

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TORINO
Facoltà di SCIENZE MFN
CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE



PROVA FINALE

DETERMINAZIONE DI METALLI NEL VINO MEDIANTE ASSORBIMENTO ATOMICO, AL FINE DELLA VALIDAZIONE DI UN METODO UFFICIALE

CANDIDATO: Alex Morra

TUTOR ACCADEMICO: Prof. Marco Ginepro

**TUTOR AZIENDALE: Enol. Paola Manera
Dr.ssa Ana Moar Grobas**

Anno Accademico: 2011-2012

*Ringrazio il mio relatore Dott. Marco Ginepro,
per il continuo sostegno e la preziosa collaborazione.*

*Ringrazio inoltre tutto il personale del Laboratorio
Sinergo Soc. Coop. di Nizza Monferrato per gli insegnamenti
e le informazioni fornitemi durante il periodo di stage.*

*In particolare la titolare Enol. Paola Manera, il mio tutor Dott.ssa Ana
Moar Grobas ed i tecnici del laboratorio, Dott.ssa Nadia Cane,
Enol. Gabriella Moretto, Tec. Biologico Michela Chiappone, Dott.ssa Elisa
Bianco. Chiaramente la mia riconoscenza si estende anche
al resto degli impiegati, che mi ha accolto, sopportato e
supportato in questa meravigliosa esperienza.*

INDICE

1. PREMESSA	4
2. INTRODUZIONE	
2.1. Cos' è la validazione di un metodo analitico	5
2.2. Test statistici utilizzati in sede di validazione	16
2.3. Metalli nel vino	22
3. SPETTROSCOPIA ATOMICA	
3.1. La storia	29
3.2. Spettrometro ad assorbimento atomico	31
3.3. Spettrometro ad emissione atomica	36
3.4. Interferenze	36
4. PRESENTAZIONE DEI DATI	38
5. PROVE DI VALIDAZIONE	
5.1. Vino sintetico	43
5.2. Rame	48
5.3. Ferro	51
5.4. Zinco	54
5.5. Calcio	57
5.6. Potassio	60
5.7. Magnesio	63
5.8. Sodio	67
6. CONCLUSIONI	70
7. BIBLIOGRAFIA	72

1. PREMESSA

In questa relazione sono presentate le attività che ho svolto nel laboratorio di analisi chimiche su vini e mosti Sinergo Soc. Coop. di Nizza Monferrato. Il lavoro effettuato è principalmente correlato all'utilizzo dello spettrometro a fiamma, sia in assorbimento sia in emissione, utilizzato per le rivelazioni dei metalli presenti nel vino. Nel corso dello stage formativo, ho contribuito attivamente nella raccolta dei dati analitici per la validazione del metodo applicato alle misurazioni dei metalli nei vini, come metodo ufficiale OIV (Organization Internationale de la Vigne et du Vin).

Il processo di validazione non è stato portato a termine entro la fine del periodo di tirocinio, ma le mie misurazioni possono essere considerate dal punto di vista della preparazione alla validazione vera e propria, cioè come fase preliminare. In aggiunta è stata dichiarata dall'azienda l'intenzione di rinnovare il parco macchine in tempi futuri, a causa dello stato di usura e delle manutenzioni sempre più frequenti.



Figura 1 – In primo piano un filare del Barbera d’Asti sulle colline di Nizza Monferrato.

2. INTRODUZIONE

2.1 Cos' è la validazione di un metodo analitico^[1]

PREMESSA

Con il termine *validazione* s'intende: "La conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi a una specifica utilizzazione o applicazione prevista siano stati soddisfatti" (ISO 9000-2000). Il processo di validazione ha lo scopo di dimostrare la validità per l'utilizzo di un metodo, mediante la valutazione di tutti i parametri utili a tale scopo (caratteristiche tecniche, applicabilità, performance analitiche, ecc).

La validazione di metodi analitici ha acquisito notevole importanza recentemente, con l'applicazione della nuova normativa UNI CEI EN ISO/IEC 17025 nei laboratori. Essa, infatti, pone un maggiore rilievo a questo procedimento, in seguito all'emergente esigenza di avere a disposizione una metodologia di validazione comune, affinché i dati ottenuti dalle varie strutture possano essere confrontabili tra di loro. Un risultato analitico non è valutabile, né confrontabile, né interpretabile, se non è corredato da una serie d'indicatori che informano sulle performance del metodo impiegato per ottenere il risultato analitico.

I parametri ricavati dalla validazione si possono ritenere caratteristici del "bene-servizio" che il laboratorio è in grado di fornire.

Ecco come spiega l'importanza della validazione dei metodi analitici il Presidente della **SINCERT** (Sistema Nazionale per l'Accreditamento degli Organismi di Certificazione e Ispezione) **Lorenzo Thione**:

"Oltre il 10 % del Prodotto Interno Lordo nei paesi più sviluppati è costituito da prove, analisi, misurazioni e affini, con costante tendenza alla crescita. La qualità di suddette prove e misure - intesa, secondo la definizione generale di qualità, come capacità di soddisfazione dei bisogni associati - si basa sulla ricerca delle "giuste" proprietà dell'oggetto in prova e nella capacità di fornire la conoscenza di dette proprietà con un sufficiente grado di confidenza o, in altri termini, con adeguato margine d'incertezza, nel rispetto, s'intende, di criteri di efficacia, efficienza ed etica professionale.

Prescindendo dai sia pur importanti aspetti organizzativi, gestionali e procedurali, i parametri essenziali che caratterizzano la qualità delle operazioni di prova e misura (e relativi risultati) sono costituiti dalla validità dei metodi utilizzati (rappresentatività, riproducibilità e ripetibilità) e dal grado di definizione dei risultati stessi tramite determinazione (stima) dell'incertezza a essi associata.

Un risultato di qualità è quello ottenuto con metodi validi e reso "certo" dalla conoscenza."

Affrontando un problema analitico, il laboratorio si può trovare a dover effettuare una scelta tra metodi diversi per uno stesso parametro. I metodi analitici vengono solitamente valutati sulla base di tre caratteristiche: affidabilità, applicabilità e praticabilità.

L'applicabilità riguarda per esempio la possibilità di eseguire una determinata misura su un ampio spettro di matrici. La praticabilità del metodo si riferisce ai requisiti di cui deve disporre un laboratorio per la sua esecuzione. L'affidabilità, invece, prende in considerazione i parametri caratteristici dei metodi analitici (accuratezza, precisione, ripetibilità, ecc.).

Quando si parla generalmente della validazione di un metodo, possiamo distinguere due casi:

- **Validazione di un metodo normato** (si tratta della verifica dell'applicabilità di un metodo ufficiale o validato in precedenza da un altro laboratorio, verificando che gli indici statistici ricavati rientrino nei limiti imposti dal metodo stesso);
- **Validazione di un nuovo metodo interno** (consiste nell'introduzione di un nuovo metodo analitico, attraverso un procedimento complesso che necessita di uno studio più approfondito del caso in esame).

Sarà in seguito trattato solamente il primo sistema di validazione, cioè quello interessato ai fini dello studio preposto a questa tesi.

PARAMETRI TECNICI DI VALIDAZIONE

Le grandezze caratteristiche che definiscono le prestazioni di un metodo analitico sono quelle comunemente accettate e utilizzate dalle più prestigiose organizzazioni scientifiche europee e internazionali. I parametri che saranno approfonditi in seguito sono:

- Selettività;
- Limite di rilevabilità;
- Limite di quantificazione;
- Intervallo di lavoro e intervallo di linearità;
- Precisione (ripetibilità e riproducibilità);
- Accuratezza;
- Sensibilità;
- Robustezza;
- Recupero;
- Incertezza;

I parametri indicati, dopo essere stati determinati, descrivono dettagliatamente le “performance” del metodo analitico. Considerata la varietà di metodi in uso nella pratica comune dei laboratori, l’applicazione rigorosa di tutti questi parametri ai metodi analitici è impossibile da effettuare: pensiamo ai metodi microbiologici di difficile, se non impossibile applicazione, come pure ai metodi chimici basati su varie tecniche analitiche. Spetta all’operatore scegliere e valutare quali siano le grandezze significative per il metodo analitico che si accinge a validare.

SCHEMA OPERATIVO

Dopo aver individuato un metodo, l’approccio analitico potrebbe essere così schematizzato:

- 1.** Verifica della professionalità dell’operatore coinvolto nonché delle sue attitudini e familiarità con le tecniche analitiche coinvolte. E’ necessario affiancare all’operatore designato, nei primi momenti dell’applicazione del metodo, un supervisore in grado di formare e controllare l’operato dello stesso e correggere eventuali errori procedurali. Il livello della supervisione si ridurrà gradualmente fino al raggiungimento della piena padronanza e conoscenza del metodo da parte dell’operatore.
- 2.** Verificare la disponibilità e adeguatezza dell’attrezzatura, la disponibilità di reagenti e prodotti indispensabili per la conduzione dell’analisi.
- 3.** Verificare se l’intervallo di concentrazione atteso sia compreso in quello di misura del metodo. Se è necessario adattare o modificare qualcosa di un metodo validato, bisognerà procedere a un riesame della validazione, effettuando un eventuale intervento.

Secondo la loro natura le variazioni effettuate possono rendere del tutto inaffidabili i dati della validazione originale, in tal caso occorre procedere con successivi stadi di certificazione per metodi interni oppure scegliere un altro metodo ufficiale.

Nel caso il laboratorio abbia dimostrato la capacità di raggiungere il livello prestazionale descritto dal metodo, può far propri i parametri di validazione riportati e utilizzare il metodo analitico scelto all’interno della struttura, applicandolo nei casi in cui siano richieste delle prestazioni conformi a quelle riportate in norma.

SELETTIVITA’

In generale si può affermare che i metodi analitici prevedono uno stadio di misura che può essere preceduto da uno stadio di separazione fisica o chimico-fisica. E’ necessario stabilire che il segnale prodotto nello stadio di misura, o la sua proprietà misurata, sia attribuibile in maniera univoca all’analita d’interesse e non alla presenza contemporanea di un qualcosa di simile dal punto di vista chimico-fisico-biologico, che provochi un incremento anche casuale della proprietà misurata. Bisogna

quindi procedere con la conferma d'identità. Il fatto che altri componenti interferiscano con lo stadio di misurazione dipende dall'efficienza di separazione dello stadio di misura della selettività. Se la misura non è specifica, è possibile che alcuni analiti non interferiscano, purché si sia preventivamente dimostrato nelle stesse condizioni analitiche.

E' molto difficile stabilire le interferenze perché esiste sempre la possibilità di imbattersi in qualche specie non conosciuta e studiata. Esistono dei casi, anche se piuttosto rari, in cui le interferenze si conoscono e possono essere identificate per una particolare metodologia. Se sono presenti interferenti o non si possono separare dall'analita, oppure se l'analista non si accorge della loro presenza, essi possono produrre una serie d'inconvenienti, secondo com'è identificato e quantizzato l'analita d'interesse, fino a mascherare la risposta specifica caratteristica (falso negativo nell'analisi qualitativa). Nell'analisi quantitativa le interferenze possono avere l'effetto di aumentare la concentrazione dell'analita, incrementando la risposta caratteristica attribuita all'analita ricercato (risultato sovrastimato) o, all'opposto, sopprimendo la risposta dell'analita (risultato sottostimato).

Nel caso di un metodo chimico, le interferenze, solitamente, influenzano la pendenza della retta di taratura in modo diverso dal contributo dato dall'analita d'interesse, così da influenzare la linearità della retta di taratura costruita con il metodo delle aggiunte. Detto effetto ha la potenzialità di indicare una possibile presenza d'interferenti, ma non è di nessuna utilità se la curva di taratura è di per sé non lineare. Un altro sistema di accertamento della presenza d'interferenti può essere l'analisi di campioni bianchi non contenenti l'analita da ricercare. La selettività di un metodo, normalmente, è valutata studiando la sua capacità di misurare l'analita durante tutte le fasi della metodica entro le quali è stata introdotta deliberatamente una sostanza interferente fra quelle che normalmente sono presenti nei campioni reali. L'idoneità del metodo nella misurazione dell'analita, a confronto con altri metodi/tecniche indipendenti, è la misura della selettività.

Nel caso invece di un metodo microbiologico, un esempio della verifica della selettività è l'aggiunta a una matrice di un ceppo microbico diverso da quello ricercato e la conferma della mancata crescita nei terreni di coltura specificati. La disponibilità di terreni selettivi è una buona garanzia di selettività dei metodi microbiologici. Quando la tecnica che si sta validando è già intrinsecamente specifica/selettiva, può essere trascurata la sua valutazione, ricorrendo ad altre tecniche di conferma (rivelatori specifici, terreni selettivi ecc.)



Figura 2 - Primo piano di un grappolo d' uva, Barbera d'Asti.

LIMITE DI RILEVABILITA'

Ove vengano effettuate misure a bassi livelli di analita è importante conoscere qual è la più bassa concentrazione o valore della proprietà valutata, che può essere rilevato con un certo grado di sicurezza, ovvero con una certa probabilità di commettere un errore. L'importanza di questo parametro e i problemi a esso correlati, sorgono dal fatto che la probabilità di rivelazione non cambia bruscamente da zero a uno qualora sia superata la soglia minima. Questi problemi sono stati studiati in dettaglio dal punto di vista statistico e sono stati proposti alcuni criteri di decisione di seguito riportati.

Un metodo per la valutazione di questo limite è quello di applicare la metodica su una matrice non contenente l'analita d'interesse, replicando un certo numero di volte la determinazione e calcolando la media del segnale del bianco e il suo scarto tipo. In questi casi, il valore del bianco, aumentato di tre volte il suo scarto tipo, può essere sufficiente a indicare un valore minimo di soglia. Si noti che sia il valore medio del bianco che il suo scarto tipo, dipendono dalla matrice del campione bianco. Pertanto, detto limite, dipende strettamente dalla matrice. Inoltre il suo valore è dipendente dalla sensibilità del metodo, che è correlata alla pendenza della retta di taratura. Questa metodologia può risultare riduttiva, in quanto attribuisce una variabilità costante, tramite un fattore moltiplicativo, alla condizione del bianco, prescindendo da considerazioni statistico-probabilistiche.

Quando il lavoro di validazione richiede valori più precisi, è opportuno un approccio più rigoroso, che utilizzi considerazioni statistiche per la determinazione del limite di rilevabilità.

Un secondo metodo di valutazione del limite di rilevabilità è quello che tiene in considerazione la retta di taratura costruita con standard esterni (in soluzione acquosa o in solvente), che utilizza le iperboli fiduciali della retta e le iperboli del campione. I metodi che impiegano la regressione lineare per la determinazione del limite di rilevabilità sono denominati, da alcuni, criterio delle iperboli fiduciali e criterio della propagazione dell'errore (è consigliabile un livello di confidenza del 95%). Sono di facile calcolo e si ottengono tramite interpolazione dell'intercetta dell'iperbole fiduciale superiore (della retta), sulla retta di taratura (criterio delle iperboli fiduciali) o per interpolazione dell'intercetta dell'iperbole fiduciale superiore del campione sulla retta di taratura (criterio della propagazione dell'errore). Avendo a disposizione un programma statistico che gestisce il calcolo, il risultato è immediato.

In alternativa, i risultati attesi sono ugualmente raggiunti per mezzo di un foglio elettronico di calcolo, elaborato con i comuni programmi in commercio.

Questi ultimi due metodi, quando applicabili, indicano un valore di rilevabilità più verosimile. Sono, infatti, più rigorosi perché derivano da considerazioni statistiche più complesse. Essi forniscono limiti strumentali e non legati alla metodica in questione, poiché la taratura è eseguita utilizzando soluzioni in solvente; non si tiene conto pertanto dell'effetto matrice, che può avere rilevanza nella

determinazione del limite di rilevabilità. Questi criteri sono applicabili per matrici semplici, quali acque potabili, superficiali ecc., dove l'effetto matrice è ininfluente sul metodo stesso.

Un modo di operare più rigoroso e applicabile alle matrici complesse, dove l'effetto matrice può essere significativo, è quello di utilizzare sempre il metodo della regressione lineare, ma operando la taratura utilizzando una matrice fortificata. In questo caso il laboratorio è sollevato dal problema del recupero. Questo metodo, pur rigoroso, è di difficile applicazione, ma il suo utilizzo è suggerito per campioni particolari o quando i risultati sono critici. Per misure chimiche qualitative è possibile determinare in modo empirico una concentrazione soglia (concentrazione cut off), sotto alla quale la selettività diventa inapplicabile. In termini pratici, si tratta di replicare almeno dieci volte una serie di determinazioni a concentrazione decrescente, e valutare quante volte, per ogni livello di concentrazione, si è avuto esito positivo. A questo punto è sufficiente scegliere la soglia di accettabilità di positivi/negativi (anche in questo caso è consigliabile tenersi attorno al 5-10% di possibilità di errore), cui corrisponde una concentrazione ben definita di analita. Il risultato costituisce il valore di soglia da considerarsi come limite di rilevabilità.

LIMITE DI QUANTIFICAZIONE

Considerato che il limite di rilevabilità offre un valore con un grado di precisione molto basso, è necessario stabilire un altro limite, che definisca il minimo contributo di analita nel campione che può essere rilevato con una probabilità stabilita a priori, che in genere si desidera sia la più alta possibile (95 %, 99% ...).

Pertanto, il limite di quantificazione per metodi chimici e fisici è definito come la concentrazione minima di analita che può essere determinata con un accettabile livello di precisione (ripetibilità), stabilito dal laboratorio e in seguito verificato. Il limite di quantificazione riguarda la potenza del metodo analitico utilizzato, e per questo motivo è di fondamentale importanza nella scelta di un metodo, di una linea strumentale, e quindi è di vitale importanza nel processo di validazione del metodo medesimo, in relazione agli obiettivi conoscitivi prefissati. Essendo il limite di quantificazione un numero calcolato, per ogni metodo chimico quantitativo è indispensabile verificare il valore del limite di quantificazione, tramite verifiche di precisione.

In analogia al limite di rilevabilità, un primo criterio di calcolo del limite di quantificazione è quello che lo definisce come il valore del bianco più 5, 6 o 10 volte lo scarto tipo del bianco, a seconda dell'organismo internazionale che indica il criterio di calcolo. In maniera analoga al limite di rilevabilità, i criteri di calcolo più rigorosi, che fanno uso di considerazioni statistiche, impiegano la regressione lineare, e sono denominati criterio delle iperboli fiduciali e criterio della propagazione dell'errore (anche in questo caso è consigliabile un livello di confidenza del 95%).

INTERVALLO DI LAVORO ED INTERVALLO DI LINEARITA'

Per ogni metodo quantitativo è necessario stabilire l'intervallo di concentrazione dell'analita entro il quale il metodo è applicabile. All'estremo inferiore di concentrazione i fattori limitanti sono il limite di rilevabilità e il limite di quantificazione, a seconda che il metodo sia qualitativo o quantitativo. All'estremo superiore dell'intervallo di concentrazione sono importanti le limitazioni dei vari effetti dipendenti dal sistema di risposta dello strumento.

Entro l'intervallo di lavoro esistono degli intervalli, dove sussiste una relazione lineare tra il segnale misurato e la concentrazione dell'analita. E' opportuno valutare la linearità del metodo utilizzando strumenti statistici significativi (ad esempio mediante l'analisi dei residui della regressione lineare, o utilizzando il test F di significatività della regressione).

L'ampiezza dell'intervallo di linearità può essere calcolata nella valutazione dell'intervallo di lavoro; la sua determinazione richiede la misura di un numero significativo di livelli di concentrazione. Un criterio può essere quello di scegliere l'estremo superiore dell'intervallo, nel punto in cui la curvatura della retta esce dallo spazio delimitato dalle iperboli fiduciali. Sia l'intervallo di lavoro, sia l'intervallo lineare, possono differire per matrici differenti, in accordo con gli effetti delle interferenze dovute alla matrice.

PRECISIONE

La precisione è l'espressione quantitativa, in termini di scarto tipo, di quanto i risultati di una stessa misura ripetuta sono vicini tra di loro. Le due grandezze più comuni per descrivere la precisione sono la ripetibilità e la riproducibilità. La ripetibilità indica la concordanza dei valori ottenuti da più misure ripetute quando il metodo è applicato da un singolo analista, con la medesima attrezzatura, in un breve periodo di tempo. Questa grandezza può essere espressa in termini di **ripetibilità stretta** o di **ripetibilità intermedia**. La ripetibilità stretta è significativa, ad esempio, nelle considerazioni riguardo alle analisi in duplicato. Dallo scarto tipo calcolato in queste condizioni, si ricava il limite di ripetibilità "r", che permette all'operatore di decidere se la differenza tra misure ripetute in doppio nello stesso campione, sia o meno significativa. Per valutare la concordanza dei dati in un lungo periodo di tempo, si utilizza la ripetibilità intermedia, eseguendo la misura sempre con lo stesso analista, la stessa attrezzatura nello stesso laboratorio (l'unica condizione da cambiare è il fattore tempo).

Nel caso la misura sia effettuata da più laboratori, utilizzando lo stesso metodo analitico, il risultato ottenuto esprime la riproducibilità che tiene conto di tutte le possibili variabilità nei laboratori. Questa è una misura più significativa della ripetibilità, ha un valore quantitativamente più grande della precisione ed è utilizzata per calcolare l'incertezza associata a una misura, nel caso si utilizzi un metodo normalizzato o non normalizzato, che contenga questo tipo d'informazione. Dallo scarto tipo di riproducibilità è utile ricavare il limite di riproducibilità "R", che permette all'analista di decidere se

la differenza tra analisi in doppio di un campione, in condizioni di riproducibilità, sia o meno significativa. Sia la ripetibilità sia la riproducibilità sono normalmente dipendenti dalla concentrazione dell'analita. Pertanto, quando necessario, devono essere valutate a vari livelli.

Per le analisi qualitative la misura della precisione assume un significato leggermente diverso e consiste in una serie di misure si/no (positivo/negativo) a una data soglia di concentrazione dell'analita. Ne deriva che l'espressione quantitativa non può essere espressa in termini di scarto tipo ma è valutata come percentuale di falsi positivi (o negativi). Queste percentuali sono determinate per un certo numero di concentrazioni al di sotto o sopra il limite di rilevabilità, oppure si possono utilizzare dati provenienti da un metodo di conferma, nel caso se ne abbia uno a disposizione.

ESATTEZZA

La validazione del metodo si propone di quantificare l'accuratezza dei risultati valutando sia gli effetti sistematici sia quelli casuali. A queste due componenti sono associate le grandezze chiamate rispettivamente **esattezza** e **precisione**. L'esattezza misura quantitativamente quanto vicino al valore vero si posiziona la media di una serie di misure ed è normalmente espressa in termini di "BIAS". Per effettuare la valutazione dell'esattezza si può procedere in due modi: uno è quello di valutarla tramite dei materiali di riferimento certificati, l'altro è quello di determinare i valori di una matrice incognita, utilizzando un metodo di riferimento. In ogni caso il laboratorio deve considerare i valori di precisione, stabiliti a priori in termini di ripetibilità e di riproducibilità.

L'alternativa più facilmente percorribile, applicata normalmente nei laboratori per la valutazione pratica dell'esattezza, è quella basata sul confronto della media dei risultati con i valori noti di un materiale di riferimento (o valori convenzionalmente considerati come veri).

Per far ciò si determina la media di una serie di misure ripetute di un materiale di riferimento certificato, applicando il metodo da validare e si confrontano i risultati con il valore dichiarato. Per procedere correttamente si esegue un test statistico chiamato t-test (è normalmente accettato un valore di significatività del 95%). Se il test fornisce un risultato positivo, allora è possibile dichiarare che il metodo fornisce risultati accurati al livello di significatività prescelto. Il materiale di riferimento certificato deve essere costituito da una matrice il più possibile simile a quella in esame. La scelta del materiale di riferimento deve essere appropriata all'uso che se ne deve fare durante la validazione.

Per effettuare la verifica tramite un metodo alternativo, si confrontano i risultati dei valori ottenuti per lo stesso campione con entrambi i metodi: il metodo da validare e il metodo di riferimento.

In questo caso non è necessario avere materiali di riferimento certificati, ma è possibile operare con matrici incognite. Si applica preliminarmente un F-test sulle varianze (è consigliabile un livello di confidenza del 95%) e, dopo esito positivo, si applica il t-test per il confronto tra le medie; si calcola

quindi lo scostamento dei valori, considerando come valore vero quello ottenuto con il metodo di riferimento.

Se non si dispone di un materiale di riferimento certificato e non sono disponibili metodi di riferimento normati per il confronto, per gli scopi di validazione è possibile determinare l'esattezza del metodo, utilizzando un materiale di riferimento preparato in laboratorio. Il materiale di riferimento di laboratorio deve essere preparato con materiale ben definito, o con altri materiali d'idonea purezza e stabilità. Gli analiti certificati devono essere sostanze ben determinate la cui stabilità sia stata testata in laboratorio. Questa metodologia è sufficientemente valida per matrici non molto complesse, quali acque potabili, acque superficiali ecc., mentre può non essere valida quando si tratta di matrici complesse dove l'aggiunta standard di un analita può non simulare in modo soddisfacente la matrice oggetto di studio.

SENSIBILITA'

La sensibilità è il gradiente della curva di taratura, ovvero la variazione di risposta strumentale che corrisponde a una variazione di concentrazione dell'analita. Avendo a disposizione i parametri della retta di regressione del metodo, il calcolo del valore della sensibilità, desunto dalla pendenza della retta, è automatico.

ROBUSTEZZA

La robustezza è la capacità posseduta da un metodo di non essere influenzato significativamente, in termini di risultati finali, per effetto di variazioni deliberate, introdotte nelle sue fasi di realizzazione. In altri termini può essere intesa come l'efficienza di un metodo e il modo in cui le sue prestazioni si adeguano ad una non perfetta situazione analitica. In ogni metodo vi sono certi passaggi nei quali, se non si opera con la cura necessaria, si verificano degli importanti effetti sulle performances, fino ad arrivare all'inutilizzabilità pratica del metodo.

In effetti, anche se il processo di validazione ha potuto dimostrare che l'esattezza e la precisione del procedimento sono accettabili, un metodo non può essere ritenuto adatto a essere usato normalmente nel laboratorio che l'ha sviluppato, e ancor meno può essere trasferito ad altri laboratori, se non è stato sottoposto a indagini sui passaggi del procedimento più critici. La sua applicazione può avvenire in un arco di condizioni leggermente modificate rispetto a quelle in cui è stato sviluppato. Ad esempio può essere applicato dagli analisti con diverso grado di competenza, a strumenti con diverso grado di taratura, a lotti di reagenti di vari produttori.

In una certa misura (riferibile alle variate condizioni ambientali, se come nel caso sotto descritto, si variano i tempi di esecuzione delle prove), la valutazione della ripetibilità intermedia valuta anche la robustezza del metodo. Se possibile, gli stadi della procedura analitica devono essere identificati

nella fase di sviluppo del metodo e vanno valutati circa la loro influenza sulle prestazioni mediante test chiamati “test di robustezza”. Ciò implica l’effettuazione di deliberate varianti al metodo e l’indagine del conseguente effetto sulle prestazioni. Per determinare la robustezza è opportuno individuare le variabili ritenute critiche, ripartendo il procedimento analitico in una serie di procedimenti singoli e valutarne l’eventuale variabilità, impostando la verifica almeno su due livelli di concentrazione. La ripetibilità ottenuta in queste condizioni deve essere confrontata con quella ristretta, valutata in precedenza mediante i consueti test statistici (test di Fisher). Se il risultato è positivo (varianze compatibili) il metodo in questione si può definire robusto, limitatamente alle variazioni operate dal laboratorio.

La robustezza è normalmente valutata durante la fase dello sviluppo del metodo, da parte del laboratorio che lo mette a punto, e prima di intraprendere studi collaborativi con altri laboratori.

RECUPERO

Le metodiche analitiche non sempre misurano tutto l’analita presente nel campione. E’ quindi necessario verificare l’efficienza del metodo nel determinare tutto l’analita presente. Il recupero misura l’esattezza del metodo. Solitamente non è nota la quantità di un particolare analita presente in un’aliquota da saggio ed è difficile essere sicuri dell’efficienza del metodo di estrazione dell’analita dalla matrice.

Un metodo per determinare l’efficienza di estrazione è di operare su aliquote da saggio contenenti l’analita a concentrazioni conosciute, estrarre l’analita dalla matrice e misurarne il recupero. Se si deve operare su più livelli, si ripete l’operazione su matrici contenenti concentrazioni diverse. I problemi inerenti a questa tecnica sono dovuti al fatto che l’analita introdotto in questo modo, probabilmente, non sarà trattenuto allo stesso modo di quello naturalmente presente nella matrice, e pertanto la tecnica potrà dare una sovrastima dell’efficienza di estrazione. Tuttavia questa è la strada comunemente accettata per determinare l’efficienza del recupero.

Il miglior modo di procedere alla sperimentazione per la valutazione del recupero, anche se ciò non è sempre possibile, è quello di operare utilizzando materiali di riferimento certificati, prodotti dopo caratterizzazione di materiali naturali, piuttosto che per caratterizzazione da materiali sintetici, in cui siano stati inseriti gli analiti. In questo caso gli studi di recupero possono rappresentare in modo accurato l’estrazione di porzioni reali. In mancanza di materiali di riferimento certificati, l’alternativa è quella di procedere con materiali costruiti in laboratorio mediante aggiunte note dell’analita di interesse (Spike) con tutte le limitazioni che questa procedura comporta.

Il valore del recupero, oltre a fornire informazioni sull’esattezza del metodo, può essere utilizzato per effettuare correzioni dei risultati analitici. Quest’operazione, molto discussa e controversa in

ambienti scientifici, rappresenta una specifica decisione del laboratorio nel caso in cui norme ufficiali non impongano il comportamento da utilizzarsi nella gestione del dato del recupero.

In ogni caso, l'utilizzatore del dato deve sapere quant'è il recupero e se il risultato è stato corretto per il valore del recupero, oppure no.

VALIDAZIONE DEI METODI NORMALTI

La validazione è una fase nella quale, a monte dell'applicazione del metodo, si prendono in considerazione tutti i requisiti che devono essere soddisfatti. Le caratteristiche del metodo devono essere definite in termini di parametri tecnici (campo di applicazione, campo di prova, accuratezza, limite di quantificazione, precisione, ecc) ma anche di parametri economici (disponibilità di adeguate risorse umane e strumentali, costi, tempi, ecc).

Su questa base si ritiene che ogni metodo vada sottoposto a validazione, individuando quali sono i parametri da valutare, per verificare se le caratteristiche del metodo soddisfano i requisiti.

Spesso si presume che i metodi normalizzati possano essere direttamente applicati, e i dati di validazione pubblicati sulla norma, direttamente utilizzati per gli scopi analitici.



Figura 3 - Immagine catturata presso il Laboratorio Sinergo, mentre ero intento a preparare alcuni campioni per la determinazione del rame.

Questa inesatta operazione va corretta con un diverso approccio alla problematica analitica, fondato su alcuni preliminari interrogativi e successive verifiche, da farsi prima di intraprendere qualsiasi operazione analitica.

L'interrogativo necessario, nell'adozione di un metodo ufficiale, è quello di domandarsi se il laboratorio sia in grado di ottenere delle ripetibilità e riproducibilità compatibili con quelle pubblicate nel metodo normalizzato (se riportate). Per rispondere a tale domanda è sufficiente applicare il metodo replicando un discreto numero di volte la prova su un campione e confrontare la ripetibilità ottenuta con quella tabulata mediante i consueti test statistici. In caso affermativo il laboratorio può utilizzare il metodo di prova normalizzato evitando di procedere ai successivi stadi di validazione, facendo propri i parametri caratteristici pubblicati dal metodo normalizzato.

2.2 Test statistici utilizzati in sede di validazione^[2]

ACCETTABILITA' E ACCURATEZZA DELLE PROVE

Il laboratorio deve controllare se è in grado di ottenere delle ripetibilità compatibili con quelle pubblicate nel metodo normalizzato (se riportate). In caso affermativo il laboratorio potrà utilizzare il metodo di prova evitando di procedere ai successivi stadi di validazione, facendo propri i parametri caratteristici pubblicati dal metodo normalizzato.

La verifica dei parametri qualitativi viene fatta eseguendo un numero congruo di prove, in modo da consentire un'elaborazione statistica attendibile (non meno di 10 misure sperimentali). Tali prove devono essere eseguite dallo stesso operatore, sullo stesso campione e utilizzando il medesimo metodo.

In seguito si confrontano i risultati ottenuti secondo i test statistici indicati a continuazione:

- **Confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio (s_r) e quello riportato dalla norma (σ_r)** verificando di rientrare tra il valore massimo (V_{\max}) e minimo (V_{\min}) indicati per n-1 gradi di libertà:

$$V_{\min} \leq \frac{S_r}{\sigma_r} \leq V_{\max}$$

Dove:

S_r è lo scarto tipo calcolato dalle prove di ripetibilità;

σ_r è lo scarto tipo di ripetibilità calcolato a partire del valore di ripetibilità indicato nel metodo normato secondo la seguente espressione:

$$\sigma_r = r / (1.96 * \sqrt{2})$$

r è la ripetibilità, precisione in condizioni appropriate (stesso campione, stesso analista, stesse condizioni e apparecchiature entro brevi intervalli di tempo):

$$r = t * S_i / (n)^{1/2}$$

Dove:

t è il coefficiente di Student relativo a n prove eseguite in sede di validazione e calcolato in base ai gradi di libertà associati ($v = n-1$);

S_i è lo scarto tipo calcolato in sede di validazione o di verifica di applicabilità ed eventualmente riportato nel metodo ufficiale;

n è il numero di prove che si prevedono eseguire per la verifica della ripetibilità.

Nella tabella 1 sono elencati i limiti di confidenza del rapporto s_r / σ_r .

Se il rapporto è inferiore al valore del limite minimo, il laboratorio deve fornire spiegazioni per la bassa dispersione dei dati espressi da S_r (p.e. strumentazione tecnologicamente superiore). Se il rapporto è superiore al valore massimo, il laboratorio non rientra nei parametri di ripetibilità richiesti e deve provvedere alla validazione del metodo considerandolo come metodo interno.

Tabella 1 - Limiti di confidenza del rapporto S_r/σ_r in funzione dei gradi di libertà v

v = n - 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Valore min	0.0316	0.160	0.268	0.348	0.408	0.454	0.491	0.522	0.548
Valore max	2.241	1.921	1.765	1.669	1.602	1.551	1.512	1.481	1.454

- **Test t di Student per la verifica della accuratezza della media.** Si confronta il valore medio delle prove di ripetibilità con il valore noto del materiale di riferimento: Z sperimentale (Z_{sp}) deve essere inferiore o uguale a Z tabulato (Z_{tab}), essendo quest'ultimo il valore della variabile normale razionalizzata con in livello di probabilità del 95% ($Z_{tab} = 1.036$).

Il valore di Z sperimentale (Z_{sp}) viene calcolato secondo la seguente espressione:

$$Z_{sp} = |X_{medio} - \mu_0| / [\sigma_L^2 + s_r^2/n]^{1/2}$$

Dove:

X_{medio} è il valore medio trovato durante le prove di validazione;

μ₀ è il valore vero della soluzione di riferimento;

σ_L^2 è lo scarto tipo interlaboratorio calcolato a partire dei valori di ripetibilità e riproducibilità indicati nel metodo normato ($\sigma_L^2 = \sigma_R^2 - \sigma_r^2$);

S_r è lo scarto tipo calcolato dalle prove di ripetibilità.

Nel caso in cui sono apportate modifiche significative al metodo normato, saranno controllati nuovamente i parametri di validazione ed in particolar modo quelli principalmente influenzati dalle modifiche stesse.

INCERTEZZA TIPO COMPOSTA

La definizione d'incertezza tipo composta riportata dalla UNI ENV 13005 è: incertezza tipo del risultato di una misurazione quando il risultato è ottenuto mediante i valori di un certo numero di altre grandezze; essa è uguale alla radice quadrata positiva di una somma di termini che sono le varianze o le covarianze di quelle grandezze, pesate secondo la variazione del risultato della misurazione al variare di esse.

La dispersione dei dati deriva dal fatto che ogni misura non è priva di variabilità casuali e le stesse possono verificarsi durante tutti gli stadi delle operazioni di prova. Qualunque sia il criterio adottato per il calcolo dell'incertezza, ciò che si deve ottenere è l'espressione numerica, in termini di scarto tipo, di un intervallo corredato della sua unità di misura.

Quando le variabilità sono espresse in termini di scarto tipo, la grandezza finale ottenuta dall'applicazione della legge generale di propagazione degli errori è chiamata incertezza tipo composta (può essere omesso il termine "tipo" quando è sottinteso che è espressa in termini di scarto tipo) e deriva esclusivamente dalla conoscenza dei valori delle variabilità dei singoli passaggi analitici (incertezze tipo parziali). La valutazione delle incertezze parziali associate ai vari stadi della procedura analitica, oltre che per la quantificazione dell'incertezza composta, è molto utile per identificare i passaggi più critici della procedura analitica stessa.

E' importante comprendere la differenza tra incertezza ed errore, perché sono due concetti del tutto distinti, spesso confusi tra loro. Per non confondersi ulteriormente la norma UNI CEI ENV 13005 suggerisce di non usare più il termine errore, ma piuttosto quello di scarto:

- L'*errore assoluto* (da esprimere con il termine **scarto**) è definito come la differenza tra un singolo risultato e il valore vero del misurando (sconosciuto). Pertanto questo fornisce un valore singolo, che dà un'indicazione di quanto lontano dal valore vero è il risultato della misurazione. Lo scarto rimane quindi di per sé sconosciuto, come lo è il valore vero del misurando.

- L'**incertezza**, invece, è un intervallo stimato che comprende tutti i possibili valori ipoteticamente ottenibili della misurazione in considerazione (con un livello di probabilità stabilito a priori).

Tra i possibili fattori che possono determinare l'incertezza di una misura, e che sono identificati nelle grandezze d'ingresso, devono essere distinti:

- **SCARTO ALEATORIO** (chiamato anche errore casuale): componente dello scarto che nelle misurazioni ripetute varia in modo non prevedibile. E' riconosciuto dalla dispersione dei risultati ottenuti in misure ripetute. Non può essere compensato, ma può essere ridotto aumentando il numero di osservazioni.
- **SCARTO SISTEMATICO** (chiamato anche errore sistematico): è definito come la componente dello scarto che, nelle misure ripetute, resta costante o varia in modo prevedibile. E' riconosciuto dallo scostamento del valore medio dal valore vero o accettato. Non dipende dal numero di osservazioni, tuttavia può essere ridotto o tenuto sotto controllo.
- Esistono infine gli **ERRORI ACCIDENTALI** (per i quali è opportuno mantenere il termine "errori"). Questo tipo di errori rende non valide le operazioni di misura ed è dovuto ad errori umani o a malfunzionamenti delle apparecchiature.

Prima di effettuare le valutazioni e i calcoli statistici, è opportuno accertarsi della presenza o meno di questi errori accidentali che, se non riconosciuti immediatamente, possono essere evidenziati per mezzo dei più comuni test sui dati aberranti e dei test di normalità. In caso positivo del test si è autorizzati a procedere con le consuete elaborazioni statistiche.

Il test che sarà applicato durante il processo di validazione è il **TEST DI GRUBBS**, che consente di rilevare un singolo valore anomalo, il maggiore o il minore di una serie di dati. Resta inteso che già l'esperienza dell'analista aiuta a individuare la presenza di dati fortemente anomali.

Calcolare, a partire della serie di dati, il valore di T con la seguente formula:

$$T = |x_i^{\#} - X_m| / S_i$$

Dove

$x_i^{\#}$ è il valore sospetto (i valori agli estremi dell'intervallo);

X_m è il valore medio di tutti i valori;

S_i è lo scarto tipo sperimentale.

Confrontare il valore di **T** con i valori critici segnalati nella riga con **P = 5%** della tabella 2.

Se **T** è inferiore al valore critico accettare il valore di $x_i^{\#}$.

Se **T** è superiore al valore critico fare altre 3 determinazioni, applicare nuovamente il test di Grubbs per $x_i^{\#}$ considerando il valore di S_i con gli $(n+3)$ valori. Se il nuovo valore di **T** calcolato è superiore al valore critico corrispondente a **P = 1%**, scartare il valore di $x_i^{\#}$ e calcolare il valore di S_i senza questo valore.

Tabella 2 - Valori di T tabulati per il test di Grubbs

n_i	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P= 5%	1.155	1.481	1.715	1.887	2.020	2.126	2.215	2.290	2.355	2.412
P= 1%	1.155	1.496	1.794	1.973	2.139	2.274	2.387	2.482	2.564	2.636

INCERTEZZA ESTESA DI MISURA

La definizione della UNI ENV 13005 riporta: grandezza che definisce, intorno al risultato di una misurazione, un intervallo che ci si aspetta comprendere una frazione rilevante della distribuzione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando.

In termini pratici, per aumentare la significatività statistica dell'intervallo definito dall'incertezza composta, si moltiplica quest'ultima per un fattore, chiamato fattore di copertura. Considerata la significatività probabilistica dell'intervallo definito dall'incertezza composta, il fattore di copertura è legato al t di Student e deve essere scelto tenendo in considerazione i gradi di libertà validi per la misura per la quale si vuole calcolare l'incertezza e al livello di probabilità prescelto che, se non altrimenti indicato, deve essere considerato pari al 95%.

Per il calcolo dell'incertezza applicato a metodiche ufficiali, si possono utilizzare i dati di ripetibilità e riproducibilità del metodo come stima dell'incertezza composta. Questo però è solo applicabile se precedentemente viene verificato il rientro dentro dei criteri di accettabilità e accuratezza (applicando i test visti a pag. 15-16).

Il valore d'incertezza estesa può essere calcolata secondo la seguente espressione:

$$U(y) = K * [\sigma_L^2 + (s_r^2/n)]^{1/2}$$

Dove

σ_L è lo scarto tipo interlaboratorio calcolato secondo la seguente espressione: $\sigma_L = [\sigma_R^2 - \sigma_r^2]^{1/2}$;

σ_r è lo scarto tipo di ripetibilità calcolato a partire dei dati di ripetibilità (r) forniti dal metodo normato secondo la seguente espressione: $\sigma_r = r / t * (2)^{1/2}$;

σ_R è lo scarto tipo di riproducibilità calcolato a partire dei dati di riproducibilità (R) forniti dal metodo normato secondo la seguente espressione: $\sigma_R = R / t * (2)^{1/2}$;

s_r è lo scarto tipo di ripetibilità ottenuto con le prove in doppio

Se si verifica che s_r^2/n è di molto inferiore a σ_L^2 , la formula precedente può riscriversi come:

$$U(y) = K * \sigma_L$$

Se invece σ_r^2 fosse di molto inferiore a σ_R^2 , o quando s_r^2/n è simile a σ_r^2 , il calcolo dell'incertezza estesa viene semplificato alla seguente espressione:

$$U(y) = K * \sigma_R$$



Figura 4 - Area destinata alla preparazione dei campioni per le analisi presso il Laboratorio Sinergo Soc. Coop.

2.3 Metalli nel vino^{[3] [4] [5] [6]}

I metalli presenti nel vino fanno parte dei composti minerali, cioè quella frazione di composti rappresentati da sostanze inorganiche disciolte. Il loro quantitativo può essere valutato convenzionalmente tramite l'incenerimento di tutte le sostanze organiche a 500-550 °C: le ceneri.



Figura 5

Sono stati fissati dei valori minimi, di quest'ultime, nei vini (DM 29/12/86): 1 g/l per i bianchi, 1,2 g/l per i rosati e 1,5 g/l per i rossi.

I metalli maggiormente presenti sono, in ordine decrescente di concentrazione, potassio, calcio, magnesio e sodio. A questi vanno aggiunti i metalli pesanti contenuti in tracce, ferro, zinco, rame e piombo.

La presenza di metalli nel vino è influenzata da molti fattori: processi di vinificazione, trattamenti fitosanitari, natura del terreno, piovosità, materiali

impiegati per la lavorazione e lo stoccaggio e anche il periodo d'invecchiamento. La legislazione impone dei limiti massimi per le concentrazioni di alcuni metalli pesanti, sia nei vini che negli aceti.

Tabella 2.5 - Limite imposti dalla legislazione italiana su alcuni metalli pesanti nei vini posti in commercio

Limiti di legge	
<i>Elemento</i>	<i>Contenuto massimo</i>
Zinco	5,0 mg/l
Rame	1,0 mg/l
Piombo	0,2 mg/l

La metodica ufficiale per il dosaggio di queste sostanze è la spettrometria ad assorbimento atomico, anche se esistono altri metodi, non ufficiali, che possono portare a risultati attendibili.

Si è riscontrato nel tempo, una forte diminuzione delle contaminazioni e inquinamenti da metalli pesanti nei vini. Ciò è dovuto principalmente al progresso nelle tecnologie dei materiali impiegati nelle lavorazioni e nello stoccaggio del vino. Per esempio l'industria vetraria ha diminuito i contenuti di ossido di piombo presente nelle fusioni, contribuendo all'abbassamento dei livelli di quest'ultimo nel prodotto finito. Nella prima metà del secolo scorso, la maggior parte delle cisterne, vasche di fermentazione e tubature impiegate, erano in rame o altre sue leghe (ottone, bronzo). Attualmente questi materiali sono stati quasi del tutto sostituiti con l'acciaio inox, meno sensibile al rilascio di ioni metallici nel vino.

Come accennato in precedenza, gli interventi umani atti alla protezione della vite da malattie infettive, parassiti ed eventuali piante infestanti, alterano le concentrazioni di metalli nel terreno e quindi anche nell'uva. È noto, infatti, che la viticoltura, da svariati decenni, impieghi prodotti a base di rame per proteggere la pianta da numerose patologie fungine.

L'effetto dei trattamenti fitosanitari sui tenori di metalli nel vino è stato ampiamente indagato, la ricercatrice **Lara La Pera**, dell'Università di Messina^[4], ha espresso le seguenti osservazioni:

“Abbiamo esaminato campioni di vino provenienti da tre regioni differenti, con viti trattate con diversi pesticidi (dal rame, allo zolfo, a molecole più complesse). Per testimone si è utilizzato un filare trattato con sola acqua. Abbiamo notato che, effettivamente, i trattamenti organici ed inorganici influenzano la concentrazione in rame, piombo e zinco dei vini”.

Dei principali metalli presenti nel vino possiamo distinguere microelementi e macroelementi secondo la loro concentrazione nel prodotto.



Figura 6 - Esempio di una cantina in cui sono esposti i vini

MICROELEMENTI

Sono contenuti nell'ordine dei microgrammi ($\mu\text{g/l}$) e milligrammi (mg/l) per litro.

RAME

Uno dei metalli pesanti più rilevanti e, per questo, monitorato con attenzione durante le varie fasi di produzione del vino, è il rame (Cu). Esso, infatti, ricopre un ruolo fondamentale nella regolazione delle trasformazioni che avvengono spontaneamente nel prodotto. Più precisamente, il rame che si trova in soluzione nel suo stato di ossidazione più stabile (Cu^{2+}), influenza il decorso di reazioni di ossido-riduzione, che avvengono nel periodo d'invecchiamento del vino e giocano un ruolo importante nella formazione dell'aroma caratteristico. La presenza controllata di questo metallo ha quindi il fine di limitarne l'azione catalitica nei processi ossidativi e impedire reazioni riducenti indesiderate, che porterebbero alla formazione di odori non gradevoli. Il suo contenuto è fortemente influenzato dai trattamenti protettivi effettuati sulla vite e dall'inquinamento da parte dei materiali impiegati nei processi (valvole, pompe, contenitori, ecc). Con l'azione dei lieviti, nella fase di fermentazione del mosto, la sua concentrazione diminuisce. Infatti, uno dei prodotti secondari della fermentazione è l'acido solfidrico, che reagisce con il rame disciolto per dare il solfuro insolubile, che precipita accumulandosi con le fecce.

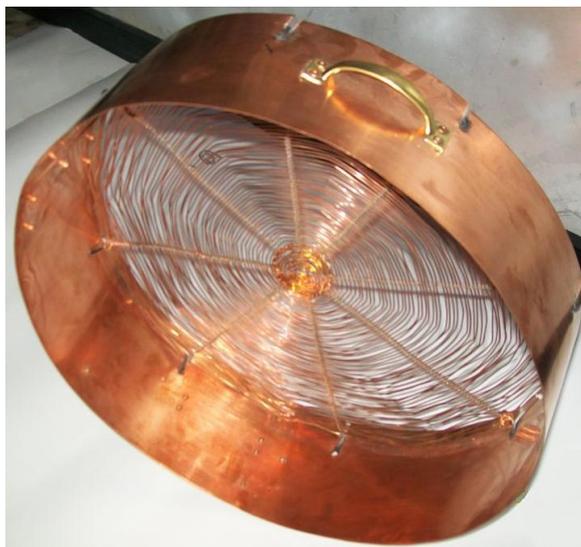


Figura 7 - Setaccio in rame usato per travasare il vino

Il contenuto finale di rame nel vino non deve essere né troppo basso né superiore ai limiti imposti dalla legge (1 mg/l). Nelle cantine moderne, che utilizzano attrezzature di acciaio inossidabile, spesso si ottiene un prodotto molto povero di Cu, per questa ragione si ricorre all'utilizzo cosiddetto "paiolo o cestello di rame" alla svinatura dei vini rossi dalle vinacce per l'eliminazione degli odori di H_2S . Gli acidi del vino sciolgono una piccola quantità di rame dalla superficie del cestello. Purtroppo l'efficacia di questo trattamento è poco prevedibile e talvolta troppo blanda. Tale operazione, ripetuta più volte, può incrementare il contenuto in rame a livelli anche alti e favorire l'ossidazione del vino.

Nel caso di un vino caratterizzato da note di riduzione evidenti, si preferisce adoperare un metodo più sicuro e prevedibile del precedente, cioè l'aggiunta mirata di sali di rame. Il prodotto enologico autorizzato dall'Unione Europea è il solfato di rame ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), mentre il citrato attualmente non è autorizzato.

Tecnologicamente si preferisce avere un contenuto di rame non superiore a 0,5 mg/l, nonostante il limite legale sia il doppio, perché concentrazioni superiori possono indurre pericoli ossidativi e intorbidimenti (casse rameose). Nel caso di un eccesso di rame, sarà necessario eseguire il trattamento di de metallizzazione (p.e. con ferrocianuro di potassio). Quest'operazione deve essere eseguita da tecnici autorizzati ed è obbligatoria la registrazione negli appositi registri di cantina. L'aggiunta di rame non è consigliabile in tutti i casi, conviene effettuare alcune prove di laboratorio su campioni di vino da trattare per valutare i giusti dosaggi. Alcuni vini reagiscono presentando note amare oppure diminuendo addirittura di colore o in complessità aromatica, si tratta di fattori piuttosto delicati.

FERRO

Il ferro è presente nel vino solitamente in concentrazioni comprese tra 2 mg/l e 10 mg/l. Si trova a due livelli di ossidazione, in equilibrio secondo il seguente sistema redox: $\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{e}^-$.

Il rapporto $[\text{Fe}^{3+}]/[\text{Fe}^{2+}]$ dipende dalle condizioni di conservazione, in particolare dal contenuto di anidride solforosa libera e dall'ossigenazione del vino. Il ferro non si trova in soluzione solamente come catione libero, ma forma anche dei complessi solubili con acidi organici (principalmente con acido tannico e citrico). Se il contenuto è superiore a 5 mg/l, in condizioni di eccessiva areazione, il vino è suscettibile a intorbidimenti in seguito alla formazione di composti insolubili come il fosfato ferrico (biancastro = casse bianche) e il "tannato ferrico" (nero violaceo = casse blu), che è un complesso insolubile generato tra le sostanze polifenoliche e il Fe(III). Anche l'origine del ferro è pesantemente influenzata da inquinamenti esterni. Solo una piccola parte è originariamente contenuta nell'uva, mentre la restante proviene dalle cessioni dei materiali con cui viene a contatto il vino (presse, pigiatrici, dalle vasche in calcestruzzo non rivestite con isolanti e dall'impiego di macchinari per la raccolta meccanica). Il contenuto di ferro in un vino viene monitorato per fini qualitativi, infatti gli ioni Fe intervengono con



Figura 8

azione catalitica nei processi di ossidazione; inoltre è il principale metallo responsabile di intorbidimenti e depositi, che ovviamente costituiscono dei difetti del vino. Per prevenire questi comportamenti è necessario studiare i modi con cui si generano questi complessi insolubili. I complessi insolubili, sono costituiti dalla forma ossidata del ferro (Fe^{3+}), che reagisce con gli ioni fosfato, per dare fosfato ferrico. Quest'ultimo è in grado di disperdersi nella matrice in forma colloidale, senza compromettere quindi la limpidezza del vino. In presenza di proteine cariche positivamente (al pH del vino), però, avviene un'interazione con il fosfato ferrico, rendendolo idrofobo ed instabile. Ciò porta alla flocculazione vera e propria.

Esistono diversi sistemi per far fronte a queste problematiche tecnologiche:

- portare il vino poco sopra alla temperatura di congelamento (- 4°C) per indurre una destabilizzazione del colloide ed inseguito separarlo per filtrazione;
- aggiungere dell'acido citrico (agente complessante) con la funzione di sottrarre del Fe^{+3} dalla formazione di complessi insolubili;
- diminuzione del Fe^{+3} per riduzione con acido ascorbico;
- stabilizzazione della dispersione colloidale con aggiunta di gomma arabica (protettore colloidale);
- eliminazione dell'eccesso di ferro nei vini rossi con il fitato di calcio e nei vini bianchi con il ferrocianuro di potassio.

ZINCO

Questo metallo proviene, nella maggior parte dei casi, interamente dal contenuto originario della pianta. La sua analisi nei vini consente di verificare che il contenuto non sia superiore ai limiti di legge (5 mg/l) e per verificare che non siano stati utilizzati illegalmente dei chiarificanti per mosti e vini contenenti dei sali di questo metallo.

La concentrazione di Zn dipende anche dal tipo di terreno su cui è stata coltivata la vite, per questo è caratteristica per diversi territori di provenienza.

MACROELEMENTI

Sono contenuti nell'ordine dei grammi (g/l) e decimi di grammo per litro.

POTASSIO

Il potassio costituisce il metallo alcalino più abbondante fra le sostanze minerali e rappresenta più del



30% delle ceneri del vino. Si trova essenzialmente in forma ionica libera e nel mosto non presenta normalmente problemi di solubilità. La situazione cambia gradualmente con la fermentazione alcolica, poiché l'etanolo, via via che aumenta di concentrazione, introduce una condizione di minor solubilità dell'idrogeno tartrato di potassio. Sulla solubilità di questo sale giocano anche altri fattori: pH, concentrazione di acido tartarico, temperatura, presenza di macromolecole, ecc., quindi nel corso della fermentazione si vanno a formare cristalli di bitartrato di potassio che precipitano, portando ad un netto impoverimento di

Figura 9 - Grappolo d'uva Chardonnay

questo metallo nel vino. Le concentrazioni in quest'ultimo sono comprese tra 400 e 1300 mg/l.

La fonte primaria di questo elemento è l'uva, dove il contenuto della buccia supera di 4-5 volte quello nella polpa, per questa caratteristica la quantità che si trova nel vino dipende anche dal processo di macerazione e dal livello di pressatura delle vinacce. Altri fattori che possono influenzare la sua concentrazione sono in misura marginale le concimazioni e il contenuto del terreno, piuttosto che la maturazione del frutto. Esistono inoltre trattamenti tecnologici autorizzati, quali l'aggiunta di metabisolfito di potassio o altri additivi.

Dalla conoscenza dei valori limiti del potassio in funzione della concentrazione alcolica, del pH, della concentrazione di acido tartarico e della temperatura si può valutare il margine di sicurezza rispetto a precipitazioni in bottiglia di cremore.

CALCIO

Il calcio è uno dei principali costituenti del vino e la sua quantità oscilla entro limiti abbastanza ampi (da 60 a 100 mg/l). I vini rossi ne sono più ricchi rispetto ai vini bianchi.

Il contenuto in calcio subisce una netta diminuzione nel passaggio da mosto a vino per cause analoghe a quelle accennate per il potassio; il sale che s'insolubilizza in questo caso è il tartrato di calcio. Per questo motivo il contenuto di questo metallo deve essere monitorato, infatti,



Figura 10 - Foglie di vite

può causare precipitazioni estemporanee, intorbidimenti in bottiglia, soprattutto nei vini bianchi.

Possono essere applicati dei provvedimenti tecnologici consentiti al fine di diminuire il tenore di calcio, per esempio trattamenti con acido tartarico racemo, che sfrutta l'insolubilità del sale, più elevata del tartrato naturale (acido L-tartarico). In genere si preferisce non abbassare il livello di questo metallo al di sotto di 50 mg/l, che in caso contrario dimostrerebbe un eccessivo trattamento.

Al calcio, come al potassio si riconosce un effetto coagulante nei confronti dei colloidali, questo comportamento contribuisce alla formazione delle casse "ferro fosfatica" o bianca.

MAGNESIO

Appartiene alla categoria dei metalli alcalino terrosi e si trova nei mosti tra 70 e 150 mg/l. La sua concentrazione non varia molto nei vini (80-100 mg/l), infatti tutti i suoi sali sono solubili anche in ambiente idroalcolico e le cause diminutive consistono soprattutto nella frazione impiegata dai lieviti per il loro fabbisogno nutrizionale. La maggior parte del magnesio proviene dalla pianta, in quanto è

un costituente essenziale degli enzimi o attivatore di processi enzimatici. Assume perciò un ruolo rilevante anche nel metabolismo dei carboidrati.

Non mancano fenomeni di compensazione da fonti esterne, in seguito a particolari trattamenti ai vini.

Si riscontra un aumento del tenore di magnesio, per esempio, trattando vini con carboni deodoranti o alcuni tipi di bentonite.

SODIO

Il sodio è l'ultimo dei metalli che rientrano nella categoria dei macro elementi, è presente nel vino dall'ordine di alcuni milligrammi fino a diverse decine per litro.

Oltre alle fonti primarie, vanno considerate anche diverse possibilità di arricchimento secondario. Il sodio entra facilmente nella composizione come impurezza, di additivi e coadiuvanti per trattamenti enologici (bentoniti, gelatine, coadiuvanti di filtrazione). Una causa di arricchimento in sodio nei vini fu legata, in passato, alla pratica della salatura (attualmente non permessa), l'aggiunta cioè di piccole quantità di cloruro di sodio per migliorare la sapidità a vini scadenti.

Drastici arricchimenti sodici accompagnati dalla diminuzione di altri analiti (soprattutto potassio), è riconducibile all'impiego di resine scambiatrici di ioni, attualmente limitata alla produzione di mosti concentrati rettificati e per la stabilizzazione tartarica di prodotti enologici (Reg. CE 606/2009).



Figura 11 - Bottiglie di vino in una cantina, conservate in posizione orizzontale.

3. SPETTROSCOPIA ATOMICA^{[7][8]}

3.1 La storia

Lo studio della spettroscopia generalmente si fa risalire all'anno 1666, con la scoperta di Newton dello spettro solare. In seguito **Wollaston** ripeté nel 1802 gli esperimenti di Newton, dimostrando che lo spettro solare era caratterizzato da linee scure. Queste furono studiate negli anni successivi da **Fraunhofer**, che ha dato il nome a queste linee determinandone anche le lunghezze d'onda.

I veri padri della spettroscopia sono però **R.W. Bunsen** e **G.R. Kirchhoff**, che approfondirono lo studio degli spettri emessi da sali di metalli alcalini ed alcalino terrosi, utilizzando una fiamma alimentata da una miscela di aria e gas di carbone (becco Bunsen). Nel 1859 Kirchhoff dimostrò che i colori osservati derivavano dalla linea dello spettro dell'elemento e non del composto intero. Ha anche dimostrato che queste lunghezze d'onda corrispondono alle linee di Fraunhofer, ciò che aveva osservato era il fenomeno di emissione e assorbimento atomico.



Figura 12 - Robert Wilhelm Bunsen

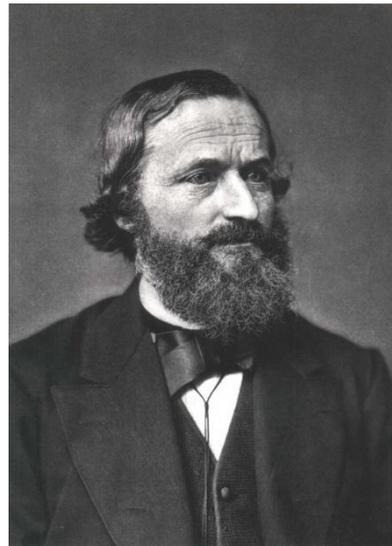


Figura 13 - Gustav Robert Kirchhoff

Questi due fenomeni furono associati nei primi tempi all'astronomia e ai fondamenti della fisica atomica.

L'**AES** (*Atomic Emission Spectroscopy*) rientra per prima nell'ambito della chimica analitica, inizialmente con spettrometri ad arco e scintilla e in seguito, attraverso gli studi compiuti da **Lunegardh** nel 1928, con l'uso della fiamma ad aria-acetilene e un nebulizzatore pneumatico. Egli ha impiegato questo sistema per analisi agricole. Ad ogni modo, la tecnica era ancora limitata e

imperfetta, fino alla scoperta del plasma accoppiato induttivamente (ICP), da **Greenfield** nel Regno Unito e **Fassel** negli USA, che risolveva parecchi problemi associati alle tecnologie precedenti.

La spettroscopia a emissione si applica alle misure della luce emessa da una fiamma o plasma da parte di specie chimiche in seguito all'assorbimento di energia sotto forma di calore o energia chimica. Se si osserva solamente l'emissione dagli atomi, se preferisce parlare di spettroscopia ad assorbimento atomico.

AAS (*Atomic Absorption Spettroscopy*) è il termine usato quando la radiazione assorbita dagli atomi è misurata. L'utilizzo di questa tecnica a scopi analitici, fu ritardata a causa dell'apparente bisogno di una maggiore risoluzione per affrontare misurazioni quantitative. Infatti, l'uso di una sorgente luminosa continua avrebbe richiesto un sistema ottico più avanzato per poter dare una lettura sensibile. Nel 1953, **Walsh** riuscì brillantemente a superare quest'ostacolo, ricorrendo all'uso di una sorgente lineare (lampada a catodo cavo). In questo modo la radiazione comprendeva solo poche lunghezze d'onda caratteristiche dell'elemento che si desidera misurare, garantendo quindi un segnale più intenso e apprezzabile.

AFS (*Atomic Fluorescent Spettroscopy*) si basa invece sulla riemissione di radiazioni da parte di atomi che sono stati esposti a una sorgente luminosa. Nel 1962, **Alkemade** fu il primo a suggerire che questa tecnica avesse un potenziale analitico, che fu successivamente dimostrato da **Winefordner** nel 1964.

Queste tre tipologie di spettroscopia atomica sono riassunte nella figura 14.

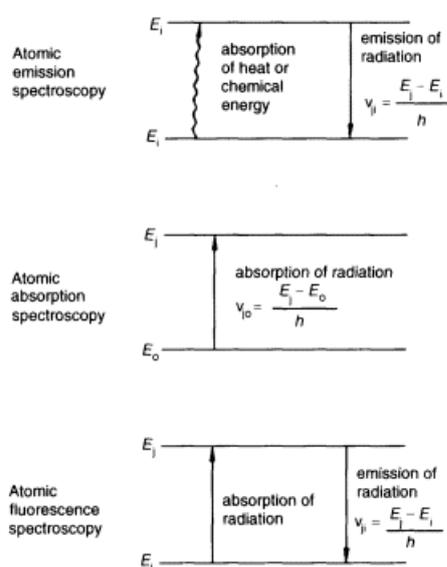


Figura 14 - Rappresentazione schematica della teoria del funzionamento della spettroscopia di assorbimento, emissione e fluorescenza atomica

3.2 Spettrometro ad assorbimento atomico

PREMESSA

Lo spettrometro ad assorbimento atomico è divenuto uno degli strumenti più frequentemente usati in chimica analitica. Questo perché, per la determinazione della maggior parte dei metalli e metalloidi, questa tecnica offre sufficiente sensibilità e relativamente poche interferenze.

Si possono distinguere principalmente due tipi di spettrometri, in base al sistema di atomizzazione che utilizzano: a fiamma (FAAS) e a riscaldamento elettrotermico (ETAAS). Se una quantità sufficiente di analita è presente nel campione, si può ricorrere allo strumento del primo tipo, che ha i vantaggi, di essere più rapido e semplice da usare. Mentre il sistema elettrotermico richiede più abilità da parte dell'operatore, è più lento ma ha limiti di rendimento superiori.

STRUMENTAZIONE

Il principio base di entrambi FAAS ed ETAAS è quello di introdurre il campione nell'atomizzatore, dove viene desolvato e in seguito atomizzato. Gli atomi formati assorbiranno la radiazione luminosa proporzionalmente alla loro concentrazione nel campione. Il raggio di luce inviato è assorbito a una specifica lunghezza d'onda, caratteristica di ciascun atomo, poi deve essere isolata tramite un apposito apparato (monocromatore, policromatore), passare per il rivelatore (fotomoltiplicatore) e fornire un risultato in uscita.

SORGENTE LUMINOSA

I requisiti fondamentali di una sorgente luminosa sono di fornire un profilo a linea sottile con poco rumore di fondo. Deve anche essere stabile, permettere un segnale riproducibile, sufficientemente intenso, tale da assicurare un buon rapporto intensità-rumore. Si può ricorrere a due tipi di sorgenti luminose, delle quali la più utilizzata è la lampada a catodo cavo. Si tratta di una lampada il cui catodo è ricoperto dall'analita d'interesse (metallo). Essa è riempita di gas inerte (argon o neon), il quale è ionizzato da una corrente elettrica e attratto al catodo.



Figura 15 - Spettrometro ad assorbimento atomico utilizzato per tutte le analisi svolte presso il Laboratorio Sinergo

Gli atomi eccitati del gas bombardano il catodo e, facendo ciò, eccitano gli atomi metallici che lo ricoprono. Questi atomi a più alta energia emettono quindi la radiazione della lunghezza d'onda tipica di quel determinato elemento, il quale corrisponde a quello di nostro interesse. La lampada a catodo cavo è disponibile per la maggior parte degli elementi metallici.

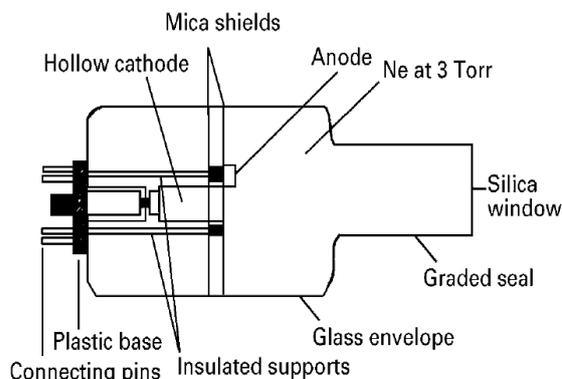


Figura 16 - Lampada a scarica

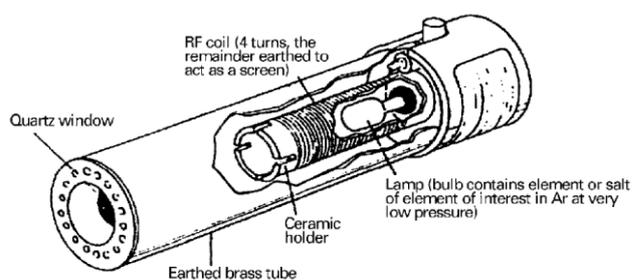


Figura 17 - Lampada a catodo cavo

Il secondo tipo di lampada è la lampada a scarica senza elettrodo, usata meno frequentemente, ad eccezione che per analiti l'arsenico e il selenio. Queste sorgenti sfruttano come energia ionizzante le microonde (nonostante tendano ad essere meno stabili) o le radiofrequenze. Le lampade a radiofrequenze sono meno intense di quelle a microonde, ma sono comunque 5-100 volte più intense di quelle a catodo cavo. Sono formate da un bulbo che contiene l'elemento da misurare (o dei suoi sali) in atmosfera di argon. Le radiofrequenze ionizzano gli atomi del gas, che a loro volta eccitano quelli del metallo, inducendoli ad emettere il loro spettro caratteristico.

Per arsenico e selenio queste lampade hanno un miglior rapporto segnale-rumore e anche una miglior durata rispetto a quelle a catodo cavo.

SISTEMA DI CORREZIONE DI FONDO

Vi sono tre sistemi di correzione automatica delle interferenze del fondo nell'assorbimento atomico e anche un sistema manuale, utilizzato anticamente, tramite l'aggiunta di una quantità nota di un analita non atomico di supporto, che assorbe a lunghezze d'onda vicine. Ciò consentiva di valutare l'assorbanza di fondo. I tre principali metodi automatici sono: attraverso la lampada a deuterio o idrogeno, per effetto Zeeman e tramite la correzione di Smith-Hieftje.

La lampada a deuterio produce uno spettro continuo, parte del quale verrà assorbito dalle specie molecolari presenti nel campione. Dato che l'assorbimento atomico sul fascio di luce emesso da questa lampada è trascurabile, sarà sufficiente sottrarre il segnale ottenuto dallo spettro continuo con quello della lampada a catodo cavo. Questo sistema è più valido nella regione UV ($\lambda < 350\text{nm}$).

Il sistema di correzione per effetto Zeeman è più versatile. Si basa sul forte campo magnetico applicato alla sorgente luminosa o nell'atomizzatore, che crea una separazione dei segnali in diverse

bande. In assenza del campo l'analita è in grado di assorbire alla sua specifica lunghezza d'onda, applicando invece il campo magnetico si splittano i livelli energetici permettendo l'assorbimento della frequenza specifica solamente nei casi sia polarizzata parallelamente a B. Applicando quindi un filtro polarizzante ortogonale al campo magnetico, s'impedisce l'assorbimento dell'analita mentre l'assorbimento di fondo della matrice non è alterato. La correzione perciò si ottiene per differenza dei due profili di assorbanza, senza e con il campo magnetico attivo.

Utilizzando il sistema Smith-Hieftje, la lampada a catodo cavo è soggetta periodicamente a dei rialzi di corrente, portando la lampada ad "auto assorbire". In questo stato non avviene alcun assorbimento atomico mentre l'assorbimento molecolare si conserva. Di conseguenza la correzione delle interferenze di fondo avviene per sottrazione dei segnali delle fasi ad alta e normale corrente. Si tratta di un metodo molto efficace ma può ridurre la durata delle lampade. In strumenti moderni la sorgente è modulata elettricamente, in passato invece si ricorreva a un settore rotante detto chopper.

Un ulteriore metodo per ottimizzare le misure ed evitare errori legati alla sorgente luminosa è lo sviluppo di strumenti a doppio raggio. Il raggio emesso dalla lampada è diviso in due raggi di uguale intensità tramite un elemento semiriflettente. Un raggio attraversa il campione atomizzato mentre l'altro no. In questo modo è possibile ottenere le misure dell'intensità di luce incidente e trasmessa più correttamente. Nonostante la complessità maggiore rispetto ai sistemi a singolo raggio, quelli a doppio raggio permettono di compensare gli errori di riscaldamento ed eventuali alterazioni della lampada.

DISPOSITIVI DI ISOLAMENTO

Per assicurarsi che solo la radiazione d'interesse sia misurata, è necessario ricorrere a un dispositivo in grado di comporre la luce. Fino a tempi recenti veniva impiegato il monocromatore. Vi sono diversi tipi di monocromatori, ma i modelli più moderni montano tipicamente una di queste tre configurazioni: Ebert, Czerny-Turner o Littrow.

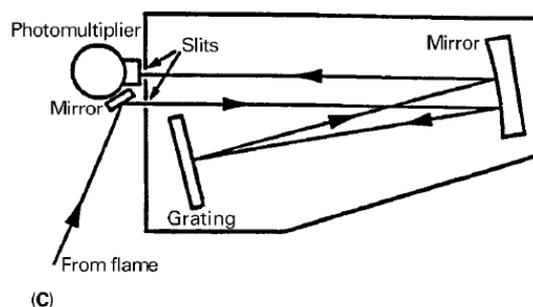
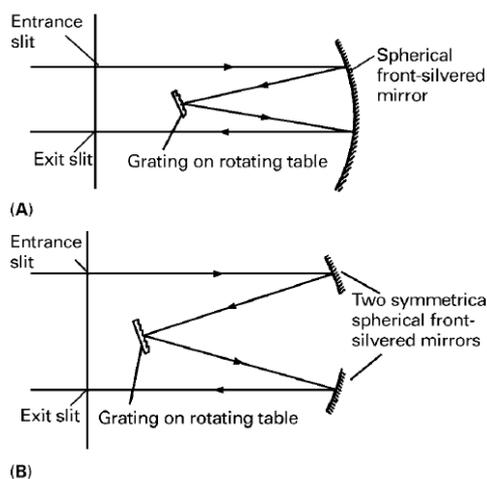


Figura 18 - Immagini schematiche dei diversi tipi di monocromatori: (A)Ebert, (B)Czerny-Turner, (C)Littrow.

La luce emessa dalla sorgente, dopo aver passato l'atomizzatore, entra nel monocromatore attraverso una fenditura d'entrata e si divide in diverse lunghezze d'onda usando un prisma o più comunemente un reticolo di diffrazione. Alterando la posizione di questo elemento è possibile selezionare solamente la radiazione della lunghezza d'onda desiderata, facendo in modo che attraversi la fenditura d'uscita e sia misurata al rivelatore. Il monocromatore permette soltanto a una radiazione precisa di essere analizzata ogni istante, questo era un fattore di debolezza dell'AAS. Tuttavia, una nuova tecnologia ha permesso lo sviluppo di nuovi spettrometri multi elementari, che sfruttano set di 4-6 lampade a catodo cavo e un policromatore di tipo Echelle, in grado con un sistema di specchi di "avvicinare" i segnali con buona dispersione. Essendo privo di una fessura d'uscita, il policromatore fornisce una larga serie di lunghezze d'onda, concentrate su un rivelatore in serie per la lettura dei segnali.

RIVELATORI

Tradizionalmente, i rivelatori per la luce isolata da un monocromatore sono formati da un tubo fotomoltiplicatore. Possono essere disposti secondo diverse modalità, per esempio side-on o end-on, può essere costruito con diversi materiali, che influenzano l'efficacia del sistema per certe lunghezze d'onda. Ad ogni caso, essi lavorano tutti allo stesso modo: la luce entra nel fotomoltiplicatore attraverso una finestra in quarzo e colpisce il fotocatodo, costruito con una lega che conseguentemente libera elettroni (Cs-Sb, Na-K-Sb-Cs, Ga-As). Questi elettroni vengono accelerati da una serie di elettrodi, detti diodi, avente un potenziale crescente. Ogni elettrone che colpisce un diodo, libera a sua volta altri elettroni, provocando quindi un aumento d'intensità del segnale, in relazione al numero di elettrodi presenti. Un singolo fotone può indurre l'emissione di 10^6 elettroni. Questi, raggiunto il catodo, originano una corrente misurabile, proporzionale all'intensità luminosa incidente al tubo fotomoltiplicatore. Gli spettrometri convenzionali sono dotati di rivelatori in grado di misurare solo un segnale per volta. Negli strumenti multielementari sono usati rivelatori a serie o dispositivi a cariche accoppiate, che possono misurare più segnali separati provenienti da un set di lampade a catodo cavo.

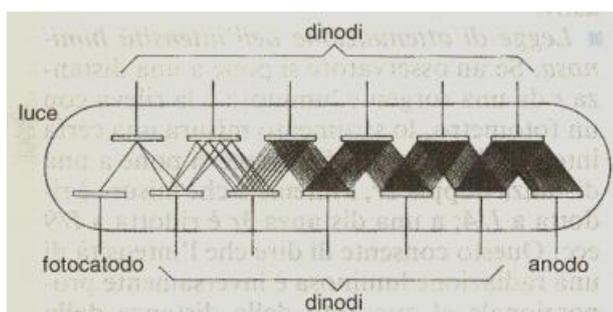


Figura 19 - Funzionamento schematico di un fotomoltiplicatore

INTRODUZIONE DEL CAMPIONE ED ATOMIZZATORE

Per il sistema a fiamma il campione è introdotto attraverso un nebulizzatore a una camera a nebbia. Il campione è aspirato per effetto Venturi, entrando a contatto con i gas di alimentazione della fiamma ed è scomposto in piccole goccioline. In alcuni sistemi è impiegata anche una sfera a impatto per aumentare la nebulizzazione. L'aerosol è poi trasportato dai gas alla camera a nebbia, contenente una serie di setti e deflettori di flusso. Questi agiscono da filtro per far passare solamente le gocce più piccole, mentre le altre sono scartate (85-90% del campione).

L'atomizzatore a fiamma più comune è quello formato da un bruciatore di 10 cm ad aria-acetilene. Ciò permette di raggiungere una temperatura di fiamma di circa 2300° C (dipende dalla frazione aria/combustibile in alimentazione). Possono essere impiegati diversi profili di fiamma:

- a **combustione magra**, con più aria, produce una fiamma ossidante blu a temperatura maggiore;
- a **combustione ricca**, con più combustibile, produce una fiamma gialla a temperatura inferiore;
- a **combustione stechiometrica**, una via di mezzo tra le precedenti.

Gli elementi mostrano diversa sensibilità a seconda del profilo impiegato. Le fiamme hanno temperature variabili e proprietà chimiche differenti. L'efficienza dell'atomizzazione dagli analiti dipende fortemente dall'area della fiamma in cui si trovano. Per questa ragione è importante che il raggio luminoso inviato dalla lampada, passi nella regione in cui il fenomeno è ottimale.

Nonostante la fiamma aria-acetilene sia sufficiente per la maggior parte degli analiti, non è abbastanza calda o riducente per atomizzare quegli elementi che formano ossidi refrattari (Mo, Si, Al e Ti). In questi casi si utilizza una fiamma diossido di azoto-acetilene, con una testa di 5 cm (per ragioni di sicurezza). In questo caso si raggiungono temperature superiori, intorno a 2900° C. Esistono poi altre miscele di alimentazione, come aria-propano e aria-idrogeno, anche se meno utilizzate. Quella alimentata ad aria-idrogeno (2200 °C) ha il vantaggio di essere trasparente a basse lunghezze d'onda, offrendo un migliore rumore di fondo per metalli che assorbono in quell'intervallo (Pb, Sn).

Il sistema di atomizzazione elettrotermico è più sensibile di quello a fiamma, perché gli atomi formati sono confinati in un tubo e quindi trascorrono un tempo maggiore lungo il fascio luminoso. Inoltre, nel primo caso, l'intero campione è atomizzato, mentre per il sistema a fiamma solo 10-15%.

3.3 Spettrometro a emissione atomica

Per quanto riguarda la spettrometria a emissione atomica, nello svolgimento di questo lavoro di tesi è stato impiegato lo stesso strumento, sfruttando la fiamma come fonte di atomizzazione. Perciò la descrizione e gli elementi sono gli stessi descritti sopra per l'AAS, con l'unica variante che nelle misurazioni in emissione di fiamma non è impiegata alcuna sorgente luminosa, ma si misura il segnale emesso dalla fiamma stessa. Sono pochi i metalli che possono essere misurati con questo sistema, perché l'energia necessaria alla ionizzazione di molti di essi non è sufficiente alla temperatura della fiamma. Per questo motivo per le misure in emissione si ricorre solitamente a fonti più energetiche (per esempio il plasma).

Nel mio caso questa tecnica è stata applicata solo per la misurazione del potassio.

3.4 Interferenze

Le tecniche a fiamma sono considerate relativamente prive d'interferenze, ma in realtà se ne possono distinguere tre classi esistenti: interferenze spettrali, di ionizzazione e chimiche.

- **Interferenze spettrali** hanno origine dalla sovrapposizione di segnali (linee o bande) provenienti da diversi elementi o molecole che la risoluzione dello strumento non è in grado di distinguere. Un esempio è l'eurobio (Eu), che assorbe a 324.753 nm sul rame (Cu) 324.754 nm. Si possono verificare anche interferenze spettrali dalla sovrapposizione di bande molecolari, come quella dell'idrossido di calcio sul bario a 553,55 nm. Il piombo sembra essere incline a dare una linea di assorbimento a 217,0 nm, lunghezza d'onda alla quale il cloruro di sodio sembra dare anche un forte assorbimento molecolare.
- **Interferenze di ionizzazione**, dette anche di fase vapore, si verificano in presenza abbondante di elementi facilmente ionizzabili. L'alto contenuto di queste sostanze comporta un'alta concentrazione di elettroni nella fiamma. Questi elettroni prevengono la ionizzazione dell'analita causando la lettura di un segnale di assorbimento atomico più alto. Se negli standard non sono presenti gli elementi facilmente ionizzabili, l'analita si ionizza solo parzialmente (perdita analitica) e quindi il risultato sarà una misura sovrastimata rispetto a quella reale. Si può evitare questo tipo d'interferenza aggiungendo un eccesso dell'elemento facilmente ionizzabile (detto soppressore di ionizzazione), sia nei campioni sia negli standard.
- **Interferenze chimiche**, rappresentano la tipologia principale dei problemi associati all'AAS, si può classificare nei casi seguenti:

a) *Formazione di composti meno volatili*

La più conosciuta di queste interferenze è quella originata dal fosfato di calcio (solfato e silicato hanno le stesse proprietà). Il segnale letto dallo strumento risulta sottostimato a causa della formazione di questo composto refrattario, l'effetto è marcato tra l'intervallo del rapporto P/Ca compreso tra 0,3 e 1,1. L'interferenza è meno pronunciata nella regione più alta della fiamma e non si riscontra in fiamme più calde ($N_2O-C_2H_2$). Vi sono anche altri esempi d'interferenze come questa, caratterizzate per esempio dalla formazione di alluminati.

I principali accorgimenti previsti per limitare questo effetto sono quindi l'uso di una fiamma più calda; lettura ad un livello più alto nella fiamma; regolazione del nebulizzatore in modo che sprigioni gocce più piccole; ricorrere ad un correttore di matrice (La, Cs, Sr), un elemento che entra in competizione con l'analita per legarsi all'interferente; infine l'uso di un agente chelante protettivo (EDTA) che forma dei complessi selettivamente con l'analita allontanandolo dalla "morsa" dell'interferente.

b) *Formazione di composti più volatili*

Situazione molto meno comune, in cui il segnale di alcuni analiti è migliorato per la formazione di composti più volatili. Appartengono a questo gruppo fluoruri e cloruri.

c) *Occlusione in composti refrattari*

Questa interferenza si può incontrare con matrici refrattarie (per esempio con zirconio, uranio e terre rare). Piccole quantità di analita possono rimanere intrappolate nel reticolo cristallino degli ossidi che si generano in fiamma. L'uso di fiamme a temperature elevate riduce questo effetto.

d) *Occlusione in composti volatili*

Alcune sostanze, come il cloruro di ammonio, sublimano esplosivamente nella fiamma, favorendo l'atomizzazione. Ciò può essere sfruttato per combattere le interferenze di tipo a e c.

4. PRESENTAZIONE DEI DATI

In questa sezione sono presentati i dati ricavati dalle analisi svolte su vini e mosti durante il periodo di stage. E' stato effettuato uno screening generale su diversi campioni di vino a disposizione del Laboratorio, al fine di selezionare in seguito quelli maggiormente rappresentativi, in termini di concentrazione. Ciò ha permesso di verificare l'applicabilità del metodo su matrici differenti.

I metodi analitici impiegati sono quelli ufficiali della OIV, per la misurazione dei seguenti metalli nel vino: rame, ferro, zinco, calcio, potassio, magnesio e sodio.

Sono state effettuate misure su campioni di vino di diverse tipologie, cercando di estrapolare alcuni dati relativi agli intervalli di concentrazione dei suddetti metalli.

I risultati ottenuti sono rappresentati nelle tabelle a seguire. I nomi evidenziati in verde sono i vini impiegati successivamente per i test di ripetibilità.

Tabella 3 - Risultati screening per il rame espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

RAME (mg/l)		0 - 0,1	0,1 - 0,25	0,25 - 0,50	0,50 - 0,75	0,75 - 1,00	1,00 - 1,25	1,25 - 1,50	1,50 - 2,50
	BARBERA 1					•			
	BARBERA 2		•						
	BARBERA 3			•					
	BARBERA 4				•				
CAMP. 5	BARBERA 5						•		
	BAROLO 1		•						
CAMP. 1	BAROLO 2	•							
	BAROLO 3				•				
	BONARDA		•						
	CHARDONNAY 1				•				
	CHARDONNAY 2				•				
CAMP. 3	CHARDONNAY 3				•				
	CHARDONNAY 4		•						
	CHARDONNAY 5	•							
CAMP. 2	DOLCETTO 1	•							
	DOLCETTO 2		•						
	DOLCETTO 3				•				
	FREISA 1	•							
	FREISA 2			•					
	FREISA 3	•							
	FREISA 4		•						
	GRIGNOLINO 1			•					
CAMP. 4	GRIGNOLINO 2		•						
	GRIGNOLINO 3					•			
	MOSCATO 1		•						
	MOSCATO 2	•							
	MOSCATO 3		•						
	NEBBIOLO 1					•			
	NEBBIOLO 2				•				
	NEBBIOLO 3	•							
	NEBBIOLO 4						•		
	PELAVERGA 1	•							
	PELAVERGA 2			•					
CAMP. 6	MOSTO 1								•
	MOSTO 2								•

Tabella 4 - Risultati screening per il ferro espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

FERRO (mg/l)		0 - 1,00	1,00 - 1,50	1,50 - 2,00	2,00 - 3,00	3,00 - 4,00	4,00 - 6,00	6,00 - 8,00	8,00 - 10,00
CAMP. 3	BARBERA 1				•				
	BARBERA 2					•			
	BARBERA 3								•
	BARBERA 4							•	
	BAROLO 1			•					
CAMP. 5	BAROLO 2				•				
	BAROLO 3				•				
	BAROLO 4							•	
CAMP. 1	BONARDA								•
	DOLCETTO 1	•							
	DOLCETTO 2	•							
	DOLCETTO 3						•		
	DOLCETTO 4							•	
CAMP. 6	DOLCETTO 5				•				
	FREISA 1				•				
	FREISA 2						•		
	FREISA 3						•		
	FREISA 4				•				
CAMP. 2	GRIGNOLINO 1				•				•
	GRIGNOLINO 2				•				
	GRIGNOLINO 3			•					
	GRIGNOLINO 4			•					
	NEBBIOLO 1						•		
CAMP. 4	NEBBIOLO 2								•
	NEBBIOLO 3	•							
	NEBBIOLO 4		•						
	NEBBIOLO 5		•						
CAMP. 4	PELAVERGA 1					•			
	PELAVERGA 2			•					
	PELAVERGA 3			•					

Tabella 5 - Risultati screening per il zinco espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

ZINCO (mg/l)		0 - 0,25	0,25 - 0,50	0,50 - 0,75	0,75 - 1,00	1,00 - 1,50	1,50 - 2,50	2,50 - 5,00
CAMP. 1	BARBERA 1		•					
	BARBERA 2					•		
	BARBERA 3					•		
	BARBERA 4		•					
	BARBERA 5	•						
CAMP. 3	BAROLO 1					•		
	BAROLO 2				•			
CAMP. 2	CHARDONNAY 1			•				
	CHARDONNAY 2			•				
	DOLCETTO 1				•			
CAMP. 5	DOLCETTO 2	•						
	DOLCETTO 3			•				
	DOLCETTO 4							•
	FREISA 1		•					
	FREISA 2	•						
CAMP. 4	FREISA 3			•				
	FREISA 4				•			
	GRIGNOLINO 1					•		
	GRIGNOLINO 2			•				
	GRIGNOLINO 3	•						
	GRIGNOLINO 4					•		
	MISTO 1		•					
	MISTO 2				•			
	MOSCATO	•						
	NEBBIOLO 1							•
CAMP. 4	NEBBIOLO 2			•				
	NEBBIOLO 3		•					
	NEBBIOLO 4						•	

Tabella 6 - Risultati screening per il potassio espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

POTASSIO (mg/l)		0 - 600	600 - 1000	1000 - 1200	1200 - 1400	1400 - 1600	1600 - 1800	1800 - 2100
CAMP. 5	BARBERA 1				•			
	BARBERA 2					■		
	BARBERA 3			•				
	BARBERA 4		•					
	BARBERA 5				•			
	BARBERA 6						•	
CAMP. 1	BAROLO 1			•				
	BAROLO 2				•			
	BAROLO 3					•		
	BAROLO 4			•				
CHARDONNAY	■							
CAMP. 2	DOLCETTO 1		•					
	DOLCETTO 2			•				
	DOLCETTO 3		■					
CAMP. 3	DOLCETTO 4					•		
	FREISA 1			•				
	FREISA 2			■				
	FREISA 3				•			
CAMP. 4	FREISA 4					•		
	GRIGNOLINO 1				•			
	GRIGNOLINO 2				■			
	GRIGNOLINO 3				•			
CAMP. 6	GRIGNOLINO 4		•					
	MISTO 1				•			
	MISTO 2				•			
	MOSCATO		•					
	MOSTO							■
	NEBBIOLO 1			•				
CAMP. 5	NEBBIOLO 2				•			
	NEBBIOLO 3					•		
	PELAVERGA 1		•					
	PELAVERGA 2			•				

Tabella 7 - Risultati screening per il calcio espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

CALCIO (mg/l)		0 - 50	50 - 70	70 - 90	90 - 100	100 - 120	120 - 140
CAMP. 1	BARBERA 1		•				
	BARBERA 2	■					
	BARBERA 3			•			
	BARBERA 4			•			
	BARBERA 5		•				
CAMP. 2	BAROLO 1		■				
	BAROLO 2			•			
	BAROLO 3	•					
	BAROLO 4		•				
CAMP. 3	BONARDA				•		
	CHARDONNAY 1		•				
	CHARDONNAY 2		•				
	DOLCETTO 1			■			
	DOLCETTO 2			•			
CAMP. 5	DOLCETTO 3		•				
	DOLCETTO 4	•					
	FREISA 1					■	
	FREISA 2			•			
CAMP. 4	FREISA 3		•				
	FREISA 4				•		
	GRIGNOLINO 1			•			
	GRIGNOLINO 2		•				
	GRIGNOLINO 3		•				
	GRIGNOLINO 4			■			
CAMP. 6	MISTO 1				•		
	MISTO 2			•			
	MOSCATO 1			•			
	MOSCATO 2						■
CAMP. 5	NEBBIOLO 1			•			
	NEBBIOLO 2		•				
	NEBBIOLO 3			•			
	NEBBIOLO 4		•				
	PELAVERGA 1			•			
PELAVERGA 2			•				

Tabella 8 - Risultati screening per il magnesio espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

MAGNESIO (mg/l)

	tipologia	0 - 50	50 - 70	70 - 80	80 - 90	90 - 100	100 - 120
CAMP. 5	BARBERA 1			•			
	BARBERA 2		•				
	BARBERA 3						•
	BARBERA 4					•	
CAMP. 1	BAROLO 1			•			
	BAROLO 2				•		
	BAROLO 3			•			
	BAROLO 4		•				
CAMP. 1	DOLCETTO 1				•		
	DOLCETTO 2		•				
	DOLCETTO 3		•				
	DOLCETTO 4				•		
CAMP. 3	FREISA 1		•				
	FREISA 2				•		
	FREISA 3			•			
	FREISA 4				•		
CAMP. 2	GRIGNOLINO 1		•				
	GRIGNOLINO 2			•			
	GRIGNOLINO 3		•				
	GRIGNOLINO 4			•			
CAMP. 2	MISTO 1			•			
	MISTO 2			•			
CAMP. 4	NEBBIOLO 1					•	
	NEBBIOLO 2				•		
	NEBBIOLO 3		•				
	NEBBIOLO 4				•		

Tabella 9 - Risultati screening per il sodio espressi in intervalli di concentrazione per diverse tipologie di vini analizzati

SODIO (mg/l)

	tipologia	0 - 10	10 - 20	20 - 30	30 - 40	40 - 60	60 - 80	
CAMP. 5	BARBERA 1				•			
	BARBERA 2			•				
	BARBERA 3		•					
	BARBERA 4					•		
CAMP. 3	BAROLO 1		•					
	BAROLO 2	•						
	BAROLO 3	•						
	BAROLO 4		•					
CAMP. 3	DOLCETTO 1			•				
	DOLCETTO 2		•					
	DOLCETTO 3			•				
	DOLCETTO 4	•						
CAMP. 2	FREISA 1	•						
	FREISA 2			•				
	FREISA 3		•					
	FREISA 4	•						
CAMP. 4	GRIGNOLINO 1	•						
	GRIGNOLINO 2				•			
CAMP. 6	GRIGNOLINO 3					•		
CAMP. 1	GRIGNOLINO 4				•			
	MISTO 1			•				
	MISTO 2							
	NEBBIOLO 1	•						
	NEBBIOLO 2		•					
	NEBBIOLO 3	•						
	NEBBIOLO 4		•					
CAMP. 1	PELAVERGA 1	•						
	PELAVERGA 2	•						
	PELAVERGA 3		•					

Nonostante il numero delle rilevazioni effettuate sul vino siano limitate per poter trarre considerazioni generalizzate, possiamo evidenziare alcune particolarità dai dati raccolti:

- Gli intervalli di concentrazione di tutti i metalli hanno una buona variabilità, anche all'interno della stessa tipologia di vino.
- Vini bianchi e rossi non presentano particolari differenze nel contenuto dei diversi metalli. Fa eccezione il potassio, che si trova a concentrazioni più elevate nei vini rossi (600 – 1200 mg/l), mentre nei bianchi è minore (300 – 700 mg/l); e il calcio che invece prevale nei vini bianchi.

Detto ciò si può trarre la conclusione che le concentrazioni di questi elementi nel vino non mostrano alcuna dipendenza dal tipo di vigneto d'origine, bensì il fattore che più incide sul loro quantitativo finale sono i processi di vinificazione, caratteristici per ciascuna cantina.

5. PROVE DI VALIDAZIONE

In questa sezione è trattata l'applicazione del metodo di analisi dei metalli e lo studio che ne deriva, in visione di una futura validazione del metodo. I metodi analitici impiegati sono quelli ufficiali della OIV(Organization Internationale de la Vigne et du Vin), per la misurazione dei seguenti metalli nel vino: rame, ferro, zinco, calcio, potassio, magnesio e sodio.

Sono state effettuate delle misure su dei campioni con concentrazioni diverse di metalli nelle condizioni di ripetibilità stretta (vedi definizione a pag. 10), per valutare che la dispersione dei dati rientri nei limiti imposti dal metodo ufficiale.

5.1 Vino sintetico

Per la verifica dell'esattezza e accuratezza della misura, sono stati preparati in precedenza due campioni di vino sintetico, contenenti valori limite (maggiori e minori) dei metalli d'interesse. Questa operazione si è resa necessaria per l'assenza di materiale certificato su cui effettuare le prove, ciò consente di dare una significatività alle rivelazioni compiute sui campioni incogniti. Un altro scopo importante di queste misure è di assicurare una buona accuratezza dello strumento, soprattutto nelle regioni in cui cadono i limiti di legge imposti per alcuni metalli pesanti.

Le informazioni principali, relative ai due campioni di vino sintetico preparati in laboratorio, sono riassunte nella tabella sottostante.

Tabella 10 - Concentrazioni in mg/l dei metalli presenti nei due campioni di vino sintetico

	MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
	Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
	mg/l			mg/l			
VINO 1	0,1	0,5	0,5	25	500	50	50
VINO 2	1,0	2,5	2,5	75	1500	100	100

I due standard sono stati preparati in un litro di soluzione idroalcolica al 10% (di alcol) e il 2% v/v di acido nitrico concentrato, per emulare il più possibile la matrice del vino. Le dosi dei componenti minerali sono state calcolate a partire da soluzioni certificate di ciascun metallo.

Sono state quindi fatte le dieci misurazioni per il rivelamento di ciascun analita in condizioni di ripetibilità stretta. I risultati ottenuti sono espressi nella tabella 11.

Tabella 11 - Risultati delle prove di ripetibilità per i differenti metalli nei campioni di vino sintetico

		MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
		Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
		ppm			ppm			
VINO 1	1	0,11	0,48	0,50	25	509	52	49
	2	0,10	0,51	0,48	24	512	51	47
	3	0,09	0,53	0,47	24	502	52	51
	4	0,11	0,49	0,51	25	494	50	48
	5	0,10	0,50	0,48	24	499	51	50
	6	0,09	0,51	0,49	23	506	49	51
	7	0,11	0,49	0,52	24	507	51	48
	8	0,10	0,51	0,48	23	493	49	50
	9	0,09	0,50	0,52	24	498	49	49
	10	0,09	0,52	0,51	22	492	50	50
VINO 2	1	1,00	2,53	2,52	75	1490	101	99
	2	0,99	2,49	2,53	74	1489	102	102
	3	0,98	2,49	2,52	72	1495	101	101
	4	1,00	2,47	2,50	73	1498	99	99
	5	1,01	2,54	2,49	74	1503	100	101
	6	1,00	2,53	2,49	75	1497	99	101
	7	0,99	2,51	2,51	73	1506	102	102
	8	1,01	2,51	2,48	73	1511	98	101
	9	1,01	2,48	2,47	73	1492	98	103
	10	0,99	2,52	2,53	74	1502	103	100

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per l'identificazione di eventuali dati aberranti. Il test si applica quindi ai valori estremi (maggiore e minore) per ciascuna serie di misurazioni e valutando lo scarto dalla media in relazione alla deviazione standard dei dati, è in grado di determinare se si tratta di valori anomali.

Perché il test sia superato, è sufficiente confrontare l'indice tabulato per 10 dati e 5% di probabilità con quello sperimentale ottenuto dalla formula sottostante.

$$T_{sp} = \frac{|x_i - X_m|}{S_i}; \text{ vedi pag. 18-19.}$$

Tabella 12 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni sui vini sintetici

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=95\%$)

		MICROELEMENTI						MACROELEMENTI							
		Cu		Fe		Zn		Na		K		Ca		Mg	
		ppm	T _{sp}	ppm	T _{sp}	ppm	T _{sp}	ppm	T _{sp}	ppm	T _{sp}	ppm	T _{sp}	ppm	T _{sp}
VINO 1	estremo inf.	0,09	1,03	0,48	1,59	0,47	1,41	22	1,96	492	1,30	49	1,19	47	1,72
	estremo sup.	0,11	1,26	0,53	1,73	0,52	1,31	25	1,31	512	1,52	52	1,36	51	1,27
VINO 2	estremo inf.	0,98	1,74	2,47	1,57	2,47	1,60	72	1,66	1489	1,30	98	1,30	99	1,48
	estremo sup.	1,01	1,16	2,54	1,40	2,53	1,23	75	1,45	1511	1,77	103	1,53	103	1,63

- L'indice entra ampiamente nel limite tabulato, il dato non è anomalo.
- L'indice si avvicina al limite tabulato, il dato non si considera anomalo.
- L'indice supera quello tabulato, il dato è anomalo.

Non è stato riscontrato nessun dato anomalo, quindi ora è possibile procedere alla trattazione statistica dei dati. Le informazioni relative ai due vini sintetici sono riassunte nella tabelle seguenti.

Tabella 13 – Parametri statistici calcolati per il vino 1

VINO 1	MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
	Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
X_a (mg/l)	0,10	0,50	0,50	25	500	50	50
X_{medio} (mg/l)	0,099	0,504	0,496	23,8	501,2	50,4	49,3
S_r	0,00876	0,01506	0,01838	0,91894	7,09930	1,17379	1,33749
r (mg/l)	0,015	0,03	0,091	2,500	35,000	2,70	3,000
σ_r	0,00541	0,01082	0,03283	0,90192	12,62691	0,97408	1,08231
R (mg/l)	0,045	0,042	0,127	5,000	66,000	5,20	8,000
σ_R	0,01623	0,01515	0,04582	1,80384	23,81074	1,87600	2,88615
σ_L^2	0,00023	0,00011	0,00102	2,44039	407,51249	2,57054	7,15848
S_r/σ_r	1,61802	1,39105	0,55982	1,01886	0,56224	1,20503	1,23578
$(\sigma_L^2+S_r^2/10)^{1/2}$	0,01555	0,01162	0,03248	1,58897	20,31139	1,64570	2,70876
$ X_{medio}-X_a $	0,001	0,004	0,004	1,2	1,2	0,4	0,7
Z_{Sp}	0,0642899	0,3441125	0,1231366	0,755205	0,0590802	0,243058	0,2584211

Tabella 14 – Parametri statistici calcolati per il vino 2

VINO 2	MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
	Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
X_a (mg/l)	1,00	2,50	2,50	75	1500	100	100
X_{medio} (mg/l)	0,998	2,507	2,504	73,600	1498,300	100,300	100,900
S_r	0,01033	0,02359	0,02119	0,96609	7,18099	1,76698	1,28668
r (mg/l)	0,029	0,06	0,091	2,500	35,000	4,00	3,000
σ_r	0,01046	0,02165	0,03283	0,90192	12,62691	1,44308	1,08231
R (mg/l)	0,045	0,104	0,127	5,000	66,000	10,90	8,000
σ_R	0,01623	0,03752	0,04582	1,80384	23,81074	3,93238	2,88615
σ_L^2	0,00015	0,00094	0,00102	2,44039	407,51249	13,38114	7,15848
S_r/σ_r	0,98716	1,08998	0,64536	1,07115	0,56871	1,22446	1,18884
$(\sigma_L^2+S_r^2/10)^{1/2}$	0,01284	0,03154	0,03265	1,59177	20,31426	3,70045	2,70629
$ X_{medio}-X_a $	0,002	0,007	0,004	1,4	1,7	0,3	0,9
Z_{Sp}	0,1558088	0,2219307	0,1224933	0,8795256	0,0836851	0,0810711	0,332558

LEGENDA	
X_{medio}	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]
Z_{sp}	Z sperimentale, indice da confrontare con la Z tabulata per la verifica dell'esattezza della media [$ X_{\text{medio}} - X_a / ((\sigma_L^2 + S_r^2/10)^{1/2})$]

Come già descritto in precedenza, per la validazione di metodi normati, si fanno due verifiche statistiche sui dati raccolti: la prima è il confronto dello scarto tipo di ripetibilità ottenuto dalle misurazioni in laboratorio, con quello fornito dal metodo ufficiale oppure ricavato da un circuito interlaboratoriale; la seconda è il test t Student per l'accuratezza della media.

Le due verifiche, descritte più nel dettaglio a pag. 15-16, sono riportate di seguito.

Tabella 15 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per i vini sintetici

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)

		MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
		Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
VINO 1	S_r/σ_r	1,61802	1,39105	0,55982	1,01886	0,56224	1,20503	1,23578
	Si compie la verifica?	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
VINO 2	S_r/σ_r	0,98716	1,08998	0,64536	1,07115	0,56871	1,22446	1,18884
	Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

La prima verifica è stata passata da tutte le misurazioni tranne che per quelle del rame nel caso del campione a concentrazione minore. La ragione di questo è attribuibile alla bassa concentrazione di questo elemento nel vino, ma anche la bassa sensibilità del metodo che non permette di avere una sufficiente significatività della seconda cifra decimale (dell'ordine delle decine di ppb). Sarà quindi contemplata l'idea di provvedere in futuro all'impiego di soluzioni più concentrate per le misure di ripetibilità la validazione ufficiale del metodo, perché ci troviamo nelle vicinanze dei limiti di rilevabilità. In realtà l'obiettivo fondamentale è garantire la precisione e accuratezza della misura per concentrazioni vicine ai limiti di legge (1 mg/l).

Tabella 16 - Risultati del test t di Student per l'accuratezza della media per i vini sintetici

2° VERIFICA ($Z_{sp} < 1,036$)

		MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
		Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
VINO 1	Z_{sp}	0,0642899	0,3441125	0,1231366	0,755205	0,0590802	0,243058	0,2584211
	Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
VINO 2	Z_{sp}	0,1558088	0,2219307	0,1224933	0,8795256	0,0836851	0,0810711	0,332558
	Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si

La seconda verifica è stata superata ampiamente da tutte le misurazioni, l'unico metallo per cui è stata riscontrata un'accuratezza minore è il sodio, i cui valori di Z_{sp} si avvicinano molto a quelli tabulati.

In conclusione è ricavata l'incertezza estesa di misura (tabella 17) per le analisi di ciascun metallo. Il calcolo è stato eseguito in modo semplificato, infatti, non sono stati considerati i contributi d'incertezza relativi alla retta di taratura, all'uso della vetreria, all'impiego di materiali certificati e alle operazioni di diluizione. Ciò significa che si considerano trascurabili gli errori (o scarti) sopraelencati e si terrà conto solamente dell'incertezza tipo di ripetibilità. La formula applicata è la seguente:

$$U(x) = K * \sqrt{\sigma_L^2 + \frac{S_r^2}{n}}$$

con n = numero di dati (10) e $K = 2.262$ t student con $n - 1$ gradi di libertà (9) e $P=95\%$.

Tabella 17 - Incertezza estesa di misura ottenuta dalle misure sui campioni di vino sintetico

		INCERTEZZA ESTESA DI MISURA						
		MICROELEMENTI			MACROELEMENTI			
		Cu	Fe	Zn	Na	K	Ca	Mg
VINO 1	U(x)	±0,04	±0,03	±0,07	±4	±46	±4	±6
VINO 2	U(x)	±0,03	±0,07	±0,07	±4	±46	±8	±6

Possiamo concludere che, dalla trattazione statistica dei dati raccolti dalle prove di ripetibilità effettuate sui due campioni di vino sintetico, il metodo risulta validabile secondo la procedura ufficiale per la validazione di metodi normati.

Purtroppo non è stato possibile terminare l'intero protocollo di validazione per mancanza di tempo, sarebbe stato necessario un numero maggiore di prove su campioni di vino certificato, senza contare che lo strumento utilizzato risultava essere piuttosto usurato ed era pertanto prossimo a essere dismesso.

Vista l'adeguatezza analitica delle misure effettuate sui campioni standard preparati in laboratorio, si possono considerare altrettanto accurate le rivelazioni eseguite su diversi campioni di vino analizzati presso il laboratorio, come operazione preparatoria alla fase di validazione.

I risultati verranno perciò esposti a seguire, trattati metallo per metallo, con la descrizione delle operazioni svolte. In questi casi verranno solamente applicati test per dati aberranti e la 1° verifica per il confronto dello scarto tipo di ripetibilità.

5.2 Rame^{[2] [9]}

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Il rame è quantificato in assorbimento ad una lunghezza d'onda di 324,75 nm.

REATTIVI

- Alcol etilico assoluto
- Acido nitrico conc. (65%)
- Soluzione std. Commerciale di Cu 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Spettrometro ad assorbimento atomico corredato di apposita lampada a catodo cavo per la determinazione del rame (energia della lampada 15 e fenditura 0.7 nm), impostato a 324.75 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipette graduate, classe A, da 1e 5 ml con precisione di ± 0.007 e ± 0.03 ml, rispettivamente
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di rame si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 1 mg/l di rame:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 0.5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 2 mg/l di rame:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 1 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 4 mg/l di rame:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 2 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50ml di etanolo assoluto e 10 ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.

L'aggiunta di alcol e acido nitrico alle soluzioni standard servono a creare una matrice il più possibile simile a quella del vino, cercando di eguagliarne il contenuto alcolico e il pH, per evitare forti interferenze di matrice.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Saranno

effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo d'interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il campione è filtrato su carta e non sono necessarie diluizioni. Nel caso di alcol buongusto o distillati di elevata tenore alcolico, diluire il campione sino ad arrivare a una gradazione di circa 10%, per evitare le interferenze dell'etanolo.

PRCEDIMENTO

Si effettuano dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno effettuati tutti i test statistici per la valutazione della ripetibilità del metodo. Nel caso specifico del rame, sono stati impiegati sei campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-0,10 mg/l, 0,10-0,25 mg/l, 0,25-0,50 mg/l, 0,50-0,75 mg/l, 1,00-1,25 mg/l, 1,50-2,50. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state effettuate automaticamente dallo strumento, come se fossero dieci campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 5 letture a distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l con due posizioni decimali. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito).

I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 18.

Tabella 18 - Risultati delle misure di ripetibilità del rame

CONC. RAME (ppm)						
	CAMP. 1 (Barbera)	CAMP. 2 (Barolo)	CAMP. 3 (Chardonnay)	CAMP. 4 (Dolcetto)	CAMP. 5 (Grignolino)	CAMP. 6 (Mosto)
1	0,11	0,24	0,49	0,63	1,24	2,09
2	0,09	0,23	0,47	0,62	1,23	2,08
3	0,08	0,23	0,49	0,61	1,23	2,13
4	0,10	0,24	0,48	0,60	1,24	2,12
5	0,09	0,23	0,49	0,59	1,23	2,03
6	0,10	0,24	0,47	0,60	1,25	2,07
7	0,09	0,23	0,48	0,60	1,21	2,09
8	0,09	0,24	0,50	0,60	1,24	2,14
9	0,08	0,25	0,47	0,59	1,21	2,10
10	0,11	0,23	0,48	0,60	1,22	2,05

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 19 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni del rame

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)

RAME	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4		CAMP. 5		CAMP. 6	
	ppm	T_{sp}										
estremo inf.	0,08	1,30	0,23	0,86	0,47	1,16	0,59	1,11	1,21	1,50	2,03	1,73
estremo sup.	0,11	1,49	0,25	2,00	0,50	1,74	0,63	2,06	1,25	1,50	2,14	1,44

Nessun dato è risultato anomalo, solamente l'estremo superiore del quarto campione si avvicina al limite tabulato.

I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati presi dal circuito inter laboratoriale, non essendo specificati dal metodo.

Tabella 20 - Parametri statistici calcolati per il rame

Rame	CAMP. 1 (Barbera)	CAMP. 2 (Barolo)	CAMP. 3 (Chardonnay)	CAMP. 4 (Dolcetto)	CAMP. 5 (Grignolino)	CAMP. 6 (Mosto)
X_{medio} (mg/l)	0,094	0,236	0,482	0,604	1,230	2,090
S_r	0,01075	0,00699	0,01033	0,01265	0,01333	0,03464
r (mg/l)	0,015	0,015	0,020	0,029	0,060	0,100
σ_r	0,00541	0,00541	0,00722	0,01046	0,02165	0,03608
R (mg/l)	0,045	0,045	0,089	0,170	0,300	0,500
σ_R	0,01623	0,01623	0,03211	0,06133	0,10823	0,18038
σ_L^2	0,00023	0,00023	0,00098	0,00365	0,01125	0,03124
S_r/σ_r	1,98644	1,29207	1,43138	1,20902	0,61597	0,96020

LEGENDA

X_{medio}	=	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	=	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	=	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	=	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	=	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	=	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	=	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 21 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per il rame

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
S_r/σ_r	1,98644	1,29207	1,43138	1,20902	0,61597	0,96020
Si compie la verifica?	No	Si	Si	Si	Si	Si

Anche in questo caso è visibile dall'esito del test che le misure eseguite sul campione meno concentrato di rame (circa 0,1 mg/l) non risultano rispettare il limite di scarto tipo di ripetibilità imposto. La causa di ciò è attribuibile alla scarsa risoluzione dello strumento che dispone ormai di un sistema ottico non più efficiente.

5.3 Ferro^{[2] [9]}

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Il ferro è quantificato in assorbimento a una lunghezza d'onda di 248,3 nm.

REATTIVI

- Alcol etilico assoluto
- Acido nitrico conc. (65%)
- Soluzione std. Commerciale di Fe 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Spettrometro ad assorbimento atomico corredato di apposita lampada a catodo cavo per la determinazione del ferro (energia della lampada 30 e fenditura 0.2 nm), impostato a 248.3 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipette graduate, classe A, da 1e 5 ml con precisione di ± 0.007 e ± 0.03 ml, rispettivamente
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di ferro si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 2 mg/l di ferro:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 1 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 5 mg/l di ferro:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 2,5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **10 mg/l** di ferro:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.

L'aggiunta di alcol e acido nitrico alle soluzioni standard servono a creare una matrice il più possibile simile a quella del vino, cercando di eguagliarne il contenuto alcolico e il pH, per evitare forti interferenze di matrice.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Saranno effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo d'interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Il campione è filtrato su carta e non sono necessarie diluizioni. Nel caso di alcol buongusto o distillati di elevata tenore alcolico, diluire il campione sino ad arrivare a una gradazione di circa 10%, per evitare le interferenze dell'etanolo.

PRCEDIMENTO

Si effettuano dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno effettuati tutti i test statistici per la valutazione della ripetibilità del metodo. Nel caso specifico del ferro, sono stati impiegati 6 campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-1,00 mg/l, 1,00-2,00 mg/l, 2,00-3,00 mg/l, 3,00-4,50 mg/l, 4,50-7,00 mg/l, 7,00-10,00. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state effettuate automaticamente dallo strumento, come se fossero dieci campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 3 letture a distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l con due posizioni decimali. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito).

I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 22.

Tabella 22 - Risultati delle misure di ripetibilità del ferro

CONC. FERRO (ppm)

	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Dolcetto)	(Nebbiolo)	(Barbera)	(Pelaverga)	(Barolo)	(Grignolino)
1	0,91	1,19	2,48	3,70	5,64	9,64
2	0,89	1,17	2,47	3,65	5,67	9,65
3	0,88	1,20	2,52	3,67	5,64	9,64
4	0,90	1,21	2,49	3,65	5,67	9,70
5	0,88	1,19	2,50	3,67	5,67	9,67
6	0,91	1,18	2,48	3,68	5,68	9,68
7	0,91	1,19	2,49	3,65	5,69	9,71
8	0,90	1,20	2,49	3,63	5,66	9,70
9	0,89	1,20	2,52	3,65	5,68	9,70
10	0,90	1,20	2,50	3,62	5,67	9,70

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 23 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni del ferro

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)

FERRO	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4		CAMP. 5		CAMP. 6	
	ppm	T_{sp}										
estremo inf.	0,88	1,47	1,17	1,98	2,47	1,46	3,62	1,57	5,64	1,65	9,64	1,43
estremo sup.	0,91	1,12	1,21	1,47	2,52	1,58	3,70	1,82	5,69	1,41	9,71	1,14

Nessun dato è risultato anomalo, solamente i due valori evidenziati in giallo si avvicinano al limite tabulato. I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati presi dal metodo normato.

Tabella 24 - Parametri statistici calcolati per il ferro

Ferro	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Dolcetto)	(Nebbiolo)	(Barbera)	(Pelaverga)	(Barolo)	(Grignolino)
X_{medio} (mg/l)	0,897	1,193	2,494	3,657	5,667	9,679
S_r	0,01160	0,01160	0,01647	0,02359	0,01636	0,02726
r (mg/l)	0,030	0,030	0,060	0,080	0,080	0,080
σ_r	0,01082	0,01082	0,02165	0,02886	0,02886	0,02886
R (mg/l)	0,042	0,042	0,104	0,137	0,137	0,137
σ_R	0,01515	0,01515	0,03752	0,04943	0,04943	0,04943
σ_L^2	0,00011	0,00011	0,00094	0,00161	0,00161	0,00161
S_r/σ_r	1,07133	1,07133	0,76067	0,81748	0,56698	0,94465

LEGENDA

X_{medio}	=	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	=	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	=	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	=	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	=	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	=	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	=	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 25 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per il ferro

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
S_r/σ_r	1,07133	1,07133	0,76067	0,81748	0,56698	0,94465
Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si

L'esito del test è positivo per tutte le serie di dati rilevate, questo è buon indice che il metodo interno rientra nei canoni di precisione imposti dal metodo ufficiale.

5.4 Zinco^{[2] [9]}

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Lo zinco è quantificato in assorbimento a una lunghezza d'onda di 213,9 nm.

REATTIVI

- Alcol etilico assoluto
- Acido nitrico conc. (65%)
- Soluzione std. Commerciale di Zn 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Spettrometro ad assorbimento atomico corredato di apposita lampada a catodo cavo per la determinazione dello zinco (energia della lampada 20 e fenditura 0.7 nm, stessa lampada impiegata per il calcio), impostato a 213.9 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipette graduate, classe A, da 1, 2 e 5 ml con precisione di ± 0.007 , ± 0.01 e ± 0.03 ml, rispettivamente.
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di ferro si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **0.6 mg/l** di zinco:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 0.3 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10 ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **3 mg/l** di zinco:* In un matraccio, classe A, da 500ml pipettare 1,5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10 ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **5 mg/l** di zinco:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 2,5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10 ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.

L'aggiunta di alcol e acido nitrico alle soluzioni standard servono a creare una matrice il più possibile simile a quella del vino, cercando di eguagliarne il contenuto alcolico e il pH, per evitare forti interferenze di matrice.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Verranno effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo di interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Non sono necessarie diluizioni, il campione deve essere solamente filtrato. Se si tratta di alcol buongusto o distillati di elevata gradazione alcolica, diluire il campione sino ad arrivare ad una gradazione sul 10% per evitare le interferenze dell'etanolo.

PRCEDIMENTO

Si effettuano dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno effettuati tutti i test statistici per la valutazione della ripetibilità del metodo. Nel caso specifico dello zinco, sono stati impiegati 5 campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-0,50 mg/l, 0,50-1,00 mg/l, 1,00-1,50 mg/l, 1,50-3,00 mg/l, 3,00-5,00 mg/l. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state fatte automaticamente dallo strumento, come se fossero dieci campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 3 letture a distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l

con due posizioni decimali. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito).

I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 26.

Tabella 26 - Risultati delle misure di ripetibilità dello zinco

CONC. ZINCO (ppm)					
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5
	(Barbera)	(Chardonnay)	(Barolo)	(Nebbiolo)	(Dolcetto)
1	0,25	0,72	1,29	2,69	4,70
2	0,22	0,73	1,30	2,65	4,66
3	0,20	0,72	1,34	2,69	4,71
4	0,19	0,68	1,28	2,70	4,74
5	0,18	0,69	1,31	2,68	4,69
6	0,21	0,73	1,26	2,71	4,64
7	0,23	0,68	1,35	2,73	4,66
8	0,24	0,70	1,31	2,75	4,71
9	0,24	0,69	1,28	2,71	4,65
10	0,22	0,72	1,29	2,68	4,71

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 27 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni dello zinco

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)								
ZINCO	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4	
	ppm	T_{sp}	ppm	T_{sp}	ppm	T_{sp}	ppm	T_{sp}
estremo inf.	0,18	1,65	0,68	1,29	1,26	1,48	2,65	1,75
estremo sup.	0,25	1,39	0,73	1,19	1,35	1,77	2,75	1,82

Nessun dato è risultato anomalo, solamente i due estremi del campione 3 si avvicinano al limite tabulato.

I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati ricavati dal circuito inter laboratoriale.

Tabella 27 - Parametri statistici calcolati per il rame

Zinco	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5
	(Barbera)	(Chardonnay)	(Barolo)	(Nebbiolo)	(Dolcetto)
X_{medio} (mg/l)	0,218	0,706	1,301	2,699	4,687
S_r	0,02300	0,02011	0,02767	0,02807	0,03268
r (mg/l)	0,091	0,091	0,091	0,091	0,091
σ_r	0,03283	0,03283	0,03283	0,03283	0,03283
R (mg/l)	0,127	0,127	0,127	0,127	0,127
σ_R	0,04582	0,04582	0,04582	0,04582	0,04582
σ_L^2	0,00102	0,00102	0,00102	0,00102	0,00102
S_r/σ_r	0,70051	0,61257	0,84279	0,85493	0,99534

LEGENDA

X_{medio}	=	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	=	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	=	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	=	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	=	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	=	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	=	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 28 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per lo zinco

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)					
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5
S_r/σ_r	0,70051	0,61257	0,84279	0,85493	0,99534
Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si

L'esito del test è positivo per tutte le serie di dati rilevate, questo è buon indice che il metodo interno rientra nei canoni di precisione imposti dal metodo ufficiale.

5.5 Calcio^{[2] [9]}

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Il calcio è quantificato in assorbimento a una lunghezza d'onda di 422,7 nm.

REATTIVI

- Soluzione diluita standard 50 g/l di lantanio
- Soluzione std. Commerciale di Ca 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Bilancia analitica sensibilità 0.1 mg.
- Spettrometro di assorbimento atomico corredato di apposita lampada a catodo cavo per la determinazione del calcio (energia della lampada 20 e fenditura 0.7 nm) ed impostato a 422.7 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipette graduate, classe A, da 10 e 5 ml con precisione di ± 0.05 e ± 0.03 ml, rispettivamente.
- Pipetta doppia tacca, classe A da 5 ml con precisione di ± 0.015 ml
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di calcio si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 4 mg/l di calcio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 2 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, aggiungere 50 ml della soluzione di cloruro di lantanio e portare a volume con acqua ultra pura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 7 mg/l di calcio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 3,5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l aggiungere 50 ml della soluzione di cloruro di lantanio e portare a volume con acqua ultra pura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 15 mg/l di calcio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 7,5 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l aggiungere 50 ml della soluzione di cloruro di lantanio e portare a volume con acqua ultra pura.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Saranno effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo d'interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Filtrare il campione su filtro senza ceneri. In un matraccio, classe A, da 50 ml, pipettare 5 ml del campione filtrato, 5 ml della soluzione di cloruro di lantanio e portare a volume con la soluzione 1g/l di potassio cloruro (fattore di diluizione 1/10).

PRCEDIMENTO

Si eseguono dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno effettuati tutti i test statistici per la valutazione della ripetibilità del metodo. Nel caso specifico del calcio, sono stati impiegati 6 campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-50 mg/l, 50-70 mg/l, 70-

90 mg/l, 90-100 mg/l, 100-120 mg/l, 120-140 mg/l. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state effettuate automaticamente dallo strumento, come se fossero 10 campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 3 letture a distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito). I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 29.

Tabella 29 - Risultati delle misure di ripetibilità del calcio

CONC. CALCIO (ppm)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Barbera)	(Barolo)	(Dolcetto)	(Grignolino)	(Freisa)	(Moscato)
1	40	70	81	90	110	132
2	40	73	79	90	113	129
3	39	71	79	93	111	129
4	39	72	80	92	112	131
5	39	71	82	91	110	129
6	41	73	81	91	110	130
7	40	70	81	90	112	131
8	41	72	83	93	109	130
9	40	71	80	92	110	128
10	40	71	79	90	110	129

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 30 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni del calcio

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)

CALCIO	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4		CAMP. 5		CAMP. 6	
	ppm	T_{sp}										
estremo inf.	39	1,22	70	1,30	79	1,11	90	0,98	109	1,36	128	1,46
estremo sup.	41	1,49	73	1,49	83	1,85	93	1,46	113	1,84	132	1,79

Nessun dato è risultato anomalo, solamente 3 dati si avvicinano al limite tabulato.

I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati presi dal metodo normato.

Tabella 31 - Parametri statistici calcolati per il calcio

Calcio	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Barbera)	(Barolo)	(Dolcetto)	(Grignolino)	(Freisa)	(Moscato)
X_{medio} (mg/l)	39,9	71,4	80,5	91,2	110,7	129,8
S_r	0,73786	1,07497	1,35401	1,22927	1,25167	1,22927
r (mg/l)	2,7	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
σ_r	0,97408	1,44308	1,44308	1,44308	1,44308	1,44308
R (mg/l)	5,2	10,9	10,9	10,9	10,9	10,9
σ_R	1,87600	3,93238	3,93238	3,93238	3,93238	3,93238
σ_L^2	2,57054	13,38114	13,38114	13,38114	13,38114	13,38114
S_r/σ_r	0,75750	0,74491	0,93828	0,85184	0,86736	0,85184

LEGENDA

X_{medio}	=	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	=	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	=	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	=	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	=	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	=	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	=	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 32 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per il calcio

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
S_r/σ_r	0,75750	0,74491	0,93828	0,85184	0,86736	0,85184
Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si

L'esito del test è positivo per tutte le serie di dati rilevate, anche in questo caso il metodo interno rientra nei canoni di precisione imposti dal metodo ufficiale.

5.6 Potassio^{[2] [9]}

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Il potassio è quantificato in emissione ad una lunghezza d'onda di 766,5 nm.

REATTIVI

- Soluzione std. Commerciale di K 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Spettrometro ad assorbimento atomico impostato in emissione di fiamma per la determinazione del potassio (fenditura 0.7 mn) a 766.5 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipette graduate, classe A, da 1 e 5 ml con precisione di ± 0.007 e ± 0.03 ml, rispettivamente.
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di potassio si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **1 mg/l** di potassio:* In un matraccio, classe A, da 200 ml pipettare 0,2 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l e portare a volume con acqua ultra pura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **5 mg/l** di potassio:* In un matraccio, classe A, da 200 ml pipettare 1 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, e portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione **15 mg/l** di potassio:* In un matraccio, classe A, da 200 ml pipettare 3 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l e portare a volume con acqua ultra pura.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Saranno effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo d'interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Filtrare il campione su filtro senza ceneri. In un matraccio, classe A, da 100 ml, pipettare 1 ml del campione filtrato senza ceneri e portare a volume con acqua ultrapura (fattore di diluizione 1/100).

PRCEDIMENTO

Si eseguono dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno effettuati tutti i test statistici per la valutazione ripetibilità del metodo. Nel caso specifico del potassio, sono stati impiegati 6 campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-500 mg/l, 500-1000 mg/l, 1000-1200 mg/l, 1200-1500 mg/l, 1500-1800 mg/l, 1800-2100 mg/l. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state effettuate automaticamente dallo strumento, come se fossero 10 campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 3 letture a

distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito).

I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 33.

Tabella 33 - Risultati delle misure di ripetibilità del potassio

CONC. POTASSIO (ppm)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Chardonnay)	(Dolcetto)	(Freisa)	(Grignolino)	(Barbera)	(Mosto)
1	478	872	1096	1309	1604	2090
2	472	866	1090	1305	1608	2096
3	482	879	1109	1285	1585	2107
4	479	878	1085	1291	1595	2105
5	466	870	1089	1293	1589	2093
6	471	880	1106	1310	1586	2092
7	480	875	1110	1303	1593	2076
8	485	866	1097	1289	1587	2092
9	475	885	1093	1297	1603	2101
10	470	882	1103	1296	1599	2100

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 34 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni del potassio

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)

POTASSIO	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4		CAMP. 5		CAMP. 6	
	ppm	T_{sp}										
estremo inf.	466	1,63	866	1,41	1085	1,45	1285	1,49	1585	1,20	2076	2,16
estremo sup.	485	1,53	885	1,47	1110	1,39	1310	1,42	1608	1,58	2107	1,33

Nessun dato è risultato anomalo, solamente l'estremo inferiore del sesto campione si avvicina al limite tabulato.

I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati presi dal metodo normato.

Tabella 35 - Parametri statistici calcolati per il potassio

Potassio	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Chardonnay)	(Dolcetto)	(Freisa)	(Grignolino)	(Barbera)	(Mosto)
X_{medio} (mg/l)	475,8	875,3	1097,8	1297,8	1594,9	2095,2
S_r	5,99630	6,61732	8,80404	8,61265	8,26573	8,90443
r (mg/l)	17	17	17	17	17	17
σ_r	6,13307	6,13307	6,13307	6,13307	6,13307	6,13307
R (mg/l)	66	66	66	66	66	66
σ_R	23,81074	23,81074	23,81074	23,81074	23,81074	23,81074
σ_L^2	529,33673	529,33673	529,33673	529,33673	529,33673	529,33673
S_r/σ_r	0,97770	1,07896	1,43550	1,40430	1,34773	1,45187

LEGENDA

X_{medio}	=	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	=	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	=	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	=	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	=	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	=	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	=	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 36 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per il potassio

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
S_r/σ_r	0,97770	1,07896	1,43550	1,40430	1,34773	1,45187
Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si

L'esito del test è positivo per tutte le serie di dati rilevate, anche in questo caso il metodo interno rientra nei canoni di precisione imposti dal metodo ufficiale.

5.7 Magnesio^{[2] [9]}

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Il magnesio è quantificato in assorbimento a una lunghezza d'onda di 285,2 nm.

REATTIVI

- Alcol etilico assoluto
- Acido nitrico conc. (65%)

- Soluzione std. Commerciale di Mg 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Spettrometro di assorbimento atomico corredato di apposita lampada a catodo cavo per la determinazione del magnesio (energia della lampada 20 e fenditura 0.7 nm); è la stessa lampada che viene usata nella determinazione del calcio) ed impostato a 285.2 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipetta graduata, classe A, da 1 ml con precisione di ± 0.007 .
- Pipetta doppia tacca, classe A, da 50 ml con precisione di ± 0.05
- Pipetta doppia tacca, classe A, da 10 ml con precisione di ± 0.02
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di magnesio si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **0,2 mg/l** di magnesio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 0,1 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **0,4 mg/l** di magnesio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 0,2 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **0,8 mg/l** di magnesio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 0,4 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a **1,4 mg/l** di magnesio:* In un matraccio, classe A, da 500 ml pipettare 0,7 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, 50 ml di etanolo assoluto e 10ml di acido nitrico 65%. Portare a volume con acqua ultrapura.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Saranno effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo d'interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Filtrare il campione su filtro senza ceneri. In un matraccio, classe A, da 100 ml, pipettare 1 ml del campione filtrato senza ceneri e portare a volume con acqua ultrapura (fattore di diluizione 1/100).

PRECEDIMENTO

Si eseguono dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno eseguiti tutti i test statistici per la valutazione ripetibilità del metodo. Nel caso specifico del potassio, sono stati impiegati 5 campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-70 mg/l, 70-90 mg/l, 90-100 mg/l, 100-120 mg/l, 120-150 mg/l. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state effettuate automaticamente dallo strumento, come se fossero 10 campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 3 letture a distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito).

I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 37.

Tabella 37 - Risultati delle misure di ripetibilità del magnesio

	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5
	(Dolcetto)	(Misto)	(Freisa)	(Nebbiolo)	(Barbera)
1	65	76	98	109	145
2	66	74	98	110	144
3	66	75	97	108	146
4	65	76	98	109	145
5	64	76	97	110	144
6	66	76	97	108	145
7	65	75	97	108	145
8	66	76	96	110	145
9	66	74	96	109	144
10	67	75	97	109	143

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 38 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni del magnesio

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab} = 2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)

MAGNESIO	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4		CAMP. 5	
	ppm	T_{sp}								
estremo inf.	64	1,90	74	1,58	96	1,49	108	1,22	143	1,90
estremo sup.	67	1,66	76	0,85	98	1,22	110	1,22	146	1,66

Nessun dato è risultato anomalo, solamente i due valori evidenziati in giallo si avvicinano al limite tabulato. I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati presi dal metodo normato.

Tabella 39 - Parametri statistici calcolati per il magnesio

Magnesio	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5
	(Dolcetto)	(Misto)	(Freisa)	(Nebbiolo)	(Barbera)
X_{medio} (mg/l)	65,6	75,3	97,1	109,0	144,6
S_r	0,84327	0,82327	0,73786	0,81650	0,84327
r (mg/l)	3	3	3	3	3
σ_r	1,08231	1,08231	1,08231	1,08231	1,08231
R (mg/l)	8	8	8	8	8
σ_R	2,88615	2,88615	2,88615	2,88615	2,88615
σ_L^2	7,15848	7,15848	7,15848	7,15848	7,15848
S_r/σ_r	0,77915	0,76067	0,68175	0,75440	0,77915

LEGENDA

X_{medio}	=	valore medio delle 10 ripetizioni
S_r	=	Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r	=	ripetibilità fornita dal metodo normato
σ_r	=	Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R	=	riproducibilità fornita dal metodo normato
σ_R	=	scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
σ_L^2	=	scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 40 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per il magnesio

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)					
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5
S_r/σ_r	0,77915	0,76067	0,68175	0,75440	0,77915
Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si

L'esito del test è positivo per tutte le serie di dati rilevate, anche in questo caso il metodo interno rientra nei canoni di precisione imposti dal metodo ufficiale.

5.8 Sodio^[2] [9]

L'analisi è basata sull'impiego della spettrometria atomica a fiamma. Il sodio è quantificato in assorbimento a una lunghezza d'onda di 589 nm.

REATTIVI

- Soluzione 1 g/l di potassio cloruro
- Soluzione std. Commerciale di Na 1000 mg/l

APPARECCHIATURA E ACCESSORI

- Bilancia analitica con divisioni da 0.1 mg
- Spettrofotometro di assorbimento atomico impostato in emissione di fiamma per la determinazione del sodio (fenditura 0.2 nm) 589 nm di lunghezza d'onda. I gas di alimentazione sono aria e acetilene.
- Pipette graduate, classe A, da 1, 2 e 5 ml con precisione di ± 0.007 , ± 0.01 e ± 0.03 ml, rispettivamente.
- Pipetta doppia tacca, classe A da 5ml con precisione di ± 0.015 ml
- Normale attrezzatura di laboratorio

COSTRUZIONE RETTA DI TARATURA

A partire della soluzione commerciale di magnesio si preparano le seguenti soluzioni standard:

- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 1 mg/l di sodio:* In un matraccio, classe A, da 200 ml pipettare 0,2 ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, aggiungere 0,2 g di potassio cloruro e portare a volume con acqua ultra pura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 2 mg/l di magnesio:* In un matraccio, classe A, da 200 ml pipettare 0,4ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, aggiungere 0,2 g di potassio cloruro e portare a volume con acqua ultrapura.
- *Soluzione standard di lavoro di concentrazione a 5 mg/l di sodio:* In un matraccio, classe A, da 200 ml pipettare 1ml della soluzione commerciale a 1000 mg/l, aggiungere 0,2 g di potassio cloruro e portare a volume con acqua ultrapura.

Una volta preparate le soluzioni standard, possono essere sistemate nell'auto campionatore ed è possibile impostare lo strumento perché crei automaticamente una nuova retta di taratura. Saranno effettuate cinque letture per ciascuno standard, impiegate nella costruzione della retta attraverso il metodo d'interpolazione ai minimi quadrati.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Filtrare il campione su filtro senza ceneri. In un matraccio, classe A, da 50 ml, pipettare 5 ml del campione filtrato e portare a volume con la soluzione 1g/l di potassio cloruro.

(fattore di diluizione 1/10).

PRCEDIMENTO

Si eseguono dieci misurazioni su ogni campione di vino o mosto, su cui andranno effettuati tutti i test statistici per la valutazione ripetibilità del metodo. Nel caso specifico del potassio, sono stati impiegati 6 campioni con concentrazioni comprese nei seguenti intervalli: 0-10 mg/l, 10-20 mg/l, 20-30 mg/l, 30-60 mg/l, 70-90 mg/l. Le misurazioni su ciascuno di essi sono state effettuate automaticamente dallo strumento, come se fossero 10 campioni differenti. Il tempo di attesa prima della prima lettura è di 20 secondi, vengono fatte 3 letture a distanza di 2 secondi l'una dall'altra, delle quali lo strumento fornisce la media espressa già in termini di concentrazione in mg/l. Tra un campione e l'altro la sonda passa in una soluzione di lavaggio (acido nitrico diluito).

I dati ottenuti sono rappresentati della tabella 41.

Tabella 41 - Risultati delle misure di ripetibilità del sodio

CONC. SODIO (ppm)						
	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Nebbiolo)	(Freisa)	(Dolcetto)	(Grignolino 2)	(Barbera)	(Grignolino 3)
1	7	14	26	32	49	73
2	5	12	27	33	51	73
3	7	13	26	32	50	73
4	6	12	26	34	50	74
5	7	13	26	33	51	73
6	8	12	26	32	49	73
7	8	11	26	33	50	72
8	7	12	25	32	50	73
9	6	13	27	32	49	72
10	8	12	25	32	49	72

BREVE APPROFONDIMENTO STATISTICO

E' stato in seguito applicato il test di Grubbs per individuare eventuali dati anomali. La spiegazione del test è stata trattata a pag. 18-19.

Segue la tabella dei valori dell'indice T_{sp} (sperimentale) calcolati sui valori estremi di ciascuna serie di dati.

Tabella 42 - Risultati del test di Grubbs sui valori estremi ricavati dalle determinazioni del sodio

TEST DI GRUBBS $T_{sp} < T_{tab}$ ($T_{tab}=2,29$ con $n=10$ e $P=5\%$)

SODIO	CAMP. 1		CAMP. 2		CAMP. 3		CAMP. 4		CAMP. 5		CAMP. 6	
	ppm	T_{sp}										
estremo inf.	5	1,91	11	1,66	25	1,50	32	0,71	49	1,01	72	1,26
estremo sup.	8	1,11	14	1,90	27	1,50	34	2,12	51	1,52	74	1,90

Nessun dato è risultato anomalo, nonostante alcuni si avvicinano abbastanza al limite tabulato.

I valori di r e R (limiti di ripetibilità e riproducibilità) sono stati presi dal metodo normato.

Tabella 43 - Parametri statistici calcolati per il sodio

SODIO	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
	(Nebbiolo)	(Freisa)	(Dolcetto)	(Grignolino 2)	(Barbera)	(Grignolino 3)
X_{medio} (mg/l)	6,9	12,4	26,0	32,5	49,8	72,8
S_r	0,99443	0,84327	0,66667	0,70711	0,78881	0,63246
r (mg/l)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
σ_r	0,72154	0,72154	0,72154	0,72154	0,72154	0,62516
R (mg/l)	5,3	5,7	6,8	7,3	8,7	10,5
σ_R	1,89476	2,05350	2,44601	2,63361	3,13292	3,28960
σ_L^2	3,06949	3,69623	5,46236	6,41530	9,29455	10,43064
S_r/σ_r	1,37821	1,16872	0,92395	0,98000	1,09324	1,01167

LEGENDA

X_{medio} = valore medio delle 10 ripetizioni
 S_r = Scarto tipo di ripetibilità ottenuto dal laboratorio
r= ripetibilità fornita dal metodo normato
 σ_r = Scarto tipo di ripetibilità riferito al metodo normato [$r/(1,96*\sqrt{2})$]
R= riproducibilità fornita dal metodo normato
 σ_R = scarto tipo di riproducibilità riferito al metodo normato [$R/(1,96*\sqrt{2})$]
 σ_L^2 = scarto tipo interlaboratorio [$(\sigma_R^2 - \sigma_r^2)$]

Si può procedere ora al confronto tra lo scarto tipo di ripetibilità sperimentale con quello riportato dal metodo ufficiale.

Tabella 44 - Risultati del test di dispersione dei dati (confronto tra gli scarti tipo di ripetibilità) per il sodio

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)

	CAMP. 1	CAMP. 2	CAMP. 3	CAMP. 4	CAMP. 5	CAMP. 6
S_r/σ_r	1,37821	1,16872	0,92395	0,98000	1,09324	1,01167
Si compie la verifica?	Si	Si	Si	Si	Si	Si

L'esito del test è positivo per tutte le serie di dati rilevate, anche in questo caso il metodo interno rientra nei canoni di precisione imposti dal metodo ufficiale.

6. CONCLUSIONI

Si può affermare che il metodo utilizzato per l'analisi dei metalli nei vini ha dato buoni risultati, dimostrando che è possibile seguire con il procedimento di validazione vera e propria. Infatti, quasi tutte le prove effettuate per ciascun metallo rispettano i limiti di ripetibilità e accuratezza imposti dal metodo ufficiale OIV. Fanno eccezione alcune misure del rame a regimi di concentrazione relativamente bassi ($[Cu] < 0,10 \text{ mg/l}$), che presentano un'eccessiva dispersione dei dati.

Questo fenomeno può essere provocato da molti fattori: sistema ottico usurato con necessità di manutenzione, lampada del rame in esaurimento (bassa intensità), concentrazioni molto vicine al limite di rilevabilità. Un altro fattore che influenza i risultati dei test statistici sono il numero di cifre significative fornite, per esempio vediamo come può cambiare l'esito del primo test aggiungendo un'ulteriore cifra significativa puramente inventata, ai valori del rame per il Barbera.

Procedimento attuato solo a titolo d' esempio, illustrato nelle tabelle 45-46.

Tabelle 45-46 - Illustrazione dell'effetto dell'aggiunta di una cifra significativa sull'esito del test di dispersione dei dati
2 cifr. sign. 3 cifr. sign. 2 cifr. sign. 3 cifr. sign.

	CAMP. 1A (Barbera)	CAMP. 1B (Barbera)		CAMP. 1A (Barbera)	CAMP. 1B (Barbera)
1	0,11	0,105	$X_{\text{medio}} \text{ (mg/l)}$	0,094	0,0941
2	0,09	0,094	S_r	0,01075	0,0077237
3	0,08	0,084	$r \text{ (mg/l)}$	0,015	0,015
4	0,10	0,097	σ_r	0,00541	0,00541153
5	0,09	0,089	$R \text{ (mg/l)}$	0,045	0,045
6	0,10	0,096	σ_R	0,01623	0,01623459
7	0,09	0,094	σ_L^2	0,00023	0,00507462
8	0,09	0,091	S_r/σ_r	1,98644	1,42726711
9	0,08	0,084			
10	0,11	0,107			

1° VERIFICA ($0,548 < S_r/\sigma_r < 1,454$)

	CAMP. 1A	CAMP. 1B
S_r/σ_r	1,98644	1,42728
Si compie la verifica?	No	Si

Chiaramente è possibile impostare lo strumento perché mostri tre cifre significative, ma non avrebbe senso in quanto la sensibilità di questo metodo di misura non permette rivelazioni affidabili a concentrazioni inferiori al centinaio di $\mu\text{g/l}$ ($0,1 \text{ mg/l}$).

Per giunta, lo strumento messo a disposizione dall'azienda era datato e costruito con materiali scadenti, condizioni che non garantivano una misura impeccabile.

Per le ragioni sopra elencate è stata presa in considerazione l'idea di rinnovare il parco macchine e dismettere il vecchio strumento.

Anche l'uso del vino, che presenta una matrice molto complessa e genera facilmente incrostazioni, ha bisogno di operare con particolari accortezze ed eseguire manutenzioni frequenti.

In generale posso ritenermi soddisfatto del lavoro svolto presso la Sinergo Soc. Coop. di Nizza Monferrato, in quanto è stato molto formativo, permettendomi di apprezzare le mansioni caratteristiche di un laboratorio professionale. Grazie a questa esperienza ho acquisito manualità con le strumentazioni, con le metodiche di lavoro in uso e maggior conoscenza per quanto riguarda il mondo del vino. Inoltre ho appreso l'importanza dell'analisi dei metalli, per il controllo degli elementi pesanti e tossici al fine di garantire un alimento sicuro per la salute umana.

7. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ballati L. Bonacchi G. De Martin S. Quaglino P. Tenaglia H. Venturini E. Raffaelli R. *“Linee guida per la validazione dei metodi analitici e per il calcolo dell’incertezza di misura. Accredimento e certificazione”*, Arpa Agenzia Regionale Prevenzione e Ambiente dell’Emilia-Romagna, 2002.
- [2] *Materiale fornito dal Laboratorio Sinergo Soc. Coop. di Nizza Monferrato.*
- [3] Eccli E. Kobler A. *“Rame e Vino”*, Centro di Sperimentazione Agraria di Laimburg, **Frutta e vite**, 02/2008.
- [4] Matteo Marengi *“Il problema dei metalli pesanti”*, **VigneVini**, 7/8 2005.
- [5] Vainer Salati *“Atomi, molecole e vino”*, [S.l. : s.n.], stampa 1999 (Asti : Tipolitografia Della Rovere).
- [6] Cappelli P. Vanucci V. *“Chimica degli alimenti, conservazione e trasformazione”*, Zanichelli 2005.
- [7] Ebdon L. Evans E. H. Fisher A. Hill S. J. *“An introduction to analytical atomic spectrometry”* Willey & Sons, 1998.
- [8] Tranter G. Holmes J. Lindon J. *“Encyclopedia of Spettroscopy and Spectrometry”*, Elsevier 2000.
- [9] *COMPENDIUM OF INTERNATIONAL METHODS OF ANALYSIS - OIV*