ad una via

Nel caso di un solo fattore si esegue l'analisi della varianza ad una via.

Si distingue, nella dispersione totale, la componente dovuta a fluttuazioni all'interno di un gruppo e quella che dipende dalle fluttuazioni esistenti tra un gruppo e l'altro.

Per valutare la presenza di differenze sistematiche tra i gruppi, si assume che ciascuna misura x_{ij} sia descritta dalla somma della media totale \bar{x} , la media di gruppo \bar{x}_i e l'errore casuale residuo e_{ij} :

$$x_{ij} = x_j + (\bar{x}_i - \bar{x}_t) + e_{ij}$$

dove x_{ij} = misura della replica i nel gruppo j .

Si valutano inizialmente le devianze, cioè le somme dei quadrati degli scarti dalla media. La devianza totale SS_t^2 (somma dei quadrati degli scarti dalla media generale) rappresenta la somma delle devianze tra i gruppi SS_g^2 e all'interno dei gruppi SS_r^2 .

$$SS_t^2 = SS_g^2 + SS_r^2$$

dove

$$SS_t^2 = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_t)^2$$

$$SS_g^2 = \sum_{j=1}^q n_j (\bar{x}_j - \bar{x}_t)^2 \quad \text{con} \quad \bar{x}_j = \frac{1}{n_j} \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij} \quad (\text{media dei valori all'interno di un gruppo}) \text{ e}$$

$$\bar{x}_t = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} x_{ij}$$

(media di tutti i valori)

$$SS_r^2 = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^{n_j} (x_{ij} - \bar{x}_j)^2$$

L'ipotesi nulla è: i gruppi appartengono alla stessa popolazione e differiscono solo per fluttuazioni statistiche.

L'ipotesi alternativa è: i gruppi differiscono significativamente.

Si calcola il valore di F:

$$F = \frac{\frac{SS_g^2}{(q-1)}}{\frac{SS_r^2}{(n-q)}}$$

Il numero di gradi di libertà è:

- all'interno di ciascun gruppo: numero di dati - 1;
- per le variazioni all'interno dei gruppi: numero di dati - numero di gruppi (di seguito denominato b);
- per le variazioni tra i gruppi: numero di gruppi - 1 (di seguito denominato c).

Il valore di F calcolato viene confrontato con il valore tabulato (per α , $f_1 = c$, $f_2 = b$), riportato in tabella 6. Se F calcolato è inferiore a F tabulato, si accetta l'ipotesi nulla.

Il procedimento, apparentemente complesso, può essere più chiaro con un esempio.

Esempio

La concentrazione di nitrobenzene in un suolo viene determinata in 4 diversi laboratori, ciascuno dei quali replica 3 volte l'analisi. Si hanno quindi 4 gruppi. Si vuole verificare se ci sono differenze sistematiche tra i risultati ottenuti dai diversi laboratori.

La tabella seguente riassume i risultati sperimentali:

Replica	Laboratorio (gruppo)			
	1	2	3	4
1	3,2	3,6	3,3	3,5
2	3,4	3,8	3,4	3,7
3	3,0	3,9	3,7	3,4
Media \bar{x}_j	3,20	3,77	3,47	3,53
$\sum_{i=1}^3 (x_{i,j} - \bar{x}_j)^2$	0,08	0,05	0,08	0,05

La media totale è 3,49

$$SS_g^2 = 3x(3,20 - 3,49)^2 + 3x(3,77 - 3,49)^2 + 3x(3,47 - 3,49)^2 + 3x(3,53 - 3,49)^2 = 0,493$$

$$SS_r^2 = 0,08 + 0,05 + 0,08 + 0,05 = 0,26$$

Si costruisce la cosiddetta tabella ANOVA:

Causa di variazione	Gradi di libertà	Valore
Tra i laboratori, SS_g^2	$4 - 1 = 3$	0,493
All'interno di ciascun laboratorio, SS_r^2	$12 - 4 = 8$	0,260
Devianza totale SS_t^2	$12 - 1 = 11$	$0,493 + 0,260 = 0,753$

Si calcola F

$$F = \frac{\frac{0,493}{4-1}}{\frac{0,260}{12-4}} = 5,06$$

Il valore di F tabulato (per $\alpha = 0,05$, $f_1 = 3$, $f_2 = 8$) è 4,07 (tabella 6).

Il valore calcolato è maggiore del valore tabulato: pertanto le differenze tra i laboratori non possono essere considerate semplici fluttuazioni statistiche. L'analisi di almeno uno dei laboratori devia sistematicamente dalle altre.

L'analisi della varianza a due vie

Questa procedura si usa quando si vuole studiare simultaneamente l'effetto di due fattori sui dati.

I dati sono ordinati in modo che l'effetto di un fattore (denominato A) formi le righe di una matrice e quello dell'altro (denominato B) formi le colonne.

Si assume il seguente modello:

$$x_{ij} = \bar{x}_t + (\bar{x}_i^A - \bar{x}_t) + (\bar{x}_j^B - \bar{x}_t) + e_{ij}$$

dove

x_{ij} = misura nella riga i e colonna j

\bar{x}_i^A = media per il fattore A nella riga i

\bar{x}_j^B = media per il fattore B nella colonna j

e_{ij} = errore casuale residuo

Le medie si calcolano con le seguenti formule:

$$\bar{x}_i^A = \frac{1}{q} \sum_{j=1}^q x_{ij}$$

$$\bar{x}_j^B = \frac{1}{p} \sum_{i=1}^p x_{ij}$$

$$\bar{x}_t = \frac{1}{pq} \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^p x_{ij}$$

dove p è il numero dei gruppi del fattore A (= numero di righe della matrice dei dati) e q è il numero dei gruppi del fattore B (= numero di colonne della matrice dei dati).

La somma dei quadrati degli scarti dalla media generale è:

$$SS_t^2 = SS_A^2 + SS_B^2 + SS_r^2$$

con

$$SS_t^2 = \sum_{j=1}^q \sum_{i=1}^p (x_{ij} - \bar{x}_t)^2$$

$$SS_A^2 = q \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i^A - \bar{x}_t)^2$$

$$SS_B^2 = p \sum_{j=1}^q (\bar{x}_j^B - \bar{x}_t)^2$$

$$SS_r^2 = SS_t^2 - SS_A^2 - SS_B^2$$

L'ipotesi nulla è: i gruppi appartengono alla stessa popolazione e differiscono solo per fluttuazioni statistiche.

L'ipotesi alternativa è: i gruppi differiscono significativamente.

Si studia l'effetto di ciascuno dei due fattori.

Si calcola F per ciascuno dei due fattori:

$$F_A = \frac{\frac{SS_A^2}{(p-1)}}{\frac{SS_r^2}{(p-1)(q-1)}}$$

$$F_B = \frac{\frac{SS_B^2}{(q-1)}}{\frac{SS_r^2}{(p-1)(q-1)}}$$

Il numero di gradi di libertà è:

- per ciascun fattore: numero di gruppi - 1 (di seguito denominato c).
- per le variazioni all'interno dei gruppi: (p - 1) x (q - 1) (di seguito denominato d).

Si confronta il valore di F calcolato con il valore tabulato (per $\alpha = 0,05$, $f_1 = c$, $f_2 = d$), riportato in tabella 6. Se F calcolato è inferiore a F tabulato, si accetta l'ipotesi nulla.

Esempio

Quattro laboratori determinano il contenuto di arsenico in un campione di suolo e ciascun laboratorio usa tre diversi metodi analitici. Con l'analisi della varianza a due vie si vuole stabilire se ci sono differenze sistematiche tra i laboratori e tra i metodi di analisi.

Il fattore A è il metodo analitico (p = 3).

Il fattore B è il laboratorio (q = 4).

La tabella seguente riassume i risultati sperimentali:

Metodo	Laboratorio				Media \bar{x}_iA
	1	2	3	4	
1	10,01	9,96	9,99	10,03	10,00
2	9,97	10,05	10,04	9,99	10,01
3	10,05	10,06	10,11	10,12	10,09
Media \bar{x}_iB	10,01	10,02	10,05	10,05	Media totale $\bar{x}_t = 10,03$

$\sum_{i=1}^3 (x_{i,j} - \bar{x}_i)^2$	0,0044	0,0062	0,0081	0,0097
--	--------	--------	--------	--------

$$SS^2_A = 4 \times [(10,00 - 10,03)^2 + (10,01 - 10,03)^2 + (10,09 - 10,03)^2] = 0,0196$$

$$SS^2_B = 3 \times [(10,01 - 10,03)^2 + (10,02 - 10,03)^2 + (10,05 - 10,03)^2 + (10,05 - 10,03)^2] = 0,0039$$

$$SS^2_t = 0,0044 + 0,0062 + 0,0081 + 0,0097 = 0,0284$$

$$SS^2_r = 0,0284 - 0,0196 - 0,0039 = 0,0049$$

Si può ora costruire la tabella ANOVA:

Causa di variazione	Gradi di libertà	Valore
Tra i metodi di analisi, SS^2_A	$3 - 1 = 2$	0,0196
Tra i laboratori, SS^2_B	$4 - 1 = 3$	0,0039
Residua, SS^2_r	$(3 - 1) \times (4 - 1) = 6$	0,0049
Devianza totale, SS^2_t	$12 - 1 = 11$	0,0284

Si calcola F per il fattore A:

$$F_A = \frac{\frac{0,0196}{(3-1)}}{\frac{0,0049}{(3-1)(4-1)}} = 12,00$$

Il valore di F tabulato (per $\alpha = 0,05$, $f_1 = 2$, $f_2 = 6$) è 5,14 (tabella 6).

Il valore calcolato è maggiore del valore tabulato, pertanto le differenze tra i metodi di analisi possono essere considerate statisticamente significative.

Si calcola F per il fattore B:

$$F_B = \frac{\frac{0,0039}{(4-1)}}{\frac{0,0049}{(3-1)(4-1)}} = 1,59$$

Il valore di F tabulato (per $\alpha = 0,05$, $f_1 = 3$, $f_2 = 6$) è 4,76 (tabella 6).

Il valore calcolato è minore del valore tabulato: pertanto le differenze tra i risultati dei diversi laboratori non sono da considerarsi statisticamente significative.

L'analisi multivaria

In linea di principio l'analisi della varianza non è ristretta a due fattori. I comuni programmi di calcolo per elaborazioni statistiche prevedono l'analisi multivaria per eseguire i test per più fattori.

I dati sono ordinati in una matrice in cui le righe rappresentano i singoli insiemi di misure e le colonne contengono i livelli dei fattori.

L'analisi della varianza multidimensionale (MANOVA)

I trattamenti sopra descritti sono limitati allo studio dell'effetto di fattori su una sola a sola variabile (la concentrazione di un analita). Più generalmente può essere interessante stimare l'effetto di fattori su uno spettro completo o su un insieme di elementi. A questo scopo si utilizza l'analisi della varianza multidimensionale. I dati sono disposti come nella tabella con la differenza che ci sono più colonne per le diverse variabili dipendenti (ad esempio le lunghezze d'onda per uno spettro ottico).

In pratica i calcoli vengono eseguiti con pacchetti software per statistica.

CIFRE SIGNIFICATIVE ED ARROTONDAMENTO

Quando si riporta un risultato, si ipotizza che tutte le cifre riportate siano note con certezza tranne l'ultima, che può essere incerta. Si dice che un tale risultato contiene solo cifre significative. Ad esempio un valore di 103,4 mg/kg significa che 103 è un dato certo, ma 4 potrebbe essere 3 o 5 o anche 2 o 6, a causa dell'inevitabile incertezza nella procedura analitica.

Per arrotondare un risultato si eliminano le cifre non significative. Se la prima cifra eliminata è maggiore o uguale a 6, la cifra precedente è aumentata di 1. Se la cifra è 0-4, la cifra precedente è immutata. Se si elimina 5, si arrotonda la cifra precedente al più vicino numero pari: cioè 2,25 diventa 2,2 e 2,35 diventa 2,4.

Lo zero come cifra significativa

La cifra zero in un numero può essere significativa o no a seconda della sua posizione e del modo in cui il numero è espresso.

Si possono evidenziare i seguenti casi:

- per un numero decimale lo zero è significativo se è posizionato tra altre due cifre significative (ad esempio 15,08) è collocato alla fine del numero, dopo altre cifre significative (ad esempio 8,320)
- per un numero decimale lo zero non è significativo se è collocato all'inizio del numero (ad esempio 0,0057: il numero di cifre significative è 2 ed il numero può essere indicato come $5,7 \times 10^{-3}$)
- per un numero intero lo zero è significativo se è compreso tra altre due cifre significative (ad esempio 405, 15003) è collocato alla fine del numero ed è chiaramente specificato che si tratta di una cifra significativa (ad esempio: pesare 350 ± 2 g di cloruro di sodio)
- per un numero intero lo zero non è significativo se è collocato alla fine del numero e non è indicato se è una cifra significativa (ad esempio il numero di cifre significative nel numero 42000 non è chiaro, perché potrebbe corrispondere a $4,2 \times 10^4$, o $4,20 \times 10^4$ e così via).

Nei casi di ambiguità, conviene esprimere il numero con la notazione scientifica (ad esempio 1800 può diventare $1,800 \times 10^3$) oppure accompagnare il risultato con la stima della sua incertezza.

Le cifre significative nei calcoli

Quando si eseguono calcoli matematici, conviene trascinare il massimo numero di cifre e arrotondare alle cifre significative solamente il risultato finale.

Per esprimere il risultato con il corretto numero di cifre valgono queste semplici regole:

- quando si moltiplicano due numeri, il risultato avrà le stesse cifre significative del numero con meno cifre. Ad esempio $8,43 \times 6,937 = 58,5$.
- se si esegue un'addizione o sottrazione, il numero con meno cifre decimali limita il numero di cifre del risultato. Ad esempio $2,342 + 1,73 + 6,58 = 10,65$.

CAPITOLO 2 - Ottenere dati di qualità

Introduzione

Ottenere dati di qualità, cioè accurati, precisi e rappresentativi, è molto importante per qualunque applicazione dell'analisi chimica. Nel campo dell'analisi ambientale, argomento di questa guida, avere risultati attendibili consente di:

- prendere la giusta decisione sulla necessità o meno di bonifica di un sito. Se invece i risultati delle analisi fossero più bassi dei valori veri, si rischierebbe di non porre rimedio ad uno stato di inquinamento, con conseguenti danni per l'ambiente e per la salute dell'uomo. Al contrario un valore sovrastimato potrebbe far partire un intervento di bonifica non necessario, con dispendio di risorse economiche;
- controllare l'efficacia di un trattamento di decontaminazione e monitorare lo stato del terreno nel tempo.

Inoltre è molto importante che i dati analitici ottenuti in laboratori diversi siano comparabili, ad esempio nel caso di un contenzioso.

Per ottenere risultati attendibili è necessario utilizzare metodi di analisi validi ed eseguire correttamente tutte le operazioni previste nel procedimento analitico. Inoltre è importante adottare misure di controllo di qualità per confermare che i risultati che si ottengono sono attendibili.

In questa sede non si tratteranno i concetti di sistema, gestione ed assicurazione di qualità, rimandando per ulteriori approfondimenti ai testi ed alle norme ad essi dedicati. Si punterà invece l'attenzione sull'aspetto operativo e si forniranno indicazioni sulla buona pratica di laboratorio e sulle misure di controllo di qualità dei dati.

“Buona pratica di laboratorio” è il termine usato per descrivere come i chimici dovrebbero operare quotidianamente in laboratorio. Comprende molti fattori come sicurezza, ordine, pulizia, attenzione, meditazione, organizzazione e autodisciplina. Un chimico che possiede queste qualità otterrà probabilmente risultati migliori di chi non le possiede.

Il chimico che opera secondo la buona pratica di laboratorio si accerterà di capire pienamente cosa deve fare prima di iniziare il lavoro e avrà il controllo della situazione mentre lavora.

In questa sede la buona pratica di laboratorio viene intesa nel suo significato operativo e non negli aspetti burocratici. Non si parlerà dunque di *Good Laboratory Practice* (GLP), che è l'insieme di principi che governano l'organizzazione e l'operazione di studi tossicologici per cibi, prodotti chimici o farmaceutici, sviluppato dall'OECD (Organization for Economic Cooperation and Development).

In Italia esiste una norma sulla Buona Prassi di Laboratorio (DL 120 del 27/1/1992).

Operare in laboratorio

Introduzione

Per ottenere risultati analitici di buona qualità occorre una piena comprensione del metodo di analisi e degli stadi in cui possono verificarsi degli errori. È necessario conoscere le reazioni chimiche previste nel metodo, dall'estrazione alla determinazione finale.

È noto che la forza di una catena non è maggiore della forza del suo anello più debole. Pertanto in un metodo analitico tutte le parti sono vitali per il successo della determinazione.

Il sistema di qualità del laboratorio accerterà che il metodo da seguire sia scritto e che la documentazione sulle operazioni eseguite e sui risultati ottenuti sia redatta correttamente.

La conservazione del campione

È noto come la bontà del risultato di un'analisi non possa essere migliore della bontà del campione su cui l'analisi viene eseguita. È pertanto importante che il campione venga prelevato correttamente e venga correttamente conservato fino al momento dell'analisi. Il campionamento non è oggetto di questa trattazione, perciò in questa sede si punterà l'attenzione sulla conservazione del campione.

Il tipo e materiale dei contenitori in cui raccogliere e conservare il campione dipende dalla natura degli analiti da determinare. Per la determinazione di metalli pesanti, i campioni di suolo possono essere conservati in recipienti di vetro o di polietilene. Quest'ultimo materiale è da preferirsi se le concentrazioni in gioco sono molto basse. I contenitori in plastica non vanno invece utilizzati per i campioni nei quali verranno determinate sostanze organiche, perché potrebbero verificarsi delle contaminazioni.

La conservazione di campioni nei quali verranno determinati composti organici volatili è particolarmente critica. Il terreno può essere introdotto in fiale di vetro con setto forabile od in recipienti di vetro a bocca larga dotati di chiusura con guarnizione in teflon. Ciascun campione va conservato separato dagli altri campioni e dagli standard, per evitare fenomeni di mutua contaminazione. Ciascun contenitore va quindi introdotto in un sacchetto di polietilene separato; in presenza di elevate concentrazioni di sostanze volatili, può essere conveniente introdurre un'aliquota di carbone attivo in ciascun sacchetto. La zona di conservazione deve essere priva di vapori di solventi organici. I campioni possono infatti subire contaminazioni durante la conservazione a causa della diffusione di sostanze volatili, eventualmente presenti nell'ambiente di laboratorio, attraverso il setto (in particolare alogenoderivati organici volatili, ad esempio il cloruro di metilene). Per evidenziare questo fenomeno si può effettuare una prova in bianco: all'atto del campionamento si riempie un contenitore con acqua ultrapura e lo si sottopone alle medesime procedure di trasporto e conservazione adottate per il campione.

Per quanto riguarda la determinazione di composti organici semivolatili, i campioni di suolo da sottoporre all'analisi possono essere conservati in recipienti di vetro o di teflon dotati di chiusura con guarnizione in teflon.

Il tempo intercorrente tra il prelievo e l'analisi deve essere il più breve possibile onde evitare alterazioni del campione. Ciò è tanto più importante per l'analisi di sostanze volatili o poco stabili. Per quanto riguarda il suolo, se non si possono effettuare immediatamente le determinazioni analitiche è necessario conservare il campione alla temperatura di 4°C.

Anche gli estratti degli analiti organici vanno conservati in frigorifero a 4°C e al buio, per evitare reazioni di fotodegradazione. Secondo le indicazioni dell'EPA, il tempo che intercorre tra l'estrazione e l'analisi non può superare i 40 giorni (i metodi EPA riportano prescrizioni particolari per alcune classi di composti, ad esempio i fenoli).

Nelle tabelle 9 e 10 vengono riportati alcuni dettagli sulla conservazione dei campioni, tratte dai metodi EPA, e su alcune precauzioni da seguire.

Tabella 9: Contenitori e condizioni per un corretta conservazione dei campioni, per matrici acquose

NOME ANALITA O PARAMETRO	CONTENITORE ¹	CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE	MASSIMA DURATA
ANALISI INORGANICHE:			
Cloruri	P, V	Nulla	28 giorni
Cianuri (totali o clorurabili)	P, V	Conservare a 4°C; se presenti ossidanti, aggiungere 5 ml NaAsO ₂ 0.1N per lt, o 0,06 g di acido ascorbico per lt; portare il pH >12 con NaOH 50%	14 giorni
Ione Idrogeno (pH)	P, V	Nulla	24 ore
Nitrato	P, V	Conservare a 4°C	48 ore
Solfato	P, V	Conservare a 4°C	28 giorni
Solfuro	P, V	Conservare a 4°C, aggiungere ZnAc	7 giorni
METALLI:			
Cromo(VI)	P, V	Conservare a 4°C	24 ore
Mercurio	P, V	HNO ₃ fino a pH <2	28 giorni
Altri Metalli	P, V	HNO ₃ fino a pH <2	6 mesi
ANALISI ORGANICHE:			
Alogenuri organici totali (TOX)	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; a pH <2 con H ₂ SO ₄	28 giorni
Carbonio organico totale (TOC)	P, V	Conservare a 4°C, al buio	28 giorni
Diossine e Furani	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; + Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % ²	7 gg. prima estrazione, 45 gg. dopo estrazione
Fenoli	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; + Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % ²	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Ftalati (esteri)	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Idrocarburi alogenati	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; + Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % ²	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Idrocarburi aromatici polinucleari	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; + Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % ²	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Nitroaromatici e chetoni ciclici	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; + Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % ²	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Nitrosamine	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C; + Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % ²	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Olii e grassi	V	Conservare a 4°C; + 5 ml HCl dil. per lt	28 giorni
PCB	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Pesticidi organo clorurati	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione
Pesticidi organo fosforati	V, guarn. PTFE	Conservare a 4°C ³	7 gg. prima estrazione, 40 gg. dopo estrazione

1) P, polietilene; V, vetro; guarn. PTFE: tappo con guarnizione in teflon; 2) Per rimuovere il cloro libero; 3) Portare i campioni a pH 5-8 con NaOH o acido solforico.

Tabella 10: Condizioni per un corretta conservazione di campioni

Matrice del campione	Condizioni di conservazione	Massima durata di conservazione
SOSTANZE ORGANICHE VOLATILI		
Campioni di scarichi concentrati	Raffreddare a 4°C	14 giorni
Campioni acquosi senza cloro residuo presente	Conservare a 4°C; portare a pH <2 con H ₂ SO ₄ , con HCl o con NaHSO ₄ solido	14 giorni
Campioni acquosi con cloro residuo presente	Raccogliere il campione in un flacone da 125 ml, preventivamente condizionato con 4 gocce di soluzione al 10% di Na ₂ S ₂ O ₃ ; agitare delicatamente per mescolare il campione e la soluzione di tiosolfato, e trasferire in una fiala da 40 ml per sostanze organiche volatili. Conservare a 4°C; portare a pH <2 con H ₂ SO ₄ , con HCl o con NaHSO ₄ solido	14 giorni
Campioni solidi (es. terreni, sedimenti, fanghi, cenere)	Seguire le indicazioni per le singole metodiche	14 giorni
SOSTANZE ORGANICHE SEMIVOLATILI - PESTICIDI ORGANOCLORURATI - PCB ED ERBICIDI		
Campioni di scarichi concentrati	Nulla	Campioni estratti entro 14 gg, estratti analizzati entro 40 gg. dall' estrazione
Campioni acquosi senza cloro residuo presente	Conservare a 4°C	Campioni estratti entro 7 gg, estratti analizzati entro 40 gg. dall' estrazione
Campioni acquosi con cloro residuo presente	Conservare a 4°C; aggiungere Na ₂ S ₂ O ₃ 0.008 % (o 1 ml al 10% per litro), per rimuovere il cloro	Campioni estratti entro 7 gg, estratti analizzati entro 40 gg. dall' estrazione
Campioni solidi (es. terreni, sedimenti, fanghi, cenere)	Conservare a 4°C	Campioni estratti entro 14 gg, estratti analizzati entro 40 gg. dall' estrazione

I contenitori

I materiali dei contenitori

I contenitori sono utilizzati in laboratorio per svariati scopi: conservare campioni e reagenti, misurare volumi, far avvenire le reazioni, misurare le concentrazioni, smaltire gli scarti. In tutti i casi è importante che il contenitore rimanga inerte nei confronti del contenuto. Un contenitore deve proteggere il contenuto da contaminazioni esterne e assicurarsi che il contenuto non influenzi l'ambiente esterno.

Il vetro è il materiale più comunemente utilizzato, grazie al suo buon grado di inerzia, anche se in casi particolari si utilizzano altri materiali come polietilene, porcellana, quarzo, alluminio, platino. Il tipo di vetro da utilizzare in laboratorio è quello in borosilicato (denominato Pyrex o Kimax), nel quale può essere conservata la maggior parte delle soluzioni e dei solventi. Esistono però alcune eccezioni. Per soluzioni alcaline e soluzioni standard di silice, boro e metalli alcalini bisogna utilizzare contenitori in plastica (ad esempio polietilene ad alta densità). Anche per metalli a livello di traccia ed ultratraccia vanno utilizzati contenitori di questo materiale, per evitare fenomeni di adsorbimento sulle pareti dei contenitori o di rilascio dalle pareti stesse. Invece i contenitori di plastica devono essere evitati quando si determinano composti organici.

I sistemi di chiusura devono resistere all'attacco del materiale contenuto nel recipiente. Tappi in vetro sono inadatti a conservare liquidi fortemente alcalini perché tendono a bloccarsi. Tappi in gomma sono adatti per liquidi alcalini ma non per solventi organici, che tendono ad attaccarli. Normalmente tappi in materiale plastico inerte sono la scelta migliore. I rubinetti migliori per le burette sono in politetrafluoroetilene.

La vetreria volumetrica

La vetreria volumetrica è costituita da vetreria calibrata ed utilizzata per misure di volume. È costituita da matracci, pipette e burette tarate. Quando non è necessaria una misura esatta, si possono utilizzare anche cilindri e pipette graduati.

La vetreria volumetrica può essere tarata TC (to contain), come ad esempio i matracci, oppure TD (to deliver) come le burette.

I matracci tarati possono essere calibrati per conoscere esattamente il volume contenuto. Il loro volume è in genere da 10 ml a 1 l.

Le pipette tarate servono a rilasciare un volume prefissato. In genere vanno da 1 a 100 ml. Nell'operazione di rilascio della soluzione le pipette devono essere tenute in posizione verticale e la punta deve essere tenuta in contatto con la parete del contenitore per un secondo o due dopo la fine dell'erogazione. Attualmente in molti laboratori le pipette in vetro sono sostituite da micropipette con puntali o siringhe.

Le burette sono usate per il rilascio di un volume definito. Le più comuni hanno capacità 25-250 ml. Le burette vanno condizionate due o tre volte con la soluzione con cui saranno riempite. La velocità di uscita del flusso da una buretta da 50 ml non deve superare 0,7 ml/s per evitare che parte del liquido rimanga sulle pareti.

Esistono anche burette automatiche.

La vetreria standardizzata

Quando è possibile è opportuno utilizzare recipienti e vetreria con giunti standardizzati, che sono intercambiabili e rendono più veloce e versatile l'assemblaggio delle apparecchiature.

I giunti conici intercambiabili, i tappi e i rubinetti sono designati dal simbolo TS. I giunti conici sono caratterizzati da due numeri, ad esempio 24/30: 24 indica il diametro in mm della parte finale larga del giunto e 30 la sua lunghezza assiale.

Sui tappi, sulle bottiglie e sui matracci è indicato un solo numero che indica:

- per i tappi: il diametro in mm del buco attraverso il tappo;
- per le bottiglie: il diametro della sommità del collo della bottiglia;
- per i matracci: il diametro dell'apertura della sommità del collo del matraccio.

I giunti sferici sono caratterizzati dal simbolo SJ. Sono riportati due numeri, ad esempio 12/2; 12 indica il diametro della sfera e 2 il diametro della base del forobuco.

Per rubinetti con tappo in teflon si usa la sigla PS e si riporta un solo numero; ad esempio 2 indica un tappo di teflon con foro di 2 mm.

Il lavaggio dei contenitori

I recipienti per i campioni e per i reagenti devono essere accuratamente lavati prima dell'uso.

Le sostanze solubili possono essere rimosse semplicemente per lavaggio con acqua calda o fredda e risciacquo finale con piccole porzioni di acqua distillata.

Altre sostanze più difficili da eliminare possono essere rimosse con detergenti, solventi organici, miscela cromica, acido nitrico o acqua regia.

Per recipienti in vetro si può usare la miscela cromica (preparata aggiungendo 1 litro di acido solforico concentrato a 35 ml di dicromato di sodio concentrato), oppure una soluzione di KMnO_4 2% in KOH 5% seguita da una soluzione di acido ossalico; ovviamente queste procedure sono adatte se non si deve determinare la concentrazione di cromo, manganese o solfati. Le soluzioni devono essere lasciate almeno 15 minuti a contatto con la vetreria. Si risciacqua infine con acido (ad esempio acido nitrico) e con acqua.

Anche l'acido nitrico è adatto al lavaggio della vetreria. Può essere usato concentrato in caso di recipienti molto sporchi o, per un lavaggio non drastico, in concentrazione 1-2 M.

Le macchie di grasso possono essere eliminate con acetone o con una soluzione calda di idrossido di sodio (1 g in 50 ml di acqua) o infine con una soluzione alcolica di idrossido di potassio. Si sciacqua poi con acqua e infine con acido cloridrico diluito.

I recipienti in plastica si possono lavare con detergenti e acido cloridrico.

La vetreria tarata (soprattutto le burette) può essere lavata con una miscela composta da 30 g di idrossido di sodio, 8 g di fosfato trisodico in 1 litro di acqua. L'aggiunta di 1 - 2 g di laurilsolfato di sodio o di un altro tensioattivo rende il lavaggio più efficace.

Le celle usate in spettrofotometria possono essere lavate con detergenti, con solventi organici o con acido nitrico diluito. Infine vengono sciacquate con acqua deionizzata e poi con alcol e acetone.

I recipienti nei quali si effettuano gli attacchi dei campioni di suolo per la determinazione dei metalli possono essere puliti con un trattamento a caldo con la medesima miscela di acido utilizzata per la digestione e sciacquati più volte con acqua deionizzata.

La vetreria impiegata per la determinazione di metalli in tracce può essere sciacquata con una soluzione di acido nitrico - acqua 1+:1 e risciacquata più volte con acqua deionizzata. In questo caso l'EPA consiglia di utilizzare la seguente sequenza di lavaggio: detergente - acqua di rubinetto - acido nitrico 1:1 - acqua di rubinetto - acido cloridrico 1:1 - acqua di rubinetto - acqua deionizzata. Nella nostra opinione è meglio evitare l'uso di acqua di rubinetto e impiegare sempre acqua deionizzata. L'EPA aggiunge che se un attento controllo di qualità dimostra che alcuni stadi della procedura di lavaggio non sono indispensabili nelle procedure di routine, tali stadi possono essere eliminati.

La vetreria da usare per la determinazione di fosfati non deve essere lavata con detergenti contenenti queste sostanze.

La vetreria da utilizzare nella determinazione di tracce di composti organici (pesticidi, PCB,...) deve essere priva di questi contaminanti. Si può effettuare un lavaggio con miscela cromica per distruggere residui di queste specie eventualmente presenti. Dopo aver risciacquato si può asciugare rapidamente la vetreria con alcol etilico seguito da acetone. Altrimenti la vetreria può essere asciugata in stufa.

La sequenza di lavaggio consigliata dall'EPA per contenitori utilizzati nell'estrazione e analisi di sostanze organiche prevede i seguenti stadi:

- lavaggio con alcol subito dopo l'uso;
- immersione in un bagno caldo (50 °C circa) di detergente sintetico;
- risciacquo con acqua calda;
- immersione in un agente ossidante, ad esempio miscela cromica, possibilmente a caldo (40 – 50 °C). In alternativa esistono prodotti commerciali che hanno un effetto equivalente alla miscela cromica;
- risciacquo con acqua calda;
- risciacquo a freddo con acqua deionizzata;
- risciacquo con alcol, ad esempio metanolo o isopropanolo;
- subito prima dell'uso, risciacquo con il solvente che verrà usato per l'estrazione o per l'analisi.

Le capsule e i crogioli possono esser lavate con detergenti, oppure con la stessa miscela di solventi che si utilizzerà nelle prove successive.

In tutti i casi dopo l'uso i recipienti vanno subito sciacquati, in via preliminare, con acqua deionizzata, oppure alcol nel caso di residui organici, perché il materiale secco sulle pareti è più difficile da asportare. Residui solidi non solubili e non asportabili con un semplice risciacquo in molti casi sono eliminabili con un trattamento in un bagno a ultrasuoni.

I recipienti puliti non vanno conservati in spazi aperti del laboratorio, per evitare il pericolo di nuove contaminazioni. E' consigliabile chiudere con *parafilm* od altra pellicola l'apertura dei contenitori non dotati di tappo (ad esempio beaker, beute), anche se conservati al chiuso.

I reagenti

L'acqua

L'acqua è il principale reagente usato in un laboratorio chimico. Essa è impiegata per le diluizioni, per preparare le soluzioni dei reagenti, per il risciacquo della vetreria.

E' molto importante che l'acqua utilizzata per le analisi non contenga concentrazioni rilevabili degli analiti o sostanze che interferiscano con l'analisi. La tabella 11 mostra i principali processi utilizzati per la purificazione dell'acqua e le loro caratteristiche. In generale, se possibile, conviene utilizzare sistemi di deionizzazione accoppiati con mezzi di purificazione di sostanze organiche, ad esempio carbone attivo, seguiti da filtrazione per rimuovere il particolato: con questo procedimento si ottiene acqua di ottima qualità. Tuttavia anche l'acqua distillata comune è utilizzabile per molte analisi: le procedure di controllo di qualità, in particolare l'analisi di bianchi, ne possono indicare le possibilità ed i limiti di applicazione.

Tabella 11: Metodi di purificazione dell'acqua

Processo	Solidi ionici disciolti	Gas ionizzati disciolti	Sostanze organiche disciolte	Particolato	Batteri	Pirogeni – endotossine
Distillazione	B – E ¹	M	B	E	E	E
Deionizzazione	E	E	M	M	M	M
Osmosi inversa	B ²	M	B	E	E	E
Adsorbimento						
su C attivo	M	M ³	B – E ⁴	M	M	M
Filtrazione	M	M	M	E	E	M
Ultrafiltrazione	M	M	B ⁵	E	E	E
Ossidazione						
ultravioletta	M	M	B – E ⁶	M	B ⁷	M

Legenda: M = mediocre (rimozione bassa o nulla);

B = buono (in grado di rimuovere elevate frazioni di contaminante);

E = eccellente (rimozione completa o quasi).

- Note:**
- 1 La resistività dell'acqua purificata per distillazione è di un ordine di grandezza inferiore a quella dell'acqua prodotta per deionizzazione, soprattutto a causa della presenza di CO₂ e talvolta di H₂S, NH₃ e altri gas se presenti nell'acqua di partenza.
 - 2 La resistività dipende dalla resistività dell'acqua di partenza.
 - 3 Il carbone attivo rimuove il cloro per adsorbimento.
 - 4 Se usato in combinazione con altri processi di purificazione, il carbone attivo di buona qualità e altri adsorbenti sintetici hanno capacità eccellenti di rimuovere contaminanti organici, anche per composti e applicazioni specifici.
 - 5 L'ultrafiltrazione è utile nel ridurre specifici contaminanti nell'acqua di partenza sulla base del peso molecolare di *cut-off* della membrana.
 - 6 L'ossidazione ultravioletta a 185 nm (processo in *batch*) è efficace per rimuovere contaminanti organici in traccia quando è usata come post-trattamento.
 - 7 Sterilizzatori a 254 nm, mentre non rimuovono fisicamente i batteri, possono avere capacità battericide o batteriostatiche limitate dall'intensità, tempo di contatto e velocità di flusso.

I prodotti chimici

I prodotti chimici usati in laboratorio sono classificabili nelle seguenti categorie: acidi, basi, sali solventi organici, agenti ossidanti e riducenti, indicatori, agenti essiccanti, soluzioni tampone, agenti complessanti.

I prodotti chimici presenti in commercio sono disponibili a diversi gradi di purezza. A meno che non sia specificato diversamente, si utilizzano reagenti di grado di purezza analitico. Per applicazioni particolari sono necessari reattivi ad elevata purezza o esenti da tracce degli analiti di interesse: Le case produttrici hanno linee di reagenti con caratteristiche diverse a seconda delle applicazioni.

Il grado di purezza e la natura delle impurità presenti in un reagente possono essere più o meno importanti a seconda dell'analita da determinare. Ad esempio gli acidi minerali, come acido solforico, cloridrico e nitrico, inevitabilmente contengono piccole quantità di metallo come impurezza. La loro presenza in un acido non pregiudica il suo utilizzo, a meno che non li si usi per la digestione di campioni prima della determinazione di ultratracce di metallo. In generale per la determinazione di metalli in terreni gli acidi a grado di purezza analitico sono sufficientemente puri. Solo per analisi a livello di ultratraccia ($\mu\text{g/l}$) è necessario l'uso di acidi ad elevata purezza.

Allo stesso modo, la presenza di impurezze in un solvente organico come l'esano può essere o meno importante. Ad esempio se l'esano viene usato come solvente per la spettroscopia UV, la presenza di tracce di composti aromatici lo rende meno trasparente nella regione dell'ultravioletto. Perciò per queste applicazioni esiste l'esano a grado spettroscopico, che ha un'elevata trasparenza. Allo stesso modo sono disponibili esano ed altri solventi organici per l'analisi di residui di pesticidi.

A volte i prodotti chimici sono addizionati di altri reagenti come stabilizzatori. Ad esempio la formaldeide è molto reattiva allo stato puro e dimerizza o polimerizza nel tempo. E' venduta come soluzione 40% v/v in acqua, con uno stabilizzatore a base di metanolo per evitare la polimerizzazione.

Alcuni reagenti organici sono poco stabili per esposizione all'atmosfera. Conviene quindi comperarne piccole quantità a intervalli frequenti. Allo stesso modo il titolo di reagenti volatili come l'ammoniaca può variare in seguito a ripetute aperture del contenitore.

I sali facilmente idratibili possono essere conservati in essiccatore.

Se i reagenti sono sensibili alla luce vanno conservati in bottiglie scure e in luogo buio.

I reagenti instabili a temperatura ambiente vanno conservati in frigorifero.

La manipolazione dei reagenti

Non si deve introdurre una spatola o una pipetta direttamente nel recipiente del solido o del liquido, per evitare di inquinarli. La quantità approssimativa di reagente o solvente necessaria deve essere travasata dalla bottiglia principale in un contenitore pulito. Quello che rimane nel contenitore dopo l'uso non deve essere rimesso nella bottiglia ma scartato. Se si pesano più reagenti per preparare diverse soluzioni usando la stessa spatola, si possono causare contaminazioni.

La preparazione e diluizione delle soluzioni

Una soluzione di esatta concentrazione si prepara sciogliendo una quantità pesata di sostanza o diluendo una soluzione più concentrata portandola a volume in un matraccio tarato. Poiché l'errore nella pesata o nel prelievo del volume aumenta al diminuire della quantità, conviene preparare soluzioni in cui non si usino pesi o volumi troppo piccoli. È opportuno quindi effettuare diluizioni successive. Dopo la preparazione le soluzioni possono essere trasferite in altri contenitori per la conservazione, poiché i matracci tarati sono relativamente costosi.

Spesso quando si miscelano soluzioni fortemente concentrate c'è una variazione di volume, così che il volume totale è diverso dalla somma dei volumi.

Per ottenere soluzioni omogenee, occorre ricordarsi di miscelare accuratamente durante le soluzioni e gli standard durante la preparazione e di agitarle nuovamente del momento dell'uso. Lo stesso vale per i campioni da analizzare.

Per motivi di sicurezza, si aggiunge acido all'acqua e non viceversa ("mai dare da bere all'acido!").

Per la preparazione di soluzioni standard, cioè soluzioni a concentrazione nota di analita, solitamente si parte da standard commerciali. Si prepara una soluzione concentrata (ad esempio 1000 mg/l) dalla quale si ottengono per diluizione gli standard a concentrazione inferiore. E' anche possibile acquistare soluzioni standard concentrate già pronte e certificate. Per i composti organici volatili esistono anche miscele di gas a concentrazione nota.

Le soluzioni dei metalli possono essere ottenute anche sciogliendo in acqua una quantità accuratamente pesata di un sale, oppure sciogliendo in acido un'aliquota di analita allo stato metallico. Le soluzioni finali devono avere pH acido per evitare fenomeni di idrolisi e di interazione con le pareti dei contenitori. Questi ultimi possono essere in vetro o plastica per concentrazioni più elevate, mentre devono essere in plastica per basse concentrazioni (a livello di µg/l).

La stabilità dei reagenti

I reagenti solidi possono diminuire la loro purezza per assorbimento di umidità o di gas dall'atmosfera. In alcuni casi la loro degradazione non è recuperabile, come per l'idrossido di sodio che si combina con l'anidride carbonica dell'aria convertendosi parzialmente in carbonato. In altri casi si può eliminare la presenza di umidità nei solidi. Se il materiale è stabile al riscaldamento si può riscaldarlo in stufa, raffreddarlo e pesarlo, ripetendo l'operazione fino a peso costante. Composti termicamente instabili possono essere "essiccati" ponendoli in un essiccatore e facendo il vuoto.

In alcuni casi può essere necessario aggiungere conservanti o altri reattivi ai contenitori in cui sono conservati i campioni per prevenire fenomeni di ossidazione, adsorbimento, perdite per volatilità, degradazione microbica o altre reazioni chimiche.

E' importante che i campioni ed i reagenti siano conservati correttamente in modo da preservare la loro integrità. Le condizioni di conservazione devono essere tali che il reagente o il campione non subisca cambiamenti e non causi danni o comunque influenzino l'ambiente circostante. Deve quindi essere contenuto in un recipiente correttamente sigillato e dotato di un'etichetta chiara. I contenitori saranno conservati in un armadio, frigorifero, congelatore e così via a seconda delle loro caratteristiche. La scelta sarà dettata dalle proprietà del campione e dalla necessità di proteggerlo dalla luce, elevata temperatura, umidità, polvere e influenze chimiche o microbiologiche.

La durata delle soluzioni standard dipende dalla loro natura, dalla concentrazione e dalla presenza di altri reagenti. È meglio preparare frequentemente piccoli volumi di soluzioni standard piuttosto che prepararne un volume elevato ed utilizzarlo per lunghi tempi.

La concentrazione può variare a causa dell'assorbimento di vapori d'acqua o di gas dall'aria o per evaporazione del solvente.

Soluzioni di acidi o basi diluite sono stabili per un lungo tempo a meno che non siano state aperte e chiuse ripetutamente.

Soluzioni standard di metalli in acido sono stabili per un anno a livello di concentrazione 1 mg/l.

Le soluzioni standard di composti organici, soprattutto volatili, hanno invece minore stabilità.

I metodi EPA per la determinazione di sostanze organiche indicano le condizioni per la preparazione e conservazione degli standard.

In linea generale, soluzioni standard concentrate di composti volatili vanno conservate a -10° , od a temperature inferiori, e quelle dei composti meno volatili a temperature minori o uguali a 4°C . Si consiglia tuttavia di seguire le specifiche indicazioni riportate nei singoli metodi. I contenitori vanno aperti per il minimo tempo possibile e dopo l'uso devono essere immediatamente rimessi in frigorifero od in congelatore per evitare l'evaporazione degli analiti.

Per quanto riguarda la durata, le soluzioni standard concentrate (tipicamente 1000 mg/l), sono generalmente stabili per sei mesi, con l'eccezione delle sostanze gassose (con punto di ebollizione inferiore a 30°C , come clorometano e cloruro di vinile) che vanno preparate almeno ogni settimana. Anche gli standard di sostanze molto reattive, come lo stirene, hanno una durata limitata. La stabilità delle soluzioni più diluite dipende dalla concentrazione e dalla natura chimica del composto. In generale conviene preparare al momento le soluzioni a bassa concentrazione da usare per la calibrazione. Si rimanda ai singoli metodi per avere indicazioni specifiche su ciascun analita. I tempi riportati sono tuttavia indicativi: il titolo degli standard va controllato periodicamente e le soluzioni devono essere ripreparate se si evidenziano fenomeni di evaporazione o degradazione.

Gli analiti presenti in un campione possono essere persi a vari stadi della procedura analitica per diverse ragioni:

- degradazione a causa del calore, ossidazione;
- precipitazione durante la dissoluzione del campione;
- perdite per volatilizzazione durante la digestione, o evaporazione;
- tracce;
- estrazione incompleta dell'analita dalla matrice. Può essere un problema fisico derivante dall'incompleta penetrazione del solvente di estrazione nella matrice. In alternativa, ci può essere un legame chimico molto forte tra la matrice e l'analita. Ad esempio nel suolo la frazione di metallo legata alla componente argillosa del suolo stesso è più difficile da rimuovere delle frazioni presenti in forma scambiabile o legata a sostanze organiche.

L'etichettatura

L'etichettatura è un aspetto importante della gestione del laboratorio, per rendere chiara l'identità e lo stato dei reagenti, dei materiali e degli apparecchi.

L'etichetta dovrebbe resistere all'esposizione al sole od al contatto accidentale con sostanze chimiche.

È importante indicare sulle soluzioni, e soprattutto sulle soluzioni standard, non solo la composizione ma anche il solvente e la data di preparazione.

La filtrazione

I requisiti per una filtrazione efficiente sono essenzialmente due:

- il materiale del filtro non deve reagire con i componenti della soluzione o con il precipitato;
- i pori del filtro devono essere più piccoli delle dimensioni delle particelle da filtrare.

I materiali più comuni di cui sono costituiti i filtri sono:

- cellulosa (filtri di carta);
- esteri di cellulosa (soprattutto nitrato e acetato);
- fibra di vetro;
- teflon.

Altri materiali usati per la filtrazione sono nylon, policarbonato, polivinidilfluoruro, polisulfone, polietilensulfone, allumina.

Si può operare per gravità, sotto vuoto o sotto pressione positiva, a seconda del tipo di filtro e del volume e della natura del fluido da filtrare.

In alternativa ai filtri, in alcuni casi si possono utilizzare crogioli filtranti con setto in vetro o porcellana. Con i crogioli filtranti si opera sotto vuoto.

Si può distinguere tra filtrazione su superficie e filtrazione in profondità. Un filtro di profondità intrappola le particelle solide sia nello spessore del filtro stesso che sulla superficie. Tipici filtri di profondità sono quelli in cellulosa e fibra di vetro, che non hanno una struttura porosa definita ma sono costituiti da una matrice di fibre intrecciate. Essi sono caratterizzati in termini non di porosità ma di "trattenimento di particelle".

I vantaggi dei filtri di profondità sono l'alta capacità di trattenimento, in quanto l'azione filtrante non è limitata alla superficie, ed i costi ridotti. Inoltre, grazie alla disposizione casuale delle fibre, trattengono un'ampia percentuale di particolato. Gli svantaggi sono che, in seguito ad una variazione brusca di pressione, come quando viene applicato il vuoto, si possono staccare fibre o particelle. Inoltre il particolato intrappolato può essere trascinato attraverso la matrice e contaminare il filtrato.

I filtri a membrana sono sottili pellicole polimeriche costituite da migliaia di pori microscopici, la cui dimensione determina il grado di filtrazione. Un filtro a membrana trattiene le particelle di dimensioni maggiori dei pori sulla sua superficie. Le particelle più piccole possono attraversare la membrana oppure essere catturate al suo interno. Inoltre, dopo un certo tempo di filtrazione, la presenza sulla superficie del filtro di uno strato di precipitato ne riduce la porosità, permettendo il trattenimento anche di particelle più piccole. I filtri a membrana hanno il vantaggio di avere un grado di filtrazione determinabile e assoluto al di sotto del micron. I loro maggiori svantaggi rispetto ai filtri di profondità sono la più bassa velocità di filtrazione ed i costi maggiori.

I filtri di profondità trattengono circa il 90% delle particelle e ne lasciano passare il 10%. In molte applicazioni essi sono usati come prefiltri a monte dei filtri a membrana, che trattengono il 100% delle particelle di diametro superiore ai pori, per impedirne un prematuro intasamento.

Essi vengono utilizzati per applicazioni critiche come la sterilizzazione e la filtrazione finale di un fluido. Nella chimica analitica le membrane trovano applicazione per la filtrazione dei solventi e degli eluenti da utilizzare in cromatografia, al fine di evitare l'introduzione di particolato in colonna. Inoltre nell'analisi delle acque per convenzione la frazione disciolta di un analita è quella che passa attraverso un filtro a membrana da 0,45 μm , mentre il particolato è la frazione trattenuta dal filtro stesso. Esistono in commercio membrane con pori di varie dimensioni.

Un filtro a combinazione è una struttura multistrato costituita da filtri di profondità e a membrana oppure da membrane a porosità differenti. Esso può costituire un'alternativa all'utilizzo di singoli prefiltri e filtri finali.

Si può inoltre distinguere tra filtri idrofili ed idrofobi. I primi sono preferibili per la filtrazione di soluzioni acquose ma sono virtualmente bagnabili da qualunque liquido. I filtri idrofobi non sono bagnati dall'acqua ma da solventi organici. Dopo essere stati attivati dal passaggio di un solvente organico però sono attrassati anche da soluzioni acquose.

La compatibilità chimica è definita come la capacità del materiale di cui è costituito il filtro a resistere all'azione dei componenti del fluido da filtrare in modo che la struttura dei pori non venga danneggiata ed il materiale costitutivo del filtro non liberi particelle o fibre o addirittura si disintegri. Essa è influenzata dalla temperatura, concentrazione e durata dell'esposizione ad una sostanza chimica. Le case produttrici riportano tabelle di compatibilità tra i materiali dei filtri ed i più comuni acidi, basi o solventi organici. E' utile consultarle per scegliere il filtro adatto al fluido da filtrare. Ad esempio i filtri in acetato od esteri misti di cellulosa sono molto adatti per soluzioni acquose ma hanno scarsa resistenza ai solventi organici. I filtri di teflon,

per la loro inerzia, sono utilizzabili con tutti i tipi di soluzione, ma sono più costosi di altri filtri: per questo spesso si preferisce, quando possibile, impiegare altri materiali più economici; Prima di filtrare soluzioni acquose essi devono essere attivati facendo fluire del metanolo.

Ovviamente anche il materiale costitutivo del supporto di filtrazione deve essere compatibile con il fluido da filtrare.

Quando si filtra conviene travasare prima la maggior parte del liquido surnatante, in modo che la filtrazione proceda rapidamente, e poi far scendere il precipitato, che causerà una parziale occlusione dei pori e quindi rallenterà la velocità di flusso della soluzione.

Il filtro può rilasciare in soluzione contaminanti, ad esempio adesivi, additivi per la polimerizzazione o residui di lavorazione. Questo fenomeno può essere un inconveniente soprattutto per le analisi a livello di traccia. Conviene allora trattare il filtro con acqua o con un'opportuna soluzione prima dell'uso; è comunque buona prassi scartare la prima aliquota di filtrato. Un'eventuale contaminazione da parte del filtro può essere evidenziata con una prova in bianco.

Esistono molti tipi di dispositivi filtranti. Il più semplice, utilizzato soprattutto con filtri di carta, è costituito semplicemente da un imbuto nel quale si inserisce il filtro stesso, che può essere liscio o a pieghe. Dispositivi comunemente utilizzati per filtri a membrane sono le cartucce, smontabili o monouso, da applicare alle siringhe, e le unità di filtrazione, monouso o riutilizzabili, costituite da un recipiente cavo di riempimento, un supporto per la membrana ed un recipiente di raccolta.

Il tipo di dispositivo filtrante dipende anche dal volume di fluido da filtrare. Per piccoli volumi o campioni costosi le dimensioni del dispositivo dovrebbero essere ridotte al minimo.

I metodi classici di analisi

Come metodi classici di analisi si intendono le tecniche volumetriche e gravimetriche. Anche utilizzando queste metodiche, seppur ben consolidate, si possono incontrare problemi o commettere errori, soprattutto la prima volta in cui le si applica.

Ad esempio i metodi che prevedono titolazioni spesso richiedono all'analista una certa pratica nel riconoscere il "vero" punto finale. Può essere utile avere soluzioni di confronto contenenti un eccesso e un difetto di reagente. Al momento della lettura del volume erogato, l'occhio dell'analista deve essere alla stessa altezza del menisco, per evitare errori di parallasse. Il parallasse è l'apparente spostamento del livello di un liquido o di un indice quando un osservatore cambia posizione. Esso si verifica quando un oggetto viene visto da una posizione che non è ad angolo retto rispetto all'oggetto stesso. Può essere preferibile valutare il punto finale strumentalmente con uno spettrofotometro o un potenziometro.

Prima di procedere alla titolazione, le burette devono essere avvindate con le soluzioni del campione e del titolante.

Le burette devono essere pulite e sgrassate, ad esempio con potassa alcolica, in modo che le soluzioni scorrono in modo fluido e non rimangano gocce aderenti alle pareti, con conseguente errore nella lettura dei volumi. Per lo stesso motivo la velocità di percolazione attraverso la buretta non deve essere troppo rapida e va rallentata in prossimità del punto finale. Durante la titolazione si deve mescolare o agitare costantemente per garantire una reazione rapida e completa del titolante con l'analita e/o l'indicatore.

Le procedure gravimetriche possono causare problemi se le stufe o le muffole non sono ben calibrate. Gli essiccatori devono essere funzionanti, ed il gel di silice in essi presenti non deve essere idratato, cioè avere un colore blu e non rosa. E' necessario riscaldare più volte, raffreddare e ripesare i precipitati sino a rag-

giungere un peso costante. Altre cause di errore possono derivare da co-precipitazioni o estrazioni inefficaci, o dall'uso di reagenti impuri.

L'ambiente di laboratorio

L'ambiente di laboratorio può influenzare la qualità delle misure attraverso vari fattori: vibrazioni, polvere, luce solare, radiazioni, campi elettrici e magnetici, rumore, fluttuazioni in temperatura e umidità.

L'analista in genere ha scarsa influenza sulla struttura e disposizione di un laboratorio preesistente, ma può cercare di migliorare alcuni aspetti. Ad esempio è possibile:

- richiedere l'installazione di condizionatori per mantenere l'ambiente a temperatura costante;
- modificare la disposizione degli strumenti per evitare interferenze reciproche;
- accordarsi con gli altri analisti per svolgere in tempi diversi operazioni od analisi che potrebbero causare interferenze sull'analisi in corso.

La sicurezza

La sicurezza è un elemento fondamentale in ogni laboratorio chimico. Anche qui, come in ogni posto di lavoro, devono essere rispettate le norme della legislazione italiana in termini di sicurezza (legge 626/94 e successive modifiche e integrazioni).

Le principali norme di comportamento da adottare per garantire la sicurezza in un laboratorio chimico sono:

- indossare camice, guanti e occhiali protettivi; se necessario, indossare altri dispositivi di protezione individuale (es. maschere antipolvere, antigas o dotate di impianto di respirazione autonomo);
- leggere le schede di sicurezza relative ai prodotti chimici utilizzati, al fine di conoscere gli eventuali rischi legati al loro uso e le norme da seguire per la loro manipolazione;
- prima di eseguire operazioni non ben conosciute, consultarsi con personale esperto;
- leggere le istruzioni del produttore prima di utilizzare un'apparecchiatura; gli apparecchi devono essere usati esclusivamente per il loro uso specifico. Non si devono utilizzare attrezzi impropri o di fortuna;
- utilizzare reagenti volatili (acidi, ammoniaca, solventi organici...) solo sotto cappa. Analogamente, effettuare sotto cappa tutte le operazioni che possono generare fumi o vapori;
- tenere le sostanze infiammabili lontane da fiamme libere o da apparecchiature elettriche senza protezione antiscintilla;
- conservare i reagenti in contenitori chiusi e in armadi adatti;
- etichettare i contenitori dei reagenti, indicando gli eventuali rischi; i simboli e le frasi di rischio (frasi R) e le norme per l'uso sicuro e la conservazione dei prodotti (codici S) che sono riportate nel D.M. 17/12/1977;
- aprire i recipienti con cautela, dirigendone l'imboccatura lontano da se stessi e da altre persone. Se il recipiente viene prelevato da un ambiente a temperatura diversa, aspettare che la temperatura si equilibri con quella dell'ambiente;
- fissare saldamente i tubi di adduzione o scarico di acque;
- adottare misure di protezione per le operazioni in pressione o in depressione, che possono causare esplosioni o implosioni; utilizzare con cautela i gas compressi in bombole;
- tenere le apparecchiature elettriche lontano da schizzi d'acqua, solventi, sostanze corrosive;
- curare l'ordine e la pulizia del posto di lavoro occupato e riporre il materiale non utilizzato;
- non portare oggetti alla bocca o agli occhi e lavarsi le mani al termine del lavoro;
- non pipettare aspirando a bocca;
- pulire immediatamente qualunque sversamento;

-
- conoscere le misure di primo soccorso da adottare in caso di incidente ed il comportamento da tenere in presenza di un incendio.
 - Anche la struttura e la dotazione del laboratorio devono rispettare la normativa vigente in termini di sicurezza. In particolare in un laboratorio devono essere presenti:
 - cappe aspiranti;
 - armadi di sicurezza per la conservazione di solventi e prodotti chimici;
 - docce, lavaocchi e materiale per primo soccorso, in caso di incidenti;
 - cartelli che segnalino, mediante i simboli convenzionali, pericoli particolari derivanti da radiazioni ionizzanti, materiale infiammabile e così via;
 - schede di sicurezza di tutti i prodotti chimici presenti;
 - estintori, dispositivi di rilevamento di incendi e di vapori di sostanze volatili;
 - sistema di raccolta dei reflui.

La strumentazione

Le principali strumentazioni presenti nei laboratori di analisi possono essere divise in due gruppi:

- strumentazione di uso generale: bilance, micropipette, stufe, muffole, centrifughe;
- strumentazione per determinazione di analiti: potenziometri (pH metri), spettrofotometri UV-visibile, spettrometri di assorbimento atomico o emissione atomica, cromatografi (cromatografi liquidi, gascromatografi, eventualmente accoppiati a spettrometro di massa, cromatografi ionici).

Altre strumentazioni per applicazioni particolari sono: spettrometri IR, diffrattometri a raggi X, analizzatori voltammetrici, termobalance, calorimetri a scansione differenziale e così via.

Indicazioni generali di utilizzo

La regolare manutenzione della strumentazione garantisce una maggiore durata e un miglior funzionamento.

In primo luogo gli strumenti vanno mantenuti puliti e eventuali sversamenti di prodotti chimici vanno subito puliti. I manuali di ciascuno strumento indicano in genere altre operazioni da compiere periodicamente per mantenere gli strumenti in buone condizioni. La pulizia di strumenti delicati può causare loro dei danni. Se il manuale dello strumento non contiene istruzioni chiare per la pulizia, è più sicuro affidarsi ai tecnici.

Le parti di ricambio dovrebbero essere controllate e periodicamente sostituite. Conviene tener traccia dell'utilizzo e di tutti gli interventi tecnici e di manutenzione effettuati sullo strumento in modo da avere a disposizione la sua "storia".

Prima di iniziare ad utilizzare un nuovo strumento è importante leggerne il manuale, che spesso fornisce utili indicazioni pratiche. Esso dovrebbe essere poi collocato vicino a ciascuno strumento per consentirne la consultazione in caso di necessità.

Gli strumenti devono essere stabilizzati e il loro funzionamento deve essere ottimizzato prima di iniziare un'analisi. È inoltre necessaria una calibrazione, come indicato nel capitolo seguente.

La verifica dell'efficienza degli strumenti durante un insieme di analisi è realizzata con procedure di controllo di qualità.

La calibrazione

La calibrazione di uno strumento o di un'apparecchiatura (ad esempio la vetreria) consiste nel confronto di una quantità misurata con un valore di riferimento. La calibrazione è un aspetto molto importante di una misura: la validità di un risultato dipende infatti dalla validità della calibrazione.

Si possono distinguere due componenti:

- calibrazione "fisica", finalizzata alla verifica che gli strumenti funzionino correttamente;
- calibrazione "chimica" con soluzioni a concentrazione nota, che possono essere misurate separatamente dai campioni (standard esterni) o fare parte dei campioni stessi (standard interni).

Per quanto riguarda la calibrazione "fisica", tutti gli strumenti (vetreria volumetrica, forni, muffole, bilance, strumenti per le analisi) devono essere calibrati con standard documentabili a intervalli regolari di tempo.

La calibrazione deve essere effettuata spesso, con frequenza dipendente dal tipo di strumento.

La calibrazione “chimica” viene effettuata in due modi: usando standard chimici puri (cioè quantità note di analita sciolte o diluite nell’opportuno solvente) oppure matrici tipiche (uguali o molto simili alla matrice da analizzare) in cui la quantità di analita presente è ben nota. Questi si chiamano materiali di riferimento.

Secondo le definizioni ISO (International Organization for Standardization):

- un materiale di riferimento è un materiale o una sostanza di cui una o più proprietà sono sufficientemente note da essere usate per la calibrazione di un metodo, o per assegnare valori a materiali;
- un materiale di riferimento certificato è un materiale di riferimento di cui una o più proprietà sono certificate da una procedura tecnicamente valida, accompagnata da un certificato o da un’altra documentazione emessa da un ente certificatore.

I materiali di riferimento certificati hanno cinque applicazioni principali:

- calibrazione e verifica di processi di misura in condizioni di routine;
- controllo di qualità interno e schemi di assicurazione di qualità;
- verifica dell’applicazione corretta di metodi standardizzati;
- sviluppo e validazione di nuovi metodi di misura;
- calibrazione di altri materiali.

Lo sviluppo e caratterizzazione di materiali di riferimento è un processo costoso, che si riflette sul loro prezzo di vendita. Per questo motivo l’uso di materiali di riferimento è diretto alla validazione iniziale di un metodo. Non è economico usare un materiale di riferimento per il controllo di qualità di routine, ma esso può essere utilizzato per calibrare altri materiali secondari più economici con i quali effettuare il controllo di qualità quotidiano.

La frequenza della calibrazione “chimica” dipende dal tipo di strumento. L’EPA consiglia di calibrare quotidianamente e noi concordiamo su questa indicazione. Dopo la calibrazione è conveniente misurare la risposta dello strumento ad una concentrazione nota usando i dati della calibrazione stessa per confermarne il valore. Più volte al giorno si deve inoltre controllare se sono necessarie correzioni per la presenza di derive o di avvelenamento del sistema di rivelazione, per verificare la risposta alla calibrazione ed alla selettività ed evidenziare eventuali effetti memoria.

Le procedure di calibrazione ed i valori misurati (ad esempio intensità, o assorbanza, o area del picco) devono essere documentati e conservati; spesso è richiesto che vengano riportati insieme ai risultati delle analisi. I dati della calibrazione servono a provare che un sistema è funzionante, e che i risultati ottenuti sui campioni sono corretti, ed indicano quando le prestazioni si stanno deteriorando.

Conviene costruire carte di controllo, in modo da evidenziare effetti di deriva verso l’alto o verso il basso della sensibilità di risposta. Con una carta di controllo si può determinare in quanto tempo, dopo la calibrazione, i valori cadono al di fuori degli intervalli considerati accettabili. La frequenza di ricalibrazione deve essere collocata all’interno di questo intervallo.

Se la procedura di calibrazione rivela che lo strumento non è all’interno di limiti accettabili, occorre un’azione correttiva, che può essere una calibrazione “fisica”, la manutenzione o la riparazione dello strumento.

La calibrazione esterna

Si preparano un bianco e più soluzioni standard a concentrazione nota dell’analita e si misura il loro segnale. Il segnale netto (standard – bianco) viene riportato in grafico in funzione della concentrazione degli standard. Si ottiene così una curva di calibrazione (figura 4). Nel corso dell’analisi si misurerà il segnale dei campioni e si ricaverà dalla curva il valore di concentrazione corrispondente al segnale stesso. Le strumentazioni moderne calcolano automaticamente la curva di calibrazione dalle misure degli standard e forniscono direttamente le concentrazioni dei campioni. Nella grande maggioranza dei casi si cerca di essere in

condizioni di dipendenza lineare tra segnale e concentrazione, in modo che la curva sia in realtà un segmento di retta. In genere si usano almeno tre standard più un bianco. I metodi EPA prevedono di effettuare la calibrazione con tre soluzioni standard per la determinazione di metalli e con cinque soluzioni quando gli analiti sono composti organici. Si misura prima il segnale del bianco e poi quello degli standard, in ordine di concentrazione crescente, allo scopo di evitare effetti memoria. Non si deve assumere che la curva passi attraverso il punto 0,0 a meno che la misura di un bianco non abbia mostrato che questo è il caso. Per l'intervallo di uso della curva v. 3.3.1.1 (controllo di qualità).

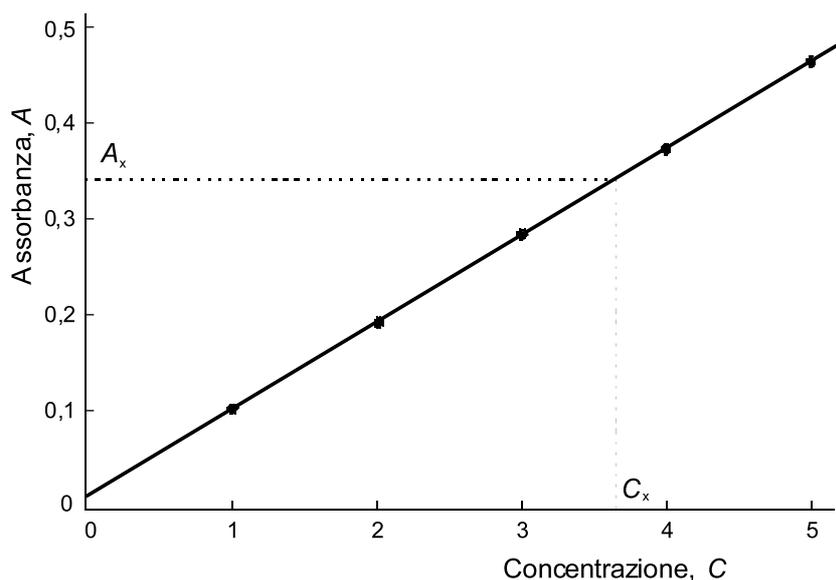


Figura 4: Esempio di curva di calibrazione

L'uso di standard esterni è adatto per molte applicazioni. Idealmente gli standard dovrebbero essere preparati in una matrice il più possibile simile alla matrice dei campioni, per essere sicuri che rispondano allo strumento nello stesso modo dei campioni stessi. Sicuramente standard e campioni vanno preparati nei medesimi solventi.

Per minimizzare i problemi di effetti matrice si utilizzano le tecniche di calibrazione interna.

La calibrazione interna: il metodo delle aggiunte standard

Le tecniche di calibrazione interna prevedono l'aggiunta dello standard al campione stesso cosicchè standard e analita originario sono misurati nella medesima matrice. Gli standard interni possono essere sia gli analiti stessi, o una sostanza correlata. In questo caso si sceglie una sostanza che non sia presente originariamente nel campione ma che si comporti in modo simile a quello dell'analita nel processo di misura.

Quando lo standard interno è l'analita stesso si parla di metodo delle aggiunte standard, singole o multiple.

Nel caso dell'aggiunta standard singola si analizza il campione tal quale e dopo l'aggiunta di una quantità nota dell'analita. La concentrazione originaria C_x è data dall'equazione

$$C_x = \frac{C_s \times A \times F_1}{B - (A \times F_2)}$$

dove

C_s = concentrazione della soluzione standard (prima di essere addizionato al campione)

A = segnale del campione tal quale (può essere l'assorbanza, l'area del picco cromatografico, l'intensità di emissione...)

B = segnale del campione addizionato dello standard

$$F_1 = \frac{Volume_{standard}}{Volume_{campione} + Volume_{standard}}$$
 è il fattore di diluizione che, moltiplicato per C_s , fornisce la concentrazione di analita aggiunta al campione

$$F_2 = \frac{Volume_{campione}}{Volume_{campione} + Volume_{standard}}$$

è il fattore di diluizione che, moltiplicato per il segnale del campione, tiene conto della sua variazione in seguito alla diluizione causata dall'aggiunta dello standard.

Di solito si usano standard ad elevata concentrazione, aggiunti in volumi piccoli rispetto al volume di **campione**. In questo caso si può trascurare la variazione di volume dovuta all'aggiunta di standard.

$$F_1' = \frac{Volume_{standard}}{Volume_{campione}}$$

In questo caso F_1 si semplifica in F_1' : e $F_2 = 1$.

In queste condizioni la concentrazione incognita C_x diventa:

$$C_x = \frac{C_s \times A \times F_1'}{B - A}$$

La quantità (massa) di analita aggiunto non deve rappresentare un forte eccesso rispetto alla quantità originariamente presente. Tra l'aggiunta e la misura deve trascorrere un tempo sufficiente da permettere che lo standard vada in equilibrio con la matrice del campione e con eventuali interferenti.

Con il metodo delle aggiunte standard multiple si analizzano più aliquote del campione addizionate di quantità crescenti di analita (con alcuni tipi di strumentazione, ad esempio gli analizzatori voltammetrici, vengono effettuate aggiunte successive alla stessa aliquota di campione misurandone ogni volta il segnale). Si riporta in grafico sull'asse delle ordinate il segnale misurato e sull'asse delle ascisse il valore della concentrazione aggiunta. La concentrazione incognita è rappresentata dall'intercetta della retta sull'asse negativo delle ascisse (figura 5).

Il metodo consente di ovviare parzialmente all'effetto della matrice sulla sensibilità di risposta dello strumento, ma non nel caso in cui l'analita sia in forma diversa nello standard e nel campione. Se l'analita è legato fortemente alla matrice non sempre si comporterà allo stesso modo dello standard aggiunto. Inoltre il metodo delle aggiunte standard non permette di tener conto di segnali di fondo (non dovuti all'analita ma ad eventuali interferenti) presenti nel campione.

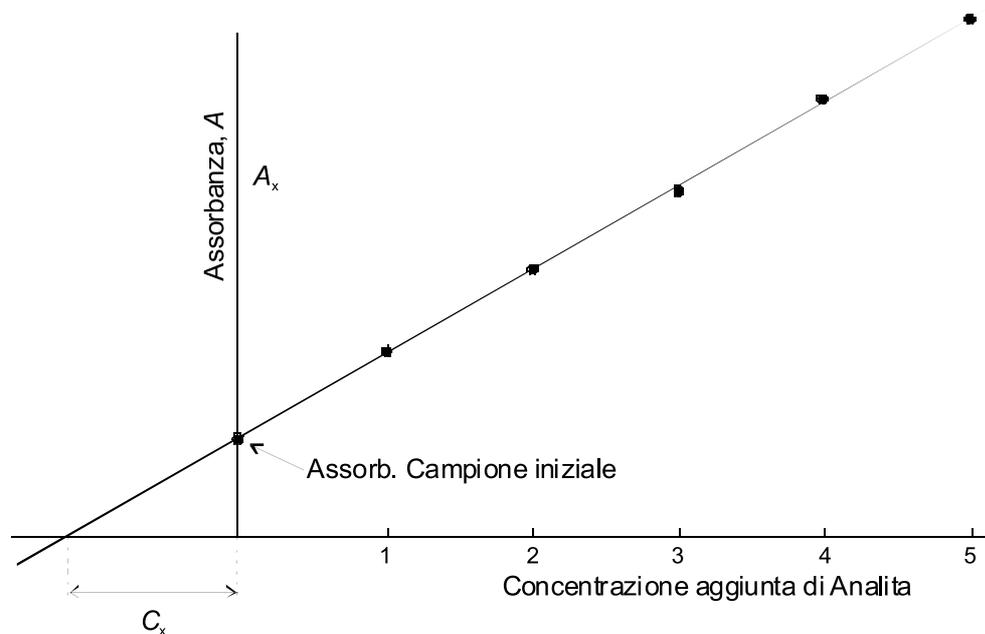


Figura 5: Esempio di grafico per la determinazione di un analita con il metodo delle aggiunte standard multiple.

L'aggiunta di una soluzione dell'analita di interesse è anche un metodo per confermare la presenza dell'analita stesso. Ad esempio in gascromatografia o in cromatografia liquida non è inusuale che la matrice del campione causi una differenza nei tempi di ritenzione del picco dell'analita tra standard e campione. Aggiungendo lo standard al campione e misurando il tempo di ritenzione del picco incrementato è possibile confermare l'identità di una specie.

La calibrazione interna: il metodo dello standard interno

Il metodo dello standard interno è utilizzato per minimizzare le differenze nelle proprietà fisiche di una serie di soluzioni che contengono lo stesso analita. Si aggiunge una quantità fissa di una sostanza pura ai campioni ed agli standard. Si calcola il rapporto tra la concentrazione dell'analita e dello standard interno in ciascuna soluzione. Se i parametri che influenzano la risposta sono controllati, il segnale dello standard interno sarà costante. Se tuttavia uno o più parametri variano, la risposta dell'analita e dello standard interno sarà influenzata nella stessa misura. Quindi il loro rapporto dipenderà solo dalla concentrazione dell'analita. La curva di taratura è rappresentata dal grafico che riporta il valore di tale rapporto in funzione della concentrazione.

Lo standard interno deve essere una sostanza simile all'analita, con un segnale facilmente misurabile, che risponda a qualunque variabile che influenzi la risposta dello strumento in modo simile all'analita stesso, e che non causi interferenze. La concentrazione dello standard interno deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella dell'analita.

La strumentazione: le singole apparecchiature

Per ogni strumento si forniranno indicazioni pratiche trattando, quando pertinente, i seguenti argomenti:

- indicazioni per un corretto utilizzo ed accorgimenti da adottare durante la calibrazione e l'analisi;
- manutenzione e controlli periodici;
- possibili fonti di errore.

Per tutti gli strumenti valgono le seguenti considerazioni:

- la frequenza degli interventi di manutenzione descritti dipende dalla frequenza d'uso dello strumento e dalla natura (matrice, concentrazione) dei campioni analizzati;
- alcuni degli interventi descritti sono molto semplici. Gli interventi più complessi (ad esempio la pulizia della sorgente del GC-MS) vanno effettuati da personale esperto. Se non si possiede la necessaria competenza, conviene affidarsi ai tecnici delle ditte produttrici degli strumenti.

La bilancia

Si distingue normalmente tra bilancia tecnica (sensibilità 0,01 g) e analitica (sensibilità 0,1 mg).

Se possibile la bilancia deve trovarsi in un locale diverso da quello del laboratorio, per evitare la presenza di gradienti di temperatura e di umidità. Deve essere collocata su un tavolo antivibrante regolando la planimetria del piano di pesata mediante una livella a bolla. Il piatto della bilancia deve essere tenuto pulito. È importante controllarne periodicamente la calibrazione con pesi a valore noto. Nella bilancia analitica il piatto è collocato in uno scomparto chiuso, di solito delimitato da vetri scorrevoli, che contiene materiale essiccante.

Le micropipette

Frequentemente nei laboratori si misurano piccoli volumi di reagenti con l'ausilio di micropipette a puntale o a siringa. Tipicamente esse sono utilizzate per erogare volumi da pochi μl a 5 - 10 ml. Le micropipette a puntale possono essere a volume fisso o variabile; ciascun modello è adatto ad un determinato intervallo di volumi: ad esempio 2 - 20 μl , 10 - 100 μl , 200 - 1000 μl e così via. Non conviene usare una micropipetta da 200 - 1000 μl per l'erogazione di 50 μl , anche se il dispositivo di regolazione permette di selezionare questo volume, perché non si otterrebbe un'accuratezza sufficiente. È consigliabile non utilizzare micropipette a puntale per l'aspirazione di acidi concentrati, perché i vapori penetrerebbero all'interno del dispositivo e causerebbero fenomeni di corrosione. È meglio in questi casi utilizzare micropipette a siringa.

Le micropipette a siringa sono in genere adatte all'erogazione di un ampio intervallo di volumi, ottenuti variando le dimensioni delle siringhe da collegare al dispositivo principale. È necessario condizionare la siringa con la soluzione da prelevare prima dell'uso. Inoltre quando si effettuano erogazioni multiple con la stessa siringa conviene non usare l'ultima aliquota di volume iniettabile, perché spesso la sua erogazione non è accurata come le altre, ma fermarsi alla penultima.

Le micropipette vanno periodicamente tarate per pesata. Se si riscontrano malfunzionamenti ai quali non è possibile provvedere direttamente, vanno rimandate alla ditta produttrice per la manutenzione e la ricalibrazione.

La stufa, la muffola, la centrifuga

Questi strumenti non richiedono particolari manutenzioni, a parte ovviamente le normali procedure di pulizia.

La calibrazione di una stufa può essere controllata impostando una temperatura e misurandone l'effettivo raggiungimento con un termometro.

Quando si effettuano misure di umidità, oppure di ceneri, occorre preventivamente sottoporre il recipiente che si userà ai medesimi trattamenti termici previsti per il campione, in modo da evitare errori dovuti a sue eventuali variazioni di peso (ad esempio per la presenza di umidità residua). Il recipiente trattato verrà conservato in essiccatore e pesato, dopo avervi introdotto il campione, all'inizio della prova. Dopo il trattamento termico il tutto verrà trasferito in essiccatore e pesato solo dopo il raggiungimento della temperatura ambiente.

Il vano della centrifuga deve essere ben bilanciato. Pertanto occorre accertarsi che le provette abbiano pesi

uguali. Nel caso si centrifughi un numero dispari di campioni, si introdurrà un'ulteriore provetta con lo stesso peso di acqua in posizione opposta alla provetta "spaiata".

Il potenziometro e pHmetro

Gli elettrodi usati per la misura del pH sono solitamente quelli a vetro, spesso combinati con l'elettrodo di riferimento. Gli elettrodi di uso generale non possono essere utilizzati in soluzioni a pH superiore di 11 (per l'insorgere del cosiddetto errore alcalino) o in soluzioni fortemente acide. Ci sono in commercio elettrodi che possono essere utilizzati fino a pH 14. La rilevazione del valore di pH deve essere preceduta da un periodo di ambientamento degli elettrodi nella soluzione in esame. Va ricordato che in ambiente acido ($\text{pH} < 3$) il raggiungimento dell'equilibrio è più lento che in ambiente neutro o debolmente acido. E' necessario agitare la soluzione, soprattutto in presenza di soluzioni non tamponate. Va inoltre ricordato che i risultati delle misure effettuate in soluzioni non acquose vanno interpretati con cautela.

La calibrazione del pH metro si effettua utilizzando soluzioni tampone a pH noto. Una buona taratura si effettua con due soluzioni tampone. Il pH delle soluzioni standard deve essere entro ± 2 unità rispetto al pH da misurare.

Il pHmetro è uno strumento relativamente semplice che non richiede particolari interventi di manutenzione. Dopo l'uso gli elettrodi devono essere sciacquati in acqua distillata e conservati in una soluzione dell'elettrolita interno (costituita ad esempio da KCl 3 M), a meno che le istruzioni allegate allo strumento non diano indicazioni diverse. Soprattutto la membrana dell'elettrodo a vetro non deve essere lasciata a secco. Periodicamente si rabbocca anche la soluzione dell'elettrolita interno. Se l'elettrodo è stato utilizzato in campioni con una matrice complessa o contenenti potenziali interferenti (ad esempio ioni solfuro, che possono causare la precipitazione di Ag_2S in presenza di un elettrodo di riferimento Ag/AgCl) può essere necessario un trattamento più drastico di pulizia. Si consiglia di seguire le indicazioni riportate dalle case produttrici di ciascun elettrodo.

La temperatura influenza la misura del pH per due motivi. In primo luogo, il valore del potenziale (e di conseguenza l'andamento della curva di calibrazione) dipende dalla temperatura, in accordo con la legge di Nernst. Spesso i pHmetri sono dotati di una sonda che compensa direttamente la temperatura della soluzione in esame. In caso contrario si deve fissare manualmente il compensatore al valore della temperatura della soluzione stessa.

Inoltre il valore di pH di campioni e tamponi varia, sia pur lievemente, con la temperatura, in quanto quest'ultima influenza gli equilibri chimici presenti in soluzione. Ad esempio uno dei tamponi NIST (National Institute of Standards and Technology) ha pH 4,00 a 20 °C e 4,02 a 30 °C. Le case produttrici di prodotti chimici spesso riportano il pH delle soluzioni tampone in funzione della temperatura: è così possibile inserire l'esatto valore durante la calibrazione. Alcuni strumenti, nei quali sono memorizzati i dati di alcune serie di soluzioni tampone commerciali, effettuano automaticamente questa correzione una volta specificata la casa produttrice.

Gli elettrodi ionoselettivi vengono spesso conservati, per brevi periodi, in soluzioni contenenti lo ione a cui ciascun elettrodo è sensibile e, per lunghi periodi, a secco. In ogni caso, conviene seguire le indicazioni fornite dalle case produttrici per i singoli elettrodi.

Lo spettrofotometro UV-visibile

E' opportuno controllare periodicamente l'accuratezza delle prestazioni di uno spettrofotometro UV-visibile. Esistono in commercio soluzioni certificate di dicromato di potassio in acido perclorico diluito, fornite in celle sigillate, con le quali si può verificare l'accuratezza della scala di assorbanza e la linearità di risposta nella regione dell'ultravioletto. Per la zona del visibile sono disponibili filtri in vetro con assorbanza nota. L'accuratezza nella selezione della lunghezza d'onda può essere controllata con soluzioni contenenti terre

rare, vendute in celle sigillate, che danno luogo a spettri caratteristici con una serie di picchi stretti nelle regioni dell'UV e del visibile. Esempi di sostanze usate a questo scopo sono l'ossido di olmio e l'ossido di samario. In alternativa si possono utilizzare filtri a base di terre rare, come olmio o didimio. Inoltre per la rivelazione della luce parassita (stray light) esistono filtri caratterizzati da una lunghezza d'onda di cut off al di sotto della quale la trasmittanza dovrebbe essere nulla: l'esistenza di luce trasmessa indica quindi la presenza di stray light. Questi filtri sono comunemente costituiti da alogenuri o carbonati di metalli alcalini. Infine si può controllare la risoluzione dello strumento con celle sigillate contenenti una soluzione di toluene in esano oppure vapori di benzene. Le caratteristiche dello spettro di queste sostanze dipenderanno dalla risoluzione dello strumento. Ad esempio ci si attende che per il toluene il rapporto tra il massimo a 269 nm ed il minimo a 266 nm sia pari a 1,6 per una larghezza di banda di 1,5 nm.

Gli spettrofotometri UV-visibile non richiedono particolari interventi di manutenzione. Le parti da sostituire più frequentemente, e comunque dopo moltissime ore di utilizzo, sono le lampade che emettono le radiazioni visibili o UV. Quando non si riesce a ottenere uno spettro da una soluzione, pertanto, il primo controllo da effettuare è quello dell'usura della lampada.

Per misure nell'ultravioletto si devono utilizzare celle in quarzo, che è trasparente da circa 190 nm nell'UV fino a 3-4 μm nell'IR; nell'intervallo di radiazioni del visibile è possibile impiegare anche il vetro, che è trasparente da circa 350 nm a 2-3 μm . Le celle devono essere pulite, sciacquate con acqua e con la soluzione appropriata tra una misura e l'altra e, se necessario, asciugate dall'esterno con carta non abrasiva. Si può anche ripulirne l'esterno con metanolo, che evapora rapidamente lasciando le pareti asciutte e prive di contaminanti. Prima di ogni misura, le celle devono essere condizionate con un'aliquota della soluzione (bianco, standard o campione) in esame. Esse normalmente presentano due lati trasparenti e due lati opachi, e vanno tenute dai lati opachi, per evitare la presenza di impronte digitali, che potrebbero causare fenomeni di assorbimento o diffusione della luce, sulle pareti trasparenti. Inoltre tutte le celle hanno lievi imperfezioni, per cui le perdite per riflessione e diffusione cambiano quando lati diversi sono esposti alla radiazione: pertanto è importante riposizionare la cuvetta sempre dallo stesso lato quando si esegue una serie di misure.

Le soluzioni degli standard e dei campioni devono essere otticamente trasparenti. Per effettuare misure spettrofotometriche di assorbanza, il composto in esame deve essere stabile nel tempo; in caso contrario occorre conoscere l'intervallo di stabilità del colore ed effettuare l'analisi in tale intervallo.

Descrizione della tecnica e dello strumento

Lo spettrometro di assorbimento atomico a fiamma e fornello

Qualunque fattore influenzi l'atomizzazione della soluzione può essere critico per l'efficienza dell'atomizzazione stessa e quindi per l'accuratezza della misura. Quindi utilizzando lo spettrometro di assorbimento atomico a fiamma si deve tener conto della concentrazione di acidi e della presenza di solventi organici o tensioattivi che possono cambiare la viscosità della soluzione introdotta nell'atomizzatore. Con lo strumento a fornello di grafite può essere necessario modificare la sequenza di stadi di riscaldamento che portano all'atomizzazione a seconda della composizione della matrice. Ad esempio si può inserire uno stadio intermedio tra quelli della rimozione del solvente e dell'arrostimento, ad una temperatura appena superiore al punto di ebollizione di un sale relativamente volatile (ad esempio acetato di ammonio) presente in soluzione; in alcuni casi può risultare necessario rallentare la velocità con cui la temperatura raggiunge il punto di arrostimento, per evitare fenomeni di evaporazione troppo rapida, che potrebbe portare a schizzi e quindi a perdita di parte dell'analita; in presenza di un'elevata frazione di materia organica conviene inoltre prolungare lo stadio di arrostimento. Per la determinazione di molti elementi conviene aggiungere dei modificatori di matrice. La loro funzione è quella di permettere una migliore separazione tra gli stadi di rimozio-

ne della matrice e di atomizzazione, rendendo più volatile la prima oppure diminuendo la volatilità dell'analita.

Con entrambe le tipologie di strumento è importante che soluzioni standard e campioni siano preparati nella stessa matrice in modo che l'efficienza di trasporto e di atomizzazione siano le medesime. Può essere necessaria la correzione del fondo, particolarmente a basse lunghezze d'onda, cioè inferiori a 275 nm.

Prima di iniziare le misure conviene attendere circa 15 minuti perché si stabilizzi l'emissione della lampada.

Quando si eseguono le misure conviene visualizzare la forma dei picchi, se lo strumento lo consente, e non solo il valore dell'area o dell'altezza, in modo da evidenziare eventuali problemi (ad esempio picco incompleto a causa di un tempo di atomizzazione troppo breve).

Con gli spettrometri a fiamma le principali fonti di errore consistono nella diversa efficienza di nebulizzazione di standard e campioni, nell'incompleta atomizzazione dell'analita o nella formazione nella fiamma di composti che possono causare assorbimento o diffusione della radiazione.

Per quanto riguarda lo spettrometro a fornetto, le principali cause di errore nel corso delle misure sono il fornetto usurato e l'iniezione non corretta del campione nel fornetto stesso. Occorre controllare periodicamente che i volumi, nei cup di misura, del modificatore e delle soluzioni standard per i controlli di qualità siano sufficienti per l'esecuzione delle analisi successive, e se necessario rabboccare le soluzioni. Lo strumento soffre di effetti memoria, per cui è importante, quando si analizzano campioni a concentrazione relativamente elevata, intercalare la misura di un bianco, finché il suo segnale non torna al livello di base. Per lo stesso motivo prima di iniziare la calibrazione occorre ripetere l'analisi sul bianco finché il suo segnale non rimane stabile.

Per la manutenzione degli spettrometri a fiamma è necessario eseguire periodicamente la pulizia del bruciatore, del nebulizzatore, della camera di nebulizzazione e dei tubi di trasporto del campione.

Le principali operazioni di manutenzione e controllo per gli spettrometri di assorbimento atomico a fornetto di grafite sono:

- la sostituzione del fornetto di grafite quando è usurato. L'usura si rileva visivamente, oppure dalla forma dei picchi, che diventano sempre più allargati e codati, o addirittura da messaggi di errore dello strumento stesso che rivela un'impedenza molto elevata. È possibile che un fornetto apparentemente in buono stato non dia in realtà buone prestazioni a causa della presenza di piccolissimi fori nella struttura della grafite. Prima dell'uso il fornetto deve essere sottoposto ad un trattamento termico con successivi cicli di riscaldamento e raffreddamento seguendo le indicazioni dei produttori dello strumento;
- la pulizia dei coni di grafite nei quali si inserisce il fornetto. I coni si possono pulire con un batuffolo di cotone imbevuto di acido fosforico diluito. Quando lo strumento non fornisce prestazioni soddisfacenti, oppure il ciclo di riscaldamento non viene avviato, anche in presenza di un fornetto nuovo, è probabile che i coni siano da sostituire;
- la pulizia delle finestre in quarzo del fornetto e del reparto lampade e monocromatore. Le finestre possono essere lavate con ammoniaca diluita;
- il controllo che il puntale dell'autocampionatore (se questo dispositivo è presente) non sia piegato o deformato e che depositi correttamente il campione nel fornetto;
- il controllo che la lampada sia posizionata correttamente rispetto alle fenditure, e l'eventuale regolazione della sua posizione.

Descrizione della tecnica e dello strumento

Lo spettrometro di assorbimento atomico con generazione di idruri ed a vapori freddi

Per la manutenzione e l'uso dello strumento valgono tutte le indicazioni riportate al punto 3.2.7.6, con l'aggiunta di alcune note sull'introduzione del campione.

Prima di iniziare una misura conviene far fluire il gas inerte nel sistema per alcuni minuti in assenza di campione. E' utile impostare un flusso di gas anche tra una misura e l'altra per evitare effetti memoria. Nei sistemi a flusso continuo e flow injection inoltre è opportuno avviare l'aspirazione dei reagenti, e controllare che fluiscano regolarmente, prima di introdurre il campione. Occorre regolare la velocità di flusso del gas e dei reattivi in modo che non ci sia un travaso di soluzione dal separatore gas-liquido alla cella.

Al termine di ogni ciclo di analisi è necessario aspirare acqua nei tubi in cui sono fluiti i reagenti per rimuoverne le tracce. Nei sistemi in batch si lavano i recipienti del campione e dei reagenti ed i rispettivi beccucci.

Le soluzioni di sodio boridruro vanno preparate in NaOH per prolungarne la stabilità, in quanto rilasciano idrogeno a contatto con gli acidi; tuttavia anche in ambiente basico non sono del tutto stabili e vanno conservate a 4° C e ripreparate almeno settimanalmente.

Le parti da cambiare più frequentemente sono i tubi delle pompe peristaltiche quando queste rientrano nella configurazione del sistema.

La cella in quarzo e le finestre che ne chiudono le estremità vanno pulite periodicamente con acido diluito. Nel caso in cui questo trattamento non fosse sufficiente a rimuovere le contaminazioni, si può fare un lavaggio più drastico immergendo i componenti per pochi minuti in acido fluoridrico: questa operazione va compiuta solo in caso di effettiva necessità perché l'acido fluoridrico attacca il quarzo. Non si devono sfregare le pareti della cella con spatole o altri utensili per rimuovere eventuali incrostazioni: eventuali abrasioni infatti pregiudicherebbero il buon funzionamento dell'apparato.

Utilizzando il sistema di generazione di idruri occorre seguire alcune norme di sicurezza: le soluzioni di boridruro vanno maneggiate con cautela, e l'area di lavoro deve essere dotata di un adeguato sistema di aspirazione a causa della presenza di fumi tossici.

Lo spettrometro di emissione atomica a plasma ad accoppiamento indotto (ICP-AES) e lo spettrometro ICP-MS

Prima di iniziare le misure, conviene attendere 15-30 minuti perché il plasma si stabilizzi dal punto di vista termico. Molti strumenti contengono una lampada a vapori di mercurio che emette radiazioni a lunghezza d'onda fissa per mezzo delle quali viene automaticamente calibrato il monocromatore, al fine di assicurare la corretta selezione delle lunghezze d'onda durante le misure. L'operazione viene svolta all'inizio di ogni ciclo di analisi; successivamente si procede alla calibrazione vera e propria (intensità di emissione in funzione della concentrazione) con soluzioni standard. La calibrazione del monocromatore può essere ripetuta periodicamente a intervalli di una o più ore durante lo svolgimento delle analisi.

Lo strumento soffre di effetti memoria in misura minore rispetto allo spettrometro di assorbimento atomico a fornello di grafite, tuttavia è consigliabile, dopo aver misurato un campione a concentrazione relativamente elevata, effettuare una misura su un bianco e controllare che il suo segnale sia quello atteso. Inoltre quando si effettua una misura, conviene aspirare un'aliquota di campione o di soluzione standard (1 - 2 ml circa) prima di registrare l'intensità di emissione, in modo da rimuovere dal sistema le tracce del campione precedente. Una soluzione standard, a concentrazione vicina a quella dei campioni, può essere letta dopo l'analisi di 3-4 campioni, allo scopo di correggere fenomeni di deriva del segnale che con questo strumento sono abbastanza frequenti.

Al termine delle analisi occorre far fluire per alcuni minuti una soluzione acida diluita, e successivamente acqua pura, al fine di rimuovere dal sistema le tracce dei campioni analizzati.

Le principali cause di errore sono legate all'introduzione del campione nell'atomizzatore, in relazione ai seguenti aspetti: usura dei tubi della pompa, parziale occlusione del nebulizzatore, presenza di depositi e incrostazioni nella camera di nebulizzazione o nella torcia.

I principali interventi di manutenzione per lo spettrometro di emissione a plasma ICP sono:

- la pulizia della torcia, che viene lasciata immersa in una soluzione acida per 12 ore circa. Normalmente si utilizzano acido nitrico, acido cloridrico od acqua regia. Se il trattamento non fosse sufficiente si può immergere la torcia in acido fluoridrico diluito per un breve periodo. Poiché l'acido fluoridrico attacca il quarzo, questa operazione non va ripetuta di frequente;
- la pulizia del nebulizzatore. In caso di ostruzioni, l'orifizio del nebulizzatore pneumatico può essere ripulito per aspirazione sotto vuoto o per trattamento con ultrasuoni. Si può anche introdurre un filo metallico sottilissimo attraverso l'orifizio, solo se il diametro del filo è sufficientemente piccolo da non causarne l'allargamento;
- la pulizia della camera di nebulizzazione;
- la sostituzione dei tubi di aspirazione del campione.

Le indicazioni sull'introduzione del campione, sui tempi di stabilizzazione e sugli effetti memoria sono valide anche per lo spettrometro ICP-MS: Nella maggior parte dei laboratori questo strumento viene tenuto sempre acceso e (per le sezioni in cui ciò è necessario) sotto vuoto, a meno che rimanga inutilizzato per lunghi periodi, per evitare lunghi tempi di attesa per raggiungere i bassi livelli di pressione richiesti per l'analisi.

All'inizio di un ciclo di misure si effettua un'operazione di "tuning" con una miscela multielementare per controllare l'accuratezza dell'identificazione dei valori dei rapporti m/z e la risoluzione dello strumento.

La calibrazione viene fatta solitamente con il metodo dello standard interno. Si aggiungono al campione quantità note di elementi poco comuni, come rodio, indio e rutenio. Si scelgono standard interni aventi rapporti m/z vicini a quelli degli analiti. Nel caso di interferenze spettrali (isobariche o molecolari), se non è possibile effettuare la misura in corrispondenza di rapporti m/z alternativi, si valutano sperimentalmente fattori correttivi che permettano di sottrarre, dal segnale di interesse, il contributo degli ioni diversi dall'analita; a questo scopo si misura l'intensità del segnale di un altro isotopo degli interferenti e, tenendo conto delle abbondanze isotopiche, si risale alla frazione di segnale, in corrispondenza del rapporto m/z dell'analita, dovuta agli interferenti stessi. Si può inoltre minimizzare la formazione della specie molecolare interferente agendo sulle condizioni operative. Ad esempio la potenza di alimentazione della torcia e la velocità di flusso del nebulizzatore influenzano la formazione delle specie ArO^+ , ClO^+ , $ArAr^+$. Recentemente è stata introdotta la possibilità di utilizzare una cella di collisione, nella quale un gas di reazione (ad esempio He, H_2 o NH_3) collide con gli ioni poliatomici causandone la decomposizione, senza esercitare un'apprezzabile influenza sugli ioni degli analiti. La presenza di interferenze viene identificata a partire da dati di letteratura e, come consigliato dall'EPA, aspirando soluzioni che contengono concentrazioni note degli interferenti più comuni.

I campioni analizzati non devono avere concentrazioni saline troppo elevate che causerebbero incrostazioni ed occlusioni. Solitamente si limita l'analisi a soluzioni con un livello di solidi disciolti inferiore a 2 mg/l.

Per lo spettrometro ICP-MS la manutenzione del sistema di introduzione del campione (pompa, nebulizzatore, camera di nebulizzazione) e della torcia sono identici a quelli descritti per l'ICP-AES. Per quanto riguarda lo spettrometro di massa, i principali interventi necessari sono:

- la pulizia dei coni dell'interfaccia;
- la pulizia delle lenti che focalizzano il fascio di ioni;
- la pulizia delle barre del quadrupolo;
- la sostituzione periodica dei coni dell'interfaccia e dell'olio delle pompe da vuoto.

Il gascromatografo

Le condizioni cromatografiche devono essere ottimizzate per ottenere la separazione del picco dell'analita dai picchi generati da altri composti presenti nel campione. I parametri su cui si può agire sono il tipo di colonna, la velocità di flusso della fase mobile, il programma di temperatura. Si può inoltre regolare il volume iniettato e la temperatura di iniezione. In presenza di picchi non identificati o non riproducibili, che potrebbero derivare da contaminazioni del sistema o della colonna, può essere utile effettuare le operazioni di manutenzione sotto descritte.

Per confermare l'identità di una specie, un'aliquota separata dell'estratto del campione può essere addizionata di una quantità nota di analita puro. Si possono usare colonne con diversa polarità per confermare l'identità e la purezza dell'analita perché si otterranno diversi tempi di ritenzione. Quando possibile, un'ulteriore conferma può venire dall'analisi del campione mediante GC-MS.

Soprattutto per l'analisi di tracce, occorre inoltre minimizzare le contaminazioni derivanti da rilasci dai recipienti o da impurezze presenti nei reagenti, nel gas di trasporto nell'ambiente di laboratorio (polveri, vapori di sostanze volatili), o derivanti dall'operatore stesso.

La calibrazione viene spesso effettuata con il metodo dello standard interno. Come standard interni si scelgono composti non presenti nei campioni, con caratteristiche chimiche analoghe a quelle degli analiti e che diano luogo a picchi ben risolti da quelli degli analiti stessi anche se a tempi di ritenzione vicini. Se si determinano numerosi composti con una sola analisi si aggiungono più standard interni con tempi di ritenzione diversi. La presenza dello standard interno consente di tenere conto di fluttuazioni sia nella sensibilità di risposta dello strumento sia nella posizione dei tempi di ritenzione. Le soluzioni standard possono essere preparate a partire dai composti puri oppure da standard commerciali concentrati; esistono inoltre in commercio soluzioni contenenti miscele di composti organici di composizione appositamente studiata per l'utilizzo con i metodi di analisi EPA.

Ogni nuova colonna deve essere condizionata facendo fluire il gas di trasporto in assenza di collegamento al rivelatore per almeno un'ora. In questa operazione conviene tenere la colonna ad una temperatura di 30 °C inferiore alla sua temperatura massima di esercizio. E' opportuno ripetere il condizionamento ogni volta che si sostituisce una colonna, anche quando se ne installa una già usata.

Le colonne cromatografiche con il tempo perdono di risoluzione, oppure possono essere avvelenate. Pertanto prima di iniziare una serie di misure è necessario assicurarsi che la colonna funzioni correttamente; la verifica viene fatta con soluzioni standard di riferimento, contenenti una miscela di composti appartenenti ad una serie omologa (ad esempio una miscela di idrocarburi). Dalla disposizione e forma dei picchi ottenuti è possibile calcolare il numero di piatti teorici e controllare se i picchi sono simmetrici o asimmetrici.

Il numero di piatti teorici può essere valutato misurando la larghezza dei picchi a metà altezza e conoscendo i tempi di ritenzione. Vale la seguente relazione tra il tempo di ritenzione e il numero di atomi di carbonio degli idrocarburi omologhi:

$$\log t_R = a \times n + b$$

dove t_R è il tempo di ritenzione, n è il numero di atomi di carbonio. Ci deve quindi essere una relazione lineare tra t_R e n . Se invece, riportando in grafico i due parametri, si osserva una convessità o una concavità, la colonna non è perfettamente soddisfacente.

L'asimmetria di un picco viene calcolata dal fattore di asimmetria A , rappresentato dal rapporto tra le larghezze della metà destra e della metà sinistra del picco, calcolate ad un'altezza uguale ad un decimo dell'altezza totale del picco. Se il picco è simmetrico il valore del fattore di asimmetria è uguale ad 1; il picco è considerato accettabile se $A \leq 2$; quando $A \geq 2$ il picco è molto insoddisfacente. L'asimmetria dei picchi indica che all'interno della colonna vi sono meccanismi di ripartizione non ottimali. I fenomeni di codatura si manifestano più frequentemente con soluti polari; perciò la simmetria dei picchi si controlla con una misce-

la standard che contiene idrocarburi alifatici, un idrocarburo aromatico, un'ammina aromatica, un fenolo, un alcol e altri composti polari.

Altra verifica importante è il flusso della fase mobile. In primo luogo si calcola il flusso all'interno della colonna F_c :

$$F_c = F_a \times \frac{T_c}{T_a} \times \frac{P_a - P_w}{P_a}$$

dove

F_a = flusso in ml/min misurato all'uscita della colonna con un flussimetro a bolla di sapone, oppure con un dispositivo elettronico, alla temperatura ambiente

T_a = temperatura ambiente; T_c = temperatura della colonna;

$(P_a - P_w)/P_a$ = fattore correttivo per ottenere il valore della pressione all'uscita della colonna corretto per la tensione di vapore dell'acqua P_w presente nel flussimetro a bolla di sapone.

Da F_c si ricava la velocità lineare della fase gassosa v (cm/s):

$$v = \frac{F_c}{A_c}$$

dove A_c = area della sezione disponibile della colonna = $r_c^2 \times \pi \times e$, dove r_c = raggio della colonna e e = rapporto tra la sezione disponibile e la sezione totale della colonna (vale 1 per colonne capillari).

Per avere una risoluzione ottimale può essere richiesta una regolazione della velocità di flusso.

Le prestazioni di una colonna capillare ed alcune sue caratteristiche (efficienza di separazione, attività all'adsorbimento, acidità/basicità, spessore del film di fase stazionaria) possono essere valutate con il test di Grob, per il quale si rimanda alla letteratura specializzata.

Prima di effettuare un'iniezione la siringa va sciacquata con un opportuno solvente. Se si utilizza un auto-campionatore, la siringa deve essere pulita giornalmente, ad esempio con cloruro di metilene.

E' importante visualizzare e/o stampare il cromatogramma per esaminare la forma dei singoli picchi evidenziando eventuali problemi come la parziale risoluzione di due segnali o la presenza di "spalle". I dati ottenuti usando i soli integratori, senza l'esame visuale del segnale, devono essere trattati con cautela.

Dopo ogni analisi, si attende che il forno sia tornato alla temperatura iniziale prima di effettuare una seconda iniezione. In alcuni strumenti ci sono dispositivi di raffreddamento che abbreviano i tempi di attesa.

Le principali fonti di errore nell'esecuzione delle misure sono:

- errata scelta del volume di campione iniettato. Con gli iniettori *split-splitless* è importante scegliere il corretto rapporto di *splitting* per evitare la saturazione della colonna;
- effetto memoria. La siringa va sciacquata con il solvente tra un campione e l'altro e va preventivamente condizionata con la soluzione da iniettare. Analogamente, occorre pulire altri dispositivi di introduzione del campione (es. *purge and trap*). Inoltre dopo l'analisi di un campione con elevate concentrazioni di analita è buona norma analizzare un bianco, oppure un'aliquota di solvente puro. Se si riscontrano segnali si ripete l'operazione fino a verificare l'assenza di effetti memoria;
- scarsa risoluzione o sovrapposizione dei picchi di più sostanze. I fenomeni di coeluizione si identificano da informazioni di letteratura ed iniettando soluzioni standard dei composti che potrebbero causare interferenza nella misura del segnale dell'analita di interesse;
- rilascio (*bleeding*) da parte della colonna. Un certo livello di *bleeding* è comune a tutte le colonne, ma

un rilascio eccessivo è deleterio per l'analisi. Il processo è accelerato in presenza di ossigeno o di altri contaminanti.

Per minimizzare le contaminazioni da ossigeno occorre usare gas puro e rimuovere ulteriormente le tracce di ossigeno con trappole o cartuccia. E' inoltre necessario controllare che non ci siano punti del sistema che presentino perdite.

Per rimuovere altri contaminanti, che in genere sono trattenuti in testa alla colonna, si rimuove periodicamente un pezzo (pochi centimetri) di colonna capillare dalla parte iniziale. Dopo questo trattamento si fa un condizionamento della colonna ad una temperatura vicina alla sua massima temperatura di esercizio e se ne controllano le prestazioni con una miscela standard.

Ovviamente non si deve interrompere il flusso del *carrier* in colonna né spegnere lo strumento quando il forno è caldo. Prima di spegnere il gascromatografo conviene portare il forno a 40 °C.

Per il rivelatore a cattura di elettroni (ECD) è conveniente accendere il filamento solo dopo che il rivelatore è ad una temperatura superiore a 150 °C. Analogamente, al termine delle analisi, si spegne il filamento solo dopo che la temperatura è scesa a 150 °C.

In molti laboratori lo strumento viene lasciato sempre acceso con il forno a bassa temperatura (ad esempio 40 – 50 °C). In queste condizioni quando si inizia un ciclo di analisi non è necessario attendere la stabilizzazione del sistema: tuttavia è buona norma effettuare una corsa in assenza di campione con le stesse impostazioni di temperatura usate per le analisi.

Al termine di ogni giornata di lavoro conviene effettuare una pulizia del sistema con un trattamento termico a circa 30 °C in meno della temperatura massima di esercizio della colonna. Lo stesso trattamento va effettuato all'inizio di un ciclo di analisi se non si conosce come è stato utilizzato precedentemente lo strumento.

I principali interventi di manutenzione dello strumento sono:

- la sostituzione del setto dell'iniettore;
- la sostituzione della lana di vetro presente nel *liner*. Lo scopo della lana di vetro è aumentare l'area superficiale disponibile, facilitando quindi la vaporizzazione, e filtrare eventuali residui non volatili. E' importante che essa sia posizionata sempre alla stessa altezza nel *liner*;
- la sostituzione del *liner* oppure il suo lavaggio e disattivazione mediante silanizzazione. In commercio sono disponibili *liner* già disattivati. In assenza di disattivazione, i siti attivi sulla superficie del *liner* possono interagire con gli analiti e causarne l'adsorbimento o la degradazione;
- la pulizia delle parti metalliche dell'iniettore;
- la sostituzione delle ferrule (ad esempio quando si sostituisce una colonna);
- la sostituzione della trappola per l'ossigeno;
- per il rivelatore a ionizzazione di fiamma, la pulizia del *jet*.

Il gascromatografo accoppiato a spettrometro di massa

Per le condizioni operative e gli interventi di manutenzione del gascromatografo si rimanda al capitolo precedente.

Nella maggior parte dei laboratori lo strumento viene tenuto sempre acceso e (per i moduli in cui ciò è necessario) sotto vuoto, a meno che rimanga inutilizzato per lunghi periodi: infatti quando si accende l'apparecchio occorrono molte ore perché si arrivi ai bassi livelli di pressione richiesti per l'analisi. Come per il GC, anche con il GC-MS è buona norma, prima di iniziare un ciclo di analisi, effettuare una corsa in assenza di campione con le stesse impostazioni di temperatura usate per le analisi.

Quando si condiziona una colonna in assenza di collegamento al rivelatore occorre chiudere l'estremità del forno collegata alla massa con una ferrula cieca per evitare l'ingresso di umidità dall'atmosfera.

Prima dell'utilizzo lo strumento deve essere calibrato e "sintonizzato" (tuned) con un composto di riferimento. Con la calibrazione si regola lo strumento in modo che nello spettro le masse dei frammenti del composto siano riportate correttamente. Con la sintonizzazione si controlla che i picchi adiacenti si sovrappongano il meno possibile e che i rapporti tra le altezze dei picchi siano quelli attesi. Negli strumenti moderni esiste la funzione di autotuning che regola sia la calibrazione che la sintonizzazione. Come composto di riferimento si utilizza la perfluoro-t-butilamina (PFTBA o FC43), contenuta in una fiala all'interno dello strumento e introdotta nella sorgente tramite una valvola. La PFTBA produce frammenti caratteristici con i quali si regolano l'asse delle masse e le altezze relative dei picchi.

Negli strumenti meno recenti è l'operatore stesso a fare un tuning iniettando un'aliquota di PFTBA ed effettuando le opportune regolazioni dello strumento finché lo spettro non corrisponda a quello atteso. I metodi EPA di analisi ambientale prevedono inoltre una regolazione dello strumento con bromofluorobenzene (BFB) per la determinazione dei composti volatili e con decafluorotrifenilfosfina (DFTPP) per gli analiti semivolatili. Gli spettri di massa delle due sostanze devono rispondere ad una serie di requisiti indicati dall'EPA. Lo scopo di questo controllo è di rendere confrontabili e riproducibili i risultati ottenuti in laboratori diversi. Queste procedure sono state sviluppate dall'EPA per i propri laboratori e sono state adottate da altri laboratori di analisi ambientale.

Una delle principali fonti di errore è l'ingresso di aria. Si deve allora controllare la tenuta delle varie connessioni. Esistono strumenti in grado di controllare automaticamente che non ci siano perdite nel vuoto oppure tracce di vapore acqueo.

I principali interventi di manutenzione per lo spettrometro di massa sono:

- riempimento della fiala della soluzione di riferimento di PFTBA (una volta all'anno circa);
- sostituzione dell'olio nella pompa per il vuoto (una volta all'anno circa);
- pulizia della sorgente. La sorgente viene scollegata dallo strumento ed i suoi componenti sono smontati e puliti separatamente. Esistono in letteratura molte procedure di pulizia. Si può ad esempio strofinare i componenti con carta abrasiva finissima o polvere di allumina e sciacquarli immergendoli in acqua addizionata di tensioattivo e successivamente in metanolo, oppure trattandoli in un bagno ad ultrasuoni. È importante leggere le istruzioni allegate a ciascuno strumento per evitare di pulire parti che potrebbero essere danneggiate;
- pulizia delle barre del quadrupolo, sulle quali si può avere un lento accumulo di specie poco volatili;
- sostituzione del filamento della sorgente di ionizzazione a impatto elettronico.

Quando si manipolano i componenti dello spettrometro di massa è opportuno indossare guanti per non contaminare lo strumento con impronte digitali.

Prima di spegnere lo strumento, o prima di ogni operazione di manutenzione che riguardi la colonna o il rivelatore, le parti sotto vuoto sono riportate alla pressione atmosferica.

Descrizione della tecnica e dello strumento

Il cromatografo liquido e il cromatografo ionico

I parametri da cui dipendono i tempi di ritenzione dei soluti e la possibilità di separarli sono:

- natura della colonna: struttura chimica della fase stazionaria, dimensione delle particelle, lunghezza;
- composizione della fase mobile: percentuale di acqua e solvente organico, pH, forza ionica;
- velocità di flusso.

Come per la gascromatografia, anche per la cromatografia liquida e per la cromatografia ionica occorre controllare periodicamente il buon funzionamento delle colonne. A questo scopo si inietta una miscela standard di soluti e si confronta il cromatogramma ottenuto con un cromatogramma di riferimento (ad esempio registrato in precedenza in condizioni ottimali). Si possono inoltre calcolare il numero di piatti teorici e valutare la simmetria dei picchi. Il procedimento da seguire è quello descritto per la gascromatografia.

Inoltre per valutare le alterazioni della colonna dovute ad adsorbimento di impurezze si calcola la variazione dei valori di t_R dei componenti della soluzione test. Se la colonna ha subito alterazioni, in molti casi la si può riattivare facendo passare un solvente in grado di eluire gli inquinanti adsorbiti.

Se la pressione della colonna aumenta in modo eccessivo, la colonna non è più utilizzabile e deve essere sostituita.

È fondamentale che il solvente sia filtrato con filtri aventi pori con dimensioni dell'ordine dei μm , perché le particelle presenti in sospensione andrebbero a depositarsi in testa alla colonna, riducendone l'efficienza. Perciò prima del suo utilizzo l'eluente è normalmente filtrato sotto vuoto attraverso filtri da $0,45 \mu\text{m}$. Inoltre prima della pompa del cromatografo si dispongono filtri in acciaio sinterizzato. Nell'arco di una settimana di funzionamento continuo i pori si occludono parzialmente. La pulizia dei filtri di acciaio si può fare con un bagno a ultrasuoni. I filtri vanno cambiati o puliti spesso perché un filtro sporco può causare codature nei picchi. L'eluente inoltre deve essere degasato mediante insufflazione di gas inerte (ad esempio elio), o sotto vuoto, oppure con l'eventuale dispositivo di degasamento incorporato nello strumento.

Se non si conosce come lo strumento è stato utilizzato in precedenza, è conveniente effettuare una pulizia preliminare del sistema, facendo fluire per 10 minuti, in assenza della colonna, un solvente, ad esempio una miscela isopropanolo/acqua od acetonitrile/acqua 50/50. Si possono anche effettuare alcune iniezioni di fase mobile per rimuovere tracce del precedente eluente o altre impurezze dall'iniettore. Se necessario, l'iniettore deve essere lavato come il resto dello strumento. Anche in presenza di una linea di base disturbata o di deformazione nei picchi è conveniente effettuare una pulizia del sistema, compresa la colonna. Se si sospetta la presenza di sali od altre impurità di tipo inorganico si può far fluire acqua o HNO_3 diluito (se si utilizza una colonna in silice a fase inversa, il pH non deve essere inferiore a 2 per evitare idrolisi). Tracce di metalli possono essere rimosse con EDTA 10-20 mM. In presenza di impurezze di tipo organico il lavaggio può essere effettuato con (in ordine di efficienza) metanolo o acetonitrile, isopropanolo, cloroformio, tetraidrofurano, esano od eptano. Un solvente con azione molto drastica è il dimetilsolfossido acidificato con HCl 0,1 %. Il volume di lavaggio può essere pari a circa 10-15 volte il volume della colonna, il che equivale a 20-30 ml di reagente per le comuni colonne da 15-20 cm ad una velocità di flusso di 2 ml/min. Un altro procedimento consigliato per pulire una colonna contaminata, è far fluire acqua (1 ml/min per 2 minuti) seguita da acetonitrile puro, ripetendo il ciclo più volte. Un passaggio brusco di solvente attraverso la colonna può "disturbare" la fase stazionaria e causare il rilascio dei contaminanti in essa intrappolati. Per la cromatografia ionica si effettua un lavaggio della colonna seguendo le istruzioni del produttore della medesima.

Quando si cambia la fase mobile, è opportuno prevedere uno stadio di lavaggio per rimuovere le tracce di quella precedente. Un lavaggio efficace per l'apparato, dopo aver rimosso la colonna, è: isopropanolo, acqua, acido nitrico 6 N, acqua fino a pH neutro, e infine la fase mobile.

Se la cella del rivelatore UV è sporca può essere pulita iniettando un detergente, acqua calda, isopropanolo oppure acido nitrico 6 N, e successivamente sciacquando con acqua.

La presenza di rumore nella linea di base oppure una bassa sensibilità di rivelazione può essere anche dovuta ad una lampada UV vecchia.

Un aumento di pressione nel sistema cromatografico può essere dovuto a intasamenti nei capillari o nei setti, che vanno quindi opportunamente puliti, oppure alla presenza di una colonna o precolonna usurata, che quindi richiedono un lavaggio ed eventualmente una sostituzione.

Se la pompa causa pulsazioni, si può installare un sistema di smorzamento (*damper*) per diminuire il rumore di fondo.

Le fasi mobili vanno preparate con reagenti a grado di purezza cromatografico perché elevati volumi di eluente fluiscono in colonna e le impurezze intrappolate sulla fase stazionaria andranno ad alterarne gradualmente le caratteristiche.

Prima di iniziare una serie di misure, occorre far fluire l'eluente finché la linea di base non è stabilizzata. È inoltre importante controllare che il campione da iniettare non precipiti nella fase mobile. Ovviamente non ci devono essere perdite di liquido dalle connessioni. Il contenitore della fase mobile deve essere chiuso per evitare l'introduzione di impurezze e l'evaporazione del solvente; in alcuni casi esso è mantenuto in atmosfera inerte (ad esempio per evitare l'interazione di eluenti basici con la CO₂ dell'aria). Dopo aver iniettato il campione nel *loop* della valvola, è importante estrarre la siringa solo dopo aver ruotato la valvola in modo da portare il *loop* in serie al circuito della fase mobile. Se si impiega un'eluizione a gradiente, occorre ristabilizzare nelle condizioni iniziali prima di effettuare ogni iniezione.

Le colonne in silice a fase inversa possono essere utilizzate nell'intervallo di pH 2 - 8. Valori superiori infatti causano la dissoluzione progressiva della silice, mentre in condizioni più acide ha luogo l'idrolisi dei gruppi C18.

Quando si installa una nuova colonna a fase inversa, conviene condizionarla seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Tipici reagenti per questa operazione sono metanolo e acetonitrile. Una colonna scambiatrice può essere condizionata con soluzioni acquose od acqua e solvente (acetonitrile, metanolo) compatibilmente con la natura della fase stazionaria. Normalmente il grado di compatibilità è indicato dal fornitore.

Se si utilizzano fasi mobili tamponate non bisogna mai passare direttamente da una soluzione acquosa ad una al 100% di acetonitrile o viceversa, altrimenti si avrebbe precipitazione del sale del tampone.

Composti ad alto peso molecolare possono adsorbirsi su varie parti dello strumento (componenti in acciaio, in vetro o connettori). Si ovvia normalmente al problema aggiungendo il 5 - 10% di un solvente organico (es. acetonitrile o isopropanolo) al campione.

La riproducibilità dei risultati aumenta se si opera a temperatura costante. A questo scopo si può utilizzare uno strumento con colonna termostattizzata oppure collocare l'apparecchiatura in un laboratorio dotato di condizionamento termico.

Come per la gascromatografia, occorre esaminare il cromatogramma e la forma dei picchi, ed identificare l'eventuale presenza di interferenze dovute a coeluzioni. La purezza del picco di analita può essere confermata aggiungendo un'opportuna quantità di standard al campione. L'altezza del picco prodotto dovrebbe essere quella attesa dalla curva di calibrazione tenendo conto della diluizione del campione. Se si sospetta che l'analita venga eluito con un altro composto, si aggiunge una quantità nota di quest'ultimo al campione prima dell'iniezione e si valuta se il picco di interesse subisce un incremento.

L'uso di un rivelatore *diode-array* è un altro metodo per controllare la purezza di un picco. La lunghezza d'onda di massimo assorbimento del picco prodotto dal campione deve essere uguale a quella prodotta dall'analita puro, all'interno del potere risolvente del rivelatore. Gli spettri prodotti da a) la parte iniziale; b) il massimo e c) la coda del picco dell'estratto del campione non devono essere differenti l'uno dall'altro, o da quello prodotto dall'analita puro.

Se si effettua per più giorni lo stesso tipo di analisi, può essere utile lasciare la pompa accesa durante la notte a bassa velocità di flusso, facendo fluire la fase mobile a riciclo.

Quando si termina un ciclo di analisi, prima di spegnere completamente lo strumento si può far fluire acqua per eliminare tracce di tampone (se l'eluente lo conteneva) e poi lavare con 20-30 ml di metanolo o acetonitrile o con soluzioni dedicate per il tipo di colonna impiegata. A questo punto si può disconnettere la colon-

na e chiuderne le estremità per evitare che vada a secco. La colonna viene quindi conservata in presenza di eluente; l'acetone garantisce una maggiore stabilità rispetto al metanolo, che può dare luogo a fenomeni di idrolisi. Le colonne a scambio ionico possono essere conservate in presenza di soluzioni acide o basiche a seconda della loro natura.

Ulteriori interventi di manutenzione consistono in: sostituzione della guarnizione del pistone della pompa, sostituzione di o-ring, ferrule, valvole, interventi alle varie parti del circuito idraulico dello strumento.

Descrizione della tecnica e dello strumento (HPLC)

Descrizione della tecnica e dello strumento (IC)

L'analizzatore voltammetrico

L'analizzatore voltammetrico può essere utilizzato con elettrodi di lavoro solidi (carbone vetroso, oro, platino...) od a goccia di mercurio. Nel secondo caso gli interventi di manutenzione da effettuare consistono nella sostituzione periodica del capillare e nell'aggiunta di mercurio al serbatoio. Le gocce di mercurio, sulle quali o nelle quali avvengono le reazioni elettrochimiche, sono molto piccole, per cui il consumo di metallo è basso. Negli strumenti in cui il serbatoio ha dimensioni relativamente grandi (100-200 ml) è meglio introdurre frequentemente piccoli volumi di mercurio piuttosto che riempire del tutto il serbatoio stesso, per minimizzare la formazione di ossidi del metallo. Il mercurio usato può essere riciclato dopo lavaggio con acido nitrico e tripla distillazione sotto vuoto.

Gli elettrodi solidi richiedono particolari cure per funzionare correttamente. Prima di iniziare un ciclo di analisi, comunemente si impostano trattamenti a potenziale sia positivo sia negativo, per rimuovere i residui delle analisi precedenti e le impurezze eventualmente presenti per ossidazione o riduzione. Il valore dei potenziali e la durata del trattamento dipendono dalla natura dell'elettrodo: conviene in genere seguire le indicazioni fornite dalle ditte produttrici. Può essere necessario ripetere il trattamento di pulizia dell'elettrodo, mediante l'applicazione di opportuni potenziali, al termine di ogni misura, oppure ad intervalli regolari nel corso di un ciclo di analisi (ad esempio ogni 3-4 campioni). Al termine delle analisi spesso è necessario trattare e rinnovare la superficie dell'elettrodo. A questo scopo si depositano su un feltro alcune gocce di sospensione di allumina in acqua. Si mette il feltro a contatto con la superficie attiva dell'elettrodo, e si fa ruotare quest'ultimo con l'ausilio di un motore (ad esempio a 1000-2000 giri al minuto). Un trattamento ancora più drastico, che si effettua meno frequentemente, è la pulizia della superficie dell'elettrodo con carta abrasiva finissima.

Un'operazione da compiere periodicamente è l'aggiunta di elettrolita (quasi sempre costituito da KCl 3 M o KCl saturo) nella camera dell'elettrodo di riferimento e, in certi modelli di strumento, la sostituzione del setto poroso che separa l'elettrodo stesso dalla cella.

Una delle principali cause di errore è proprio la mancanza di elettrolita nell'elettrodo di riferimento: in queste condizioni il potenziale dell'elettrodo di lavoro non viene più impostato correttamente e si ottengono voltammogrammi anomali.

Le principali cause della comparsa di rumore di fondo nei voltammogrammi sono due: l'usura del capillare o la formazione di ossidi di mercurio, per l'elettrodo a goccia di mercurio, e la presenza di disturbi nella linea elettrica. Occorre quindi sostituire il capillare, ripulire tutte le parti in contatto con il mercurio e, se il rumore persiste, collegare lo strumento ad uno stabilizzatore di corrente.

Se invece il segnale misurato è costituito da una linea piatta, si è in presenza di bolle d'aria nel capillare: in questo caso occorre far scendere nuove gocce di mercurio finché non si rimuovono le bolle, ripristinando la continuità del contatto elettrico nel corpo dell'elettrodo. Se il trattamento non è sufficiente a risolvere il problema, si collega l'estremità del capillare ad una siringa, mediante un semplice tubo di gomma, e si fa scendere il mercurio mentre si aspira con la siringa: in questo modo si riesce ad eliminare le bolle intrappolate nel mercurio a monte del capillare.

Una delle principali cause di errore nell'utilizzo delle tecniche di stripping per analisi a livello di traccia ed ultratraccia è la presenza di contaminazioni dovute ad impurezze nei reagenti, sulle pareti dei contenitori, nell'atmosfera del laboratorio o apportate dall'operatore stesso. Occorre quindi utilizzare reagenti molto puri, o purificarli prima dell'uso (mediante distillazione, cristallizzazione, estrazione in fase solida...), lavare accuratamente i contenitori, manipolare i campioni con guanti in polietilene e, se possibile, operare sotto una cappa a flusso laminare.

Inoltre è importante che la velocità di agitazione durante lo stadio di deposizione sia riproducibile, per assicurare la riproducibilità della frazione di analita accumulata sull'elettrodo.

Una causa di errore insita in tutte le tecniche voltammetriche è la presenza di una sostanza che si ossida o riduce allo stesso potenziale dell'analita. Se si sospetta la presenza di un interferente, se ne aggiunge una quantità nota nella cella del campione e si valuta se il picco di interesse subisce un incremento.

Non è necessario un periodo di stabilizzazione tra l'accensione dello strumento e la misura. Tuttavia, prima della registrazione del voltammogramma, le soluzioni devono essere deossigenate mediante gorgogliamento con azoto. La durata tipica della deossigenazione è di 5 minuti; se si eseguono analisi con il metodo delle aggiunte standard, si ripete la deossigenazione per 10 s dopo ogni aggiunta.

Lo spettrometro IR

In questa sede si punterà l'attenzione sull'FT-IR, che rappresenta il tipo di strumento attualmente più diffuso, anche se molte delle considerazioni riportate sono ugualmente valide per gli strumenti dispersivi tradizionali.

La principale causa di errore nella spettrometria IR è la presenza di vapore acqueo e di biossido di carbonio nell'atmosfera. Per questo motivo lo strumento va posizionato in un ambiente il più possibile secco e pulito.

In alcuni laboratori viene immesso nello spettrometro un flusso continuo di azoto oppure di aria secca e decarbonatata allo scopo di mantenere un'atmosfera costante e priva di umidità. Inoltre nell'area dell'interferometro e nella camera del campione possono essere collocati agenti essiccanti. Le celle portacampione con finestre in KBr possono essere conservate in stufa per preservarle dall'umidità. Analogamente il bromuro di potassio usato per la preparazione delle pastiglie può essere conservato in essiccatore e periodicamente trattato in stufa. In commercio è disponibile KBr molto puro per misure IR. Conviene inoltre utilizzare solventi, per la preparazione di standard e campioni, a grado di purezza adatto per IR.

Dopo l'accensione occorre aspettare 10-20 minuti perché venga raggiunta la stabilità termica. Per questo in molti laboratori lo strumento viene lasciato sempre acceso. In alcuni modelli nella posizione di stand-by la sorgente è spenta, ed all'inizio di un ciclo di analisi sono richiesti 5-10 minuti di stabilizzazione prima di registrare il primo spettro. Nei modelli in cui la sorgente è mantenuta sempre accesa si possono effettuare immediatamente le misure.

Il buon funzionamento dello strumento si controlla registrando lo spettro di un composto puro (ad esempio polistirene o polietilene) e confrontandolo con gli spettri di riferimento riportati in letteratura.

Per avere spettri corretti e facili da interpretare i campioni solidi non devono essere troppo spessi; occorre inoltre eliminare dai campioni tracce di solventi che assorbano nell'IR.

Poiché i tempi di acquisizione dello spettro sono molto brevi, si eseguono più scansioni (tipicamente da 10 a 40) su uno stesso campione e se ne ricava la media, allo scopo di migliorare il rapporto segnale/rumore. Il miglioramento di tale rapporto si ottiene soltanto a condizione che gli spettri si riferiscano alle stesse condizioni strumentali ed ambientali. E' perciò essenziale che la costruzione dello spettrometro assicuri la massima ripetibilità dell'interferogramma. Il tempo di esecuzione delle misure dipende dall'intervallo di lunghezze d'onda esaminato, dalla risoluzione e dalle caratteristiche dello strumento. Tipicamente sono sufficienti meno di 5 minuti per acquisire tutte le repliche per un campione. Lo spettro misurato per il campione

viene poi automaticamente corretto tenendo conto dello spettro del fondo, registrato in assenza del campione stesso e memorizzato nello strumento. Conviene ripetere la misura del fondo almeno una volta al giorno.

Lo strumento non richiede molti interventi di manutenzione.

La sorgente va sostituita periodicamente. Il materiale essiccante contenuto nello scomparto dell'interferometro e nell'area portacampioni deve essere periodicamente sostituito oppure riattivato mediante riscaldamento in stufa.

E' buona norma tenere pulita la camera del campione.

Gli strumenti sono solitamente dotati di una funzione automatica che ottimizza l'allineamento dei componenti del sistema. L'operazione di allineamento viene effettuata periodicamente (tipicamente non più di una volta all'anno) e va ripetuta ogni volta che lo strumento viene spostato.

I componenti ottici dello spettrometro non vanno toccati con le dita perché le loro prestazioni potrebbero essere compromesse.

Se si utilizza un rivelatore a tellururo di mercurio e cadmio (MCT), prima di iniziare un ciclo di analisi occorre riempire di azoto liquido l'apposito scomparto.

L'esecuzione dell'analisi

Prima di iniziare un'analisi

Le attività da svolgere prima di iniziare un ciclo di analisi sono:

- localizzare i campioni;
- assicurarsi che una copia del metodo sia disponibile;
- leggere tutta la metodica se non la usa abitualmente;
- controllare che la strumentazione necessaria si libera per il periodo richiesto per l'analisi;
- controllare che tutta la strumentazione sia funzionante e pulita;
- programmare gli stadi del lavoro e cosa è necessario per ciascuno stadio;
- decidere quanti campioni possono essere analizzati in ogni gruppo di analisi;
- stimare i tempi necessari per l'esecuzione dell'analisi;
- pensare ai rischi associati con il metodo e con i reagenti necessari;
- considerare quali fattori possano influenzare i risultati, come lavori passati o presenti che possano causare contaminazioni;
- predisporre un adeguato spazio sul bancone per collocare il materiale necessario in modo non accatastato;
- avere a disposizione una quantità di vetreria pulita sufficiente o, se necessario, lavarla;
- controllare di avere quantità sufficiente di reagenti.

In pratica prima di iniziare un'analisi occorre avere bene in chiaro cosa si intende fare, avere tutto pronto per l'uso, ed organizzare il lavoro in modo da avere tempo sufficiente per svolgerne ogni parte senza necessità di affrettarsi.

Durante l'analisi

Le attività da svolgere durante l'esecuzione delle analisi sono:

- per ciascun campione annotare le condizioni ed eventuali osservazioni;

-
- prelevare le aliquote necessarie di campione assicurandosi che ciascuna sia ben etichettata e riconoscibile per tutti gli stadi dell'analisi;
 - se la stessa attrezzatura viene usata più volte per diversi campioni, pulirla accuratamente ogni volta;
 - a meno che il metodo non indichi altrimenti, dopo aver preparato il campione per la misura (ad esempio con un'estrazione o digestione) occorre in primo luogo effettuare la calibrazione dello strumento. Se i risultati sono soddisfacenti, si effettua il controllo di qualità della taratura e poi l'analisi dei bianchi e dei campioni. Se i campioni sono esaminati in blocchi, periodici controlli di qualità possono essere necessari nel corso del blocco e vanno comunque effettuati all'inizio di un nuovo gruppo di misure;
 - seguire il metodo esattamente come è riportato. Se il metodo è stato scritto correttamente descriverà il modo migliore di operare. Non prendere scorciatoie, che potrebbero portare a problemi e quindi a tempi più lunghi. Se invece si apportano modifiche alla metodica, occorre indicarle nella relazione finale;
 - non affrettarsi, perché ci sono maggiori possibilità di commettere errori;
 - registrare chiaramente le osservazioni, i dati e i dettagli del metodo.

Dopo l'analisi

Le attività da svolgere dopo l'esecuzione delle analisi sono:

- pulire la zona del laboratorio e le strumentazioni usate per le analisi in modo che siano pronte per i prossimi operatori;
- smaltire i reagenti e le soluzioni standard instabili;
- usando i dati raccolti, calcolare la risposta richiesta, cercando eventuali errori, come mancata riproducibilità nelle repliche, risultati negativi quando ci si attende un risultato positivo e così via;
- controllare le trascrizioni dei dati ed i calcoli;
- scrivere la relazione finale dell'analisi

I campioni dovrebbero essere conservati almeno fino a quando non è stata redatta la relazione finale sull'analisi. Lo smaltimento finale dei campioni deve aver luogo secondo le norme di sicurezza del laboratorio e la legislazione nazionale in materia ambientale.

La registrazione dei metodi e dei dati

Tenere una registrazione scritta dei metodi di analisi seguiti e dei dati ottenuti è molto importante per ogni laboratorio. Influenza tutti gli aspetti delle operazioni di laboratorio mostrando cosa è accaduto in passato, cosa sta succedendo attualmente, e cosa ci si attende per il futuro. Una buona organizzazione di registrazione è un ingrediente essenziale in ogni laboratorio ben gestito e fornisce le basi per un sistema di qualità efficace.

Le informazioni possono essere conservate in forma cartacea, su mezzo informatico o su entrambi. La raccolta e la conservazione delle informazioni è facilitata dall'uso di computer.

Lo scopo è permettere il recupero non distorto dell'informazione quando e come richiesta. Le informazioni devono essere riportate in modo che chiunque in futuro possa seguire il processo seguito.

Le registrazioni di informazioni sono usate nei laboratori a scopo di controllo, monitoraggio e come prova di buona efficienza.

Esse possono riguardare tutti gli aspetti delle attività di laboratorio:

- gli acquisti di reagenti e apparecchiature (ordini, ricevute, inventari, bilanci);
- le procedure di laboratorio (metodi analitici, modalità di calibrazione degli strumenti, procedure di manutenzione e pulizia, controllo di qualità);
- i rapporti con i clienti (richieste di analisi, preventivi, ordinazioni, certificati analitici, ricevute);
- il lavoro analitico (dati, carte di controllo, curve di calibrazione).

Le procedure e i metodi analitici devono essere scritti in modo che i contenuti siano semplici da seguire. Le istruzioni devono essere sicure, non ambigue e sufficientemente dettagliate da garantire che chiunque le segua possa capire cosa deve fare.

Per avere un'omogeneità nelle informazioni fornite da persone diverse, conviene predisporre degli schemi o formulari, magari prestampati. E' utile poter risalire all'autore di ciascuna informazione. Inoltre ogni pagina dovrebbe avere titolo, data e se necessario, livello di sicurezza (confidenziale o no).

L'esposizione dei risultati

L'essenza di una corretta esposizione dei risultati è fornire le informazioni in modo chiaro e non ambiguo in una forma adatta all'utilizzatore o al cliente. In genere il rapporto di un'analisi dovrebbe contenere alcune o tutte le seguenti informazioni:

- denominazione del laboratorio di analisi;
- numero di identificazione del rapporto;
- denominazione del cliente o destinatario;
- data di ricevimento dei campioni;
- descrizione dei campioni compreso numero di riferimento, descrizione, quantità e condizioni in cui sono stati ricevuti;
- data di analisi dei campioni;
- riferimento alle analisi effettuate;
- dettagli su particolari condizioni o osservazioni;
- risultati analitici e limiti di confidenza;
- limiti di rivelabilità;
- dati sul recupero dell'analita;
- dati sulla ripetibilità;
- conclusioni e raccomandazioni;
- dettagli sullo smaltimento;
- firma dell'analista e data del rapporto.

Il controllo di qualità

Il controllo di qualità descrive le misure da adottate per verificare la validità dei risultati ottenuti in un laboratorio.

Il suo scopo è assicurare che il sistema analitico funzioni correttamente. E' noto che, se la stessa misura è ripetuta più volte, non si otterrà sempre lo stesso risultato, ma ci sarà una leggera variazione nelle risposte dovuta a lievi variazioni statistiche. Il controllo di qualità è usato per controllare che queste fluttuazioni siano accettabili e non dovute a errori sistematici.

Il controllo di qualità può essere interno al laboratorio o esterno.

Il controllo di qualità interno si suddivide in due categorie:

- controllo di qualità del dato analitico, da effettuarsi per ogni gruppo di misure;
- controllo di qualità del laboratorio, da effettuarsi periodicamente.

Il controllo di qualità del dato analitico

Il controllo di qualità del dato analitico è composto di sette elementi, che dovrebbero regolarmente far parte di ogni protocollo di analisi: calibrazione e sua verifica periodica, valutazione del recupero, analisi di bianchi, analisi di standard, analisi replicate, carte di controllo, campioni "ciechi". In casi particolari si può ricorrere ad un ulteriore controllo consistente nell'analisi con due metodi diversi.

La calibrazione con standard

Quando si inizia un'analisi occorre misurare almeno tre differenti diluizioni dello standard (i metodi EPA prescrivono la calibrazione con tre soluzioni standard per la determinazione di metalli e cinque soluzioni standard per la determinazione di sostanze organiche). Successivamente la curva di calibrazione va verificata periodicamente (una volta al giorno o anche di più, a seconda della stabilità dello strumento di misura) analizzando uno o più standard. Non si possono riportare valori al di sopra dello standard più alto a meno che non si sia dimostrato che l'intervallo lineare è più ampio, e che il valore è inferiore a 1,5 volte lo standard più alto. Il più basso valore che si può riportare è il limite di rivelabilità (MDL), se lo standard di calibrazione più basso ha concentrazione non superiore di 10 volte il limite stesso. Tuttavia quando è possibile è meglio evitare estrapolazioni e fare misure solo nell'intervallo di concentrazione tra lo standard inferiore e superiore.

Il recupero di quantità note di analita

Aggiungendo al campione quantità note di analita e valutandone il recupero si evidenzia l'eventuale presenza di perdite durante i vari stadi dell'analisi e di effetti matrice. Il recupero della frazione di analita aggiunto è un argomento a favore della qualità del dato analitico, ma non esclude del tutto la presenza di effetti matrice, soprattutto in sistemi complessi come il suolo. Infatti non sempre l'analita già presente nel campione, e magari fortemente legato alla sua struttura, si comporta esattamente come la frazione aggiunta dall'esterno.

Per ovviare, almeno in parte, a questo inconveniente, si raccomanda di aggiungere l'analita alla matrice e lasciarlo in contatto almeno 12 ore prima delle successive operazioni, in modo che possa avvenire un'interazione tra matrice e analita stesso.

Per valutare l'efficienza di estrazione dei composti organici da una matrice si aggiungono inoltre al campione uno o più composti con caratteristiche chimiche simili agli analiti di interesse (i cosiddetti "surrogati"), spesso deuterati o fluorurati, presumibilmente assenti dal campione originario.

L'analisi di bianchi

Almeno il 5% dei campioni analizzati dovrebbe essere costituito da bianchi. In questo modo si verifica la purezza dei reagenti e il bianco totale della procedura. Il bianco della procedura è determinato seguendo il procedimento in ogni suo stadio ed usando le stesse quantità di reagenti impiegate per i campioni. E' necessario inoltre analizzare un bianco dopo la misura di ogni campione con concentrazione maggiore dello standard più alto o comunque quando c'è il pericolo di effetti memoria.

L'analisi di standard

Periodicamente si devono analizzare standard diversi da quelli usati per la calibrazione. Si possono seguire due procedure:

- analisi di soluzioni a concentrazione nota di analita preparate in laboratorio, in genere a concentrazione tra 5 e 50 volte il limite di rivelabilità del metodo, o vicine ai livelli presenti nei campioni, se maggiori;
- analisi di materiali di riferimento certificati. Questa seconda opzione è da preferirsi ogni qual volta siano disponibili materiali certificati per l'analita cercato. Ad esempio ci sono materiali dell'istituto statunitense National Institute of Standard and Technology (NIST), una volta chiamato National Bureau of Standards (NBS), del National Research Council canadese, e del BCR europeo. Se si utilizzano materiali di riferimento interni al laboratorio, essi vanno preparati indipendentemente dai campioni usati per la calibrazione.

Analisi replicate

L'analisi ripetuta dello stesso campione deve essere fatta per il 5% o più dei campioni per stabilire la precisione dell'analisi.

Analizzando più volte la stessa soluzione di campione dopo il pretrattamento si valuta la ripetibilità del sistema di misura.

Sottoponendo più aliquote di campione all'intero procedimento di analisi si valuta la ripetibilità di tutto il metodo e l'omogeneità del campione stesso.

Le carte di controllo

Una carta di controllo è semplicemente un diagramma in cui i valori di una grandezza sono riportati in funzione del tempo. Un esempio sono i valori ottenuti dalla misura di soluzioni standard. Si ottiene un grafico in cui sono visibili le fluttuazioni naturali del valore misurato.

Come già discusso, più misure ripetute di una concentrazione, anche usando lo stesso metodo di analisi, mostreranno una variabilità naturale. L'insieme dei risultati o popolazione avrà un valore medio e comunemente i valori saranno distribuiti simmetricamente intorno alla media in una distribuzione normale. Statisticamente è improbabile (5% di probabilità) che un componente della popolazione sia più distante dalla media di due volte la deviazione standard, e molto più improbabile (0,3% di probabilità) che sia più lontano di tre volte la deviazione standard.

Se quindi i valori deviano dalla media in misura maggiore, è probabile che siano avvenute delle variazioni nel sistema di misura che hanno alterato le sue prestazioni. Una carta di controllo rende evidenti queste variazioni; spetta poi all'analista di decidere se le variazioni sono significative e se è necessario intervenire per tenerne conto.

Il tipo più semplice di carta di controllo è la carta di Shewhart. E' usata tipicamente per seguire la variazione quotidiana di un processo analitico. Si valuta la variazione del risultato dell'analisi di una soluzione standard. Si riporta il risultato sull'asse y in funzione del tempo. Si può riportare sia il valore assoluto sia la differenza dal valore medio. Finchè la variazione nella misura è accettabile, è ragionevole assumere che i risultati misurati per i campioni siano anche accettabili.

Per decidere i limiti di accettabilità, lo standard viene misurato più volte e i risultati vengono utilizzati per calcolare la media e la deviazione standard. La carta di controllo può evidenziare tendenze all'aumento od alla diminuzione della risposta o la presenza di risultati al di fuori dei limiti di allarme e di intervento. Comunemente si utilizzano limiti di allarme a $\pm 2s$ e limiti di intervento $\pm 3s$.

Alcuni andamenti del grafico indicano la presenza di problemi e richiedono che l'analista prenda provvedimenti (ad esempio controllare il funzionamento dello strumento e ricalibrarlo):

- se una misura supera il limite di intervento, ripetere immediatamente l'analisi; se la ripetizione è all'interno del limite, continuare l'analisi. Altrimenti interrompere e risolvere il problema;
- se due punti su tre successivi superano i limiti di allarme, analizzare un altro campione. Se il campione successivo è inferiore continuare. Altrimenti interrompere e risolvere il problema;
- se quattro punti su cinque superano $\pm 1s$ o sono in ordine crescente o decrescente, analizzare un altro campione. Se il punto successivo è inferiore a $\pm 1s$ o cambia l'ordine, proseguire. Altrimenti interrompere e risolvere il problema;
- se sei punti successivi sono superiori o inferiori alla linea centrale, analizzare un altro campione. Se il prossimo punto è dalla parte opposta rispetto alla linea centrale, continuare l'analisi. Se il prossimo punto è sullo stesso lato, interrompere e risolvere il problema.

Dopo aver risolto il problema, rianalizzare metà dei campioni analizzati tra l'ultima misura sicura e quella fuori controllo.

Esistono altri tipi di carte di controllo (moving average, CUSUM) per i quali si rimanda ai testi specializzati.

Si possono costruire carte di controllo non solo per le soluzioni standard ma anche per i bianchi o per più repliche di uno stesso campione.

Un'altra funzione della carta di controllo è mostrare un miglioramento nella precisione del metodo. Se le misure raramente o mai superano i limiti di allarme, ricalcolare i limiti usando i venti dati più recenti.

I campioni "ciechi"

I campioni "ciechi" sono repliche di campioni o soluzioni a concentrazione nota, aventi una concentrazione tra 5 e 50 volte maggiore del limite di rivelabilità del metodo, che vengono inseriti nel blocco di campioni da analizzare all'insaputa dell'analista: l'analista può essere informato della presenza di campioni "ciechi", ma non deve sapere quali sono. La competenza dell'operatore viene valutata dalla precisione e accuratezza dell'analisi di tali campioni. Essi possono essere inviati dal cliente oppure dal responsabile del laboratorio.

Uso di un metodo alternativo

Un'ulteriore forma di controllo di qualità consiste nel determinare lo stesso analita con un altro metodo. Preferibilmente il metodo dovrebbe essere basato su un principio completamente diverso (ad esempio spettroscopia atomica o voltammetria per la determinazione di metalli). In cromatografia si può usare colonne di diverse polarità invece di affidarsi su un singolo tempo di ritenzione. Si può in certi casi fare l'analisi sia con fase normale sia in fase inversa. Si può anche esaminare la soluzione finale con rivelatori diversi. Ad esempio dopo una separazione con gascromatografia si può rivelare le frazioni usando due rivelatori diversi, ad esempio a ionizzazione di fiamma (FID) ed ECD. Poiché i due sistemi sono basati su principi chimico-fisici diversi, è possibile che si riesca a rivelare la presenza di composti interferenti.

Il controllo di qualità interno del laboratorio

Accanto al controllo della qualità di un insieme di misure o di un singolo strumento, un laboratorio dovrebbe prevedere un periodico controllo della propria efficienza e della qualità del proprio operato.

Oltre ai controlli svolti da enti esterni (v. 3.5.3), è importante che esista un sistema di verifica interno, che può essere condotto con maggiore frequenza e da persone che conoscono bene il laboratorio e la sua organizzazione, e quindi possono meglio individuare eventuali problemi.

È anche possibile che i risultati dei controlli interni ed esterni risultino complementari, cioè che una persona estranea al laboratorio evidenzii aspetti negativi che sfuggono al personale interno e viceversa.

Gli aspetti da verificare per il controllo di qualità di un laboratorio chimico possono essere riassunti in:

- ambiente di laboratorio. È adatto per il tipo di analisi svolte? Attività che potrebbero causare inquinamenti o interferenze nei risultati di altre analisi sono adeguatamente separate nello spazio o tempo in cui si svolgono le analisi stesse? I banconi e gli altri arredi sono puliti e ordinati?
- attrezzatura. Gli strumenti sono in buone condizioni? Esistono istruzioni chiare e dettagliate per il loro uso? Le procedure ed i risultati delle calibrazioni sono documentati in forma scritta? Il controllo degli strumenti e la loro calibrazione sono effettuati ad intervalli adeguati? Gli interventi di manutenzione e le eventuali precedenti riparazioni sono documentati in forma scritta?
- procedure e metodi. Sono a disposizione copie dei metodi ufficiali adottati nel laboratorio? I metodi non ufficiali usati in certi casi sono documentati in forma scritta e validati? Gli analisti seguono le procedure scritte?
- personale. Il personale ha le competenze ed esperienze adeguate per il lavoro che svolge? Se necessario, ha frequentato corsi di aggiornamento?
- soluzioni standard e reagenti. Gli standard sono certificati o comunque è accertata la loro accuratezza? La loro preparazione è documentata? Gli standard e i reagenti sono etichettati e conservati correttamente? Si utilizzano standard con il grado di purezza necessario?
- controllo di qualità. C'è un sistema adeguato di controllo di qualità per ogni tipo di analisi? I risultati del controllo di qualità sono soddisfacenti? Sono documentati in forma scritta? Se sono stati riscontrati problemi (ad esempio dall'uso di carte di controllo o campioni certificati), si sono adottate misure per risolverli?
- campioni. I campioni da analizzare sono correttamente etichettati e conservati? I risultati delle analisi sono correttamente esposti in forma scritta?

Il controllo di qualità esterno

I laboratori dovrebbero cercare una valutazione indipendente della propria competenza. Ci sono più possibilità, con diversi gradi di difficoltà e impegno richiesto:

- partecipazione a studi interlaboratorio e *proficiency testing*;
- richiesta di un parere di un consulente esterno;
- richiesta di accreditamento del laboratorio da parte dell'ente preposto.

La partecipazione a studi interlaboratorio e *proficiency testing* andrebbe effettuata quando possibile, in modo che le prestazioni del laboratorio possano essere confrontate con quelle di altri laboratori. Tali esercizi dovrebbero essere intrapresi per evidenziare problemi e fornire soluzioni anche attraverso la discussione con gli altri partecipanti.

Un esempio di studio interlaboratorio è quello in cui ciascun laboratorio utilizza un metodo definito per analizzare porzioni identiche di materiali omogenei. È quindi possibile stabilire le prestazioni del metodo di analisi. Studi di questo tipo possono essere avviati per sviluppare un metodo standard di analisi. Governi, associazioni e organizzazioni di standardizzazione possono aver necessità di stabilire un metodo standard per un particolare analita. I laboratori partecipanti analizzano i campioni ed i risultati sono mandati al coordinatore, che li elabora statisticamente e rimanda i risultati ai partecipanti. Alla fine dello studio, se il metodo si è rivelato soddisfacente, viene proposto come standard. L'analisi e l'elaborazione dei risultati possono essere ripetuti più volte prima di giungere ad un metodo di analisi soddisfacente.

Un altro tipo di studio interlaboratorio è lo studio di certificazione, finalizzato a fornire un valore di riferimento della concentrazione di un analita in un materiale proposto come materiale di riferimento. Un gruppo di laboratori analizza il materiale con i metodi che giudicano più affidabile. Questo tipo di studi è molto utile per i laboratori partecipanti perché li rende più consapevoli dei problemi che possono sorgere nel corso delle analisi.

Si può inoltre richiedere periodicamente ad un consulente, non facente parte del laboratorio, di controllare l'efficienza (*audit* esterno). E' un processo periodico per controllare se il sistema di qualità del laboratorio è efficace, documentato e seguito da tutto il personale. Il controllo va fatto senza preavviso sulla base di una lista di aspetti da verificare per documentare il modo in cui si eseguono le analisi. L'obiettivo è evidenziare deviazioni dalle procedure previste.

Si può infine richiedere una certificazione ufficiale del buon funzionamento del laboratorio secondo le norme ISO. La certificazione viene rilasciata da enti appositamente autorizzati.

La validazione di un metodo analitico

Nonostante esistano metodi ufficiali di analisi sviluppati da numerose organizzazioni riconosciute a livello nazionale o internazionale, ci possono essere situazioni in cui tali metodi non sono utilizzati, oppure è possibile che non esistano ancora metodiche standard per un particolare composto. Può essere quindi necessario sviluppare un metodo di analisi e validarlo. La validazione è necessaria anche quando si apportano modifiche ad un metodo esistente per soddisfare particolari esigenze.

La procedura di validazione

Per validare un metodo di analisi si procede in tre stadi:

- valutazione del limite di rivelabilità del metodo e della accuratezza e ripetibilità (da parte di un singolo operatore). Per determinare queste due ultime caratteristiche si analizzano standard a diverse concentrazioni in ogni matrice alla quale il metodo verrà applicato, considerando almeno 7 (preferibilmente 10 o più) aliquote per ciascuna concentrazione. Una delle concentrazioni deve essere pari o appena superiore al limite di rivelabilità del metodo, un'altra deve essere relativamente elevata, in modo da identificare l'intervallo di applicabilità del metodo. Facendo analisi a concentrazioni diverse si valuterà anche la relazione tra la quantità presente nel campione e l'accuratezza e precisione ottenibili: tale relazione può essere costante, lineare o curvilinea, ed è una caratteristica significativa del metodo;
- analisi di campioni incogniti. Vengono analizzati standard il cui valore è sconosciuto all'analista. Vanno effettuate più repliche dell'analisi di ciascun campione incognito: la quantità media recuperata dovrebbe cadere all'interno di $\pm 3s$, ma preferibilmente entro $\pm 2s$, rispetto alla concentrazione media dello standard. Gli standard possono essere preparati da altri analisti del medesimo laboratorio a partire da reagenti a grado di purezza analitico oppure da standard commerciali;
- valutazione della robustezza del metodo. È particolarmente importante determinare questa caratteristica se il metodo verrà proposto come metodo standard. Vanno individuati gli stadi del metodo in cui è importante operare rigorosamente e quelli in cui è possibile una minore attenzione. L'Association of Official Analytical Chemists (AOAC) statunitense suggerisce di studiare la robustezza attraverso otto analisi separate finalizzate a determinare l'effetto della variazione di sette diversi aspetti di una procedura analitica. Si supponga ad esempio di studiare l'effetto dei seguenti fattori:

Fattore	Valore nominale	Variazione
Tempo di miscelazione	20 min	25 min
Aliquota di campione	2 g	4 g
Temperatura di reazione	70 °C	75 °C
Durata del riscaldamento	10 min	15 min
Agitazione	Si	No
Valore di pH	2.0	2.5
Concentrazione di un reagente	1 M	1.1 M

Si crea una tabella di combinazione dei fattori indicando i valori nominali con lettere maiuscole, i valori variati con la corrispondente lettera minuscola:

Fattore	Combinazione							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A o a	A	A	A	A	a	a	a	a
B o b	B	B	b	b	B	B	b	b
C o C	C	c	C	c	C	c	C	c
D o d	D	D	d	d	d	d	D	D
E o e	E	e	E	e	e	E	e	E
F o f	F	f	f	F	F	f	f	F
G o g	G	g	g	G	g	G	G	g
Risultato	s	t	u	v	w	x	y	z

Facendo l'analisi nelle condizioni della combinazione 1 si otterrà il risultato s e così via.

Per determinare l'effetto della variazione di un fattore, si confrontano le medie dei quattro risultati in cui il fattore aveva il valore nominale con quelle dei quattro in cui aveva il valore variato. Ad esempio per valutare l'effetto della variazione di B si confronta $(s + t + w + x)/4$ con $(u + v + y + z)/4$.

Si calcolano sette coppie di medie e sette corrispondenti differenze, che verranno disposte in ordine crescente per rivelare la presenza di un effetto significativo sui risultati. Se non ci sono differenze notevoli, si calcola la media e la deviazione standard degli otto risultati. La deviazione standard offre una stima realistica della precisione del metodo.

Con questa prova si valutano gli effetti principali dei fattori, non le loro interazioni.

Dopo aver validato il metodo con le prove sopra descritte, è opportuno confrontarlo con un metodo di riferimento, se esistente. Si analizzano standard ad almeno tre concentrazioni diverse con il metodo di riferimento e con quello messo a punto. Se l'intervallo di applicabilità del metodo è molto ampio, si considerano più livelli di concentrazione. Dopo aver eseguito almeno cinque repliche a ciascun livello si eseguono le seguenti elaborazioni:

- test sulla distribuzione normale dei dati;
- selezione dell'opportuna dimensione del campione sulla base della stima della deviazione standard;
- confronto delle varianze dei due metodi con il test F;
- confronto delle medie dei due metodi con il test t.

Il test interlaboratorio

Per valutare se il metodo validato può essere adottato come metodo standard di riferimento è necessario fare un test interlaboratorio.

Nel test un certo numero di laboratori applica il metodo all'analisi di un certo numero di campioni per determinarne l'accuratezza e la precisione.

Occorre valutare l'effetto delle seguenti variabili:

- laboratorio. Si coinvolgono almeno tre diversi laboratori;
- strumentazione. Poiché modelli e apparecchi diversi possono essere una causa di errore, analizzare almeno due repliche di ogni concentrazione per ogni laboratorio;

- operatore: coinvolgere almeno sei operatori e non più di due per ogni laboratorio;
- concentrazioni: se la deviazione standard relativa è costante al variare della concentrazione, considerare tre livelli di concentrazione che coprano l'intervallo di validità del metodo. Se la deviazione standard non è costante, aumentare il numero di livelli;
- matrice: se si sospettano effetti matrice, effettuare il test in tutte le matrici per le quali il metodo è stato sviluppato. Se ciò non è possibile, usare campioni preparati in acqua deionizzata avendo cura di specificarlo nel rapporto sulle caratteristiche del metodo.

Il numero di repliche si calcola dalla formula:

$$r > 1 + (30/P)$$

dove r è il numero delle repliche e P è il prodotto delle variabili.

Il minimo valore di r è due.

Ad esempio se si analizza un campione a quattro concentrazioni diverse su un singolo tipo di strumento da parte di singoli operatori in cinque laboratori

$$P = 4 \times 1 \times 1 \times 5 = 20$$

$$r > 1 + (30/20) > 2,5, \text{ cioè } 3$$

Esempio di test interlaboratorio

Si immagini di inviare a 5 laboratori un composto a cinque livelli di concentrazione (3,8 - 9,6 - 20,2 - 31,5 mg/kg) prescrivendo di effettuare tre repliche con il metodo in esame.

Quando si ricevono i risultati, si scartano quelli aberranti (ad esempio con uno dei test riportati al punto 2.4.1). Si calcolano la media e la deviazione standard dei risultati ottenuti da ciascun laboratorio e la media e deviazione standard globali.

La tabella seguente mostra l'elaborazione dei risultati per una concentrazione:

Laboratorio	Risultato (mg/l)	Media \pm s	Deviazione dal valore noto	Deviazione della media globale
1	20,8	21,0 \pm 0,2	+ 0,8	+0,7
	21,0			
	21,2			
2	19,5	20,1 \pm 0,5	-0,1	-0,2
	20,2			
	20,5			
3	19,7	20,3 \pm 0,6	+0,1	0
	20,3			
	20,8			
4	20,1	20,6 \pm 0,4	+0,4	0,3
	20,7			
	21			
5	19,0	19,7 \pm 0,7	-0,5	-0,6
	19,9			
	20,3			
Media globale	20,3		$\Sigma = 0,7$	$\Sigma = 0,2$
Dev. st. globale	0,6			

La differenza tra la media globale e ciascuna media rivela l'eventuale presenza di laboratori anomali. La differenza tra la media generale ed il valore noto indica l'accuratezza del metodo. In questo caso la differenza è 0,1, con un errore relativo dello 0,5 %. La deviazione standard relativa della media globale è 3,0 %, che rappresenta la precisione del metodo.

La deviazione media è $0,7/5 = 0,1$.

La tabella seguente riassume i risultati ottenuti per tutte le concentrazioni:

Valore noto	Valore trovato	Dev. st. relativa	Errore relativo
3,8	4,1	10,8	7,9
9,6	10,0	8,6	4,2
20,2	20,3	3,0	0,5
31,5	31,6	2,1	0,3

Si nota come al diminuire della concentrazione diminuisca la precisione ed aumenti l'errore relativo del metodo.

I risultati indicano che il metodo proposto è accettabile. Tuttavia la determinazione di concentrazioni inferiori a circa 10 mg/l richiede maggiore attenzione.

Bibliografia

M. Castino, E. Roletto, "Statistica Applicata" 1991, Piccin, Padova.

S. Kromidas, "Practical Problem Solving in HPLC", 2000, Wiley-VCH, Weinheim, Germania.

D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, D. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics", 1997, Elsevier, Amsterdam, Olanda.

M. McMaster, C. McMaster, "GC/MS - A Practical User's Guide", 1998, Wiley-VCH, New York, USA.

"Metodi analitici per le acque", 1994, IRSA-CNR, Roma.

M. Otto, "Chemometrics", 1999, Wiley-VCH, Weinheim, Germania.

F.E. Prichard (Coordinating Author), "Quality in the Chemical Laboratory" (ACOL Series), 1995, Wiley, Chichester, UK.

D.A. Skoog, D.M. West, F. J. Holler, "Fondamenti di Chimica Analitica", Edises, Napoli, 1998.

"Standard Method for the Examination of Water and Wastewater", 18th Edition, 1992, APHA, Washington, USA.

Capitoli introduttivi ai metodi EPA di analisi.

CAPITOLO 3 - Metodi di analisi

Le tecniche analitiche

In questa sezione del CD vengono illustrati il principio di funzionamento e le caratteristiche delle tecniche analitiche strumentali utilizzate per l'esecuzione delle analisi con i metodi nazionali, EPA, ISO e IRSA riportati in questa raccolta di metodiche.

Le tecniche descritte sono:

- spettrofotometria UV-visibile;
- spettrometria di assorbimento atomico a fiamma (FAAS);
- spettrometria di assorbimento atomico a fornello di grafite (GFAAS);
- spettrometria di assorbimento atomico con generazione di idruri (HG-AAS);
- spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS);
- spettrometria di emissione atomica a plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES);
- spettrometria di massa con sorgente a plasma (ICP-MS);
- gascromatografia (GC);
- gascromatografia - spettrometria di massa (GC-MS);
- cromatografia liquida (HPLC);
- cromatografia ionica (IC);
- polarografia a impulsi differenziale (DPP);
- potenziometria.
- spettrometria di assorbimento nell'infrarosso (IR e FT-IR).

Per ciascuna tecnica sono stati presi in considerazione i seguenti parametri:

- principio di funzionamento;
- componenti della strumentazione;
- interferenze generali;
- applicazioni all'analisi;
- vantaggi;
- svantaggi;
- valutazione comparata rispetto a tecniche applicabili alla determinazione dei medesimi analiti;
- costo di acquisizione;
- costi di gestione;
- tempo di analisi.

Per alcuni dei parametri indicati sono stati individuati intervalli di variabilità così definiti:

- per il costo di acquisizione:
 - basso: fino a 5.000 euro;
 - moderato: da 5.000 a 25.000 euro;
 - medio: da 25.000 a 50.000 euro;
 - medio-alto: da 50.000 a 100.000 euro;
 - elevato: da 100.000 a 150.000 euro;
 - molto elevato: maggiore di 150.000 euro;
- per il tempo di stabilizzazione dello strumento:
 - breve: 1 - 10 minuti;
 - moderato: 11 - 30 minuti

-
- lungo: 31 - 60 minuti;
 - molto lungo: maggiore di 60 minuti;
- per il tempo di misura (come “misura” si intende la registrazione di un segnale da una soluzione, che può essere uno standard per la calibrazione, oppure un campione incognito da analizzare)
- breve: minore di 2 minuti;
 - moderato: 2- 5 minuti;
 - medio: 5 – 10 minuti;
 - medio – lungo: 10 – 20 minuti;
 - lungo: maggiore di 20 minuti.

Va sottolineato che i costi di acquisizione riportati rappresentano delle stime, riferite all'anno 2002, per fornire all'utilizzatore un'indicazione sull'investimento necessario per l'acquisto dei vari strumenti: il prezzo effettivo di vendita varierà a seconda della casa produttrice, del modello, della presenza di accessori e del grado di automazione.

Analogamente i tempi di stabilizzazione e di analisi riportati rappresentano delle indicazioni generali; i tempi effettivi dipenderanno dalle procedure di controllo di qualità adottate nei singoli laboratori e dalle condizioni di misura impostate (ad esempio il programma di temperatura per l'atomizzazione nella tecnica GFAAS).

I costi di gestione sono difficilmente quantificabili, perché dipendono dal tipo di strumento, dalla frequenza di utilizzo, dall'organizzazione e dalle caratteristiche del laboratorio. Per ogni strumento sono state quindi elencate le voci che concorrono a determinarne i costi di gestione. Inoltre è stata individuata una scala relativa di onerosità, definendo “bassi” i costi di gestione per strumenti molto semplici (ad esempio i potenziometri), “elevati” i costi per strumenti che richiedono molti materiali di consumo e/o frequenti interventi di manutenzione (ad esempio l'ICP-MS) e “intermedi” quelli per strumenti con caratteristiche intermedie.

Questa sezione non intende certamente sostituirsi ad un testo di analisi chimica strumentale, ma vuole richiamare agli utilizzatori i concetti fondamentali sul principio di funzionamento delle tecniche analitiche e sulla struttura delle strumentazioni. Le indicazioni riportate possono essere di ausilio nella scelta della tecnica da adottare tenendo conto degli obiettivi dell'analisi e delle esigenze di sensibilità, di tempo e di costi.

La sezione si chiude con alcuni riferimenti bibliografici utili per approfondire i temi trattati.

E' inoltre disponibile una tabella riassuntiva delle principali caratteristiche delle tecniche analitiche considerate.

Poiché per motivi di spazio non è possibile riportare il testo dell'intero capitolo, viene mostrata, a titolo di esempio, la descrizione di una tecnica analitica, e si rimanda al CD per le informazioni sulle rimanenti tecniche.

Un quadro globale delle principali caratteristiche di ciascun metodo strumentale di analisi può essere ricavato dalla tabella riassuntiva, che viene riportata integralmente.

Esempio di descrizione di tecnica strumentale: la spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite (GFAAS)

Principio della tecnica

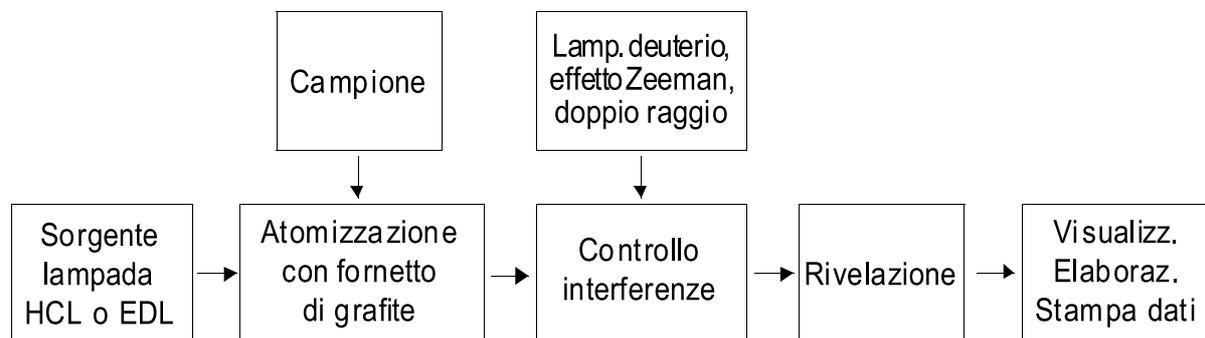
L'elemento da determinare è portato in forma atomica in fase gassosa, mediante riscaldamento in fornetto portato ad alta temperatura. Una radiazione monocromatica di lunghezza d'onda caratteristica dell'elemento è fatta passare attraverso il vapore atomico. Una parte della radiazione è assorbita dagli atomi dell'analita. La frazione assorbita è proporzionale alla sua concentrazione.

Componenti della strumentazione

- Sorgente di radiazioni monocromatiche: lampada a catodo cavo (HCL) o (per alcuni elementi, come As, Hg, Sb, Sn) lampada EDL (electrodeless discharge lamp).
- Dispositivo di atomizzazione: fornetto di grafite riscaldato mediante il passaggio di una corrente elettrica. Il volume depositato nel fornetto (di solito mediante un autocampionatore) è usualmente di 10 – 50 μ l. La temperatura del fornetto viene incrementata in stadi successivi, nei quali hanno luogo i seguenti fenomeni: evaporazione del solvente; decomposizione e volatilizzazione della maggior parte della matrice (arrostimento); atomizzazione dell'analita; pulizia finale del fornetto. Il fornetto può contenere una piattaforma (piattaforma di L'vov) che rende più uniforme la temperatura all'interno del tubo e migliora le prestazioni e i limiti di rivelabilità.
- Monocromatore (quasi sempre a reticolo) per isolare la radiazione di interesse.
- Rivelatore (comunemente un fotomoltiplicatore) per convertire l'intensità della radiazione trasmessa in un segnale elettrico ad essa proporzionale.
- Sistema di registrazione del segnale (computer o registratore).
- Dispositivo per la correzione del fondo (lampada a deuterio o effetto Zeeman).

Gli spettrometri (o spettrofotometri) possono essere a singolo o doppio raggio, a seconda che la radiazione sia inviata unicamente attraverso la nuvola atomica dell'analita o sia divisa in due porzioni di cui una attraversa l'analita atomizzato e l'altra viene utilizzata come riferimento per determinare l'attenuazione di intensità della prima, compensando il decremento dovuto al cammino ottico ed all'ambiente di misura.

Schema a blocchi di un'apparecchiatura per spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite.



Interferenze generali della tecnica

Interferenze spettrali. Si verificano quando linee o bande di assorbimento di altri componenti del campione si sovrappongono alla riga dell'analita. La sovrapposizione di linee è generalmente trascurabile perché la radiazione dell'analita emessa dalla lampada è molto stretta. Le bande di assorbimento dei componenti della matrice (non completamente volatilizzati prima dell'atomizzazione dell'analita, o ricondensati sulle pareti del fornello) e la diffusione della luce generano un segnale di fondo. Per ovviare a questo problema si deve effettuare una correzione del segnale di fondo mediante lampada a Deuterio o sfruttando l'effetto Zeeman. Il segnale di fondo con la tecnica a fornello di grafite è molto più basso di quello esistente nel caso di atomizzazione a fiamma.

Interferenze chimiche Si verificano quando altri componenti della matrice inibiscono la formazione di atomi liberi dell'analita. Si possono formare composti volatili dell'analita che vengono vaporizzati prima dello stadio di atomizzazione: ad esempio il piombo in presenza di cloruri viene parzialmente perso per volatilizzazione come $PbCl_2$ (in assenza di modificatore di matrice). Alcuni elementi invece (es. Zr, o W) tendono a formare carburi non volatili con la grafite del fornello. La tendenza è ridotta se si utilizzano fornelli in grafite pirolitica. Si ovvia a queste interferenze, in alcuni casi, con l'aggiunta di un modificatore di matrice oppure con il metodo delle aggiunte standard. I modificatori di matrice hanno la funzione di permettere una migliore separazione tra gli stadi di rimozione della matrice e di atomizzazione, rendendo più volatile la prima oppure diminuendo la volatilità dell'analita.

Effetti memoria. Si possono avere contaminazioni per effetto memoria se si analizzano soluzioni a basse concentrazioni dopo soluzioni ad elevata concentrazione.

Applicazioni

La tecnica è applicabile alla determinazione della maggior parte dei metalli e di alcuni metalloidi.

Vantaggi

- Elevata sensibilità: limiti di rivelabilità inferiori o pari a pochi $\mu g/l$.
- Applicabilità ad un vasto numero di analiti.
- Sicurezza nel funzionamento (assenza di fiamme, gas esplosivi, prodotti di combustione tossici).
- Bassi volumi di campione richiesti per l'analisi.

Svantaggi

- Elettronica sofisticata per la misura dell'assorbanza che risulta transiente.
- Condizioni critiche nel riscaldamento per l'essiccazione, l'arrostimento e l'atomizzazione.
- Necessità di un frequente controllo della pulizia del fornello.

Vantaggi rispetto a FAAS

- Maggiore sensibilità.
- Minor numero di interferenze.
- Non si usano gas reattivi.

Vantaggi rispetto a ICP-AES

- Limiti di rivelabilità inferiori.

Svantaggi rispetto a FAAS

- Minore precisione.

-
- Minore rapidità di analisi.
 - Maggiori costi di acquisto e gestione.

Svantaggi rispetto a ICP-AES

- Tempi di analisi più lunghi.
- Non si possono effettuare determinazioni multielementari.

Costo di acquisizione

Da medio a medio-alto (stima per l'anno 2002: approssimativamente 40.000 – 60.000 euro).

Costi di gestione

- Materiali di consumo e parti da sostituire periodicamente:
 - gas per la creazione di un ambiente inerte nel fornello e per l'allontanamento dei vapori del campione. Una bombola di argon dura circa 2 settimane (ipotizzando un utilizzo di 6 ore per 5 giorni la settimana);
 - fornelli. Un fornello dura approssimativamente per 200 misure (a seconda del tipo di matrice: matrici più acide o saline diminuiscono la durata dei fornelli);
 - coni di grafite in cui si inserisce il fornello;
 - tubo di iniezione dell'autocampionatore.
- Costi di ammortamento dello strumento e costi di riparazione o di un eventuale contratto di manutenzione.
- In aggiunta ai costi per l'esecuzione della misura, ci sono i costi dei reattivi per il trattamento e la preparazione dei campioni, dei bianchi e delle soluzioni standard.
- Infine ci sono i costi del personale, che varieranno da struttura a struttura.

Complessivamente i costi di gestione possono essere definiti elevati.

Tempo di analisi

- Tempo di stabilizzazione: moderato (circa 15 minuti per elemento).
- Tempo per l'esecuzione di una misura: moderato (tipicamente 2 - 4 minuti).
- Possibilità di analisi multielementare: generalmente no (richiede il cambio della lampada e una nuova calibrazione), tranne che con alcuni modelli recenti.

Tabella riassuntiva sulle tecniche strumentali di analisi

Tecnica	Principio	Applicazioni	Principali interferenze	Costo di acquisizione	Costo di gestione	Tempo	Analisi multielementare
Spett. UV-vis	Assorbimento di radiazioni UV o visibili	Composti organici e inorganici	Spettrali Diffusione della radiazione	Moderato	Basso	Stabilizzazione: moderato Misura: breve	No, tranne che in alcuni casi
FAAS	Atomizzazione con fiamma e assorbimento di radiazioni UV o visibili	Metalli ed alcuni metalloidi	Spettrali. Di distribuzione spaziale Chimiche Di ionizzazione Di trasporto Effetti memoria	Moderato	Intermedio	Stabilizzazione: moderato Misura: da breve a moderato	No
GFAAS	Atomizzazione in forno e assorbimento di radiazioni UV o visibili	Metalli ed alcuni metalloidi	Spettrali Chimiche Effetti memoria	Da medio a medio-alto	Elevato	Stabilizzazione: moderato Misura: moderato	No (tranne che con alcuni tipi di strumento)
HG-AAS	Conversione dell'analita in idruro, atomizzazione e assorbimento di radiazioni	UVElementi che formano idruuri covalenti volatili	Durante la generazione di idruuri Durante l'atomizzazione Spettrali (ridotte) Effetti memoria	Da basso a moderato (per il sistema di generazione di idruuri e la cella di misura). L'apparato va inserito in uno spettrometro di assorbimento atomico. In alternativa esistono strumenti indipendenti, dedicati al solo mercurio, di costo moderato	Elevato	Stabilizzazione: moderato Misura: moderato	No
CV-AAS	Conversione dell'analita in metallo, volatilizzazione e assorbimento di radiazioni UV	Mercurio	Durante la riduzione Spettrali (molto ridotte) Effetti memoria	Da basso a moderato (per il generatore di vapori freddi e la cella di misura). L'apparato va inserito in uno spettrometro di assorbimento atomico)	Elevato	Stabilizzazione: moderato Misura: moderato	No

Tecnica	Principio	Applicazioni	Principali interferenze	Costo di acquisizione	Costo di gestione	Tempo	Analisi multielementare
ICP-AES	Atomizzazione in plasma ed alcuni emissioni di radiazioni UV o visibili	Metalli ed alcuni metalloidi	Spettrali Di trasporto Effetti memoria	Da medio a medio-alto	Elevato	Stabilizzazione: moderato Misura: breve	Si
ICP-MS	Atomizzazione, ionizzazione e rivelazione mediante MS	La maggior parte degli elementi	Spettrali (isobariche, molecolari, ioni a doppia carica) Non spettrali (di trasporto, solidi disciolti, eccesso di ioni) Effetti memoria	Elevato	Elevato	Stabilizzazione: moderato Misura: breve	Si
GC	Volatilizzazione, ripartizione tra fase stazionaria e fase mobile (gas), separazione e rivelazione	Composti prevalentemente organici volatili e semivolatili termicamente stabili	Coeluzioni Segnale di fondo dovuto alla matrice Effetti memoria	Moderato	Intermedio	Stabilizzazione: da moderato a lungo. Misura: da moderato a lungo (ma in un solo cromatogramma si determinano più analiti)	Si
GC-MS	Volatilizzazione, ripartizione tra fase stazionaria e fase mobile (gas), separazione e rivelazione mediante MS	Composti prevalentemente organici volatili e semivolatili termicamente stabili	Coeluzioni Segnale di fondo dovuto alla matrice Effetti memoria	Da medio a medio-alto	Elevato	Stabilizzazione: da moderato a lungo. Misura: da moderato a lungo (ma in un solo cromatogramma si determinano più analiti)	Si
HPLC	Ripartizione tra fase stazionaria e fase mobile (liquido), separazione e rivelazione	Composti organici, inorganici, metallorganici	Coeluzioni Segnale di fondo dovuto alla matrice Effetti memoria	Da moderato a medio	Intermedio	Stabilizzazione: da moderato a lungo. Misura: da moderato a lungo (ma in un solo cromatogramma si determinano più analiti)	Si

Tecnica	Principio	Applicazioni	Principali interferenze	Costo di acquisizione	Costo di gestione	Tempo	Analisi multielementare
IC	Ripartizione per scambio ionico tra fase stazionaria e fase mobile (liquido), separazione e rivelazione	Specie ioniche o ionizzabili inorganiche, organiche e metallorganiche	Coeluzioni Effetti memoria	Da moderato a medio	Intermedio	Stabilizzazione: da moderato a lungo. Misura: da moderato a lungo (ma in un solo cromatogramma si determinano più analiti)	Si
DPP	Variazione di potenziale e misura della corrente risultante	Specie inorganiche, organiche e organometalliche ossidabili o riducibili	Sovrapposizione di segnali Tensioattivi Effetti memoria	Moderato	Intermedio	Stabilizzazione: nullo Misura: breve (medio se si considera la deossigenazione)	Si
Potenzioniom.	Misura della forza elettromotrice di una cella galvanica	pH, anioni e cationi	Specie a cui l'elettrodo è sensibile. Specie che alterano la forma chimica dell'analita. Variazioni di temperatura	Basso	Basso	Stabilizzazione: breve. Misura: breve	No
IR e FT-IR	Assorbimento di radiazioni nell'IR	Sostanze prevalentemente organiche	Spettrali. Ambiente esterno	Medio	Intermedio	Stabilizzazione: breve. Misura: moderato	Si

Le condizioni di analisi

In questa sezione del CD vengono riportate le condizioni operative, le interferenze ed i limiti di rivelabilità per la determinazione degli elementi e composti per i quali il DM 471/99 prevede valori di concentrazione limite accettabili nel suolo.

Le condizioni descritte fanno riferimento principalmente ai metodi EPA, sia perché sono quelli più dettagliati tra i gruppi di metodiche esaminati, sia perché sono disponibili per tutti gli analiti di interesse.

Come indicato nel testo dei metodi EPA stessi, le condizioni indicate non sono esclusive, nel senso che è possibile apportare delle modifiche (ad esempio utilizzando un altro tipo di colonna cromatografica, o variando il programma di temperatura per l'atomizzazione di una specie metallica), purché si dimostri che i risultati ottenuti sono ugualmente affidabili.

Per ciascun analita sono stati riportati gli aspetti principali delle condizioni operative di ciascun metodo di analisi, e si rimanda al testo originale della metodica (si ricorda che il CD contiene anche il testo originale di tutte le metodiche citate) per tutti gli altri particolari. Analogamente le condizioni di applicazione dei metodi nazionali, ISO e IRSA sono reperibili nel testo dei metodi stessi.

Sono inoltre indicate le interferenze specifiche della metodica di analisi per ciascun analita, mentre un riferimento ipertestuale permette di prendere visione delle interferenze comuni a tutti gli analiti, riportate nella sezione dedicata alla descrizione delle tecniche strumentali.

Infine si prende in considerazione il limite di rivelabilità di ciascun metodo, quando è disponibile, al fine di stabilire se è possibile determinare l'analita a concentrazioni pari ai limiti di legge.

Per avere un'idea dello schema tipico applicato a ciascun analita, si veda la struttura sotto riportata, riferita, a titolo di esempio, al cadmio.

Nel CD la struttura è ovviamente di tipo interattivo, per cui cliccando sulle voci in blu comparirà il testo corrispondente. In questo modo si può accedere rapidamente alle informazioni sull'analita di interesse.

Analita	Tecnica	Condizioni
Cadmio	Spettroscopia FAAS	Condizioni di misura – Interferenze – Limiti di rivelabilità
	Spettroscopia GFAAS	Condizioni di misura – Interferenze – Limiti di rivelabilità
	Spettroscopia ICP AES	Condizioni di misura – Interferenze – Limiti di rivelabilità
	Spettroscopia ICP MS	Condizioni di misura – Interferenze – Limiti di rivelabilità
ecc.		

A titolo di esempio, si riporta la descrizione delle condizioni di misura, delle interferenze e dei limiti di rivelabilità per la determinazione del cadmio.

Esempio di descrizione delle condizioni di misura (determinazione del cadmio)

Cadmio mediante FAAS

Condizioni

- Lunghezza d'onda: 228,8 nm.
- Fiamma: aria – acetilene.
- Calibrazione: esterna, utilizzando un bianco ed almeno tre soluzioni standard (indicazioni del metodo EPA 7000a). Se la matrice del campione è particolarmente complessa (per viscosità, tensione superficiale o natura dei componenti) e non è possibile simularla nelle soluzioni standard, è consigliabile adottare il metodo delle aggiunte standard.
- Come indicato nel capitolo sulla qualità del dato, è opportuno riportare, insieme ai risultati dell'analisi, anche le condizioni operative adottate durante la sua esecuzione.

Interferenze specifiche per il cadmio

Si possono verificare fenomeni di assorbimento non specifico e diffusione della radiazione alla lunghezza d'onda di misura. Si richiede la correzione del fondo.

Riferimento ipertestuale alle interferenze comuni a tutti gli analiti

Limite di rivelabilità

- Il limite di rivelabilità del cadmio con la spettrometria di assorbimento atomico a fiamma è stimato in 0,005 mg/l. Ipotizzando di effettuare l'estrazione su 1 g di suolo in un volume finale di 100 ml, questo limite corrisponde ad una concentrazione di 0,5 mg/kg.
- Limiti previsti nel DM 471/99: 2 mg/kg per siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (limite A); 15 mg/kg per siti ad uso commerciale e industriale (limite B).
- Il limite di legge (A) è di poco superiore al limite di rivelabilità. Occorre considerare che il valore di quest'ultimo rappresenta inevitabilmente una stima, e dipende fortemente dalla matrice e dalle condizioni operative. Pertanto, in presenza di campioni con concentrazioni vicine al limite di legge (A), occorre procedere con cautela ed applicare la tecnica solo dopo aver dimostrato che essa fornisce risultati sufficientemente accurati e precisi. Se necessario, si può valutare la possibilità di abbassare il limite di rivelabilità modificando le condizioni operative, ad esempio riducendo il volume finale del campione. In alternativa, si può usare una metodica più sensibile (ad esempio la spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite). Ad esempio l'EPA (metodo 7130) consiglia l'uso della tecnica GFAAS per concentrazioni inferiori a 2 mg/kg ed indica come ottimale per le misure mediante FAAS l'intervallo 5-200 mg/kg.
- Il limite di legge (B) è sufficientemente più elevato del limite di rivelabilità: pertanto si può ipotizzare che non ci siano problemi, dal punto di vista della sensibilità, per determinare il cadmio nei suoli ad uso commerciale e industriale con questa tecnica.
- Si rimanda al capitolo sulla qualità del dato per la definizione di limite di rivelabilità, delle tipologie di limite e dei loro rapporti numerici.

Cadmio mediante GFAAS

Condizioni

- Lunghezza d'onda: 228,8 nm.
- Volume iniettato: un volume di 20 µl è generalmente adatto per l'analisi.
- Programma di temperatura: prevede più stadi: evaporazione del solvente, pirolisi, atomizzazione. Ad esempio il metodo EPA 7131 prevede il seguente programma: 30 s a 125 °C; 30 s a 500 °C; 10 s a 1900 °C. Questo è il programma di base consigliato dall'EPA, che può essere modificato tenendo conto delle caratteristiche dello strumento e della matrice. In particolare per l'atomizzazione si possono impostare tempi più brevi (3-5 s) con rampa 0 (cioè incremento istantaneo della temperatura da 500 a 1900 °C). Inoltre si può prevedere uno stadio finale di pulizia del fornetto a temperatura elevata (ad esempio 5 s a 2800 °C).
- Calibrazione: esterna, utilizzando un bianco ed almeno tre soluzioni standard (indicazioni del metodo EPA 7000a). Se la matrice del campione è particolarmente complessa (per viscosità, tensione superficiale o natura dei componenti) e non è possibile simularla nelle soluzioni standard, è consigliabile adottare il metodo delle aggiunte standard.
- Come indicato nel capitolo sulla qualità del dato, è opportuno riportare, insieme ai risultati dell'analisi, anche le condizioni operative adottate durante la sua esecuzione.

Interferenze specifiche per il cadmio

- Si possono verificare fenomeni di assorbimento non specifico e diffusione della radiazione alla lunghezza d'onda di misura. Si richiede la correzione del fondo.

In presenza di un eccesso di ioni cloruro, che possono causare la volatilizzazione prematura dell'elemento, si richiede l'uso di un modificatore di matrice a base di fosfato di ammonio con relativa rimozione dei cloruri come NH₄Cl.

Riferimento ipertestuale alle interferenze comuni a tutti gli analiti

Limite di rivelabilità

- Il limite di rivelabilità del cadmio con la spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite è stimato in $1 \cdot 10^{-4}$ mg/l. Ipotizzando di effettuare l'estrazione su 1 g di suolo in un volume finale di 100 ml, questo limite corrisponde ad una concentrazione di 0,01 mg/kg.
- Limiti previsti nel DM 471/99: 2 mg/kg per siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (Limite A); 15 mg/kg per siti ad uso commerciale e industriale (limite B).
- I limiti di legge sono sufficientemente più elevati del limite di rivelabilità: pertanto si può ipotizzare che non ci siano problemi, dal punto di vista della sensibilità, per determinare il cadmio nei suoli con questa tecnica.
- Si rimanda al capitolo sulla qualità del dato per la definizione di limite di rivelabilità, delle tipologie di limite e dei loro rapporti numerici.

Cadmio mediante ICP-AES

Condizioni

Lunghezza d'onda: 226,502 nm.

- Calibrazione: esterna, utilizzando un bianco ed almeno una soluzione standard (indicazioni del metodo EPA 6010b). Quando si sospetta la presenza di interferenze o si è in presenza di una nuova matrice conviene utilizzare il metodo delle aggiunte standard.
- Come indicato nel capitolo sulla qualità del dato, è opportuno riportare, insieme ai risultati dell'analisi, anche le condizioni operative adottate durante la sua esecuzione.

Interferenze specifiche per il cadmio

Riferimento ipertestuale alle interferenze comuni a tutti gli analiti

Limite di rivelabilità

- Il limite di rivelabilità strumentale del cadmio con la spettrometria di emissione atomica a plasma è stimato in 0,0023 mg/l. Ipotizzando di effettuare l'estrazione su 1 g di suolo in un volume finale di 100 ml, questo limite corrisponde ad una concentrazione di 0,23 mg/kg.
- Limiti previsti nel DM 471/99: 2 mg/kg per siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale; 15 mg/kg per siti ad uso commerciale e industriale.
- Il limite di legge (A) è di poco superiore al limite di rivelabilità strumentale. Occorre considerare che il valore di quest'ultimo rappresenta inevitabilmente una stima, e dipende fortemente dalla matrice e dalle condizioni operative. Pertanto, in presenza di campioni con concentrazioni vicine al limite di legge (A), occorre procedere con cautela ed applicare la tecnica solo dopo aver dimostrato che essa fornisce risultati sufficientemente accurati e precisi. Se necessario, si può valutare la possibilità di abbassare il limite di rivelabilità modificando le condizioni operative, ad esempio riducendo il volume finale del campione. In alternativa, si può usare una metodica più sensibile (ad esempio la spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite).
- Il limite di legge (B) è sufficientemente più elevato del limite di rivelabilità: pertanto si può ipotizzare che non ci siano problemi, dal punto di vista della sensibilità, per determinare il cadmio nei suoli ad uso commerciale e industriale con questa tecnica.
- Si rimanda al capitolo sulla qualità del dato per la definizione di limite di rivelabilità, delle tipologie di limite e dei loro rapporti numerici.

Cadmio mediante ICP-MS

Condizioni

- Isotopi raccomandati: 114, 111. Isotopi alternativi: 112, 110, 113, 116, 106.
- Calibrazione: con standard interno, utilizzando per la curva di calibrazione un bianco ed almeno una soluzione standard (indicazioni del metodo EPA 6020).
- Come indicato nel capitolo sulla qualità del dato, è opportuno riportare, insieme ai risultati dell'analisi, anche le condizioni operative adottate durante la sua esecuzione.

Interferenze specifiche per il cadmio

- Gli ioni MoO^+ , $^{92}\text{ZrO}^+$, $^{94}\text{ZrO}^+$, $^{90}\text{ZrOH}^+$ causano interferenze molecolari sul segnale del cadmio.

Lo stagno esercita un'interferenza isobarica sul segnale del cadmio.

Riferimento ipertestuale alle interferenze comuni a tutti gli analiti

Limite di rivelabilità

- Il limite di rivelabilità del cadmio con la tecnica ICP-MS è stimato in meno di $2 \cdot 10^{-5}$ mg/l. Ipotizzando di effettuare l'estrazione su 1 g di suolo in un volume finale di 100 ml, questo limite corrisponde ad una concentrazione inferiore a 0,002 mg/kg.
- Limiti previsti nel DM 471/99: 2 mg/kg per siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale (limite A); 15 mg/kg per siti ad uso commerciale e industriale (limite B).
- I limiti di legge sono sufficientemente più elevati del limite di rivelabilità: pertanto si può ipotizzare che non ci siano problemi, dal punto di vista della sensibilità, per determinare il cadmio nei suoli con questa tecnica.
- Si rimanda al capitolo sulla qualità del dato per la definizione di limite di rivelabilità, delle tipologie di limite e dei loro rapporti numerici.

Considerazioni sui limiti di rivelabilità

Come indicato nella sezione sulla qualità del dato, il concetto di limite di rivelabilità non è ancora stato definito in modo univoco. In particolare, il suo valore dipende da vari fattori:

- le caratteristiche della tecnica strumentale;
- le condizioni operative adottate (ad esempio la quantità di campione iniettata);
- l'eventuale accoppiamento della tecnica a procedure di preconcentrazione;
- la composizione della matrice del campione;
- le modalità di calcolo del valore (limite di rivelabilità del metodo, strumentale...).

Pertanto è possibile, o addirittura probabile, trovare in letteratura valori diversi del limite di rivelabilità di un analita con lo stesso metodo di analisi.

Per questi motivi i valori riportati vanno considerati come puramente indicativi. E' quindi importante che l'analista determini i limiti di rivelabilità sulla matrice di interesse con la propria strumentazione.

Per il confronto tra limiti di rivelabilità ed i limiti di legge sono stati adottati i seguenti criteri:

- si è presa in considerazione la forma in cui è espresso il limite. Nella maggior parte dei casi i metodi EPA riportano il limite di rivelabilità del metodo (MDL) od il limite di quantificazione (LOQ), mentre per la determinazione di metalli mediante ICP-AES viene riportato il limite di rivelabilità strumentale (IDL). Nel valutare l'applicabilità di un metodo di analisi, si è tenuto conto del fatto che l'LOQ è più elevato degli altri due tipi di limite, e pertanto è più facilmente e realisticamente raggiungibile nella maggior parte dei laboratori;
- quando il limite di legge è almeno 10 volte più elevato dell'IDL, 5 volte più elevato dell'MDL o 2 volte superiore all'LOQ di un metodo di analisi, si è ipotizzato che non ci dovrebbero essere problemi, dal punto di vista della sensibilità, per determinare l'analita nei suoli con il metodo in oggetto;
- quando il limite di legge è inferiore al limite di rivelabilità di una procedura, si è ipotizzato che quest'ultima non sia applicabile alla determinazione dell'analita a livelli di concentrazione vicini al limite di legge stesso, mentre è utilizzabile in presenza di concentrazioni elevate. Va inoltre rilevato che in molti casi è possibile raggiungere limiti di rivelabilità inferiori variando alcune condizioni operative, come il volume finale di campione nelle tecniche di spettroscopia atomica, o la modalità di misura, ad esempio adottando la procedura di "Selected Ion Monitoring" nei metodi GC-MS;
- quando il limite di legge è uguale o appena superiore al limite di rivelabilità (meno di 2 volte rispetto all'LOQ, meno di 5 volte rispetto all'MDL o meno di 10 volte rispetto all'IDL) si è consigliato di procedere con cautela ed applicare la tecnica solo dopo aver dimostrato che essa fornisce misure sufficientemente accurate e precise alle concentrazioni di interesse. Se necessario, si può valutare la possibilità di abbas-

sare il limite di rivelabilità modificando le condizioni operative. In alternativa, si può usare una metodica più sensibile;

- per alcuni analiti i metodi di analisi non indicano i limiti di rivelabilità: in questi casi è stata riportata una stima dell'ordine di grandezza di questo parametro per analogia con composti analoghi.

Va sottolineato come in tutti i casi le considerazioni riportate sui limiti di rivelabilità di ciascun analita siano da considerarsi delle indicazioni preliminari: sarà compito dell'analista determinarne l'effettivo valore con la propria strumentazione e sulla matrice di interesse.

CAPITOLO 4 - Condizioni di analisi per i singoli analiti

Questa sezione del CD riporta i commenti alle metodiche analitiche ed è complementare alla precedente, che riassume le condizioni operative, le interferenze ed i limiti di rivelabilità per la determinazione di ciascun parametro. I commenti prendono in considerazione non solo lo stadio della misura strumentale, ma anche gli stadi precedenti di pretrattamento (es. estrazione, digestione) ed eventuale "clean-up" del campione. Vengono commentati i metodi EPA, ISO, IRSA e nazionali, con particolare attenzione ai metodi EPA, per i motivi esposti al punto 5.2.

In testa alla pagina sono riportati i link ai gruppi di parametri, suddivisi come nella Tabella 1 del DM 471/99. Cliccando sul nome di ciascun gruppo appare un commento ai metodi di pretrattamento e di analisi per i parametri del gruppo stesso: viene descritto il principio delle tecniche e si forniscono indicazioni sulle possibili interferenze e sugli accorgimenti da adottare per l'analisi. Cliccando sul numero del metodo, ne appare il testo completo in formato PDF (il testo può essere letto con il programma Adobe-Acrobat che, per sola lettura, è disponibile su questo stesso CD).

Il testo dei commenti ha la medesima struttura per tutti i gruppi di parametri: una breve introduzione seguita da tre capitoli dedicati al pretrattamento del campione, al clean-up (se necessario) ed alla determinazione. Ogni metodo è commentato singolarmente. Quando esistono metodiche diverse per i parametri appartenenti allo stesso gruppo (come nel caso dei composti inorganici e degli idrocarburi) è stato dedicato un capitolo a ciascun analita.

Leggendo i commenti, si può notare come esistano delle analogie nei metodi di preparazione ed analisi di parametri diversi. In particolare, la maggior parte delle tecniche di pretrattamento appartiene alle tre categorie:

- digestione acida per la determinazione di metalli
- estrazione con solvente per i composti organici semivolatili o non volatili
- volatilizzazione per i composti organici volatili.

Per ogni categoria, sono possibili più modalità operative (ad esempio estrazione con Soxhlet, con ultrasuoni, in fase supercritica ...).

Le tecniche di determinazione su cui si basa la maggior parte dei metodi sono rappresentate da:

- spettroscopia atomica per la determinazione dei metalli
- gascromatografia e gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa per i composti organici.

A titolo di esempio, si riportano i commenti relativi ai composti alifatici clorurati cancerogeni.

Esempio di commento ai metodi di analisi (composti alifatici clorurati cancerogeni)

I metodi di pretrattamento e analisi per i composti alifatici clorurati cancerogeni sono generalmente applicabili per tutti i dodici analiti per i quali la legislazione prevede limiti di concentrazione: clorometano, diclorometano, triclorometano, cloruro di vinile, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetilene, 1,2-dicloropropano, 1,1,2-tricloroetano, tricloroetilene, 1,2,3-tricloropropano, 1,1,2,2-tetracloroetano, tetracloroetilene (PCE).

Vista la volatilità degli analiti, i metodi di pretrattamento sono basati sulla loro separazione dalla matrice per volatilizzazione. In particolare, i metodi EPA sono basati sulla tecnica dello spazio di testa (5021), distillazione sotto vuoto (5032) o "purge and trap" (5035 e 5030b). Il metodo ISO/DIS 15009 invece prevede l'estrazione degli analiti con metanolo seguita da separazione "purge and trap". Il metodo ISO non fa esplicito riferimento al cloruro di vinile, all'1,1-dicloroetilene o all'1,1,2,2-tetracloroetano, ma si può ipotizzare che sia applicabile anche alla loro determinazione.

Il metodo IRSA 23a infine prevede l'estrazione degli analiti in n-pentano. La determinazione dei composti alifatici clorurati cancerogeni sfrutta nuovamente la loro volatilità e viene effettuata mediante GC (metodi EPA 8021b, IRSA 23a e ISO/DIS 15009) o GC/MS (metodo EPA 8260b). Il metodo IRSA non cita esplicitamente il clorometano, diclorometano, cloruro di vinile, 1,2-dicloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,2,3-tricloropropano. Tuttavia si può ipotizzare che la metodica sia utilizzabile anche per questi composti.

Nei metodi EPA di pretrattamento e di determinazione sono riportate procedure di controllo di qualità che si consiglia di eseguire anche se si seguono altre metodiche, al fine di verificare l'accuratezza del procedimento seguito. Sono inoltre segnalate le eventuali cause di rischio e le misure di sicurezza da adottare (ad esempio per la manipolazione di reagenti tossici).

Pretrattamento del campione

Metodi EPA

Il metodo EPA 5000 fornisce indicazioni generali sui metodi di preparazione (purge-and-trap, spazio di testa, distillazione ...) per l'introduzione di composti volatili nello strumento di misura. Fornisce inoltre informazioni sulle possibili interferenze e sulle misure di controllo di qualità da adottare. I singoli metodi di preparazione sono poi descritti in maggiore dettaglio in singoli metodi EPA (ad esempio EPA 5021, 5032, 5035).

Il metodo EPA 5021 descrive un'analisi automatica in spazio di testa per suoli ed altre matrici solide. Il campione solido è posto in un "vial" tarato e chiuso con setto al momento del campionamento. Si aggiunge un modificatore di matrice contenente uno standard interno o un sostituto. Il "vial" è posto poi in apparecchio a spazio di testa ad equilibrio automatico che scalda l'intero campione a 85°C mentre lo tiene in agitazione per vibrazione meccanica. Un volume noto di spazio di testa è in seguito introdotto automaticamente in un sistema GC o GC/MS per l'analisi dei componenti organici volatili. I limiti di concentrazione valutabili variano tra 10 e 20 µg/kg.

Il metodo EPA 5032 descrive una tecnica di distillazione sotto vuoto in un sistema chiuso per l'analisi delle sostanze organiche volatili comprese quelle non estraibili in corrente gassosa, quelle solubili in acqua, composti organici volatili in soluzione acquosa, quelle solide ed i rifiuti oleosi. Il campione è introdotto in un matraccio e poi collegato ad un sistema di distillazione sotto vuoto. La pressione di distillazione resta approssimativamente intorno a 10 torr (tensione di vapore dell'acqua) finché l'acqua non è tutta rimossa dal campione. Il vapore passa attraverso un condensatore raffreddato a -10°C, o meno, e il distillato incondensato è bloccato criogenicamente in un pezzo di colonna di acciaio inossidabile da 1/8 inch raffreddato alla temperatura dell'azoto liquido (-196°C). Dopo un tempo di distillazione idoneo, che può variare a seconda della matrice o delle sostanze da determinare, il condensato nella trappola criogenica è desorbito termica-

mente e trasferito ad un GC usando He come gas di trasporto. Questo metodo è molto valido per estrarre sostanze organiche da una grande varietà di matrici.

Il metodo EPA 5035 descrive un sistema di "purge and trap" per l'analisi delle sostanze organiche volatili che sono estraibili in corrente gassosa da una matrice solida a 40°C. È idoneo per suoli, sedimenti e ogni campione di rifiuto solido di consistenza simile al suolo. Il campione (normalmente 5 g) è posto nel vial di campionamento con la soluzione modificatrice di matrice. Il campione rimane ermeticamente sigillato a partire dal campionamento e durante l'analisi dato che il sistema di "purge and trap" chiuso aggiunge automaticamente standard ed esegue il processo di "purge and trap". Il metodo fornisce dati accurati perché si minimizzano le perdite di sostanze volatili dato che si riduce la manipolazione del campione, tuttavia è necessario un apparecchio di "purge and trap" speciale. Può essere usato anche per la determinazione di benzina nelle matrici solide. I limiti di concentrazione valutabili variano tra 0.5 e 200 µg/kg per campioni

In presenza di elevate concentrazioni (> 200 µg/kg) o di campioni oleosi, gli analiti vengono estratti con la medesima procedura, ma la loro introduzione nello strumento di misura viene effettuata secondo il metodo 5030b.

Metodi ISO

Il metodo ISO/DIS 15009 è basato sull'estrazione degli analiti in metanolo sotto agitazione. Una frazione dell'estratto viene introdotta in un sistema "purge and trap" ed i composti volatili vengono trasportati da un flusso di gas inerte ed adsorbiti su un supporto solido, dal quale sono desorbiti per via termica e introdotti nel gas cromatografo, se necessario interponendo una trappola fredda. Come indicato precedentemente, il metodo non fa esplicito riferimento al cloruro di vinile, all'1,1-dicloroetilene o all'1,1,2,2-tetracloroetano, ma si può ipotizzare che sia applicabile anche alla loro determinazione.

Metodi IRSA

Il metodo IRSA 23a riporta una procedura di estrazione dei solventi organici clorurati in n-pentano. L'estrazione può essere condotta con un agitatore magnetico o con un sistema ad ultrasuoni. Come indicato precedentemente, il metodo non cita esplicitamente il clorometano, diclorometano, cloruro di vinile, 1,2-dicloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,2,3-tricloropropano. Tuttavia si può ipotizzare che la metodica sia utilizzabile anche per questi composti.

Determinazione

Metodi EPA

Il metodo EPA 8021b descrive le condizioni gascromatografiche per la determinazione dei composti organici volatili alogenati ed aromatici. I campioni possono essere analizzati usando come pretrattamento uno dei metodi sopra segnalati. Viene usato un programma di temperatura e la determinazione viene effettuata per mezzo di un rivelatore a fotoionizzazione (PID) e di un rivelatore a conducibilità (HECD) in serie. Se le analisi riguardano esclusivamente composti alogenati si può usare solo l'HECD, nel caso di composti aromatici si può usare solo il PID. L'intervallo di concentrazione per cui il metodo è applicabile varia da 0.1 a 200 µg/L; il limite di rilevabilità per ciascun composto è di 1 µg/kg (peso umido) per campioni di suolo e di sedimenti.

Il metodo EPA 8260b è idoneo per la determinazione di molti composti organici volatili con punto di ebollizione sotto i 200°C che sono introdotti nel gascromatografo con uno dei metodi sopra riportati. I composti da analizzare vengono introdotti direttamente in una colonna "wide-bore" o concentrati criogenicamente su una pre-colonna capillare prima di essere vaporizzati istantaneamente (flash) in una colonna capillare "narrow-bore" per l'analisi. Viene usato un programma di temperatura e il rivelatore è uno spettrometro di massa (MS). Il limite di rilevabilità del metodo per ogni composto può dipendere dallo strumento, dalla scelta del metodo di preparazione e del metodo di introduzione del campione per cui usando una strumentazione quadrupolare ed una tecnica "purge and trap" approssimativamente il limite è di 5 µg/Kg per i terreni.

Metodi ISO

Il metodo ISO/DIS 15009 descrive la determinazione di idrocarburi aromatici volatili, naftalene e idrocarburi alogenati volatili mediante GC con colonna capillare. Per la determinazione degli idrocarburi alogenati si utilizza un rivelatore a cattura di elettroni (ECD). L'identità degli analiti e la presenza di eventuali interferenze positive dovute a coeluzioni viene identificata ripetendo l'analisi con un'altra colonna o usando la tecnica GC-MS. Come indicato precedentemente, il metodo non fa esplicito riferimento al cloruro di vinile, all'1,1-dicloroetilene o all'1,1,2,2-tetracloroetano, ma si può ipotizzare che sia applicabile anche alla loro determinazione.

Metodi IRSA

Il metodo IRSA 23a per i solventi organici clorurati è basato sulla separazione gascromatografica degli analiti e sulla loro rivelazione con ECD. Come indicato precedentemente, il metodo non fa esplicito riferimento ai composti: clorometano, diclorometano, cloruro di vinile, 1,2-dicloroetano, 1,1,2-tricloroetano, 1,2,3-tricloropropano. Tuttavia si può ipotizzare che la tecnica sia utilizzabile anche per questi analiti.

CAPITOLO 5 - Concentrazioni limite e limiti di rivelabilità

La tabella riporta le concentrazioni limite previste per ciascun parametro nella tabella 1 del DM 471/99 ed i corrispondenti limiti di rivelabilità. Per questi ultimi valgono le considerazioni esposte al capitolo precedente.

Il significato delle sigle e le unità di misura sono riportati nel glossario (ultimo capitolo del testo).

Compositi inorganici		A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA
1	Antimonio	10	30	20 (FAAS, metodo 7040) 0,3 (GFAAS, metodo 7041) 0,1 (HGAAS-1, metodo 7062) 2,1 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
2	Arsenico	20	50	0,1 (GFAAS, metodo 7060) 0,1 (HGAAS-1, metodo 7062) 0,2 (HGAAS-2, metodo 7061) 3,5 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL)
3	Berillio	2	10	<0,002 (ICP-MS, metodo 6020) 0,5 (FAAS, metodo 7090) 0,02 (GFAAS, metodo 7091) 0,018 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
4	Cadmio	2	15	0,5 (FAAS, metodo 7130) 0,01 (GFAAS, metodo 7131) 0,23 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
5	Cobalto	20	250	5 (FAAS, metodo 7200) 0,1 (GFAAS, metodo 7201) 0,47 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
6	Cromo totale	150	800	5 (FAAS, metodo 7190) 0,1 (GFAAS, metodo 7191) 0,47 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
7	Cromo VI	2	15	20 (colorim., metodo 7196a) 0,012 (IC, metodo 7199) 0,4 (DPP, metodo 7198) 0,2 (precip, metodo 7195) 0,04 (chelaz, metodo 7197)

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

Compositi inorganici		A	B	LIMITI DI RIVELABILITA' METODI EPA
8	Mercurio	1	5	0,02 (CVAAS, metodo 7471a) 1,7 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) ?<0,002 (ICP-MS, metodo 6020) 0,01 (ASV, metodo 7472)
9	Nichel	120	500	4 (FAAS, metodo 7520) 0,1 (GFAAS, metodo 7521) 1 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
10	Piombo	100	1000	10 (FAAS, metodo 7420) 0,1 (GFAAS, metodo 7421) 2,8 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
11	Rame	120	600	2 (FAAS, metodo 7210) 0,1 (GFAAS, metodo 7211) 0,36 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
12	Selenio	3	15	0,2 (GFAAS, metodo 7740) 0,2 (HGAAS-2, metodo 7741a) 0,3 (HGAAS-1, metodo 7742) 5 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) ?<0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
13	Stagno	1	350	80 (FAAS, metodo 7870) 1,7 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) ?<0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
14	Tallio	1	10	10 (FAAS, metodo 7840) 0,1 (GFAAS, metodo 7841) 2,7 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
15	Vanadio	90	250	20 (FAAS, metodo 7910) 0,4 (GFAAS, metodo 7911) 0,5 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) ?<0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
16	Zinco	150	1500	0,5 (FAAS, metodo 7950) 0,005 (GFAAS, metodo 7951) 0,12 (ICP-AES, metodo 6010b; IDL) <0,002 (ICP-MS, metodo 6020)
17	Cianuri (liberi)	1	100	1 (titolazione, metodo 9014) 0,2 (colorimetria, metodo 9014) 0,5 (potenziom., metodo 9213)
18	Fluoruri	100	2000	1,7 (IC, metodo 9056; MDL) 17 (potenziom., metodo 9214; MDL)

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
AROMATICI					
19 Benzene	0,1	2	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	1 (GC, metodo 23b)	0,1 (GC, metodo 15009)
20 Etilbenzene	0,5	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	1 (GC, metodo 23b)	0,1 (GC, metodo 15009)
21 Stirene	0,5	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	1 (GC, metodo 23b)	0,1 (GC, metodo 15009)
22 Toluene	0,5	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	1 (GC, metodo 23b)	0,1 (GC, metodo 15009)
23 Cilene	0,5	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	1 (GC, metodo 23b)	0,1 (GC, metodo 15009)
24 Sostanze aromatiche organiche (da 20 a 23)	1	100	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	1 (GC, metodo 23b)	0,1 (GC, metodo 15009)
AROMATICI POLICICLICI					
25 Benzo(a)pirene	0,5	10	0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,01 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
26 Benzo(a)pirene	0,1	10	0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,02 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
27 Benzo(b)fluorantene	0,5	10	0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,01 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
28Benzo(k)fluorantene	0,5	10	?0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,01 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
29Benzo(g, h, i)perilene	0,1	10	?0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,05 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
30Crisene	5	50	?0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,1 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
31Dibenzo(a)pirene	0,1	10	?0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) ?1 (GC-MS, metodo 8275) ?0,18 (HPLC, metodo 8310; PQL)		
32Dibenzo(a,h)antracene	0,1	10	0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,02 (HPLC, metodo 8310; PQL)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
33 Indenopirene	0,1	5	?0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,03 (HPLC, metodo 8310)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
34 Pirene	5	50	?0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,18 (HPLC, metodo 8310)	0,005 (GC, metodo 25)	0,01 (HPLC, metodo 13877)

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
35	10	100	0,005 s.u. (GC, metodo 8100) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 1 (GC-MS, metodo 8275) 0,01-0,18 (HPLC, metodo 8310)	0,01 (HPLC, metodo 13877)
ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI				
36	0,1	5	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
37	0,1	5	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
38	0,1	5	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
39	0,01	0,1	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
40	0,2	5	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
41	0,1	1	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
42	0,3	5	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
43	0,5	15	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
44	1	10	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
45	0,1	1	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)
46	0,5	10	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,01 (GC, metodo 15009)

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
47 Tetracloroetilene (PCE)	0,5	20	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,1 (GC, metodo 23a)	0,01 (GC, metodo 15009)
ALIFATICI CLORURATI NON CANCEROGENI					
48 1,1-Dicloroetano	0,5	30	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		0,01 (GC, metodo 15009)
49 1,2-Dicloroetilene	0,3	15	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	0,1 (GC, metodo 23a)	0,01 (GC, metodo 15009)
50 1,1,1-Tricloroetano	0,5	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		0,01 (GC, metodo 15009)
ALIFATICI ALOGENATI CANCEROGENI					
51 Tribromometano (bromofornio)	0,5	10	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		
52 1,2-Dibromoetano	0,01	0,1	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		
53 Dibromoclorometano	0,5	10	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		
54 Bromodiclorometano	0,5	10	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		
NITROBENZENI					
55 Nitrobenzene	0,5	30	?a livello di µg/kg (GC, metodo 8091) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 0,26 (HPLC, metodo 8330; LOQ)		
56 1,2-Dinitrobenzene	0,1	25	?a livello di µg/kg (GC, metodo 8091) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) ?0,3 (HPLC, metodo 8330; LOQ)		
57 1,3-Dinitrobenzene	0,1	25	?a livello di µg/kg (GC, metodo 8091) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 0,25 (HPLC, metodo 8330; LOQ)		

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
58 Clorinitrobenzeni	0,1	10	PER CIASCUN CLORONITROBENZENE: ?a livello di µg/kg (GC, metodo 8091) ?0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) ?0,3 (HPLC, metodo 8330; LOQ)		
CLOROBENZENI					
59 Monoclorobenzene	0,5	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)		0,01 (GC, metodo 15009)
60 Diclorobenzene non cancerogeni (1,2-diclorobenzene)	1	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,18 s.u. (GC, metodo 8121; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (GC, metodo 23a)	0,01 (GC, metodo 15009)
61 Diclorobenzene cancerogeni (1,4-diclorobenzene)	0,1	10	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,60 s.u. (GC, metodo 8121; LOQ) 0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		0,01 (GC, metodo 15009)
62 1,2,4-triclorobenzene	1	50	0,001 s.u. (GC, metodo 8021b; LOQ) 0,09 s.u. (GC, metodo 8121; LOQ)		
63 1,2,4,5-tetraclorobenzene	1	25	0,005 s.u. (GC-MS, metodo 8260b; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 0,006 s.u. (GC, metodo 8121; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
64 Pentaclorobenzene	0,1	50	0,03 s.u. (GC, metodo 8121; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270; LOQ c)		
65 Esaclorobenzene	0,05	5	0,004 s.u. (GC, metodo 8121; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (GC, metodo 23a)	
66 Fenoli non clorurati (1)	0,1	10	? GC, metodo 8041		
67 Metilfenolo (o-m-p-)	0,1	25	0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 19a)	
68 Fenolo	1	60	? GC, metodo 8041 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 19a)	

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
FENOLI CLORURATI					
69 2-clorofenolo	0,5	25	? GC, metodo 8041 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 19a)	
70 2,4-diclorofenolo	0,5	50	? GC, metodo 8041 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 19a)	
71 2,4,6-triclorofenolo	0,01	5	? GC, metodo 8041 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 19a)	
72 Pentaclorofenolo	0,01	5	? GC, metodo 8041 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 19a)	
AMMINE AROMATICHE					
73 Anilina	0,05	5	1,5 s.u. (GC, metodo 8131; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 26a)	
74 o-Anisidina	0,1	10	? GC 1,5 s.u. (GC, metodo 8131; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 26a)	
75 m,p-Anisidina	0,1	10	? GC 1,5 s.u. (GC, metodo 8131; LOQ) ? GC-MS centinaia di µg/kg s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 26a)	
76 Difetilamina	0,1	10	? GC 1,5 s.u. (GC, metodo 8131; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 26a)	
77 p-Toluidina	0,1	5	? GC 1,5 s.u. (GC, metodo 8131; LOQ) ? GC-MS centinaia di µg/kg s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 26a)	
78 Sostanze Ammine Aromatiche (da 73 a 77)	0,5	25	? GC 1,5 s.u. (GC, metodo 8131; LOQ) ? GC-MS centinaia di µg/kg s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)	0,1 (HPLC, metodo 26a)	
FITOFARMACI					
79 Alador	0,01	1	? GC 0,13-0,6 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) ? GC-MS centinaia di µg/kg s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
80 Aldrin	0,01	0,1	0,6 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
81 Atrazina	0,01	1	? GC centinaia di µg/kg s.u. (GC, metodi 8041a e 8081a; LOQ) ? GC-MS centinaia di µg/kg s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
82 alfa-esacloroesano	0,01	0,1	? GC 0,2 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
83 beta-esacloroesano	0,01	0,5	0,1 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
84 gamma-esacloroesano (Lindano)	0,01	0,5	0,2 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
85 Clordano	0,01	0,1	0,4 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
86 DDD.DDT.DDE	0,01	0,1	0,4-0,6 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
87 Dieldrin	0,01	0,1	0,3 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
88 Endrin	0,01	2	0,5 s.u. (GC, metodo 8081a, LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		
DIOSINE E FURANI					
89 Sommatioria PCDD, PCDF (conversione T.E.)	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻³ (GC-MS, metodo 8280a; LOQ) 1x10 ⁻⁶ (GC-MS, metodo 8290; MCL)	1 (GC, metodo 24a)	
90 PCB	0,001	5	1,6 – 8.10-4 s.u. (GC, metodo 8082; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 0,2 (GC-MS, metodo 8275)		

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

	A	B	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI EPA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI IRSA	LIMITI DI RIVELABILITÀ METODI ISO
IDROCARBURI					
91 Idrocarburi leggeri C<12	10	250	? GC a livello di µg/kg (GC, metodo 8015b) ? a livello di µg/kg (GC-MS, metodo 8260b; LOQ)	5 (gravimetria, metodo 21)	
92 Idrocarburi pesanti C>12	50	750	? GC a livello di µg/kg (GC, metodo 8015b) ? GC centinaia di µg/kg s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ) 10 (IR, metodo 8440)	5 (gravimetria, metodo 21)	20 (IR, metodo 11046) 100 (GC, metodo 11046) (?)
ALTRE SOSTANZE					
93 Amianto (fibre libere)	1000 (*)	1000 (*)			
94 Esteri dell'acido ftalico (ognuno)	10	60	0,014-0,43 s.u. (GC, metodo 8061a; LOQ) 0,660 s.u. (GC-MS, metodo 8270c; LOQ)		

(*) Corrisponde al limite di rivelabilità della tecnica analitica (diffrazione a raggi X oppure IR-Trasformata di Fourier)

Note: i punti interrogativi corrispondono ai limiti non disponibili o ipotizzati.

Normativa di riferimento

In questa sezione è disponibile il testo integrale di alcune normative di interesse per chi opera nel campo dell'indagine e bonifica dei terreni contaminati.

In particolare sono riportati:

- il DM 471/99 ("Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modifiche e integrazioni");
- il DM 6 Settembre 1994 ("Normative e metodologiche tecniche di applicazione dell'art. 6, comma 3, e dell'art. 12, comma 2, della legge 27 marzo 1992, n. 257, relativa alla cessazione dell'impiego dell'amianto");
- il DM 13 Settembre 1999 ("Approvazione dei metodi ufficiali di analisi chimica del suolo");
- la legge 23 Marzo 2001, n. 93 ("Disposizioni in campo ambientale");
- il DM 18 Settembre 2001 n. 468 ("Programma nazionale di bonifica e ripristino ambientale dei siti inquinati");
- la legge 21 Dicembre 2001, n. 443 ("Delega al Governo in materia di infrastrutture ed insediamenti produttivi strategici – cd. Legge Lunardi") - Stralcio
- il D.lgs. n°22 del 05/02/1997, detto "Decreto Ronchi" ("Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e rifiuti di imballaggio) integrato con le modifiche apportate fino al 7 marzo 2002, ed i relativi allegati;
- l'allegato alla decisione 94/3/CE (Catalogo Europeo dei Rifiuti)
- il DM Agricoltura 8 luglio 2002 ("Approvazione dei metodi ufficiali di analisi microbiologica del suolo")
- legge 31 luglio 2002, n. 179 ("Disposizioni in campo ambientale" – Collegato ambientale alla Finanziaria 2002).

Bibliografia

Nel CD è presente una sezione che riporta riferimenti bibliografici su metodi di analisi e sulla chimica ambientale.

Sono inoltre disponibili links ai siti delle regioni italiane ed a quelli di enti e strutture che si occupano di questioni ambientali.

- B.J. Alloway, D.C. Ayres, "Chemical principles of environmental pollution", 2 ed., Blackie Acad. London, 1997.
- R. Cozzi, P. Protti, T. Ruaro, "Analisi chimica strumentale", Zanichelli, Bologna, 1997.
- L. Ebdon, E.H. Evans, A. Fisher, S.J. Hill, "An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry", Wiley, New York, USA, 1998.
- V.P. Evangelou, "Environmental Soil and Water Chemistry", Wiley, New York, USA, 1998.
- S. Facchetti, D. Pitea, Eds., Chemistry and environment. Legislation, methodologies, and applications, Kluwer Acad. Press, Dordrecht, 1995.
- S.E. Manaham, "Environmental chemistry", Lewis Publ., CRC Press, Boca Raton, USA, 1994.
- E. Mentasti, G. Saini, "Analisi Chimica Cromatografica", Piccin, Padova, 1990.
- E. Merian, Ed., "Metals and their compounds in the environment", VCH Press, Weinheim, Germany, 1991.
- A. Montaser, Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Wiley-VCH, New York, USA, 1998.
- L. Morselli, Ed., "Siti contaminati, controllo e bonifica", Ed. Clueb, Bologna, 1993.
- K.A. Rubinson, J.F. Rubinson, «Chimica analitica strumentale», Zanichelli, Bologna, 2002.
- H.H. Rump, "Laboratory Manual for the Examination of water", Waste Water and Soil, Wiley-VCH, New York, USA, 1999.
- G. Saini, E. Mentasti, "Fondamenti di Chimica Analitica. Analisi Chimica Strumentale", UTET, Torino, 1995.
- C. Sarzanini, S. Cavalli, "Cromatografia Ionica. Teoria e applicazioni", UTET, Torino, 1998.
- Skoog, Leary, "Chimica Analitica Strumentale", Edises, Napoli, 1996.
- W. Stumm, J.J. Morgan, "Aquatic Chemistry", Wiley, New York, USA, 1996.
- A.M. Ure, C.M. Davidson, Eds., "Chemical speciation in the environment", Blackie Acad. London, 1995.
- Vandecasteele, C.B. Block, "Modern methods for trace element determination", Wiley, New York, USA, 1993.
- J.C. Van Loon, "Selected methods of trace analysis", Wiley, New York, USA, 1985.
- B. Welz, M. Sperling, "Atomic Absorption Spectrometry", 3rd Edition, 1999, Wiley -VCH, Weinheim, Germania.
- H.H. Willard, L.L. Merritt, Jr., J.A. Dean, F.A. Settle, Jr., "Instrumental Methods of Analysis", Wadsworth, Belmont, USA, 1988.

Glossario

Unità di misura

Le concentrazioni limite sono espresse in mg kg⁻¹ come s.s. (sostanza secca).

I limiti di rivelabilità sono espressi in mg/kg come ss (se non è specificato diversamente) o come s.u. (sostanza umida).

Sigle

A: siti ad uso Verde pubblico, privato e residenziale

B: siti ad uso commerciale e industriale

IDL = limite di rivelabilità strumentale

LOQ = limite di quantificazione

MCL = limite di calibrazione del metodo

MDL = limite di rivelabilità del metodo

PQL = limite pratico di quantificazione

ASV = voltammetria di stripping anodico

DPP = polarografia a impulsi differenziale

FAAS = spettrometria di assorbimento atomico a fiamma

GC = gascromatografia

GC-MS = gascromatografia – spettrometria di massa

GFAAS = spettrometria di assorbimento atomico a fornetto di grafite

HG-AAS –1 = spettrometria di assorbimento atomico con generazione di idruri e atomizzazione in cella di quarzo

HG-AAS –2 = spettrometria di assorbimento atomico con generazione di idruri e loro introduzione in fiamma

HPLC = High Performance (o High Pressure) Liquid Chromatography

IC = cromatografia ionica

ICP-AES = spettrometria di emissione atomica a plasma ad accoppiamento induttivo

ICP-MS = spettrometria di massa con sorgente a plasma

IR = spettrometria di assorbimento nell'infrarosso

Il CTN TES nell'ambito della rete SINAnet

Ruolo e struttura dei Centri Tematici Nazionali

Il progetto Centri Tematici Nazionali (CTN) ha avuto inizio nell'ottobre del 1998, nell'ambito delle attività di realizzazione e gestione del Sistema nazionale conoscitivo e dei controlli ambientali (SINAnet), con l'avvio e la realizzazione di 6 CTN prioritari, da sviluppare in collaborazione con le Agenzie regionali.

Il criterio di riferimento per l'individuazione dei primi 6 CTN è stato quello di garantire la corrispondenza con gli *European Topic Centres* (ETC), le strutture che giocano nella rete europea EIONet un ruolo omologo a quello dei CTN nella rete SINAnet.

La prosecuzione del progetto nel triennio 2002-2004, conseguente all'approvazione da parte della Conferenza Stato-Regioni del Piano di sviluppo SINAnet, ha visto una rivisitazione delle compagini al fine di permettere la partecipazione diretta a tutte le ARPA. Ciò ha comportato per tutti i CTN una modifica delle compagini e, limitatamente ad alcuni CTN, una parziale rivisitazione della denominazione e dei temi di competenza.

La situazione attuale vede operativi i seguenti CTN:

- Atmosfera, Clima ed Emissioni in aria (ACE)
- Agenti Fisici (AGF)
- Acque Interne e Marino costiere (AIM)
- Natura e Biodiversità (NEB), già Conservazione della Nature (CON)
- Rifiuti e Flussi di Materiali (RFM), già Rifiuti (RIF)
- Territorio e Suolo (TES), già Suolo e Siti Contaminati (SSC)

I Centri Tematici Nazionali, ciascuno nell'ambito delle aree tematiche di competenza, rappresentano per l'APAT il necessario supporto per l'attuazione dei compiti che la legge istitutiva le affida in materia di raccolta e gestione dei dati e delle informazioni ambientali e di controllo. In particolare, il supporto riguarda quanto attiene alla definizione di regole per rendere tali attività omogenee su tutto il territorio nazionale e disponibili sulla rete SINAnet, in linea con lo sviluppo di attività analoghe nel contesto comunitario.

In analogia al modello europeo, i CTN sono attuati da compagini di soggetti, nell'ambito delle quali, un Gruppo *leader* è preposto al coordinamento del progetto. Le compagini sono costituite da ARPA/APPA, con l'integrazione di altri soggetti, le Istituzioni Principali di Riferimento (IPR), che hanno competenze specialistiche in materia di azione conoscitiva per i vari temi ambientali. Per ogni CTN, l'APAT ha nominato un responsabile di progetto.

Il CTN SSC e il CTN TES

Temi di competenza

I temi di competenza del CTN SSC sono rimasti anche al CTN TES, con l'aggiunta di un nuovo tema sull'uso del territorio. I temi attuali sono dunque:

- Qualità dei Suoli
- Degradazione fisica e biologica del suolo
- Contaminazione dei suoli da fonti diffuse
- Contaminazione puntuale del suolo e siti contaminati
- Uso del territorio

Composizione del CTN SSC

Responsabile di progetto ANPA: Antonio Pugliese

Responsabile CTN leader: Renzo Barberis

I soggetti partecipanti al CTN SSC sono:

Leader: ARPA Piemonte

Co-leader: ARPA Liguria

Partecipanti: ARPA Emilia Romagna

ARPA Toscana

ARPA Veneto

ARPA Campania

IPR: Istituto di Chimica del Terreno del CNR di Pisa (CNR_PI);

Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma (ISNP_RM);

Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo di Firenze

(ISSDS_FI);

European Soil Bureau - Joint Research Centre- ISPRA -VA (ESB_IS);

Dipartimento di Chimica Analitica dell'Università di Torino (DICA_TO);

Dipartimento di Protezione e Valorizzazione Agroalimentare della Facoltà di Agraria dell'Università di Bologna, sede distaccata di Reggio Emilia (DIPROVAL_RE);

Ente di Sviluppo Agricolo della Regione Lombardia (ERSAL_MI);

Istituto Nazionale di Economia Agraria (INEA_RM).

Il Gruppo di lavoro del CTN SSC è costituito da:

Ornella ABOLLINO (DICA Università Torino) Gianluca ALESSIO (ARPA Piemonte), Daniela BALLARDINI (ARPA Emilia Romagna), Meri BARBAFIERI (Istituto per la Chimica del Terreno - CNR Pisa), Renzo BARBERIS (ARPA Piemonte), Paolo BAZZOFFI (Istituto Sperimentale Studio Difesa Suolo – Firenze), Danila BEVILACQUA (ARPA Emilia Romagna), Paola BOSCHETTI (ARPA Piemonte), Nicoletta DOTTI (ARPA Liguria), Gabriele FABIETTI (ARPA Piemonte), Nicola FILIPPI (European Soil Bureau Ispra VA), Rosa FRANCAVIGLIA (Istituto Sperimentale Nutrizione Piante – Roma), Paolo GIANDON (ARPA Veneto), Carlo JACOMINI (ANPA – Roma), Monica LAZZARI (ARPA Liguria), Edoardo MENTASTI (DICA Università di Torino), Luca MONTANARELLA (European Soil Bureau Ispra - VA), Pina NAPPI (ARPA Piemonte), Marcello PAGLIAI (Istituto Sperimentale Studio Difesa Suolo – Firenze), Giuseppe PALLADINO (DIPROVAL Università di Bologna), Aldo PANZIA OGLIETTI (ARPA Piemonte), Gianniantonio PETRUZZELLI (Istituto per la Chimica del Terreno - CNR Pisa), Antonio PUGLIESE (ANPA – Roma), Federico REGIS (ARPA Piemonte), Carlo RIGHINI (ARPA Toscana), Carlo ROAGNA (ARPA Piemonte), Licia RUBBI (ARPA Emilia Romagna), Ezio RUSCO (European Soil Bureau Ispra VA), Corrado SARZANINI (DICA Università di Torino), Giancarlo SBRILLI (ARPA Toscana), Paolo SEQUI (Istituto Sperimentale Nutrizione Piante – Roma), Marco SETTI (DIPROVAL Università di Bologna), Eliana TASSI (Istituto per la Chimica del Terreno - CNR Pisa), Silvia TRIVELLATO (ARPA Veneto), Marinella VITO (ARPA Campania).

Composizione del CTN TES

Responsabile di progetto APAT: Antonio Pugliese

Responsabile CTN leader: Renzo Barberis

I soggetti partecipanti al CTN TES sono:

Gruppo Leader: ARPA Piemonte (leader per il primo periodo)

ARPA Campania
ARPA Friuli Venezia Giulia
ARPA Marche

Partecipanti: ARPA Emilia Romagna
ARPA Liguria
ARPA Veneto
ARPA Calabria
ARPA Sardegna

IPR: Dipartimento di Chimica Analitica dell'Università di Torino
Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo di Firenze
Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma
DIPROVAL Università di Bologna
Dipartimento di Matematica e Informatica dell'Università di Salerno
Dipartimento Scienze Geologiche, Ambientali e Marine dell'Un. di Trieste

