

METODOLOGIE DI CALIBRAZIONE (ESTERNA, INTERNA E STANDARD ADDITION): descrizione ed utilizzi, differenze, vantaggi e svantaggi

Calibrazione Esterna

La calibrazione esterna rappresenta il metodo più semplice e diffuso per determinare la concentrazione di un analita in un campione sconosciuto. Il principio su cui si fonda è intuitivo: si preparano una serie di soluzioni standard a concentrazione nota, le si analizza con lo stesso metodo strumentale che verrà applicato al campione reale, e si costruisce una curva di calibrazione che mette in relazione il segnale strumentale con la concentrazione. Il campione incognito viene poi misurato e la sua concentrazione viene ricavata direttamente da questa curva.

Tra i principali punti di forza di questa tecnica vi sono la semplicità di implementazione e la grande versatilità: può essere applicata con una vastissima gamma di strumenti analitici e adattata a diverse matrici campionarie. Una singola curva di calibrazione, inoltre, può essere utilizzata per analizzare numerosi campioni, rendendola efficiente dal punto di vista del tempo quando il numero di analisi è elevato.

Il limite più rilevante è tuttavia l'effetto matrice: la presenza di altre sostanze nel campione può interferire con la misurazione dell'analita, alterando la risposta strumentale rispetto a quella degli standard preparati in solvente puro. Per questo motivo la tecnica fornisce risultati affidabili soprattutto quando la matrice è relativamente semplice o ben controllata. A ciò si aggiunge la dipendenza della precisione finale dalla cura con cui vengono preparati gli standard e dall'accuratezza della lettura strumentale.

Calibrazione Interna

La calibrazione interna nasce proprio per superare uno dei limiti della calibrazione esterna: le variazioni sistematiche che possono verificarsi durante il processo analitico. Il principio consiste nell'aggiungere, sia al campione che agli standard, una quantità nota di una sostanza interna di calibrazione — un composto diverso dall'analita, ma con proprietà chimico-fisiche molto simili. Poiché questa sostanza è soggetta alle stesse condizioni dell'analita in tutte le fasi dell'analisi, qualsiasi variazione strumentale, di preparazione del campione o di campionamento si rifletterà in modo analogo su entrambi i segnali, consentendo una correzione automatica degli errori.

Questo approccio garantisce una maggiore accuratezza rispetto alla calibrazione esterna, ed è particolarmente indicato in contesti in cui si prevedono fluttuazioni nella risposta dello strumento o cambiamenti nella matrice del campione nel tempo. Il risultato finale si esprime tipicamente come rapporto tra il segnale dell'analita e quello della sostanza interna, riducendo significativamente gli errori sistematici.

Gli svantaggi principali riguardano la complessità aggiuntiva del metodo: la scelta della sostanza interna richiede grande attenzione, poiché essa deve comportarsi in modo il più possibile identico all'analita in ogni fase dell'analisi. Inoltre, la preparazione della curva di calibrazione specifica e il calcolo dei risultati risultano più laboriosi rispetto alla calibrazione esterna, con conseguente aumento dei tempi di analisi.

Standard Addition

La Standard Addition è la tecnica di elezione quando si lavora con matrici complesse e quando l'effetto matrice è talmente significativo da non poter essere trascurato né corretto con i metodi precedenti. Anziché costruire la curva di calibrazione in un solvente separato, gli standard vengono aggiunti direttamente alla matrice del campione in esame. In questo modo, gli standard sono soggetti esattamente alle stesse interferenze che agiscono sull'analita, e l'effetto matrice viene automaticamente compensato. La concentrazione dell'analita si determina poi per estrapolazione della retta di calibrazione, individuando il punto in cui essa interseca l'asse delle ascisse.

Questa tecnica trova applicazione privilegiata nell'analisi di campioni ambientali come acque reflue e suoli, di campioni biologici come sangue e urina, e di matrici alimentari complesse.

La sua applicabilità è inoltre molto ampia, poiché funziona con quasi tutte le tecniche strumentali che producono una risposta proporzionale alla concentrazione dell'analita, dalla spettrofotometria UV-Vis alla spettroscopia atomica, dall'elettrochimica all'HPLC.

Il principale svantaggio è di natura pratica: a differenza della calibrazione esterna, per ogni campione è necessario preparare e analizzare una serie di soluzioni distinte, rendendo il metodo significativamente più lungo, laborioso e costoso in termini di reagenti e tempo strumentale. Un ulteriore elemento critico è la fase di estrapolazione: se la relazione segnale-concentrazione non è perfettamente lineare nell'intervallo considerato, o se le aggiunte non sono sufficientemente accurate, i risultati possono essere distorti. Per mitigare questo rischio, è buona pratica verificare la linearità della risposta e aggiungere standard fino a circa cinque volte la concentrazione presunta dell'analita nel campione. In alcuni casi può inoltre essere necessario un volume di campione maggiore per ottenere segnali misurabili anche dopo le successive aggiunte di standard.

SENSIBILITÀ, SPECIFICITÀ E ROBUSTEZZA DI UN METODO ANALITICO

SENSIBILITÀ DI CALIBRAZIONE, SENSIBILITÀ ANALITICA, VALUTAZIONE LINEARITÀ DEL METODO

Sensibilità: è la differenza di una concentrazione analitica che corrisponde alla più piccola differenza di un segnale in un metodo che è ancora rilevabile. La sensibilità può essere estratta dalla curva di calibrazione o definita utilizzando campioni con concentrazioni diverse.

La sensibilità di calibrazione S è definita dalla pendenza del grafico di calibrazione:

- quando l'intervallo non è lineare, cambia con la concentrazione;
 - nessuna indicazione di quale differenza di concentrazione può essere rilevata: rumore →
- sensibilità analitica = S/s

Linearità: capacità di ottenere risultati del test direttamente proporzionali alla concentrazione (quantità) di analita nel campione

- Esaminare campioni ripetuti (duplicati o triplicati) e intervalli standard su un particolare intervallo di lavoro per verificare se è possibile tracciare una linea affidabile

La linearità è spesso definita in modo inappropriato dal coefficiente di correlazione (R^2 o r)

Selettività: grado in cui un metodo può quantificare l'analita o un gruppo di analiti in presenza di interferenti; delinea la misura in cui una sostanza o un gruppo analitico può essere determinato senza interferenze da altri componenti

Specificità: un metodo selettivo per una sostanza analitica o un gruppo è specifico. Non vi sono interferenze da componenti correlati al campione

Robustezza: misura della capacità del metodo di rimanere inalterato da piccole, ma deliberate, variazioni consapevoli e inconsapevoli dei parametri del metodo. Fornisce un'indicazione dell'affidabilità durante il normale utilizzo.