

CHIMICA ANALITICA

INTRODUZIONE ALLA CHIMICA ANALITICA

Il **campionamento** è il processo attraverso il quale si ottiene un campione omogeneo, rappresentativo del sistema da studiare, sufficientemente piccolo da essere analizzato in laboratorio. I **criteri generali del campionamento** sono: la quantità, il numero, i punti di raccolta, la rappresentatività ovvero non deve essere eterogeneo, stabilità ovvero deve mantenere le sue caratteristiche costanti fino al momento dell'analisi.

La preparazione o trattamento del campione avviene in diverse fasi che sono: la diluizione, l'essiccamento, la frantumazione e la macinazione, l'estrazione, la filtrazione per gravità che separa filtrato da precipitato, eliminazione delle interferenze, che può avvenire o tramite agente mascherante, il quale lega chimicamente un'interferenza ed evita che essa provochi errori nell'analisi (es. solfato di sodio anidro) o tramite separazione meccanica, dove le specie interferenti vengono separate in seguito alla loro diversa distribuzione in fasi differenti (es. distillazione e cromatografia).

Spesso il campione viene suddiviso in porzioni dette **aliquote** per poter ripetere e controllare le analisi

ACCURATEZZA E PRECISIONE

- **Media aritmetica:** è un indice di tendenza centrale, ovvero quantità statistiche fondamentali per la stima del valore centrale dei dati
- **Mediana:** il valore che divide in 2 parti uguale un insieme di dati ordinati

Con x si indica il valore misurato di una singola replica, μ si indica il valore vero di riferimento

Errore: $\epsilon = x - \mu$

Relazione tra x e μ : $x = \mu + \Delta + \delta + G + f(p_1, p_2 \dots)$ dove delta grande indica l'errore sistematico (bias), delta piccolo l'errore casuale, G l'errore grossolano, f la mancanza di Controllo (drift).

L'errore sistematico è un errore riproducibile, che si ripresenta sempre nello stesso modo (con stesso ordine di grandezza e stesso segno), è possibile individuarlo ed eliminarlo. **Indica l'accuratezza**

L'errore casuale non si presenta sempre nello stesso modo, non è possibile individuarlo ed eliminarlo, è sempre presente ma è possibile minimizzarlo. **Indica la precisione.**

La **Mancanza di Controllo** è data da errori come le condizioni ambientali del laboratorio che hanno effetto sulla misurazione; sono eliminabili.

L'errore grossolano è dato da errori grandi ed evidenti, quindi eliminabili (es. errori nelle conversioni delle unità di misura)

La precisione (δ) rappresenta l'accordo tra misure ripetute della stessa grandezza effettuate nelle stesse condizioni. La precisione di una misura dipende dagli errori casuali

L'accuratezza (Δ) rappresenta l'accordo tra il valore misurato e il valore vero della grandezza misurata. L'accuratezza di una misura dipende principalmente da errori sistematici.

$$\epsilon = \Delta + \delta$$

Errore assoluto per misure replicate $\epsilon_{\text{ass}} = \bar{x} - \mu$

per una singola misura $\epsilon_{\text{ass}} = x - \mu$

$$\text{Errore relativo } \epsilon_{\text{rel}} = \frac{\text{errore ass.}}{\mu} \times 100$$

Gli errori sistematici sono causati da:

- **Errori strumentali:** dovuti a inesatta calibrazione o utilizzazione impropria della vetreria
- **Errori di metodo:** dovuti a un comportamento non ideale di reattivi e reazioni, o all'uso di condizioni sperimentali non idonee (es. composti più o meno solubili del solito)
- **Errori personali:** dovuti a distrazione o non conoscenza della corretta procedura (es. bolle d'aria nella buretta)

Gli errori sistematici possono inoltre essere:

- **Costanti** se non variano al variare della quantità di campione in analisi
- **Proporzionali** se variano al variare della quantità del campione

Gli errori casuali seguono una distribuzione gaussiana, è possibile stimare i parametri statistici che descrivono la distribuzione calcolando **indici di dispersione**. Essi possono essere minimizzati replicando le misurazioni (**effetto compensazione**)

$$\text{Intervallo (R): } R = x_{\text{max}} - x_{\text{min}}$$

$$\text{Semidispersione massima: } d = \frac{x_{\text{max}} - x_{\text{min}}}{2}$$

Deviazione standard: misura che quantifica la quantità di dispersione delle osservazioni in una serie di dati

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n}}$$

Varianza: misura la tendenza delle repliche a distribuirsi intorno alla media

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

Tanto più varianza e deviazione standard sono piccole, tanto più le repliche si raggruppano attorno alla media e quindi tanto è più preciso il mio risultato.

Coefficiente di variazione (o deviazione standard relativa): è un indice di dispersione che permette di confrontare misure di fenomeni riferite a unità di misura differenti, si tratta di una grandezza adimensionale. Il suo valore varia da 0 a +1. Vale 0 solo nel caso in cui anche la deviazione standard sia 0 (raramente). Più il valore si allontana da 0, minore sarà l'attendibilità della media.

$$\text{CV\%} = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

Deviazione standard della media (o errore standard): è la deviazione standard che corrisponde a più medie

$$s_m = \sqrt{\frac{s^2}{n}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Deviazione standard cumulata

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

INTERVALLI DI FIDUCIA

Gli intervalli di fiducia rappresentano un'altra modalità per esprimere l'incertezza (precisione) del risultato. Per definirli vengono introdotti concetti sulla distribuzione di probabilità.

La **distribuzione Gaussiana** è la distribuzione della probabilità di un fenomeno statistico intorno alla media:

- la probabilità più elevata coincide con il valore medio centrale e decresce spostandosi a destra o a sinistra
- allontanandosi dalla media la curva si avvicina sempre più alle ascisse senza mai toccarlo
- l'area complessiva sotto la curva è uguale a 1 perché comprende tutte le probabilità del fenomeno

La **distribuzione normale standard** è un caso specifico che si ottiene quando la media è uguale a zero, ovvero $\mu = 0$, e la deviazione standard è uguale a 1, ovvero $\sigma = 1$. In questo caso la curva della distribuzione è centrata intorno al valore 0. Qualsiasi distribuzione gaussiana può essere convertita in una distribuzione normale standard tramite l'equazione: $z = \frac{x - \mu}{\sigma}$

Per stime ottenute da poche ripetizioni, si approssima la distribuzione normale standard con la **distribuzione t di Student**: esso ha lo scopo di verificare se il valore medio di una distribuzione si discosta significativamente da un certo valore di riferimento. Differisce dal test z per il fatto che la varianza è sconosciuta

$$t = \frac{x - \mu}{s}$$

Determinare il valore vero (μ) della grandezza misurata è impossibile (richiederebbe infinite misurazioni): possiamo però stabilire un intervallo intorno alla media sperimentale all'interno del quale si prevede che si trovi μ (con una certa probabilità). Tale intervallo si chiama **intervallo di fiducia (confidenza)**.

Il **livello di fiducia (confidenza)** è la probabilità che il valore vero della grandezza misurata sia incluso nell'intervallo $-z$ e $+z$. Quest'ultimo si esprime come $1 - \alpha$, dove α indica il **livello di significatività**, ovvero la probabilità che un risultato cada al di fuori dell'intervallo di fiducia.

Intervallo di confidenza = $\bar{x} \pm t \times s_m$ dove t si calcola allo stesso modo di t_{crit} .

All'aumentare del **livello di fiducia** aumenta l'intervallo di confidenza. Inoltre aumentando il numero di misurazioni replicate si riesce a ridurre il grado di incertezza, ovvero, maggiore è il **grado di libertà** minore è il valore della t_{crit} .

Per numeri di repliche molto molto elevati, la distribuzione t di Student tende alla distribuzione normale standard e quindi per calcolare l'intervallo di confidenza possiamo utilizzare la formula:

$$\bar{x} \pm z_p \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

dove z_p è sempre un valore tabellato, ma in questo caso per il suo valore non è necessario il grado di libertà ma solamente il livello di fiducia o di significatività.

CIFRE SIGNIFICATIVE

Il numero di cifre significative è il numero minimo di cifre necessario per esprimere una misura, senza comprometterne la precisione. All'ultima cifra significativa è assegnata l'incertezza.

valore misurato = 32.26

↓

32.26 (± 0.01)

prima cifra incerta

Le cifre significative sono quindi tutte le cifre certe più la prima cifra incerta, ovvero la cifra su cui cade l'incertezza sperimentale.

- Gli *zeri* all'inizio del numero non sono mai cifre significative in quanto determinano solamente la posizione della virgola decimale
- Gli *zeri* sono significativi solo se:
 - si trovano nel numero tra due cifre significative;
 - si trovano alla fine del numero e a destra della virgola decimale

Più è alto il numero di cifre significative, più alta è la precisione del dato.

Come riportare un risultato sperimentale: **media (± incertezza assoluta)**

L'incertezza può essere stimata con la deviazione standard, deviazione standard della media o intervallo di confidenza.

Si può non riportare l'incertezza se si esprime il risultato con il corretto numero di cifre significative. In questo caso per convenzione si assume l'incertezza (±1) sull'ultima cifra significativa.

- Incertezza assoluta e risultato devono terminare nella stessa cifra decimale, la prima cifra dell'incertezza individua l'ultima cifra significativa del risultato
- La prima cifra dell'incertezza individua l'ultima cifra significativa del risultato

$$23.744 (\pm 0.023) \Rightarrow 23.74 (\pm 0.02)$$

$$2374 (\pm 23) \Rightarrow 2.37 (\pm 0.02) \times 10^3$$

Arrotondamenti

quando si sopprime una cifra in quanto non significativa, la cifra precedente deve essere:

- aumentata di 1 se la cifra eliminata è maggiore di 5

- deve essere lasciata inalterata se la cifra eliminata è minore di 5
- se la cifra soppressa è uguale a 5, arrotondare alla cifra pari più vicina

Solo sul risultato finale, non sui calcoli intermedi!

Nelle operazioni di addizione/sottrazione, dopo aver espresso tutti i numeri con lo stesso esponente, il risultato deve avere tante **cifre decimali** quante il numero che ha meno cifre decimali.

Nelle operazioni di moltiplicazione/divisione il risultato deve avere tante **cifre significative** quante il numero che contiene meno cifre significative

Propagazione dell'incertezza

Calcolo	Esempio	s_y
addizione/sottrazione	$y = a + b - c$	$s_y = \sqrt{s_a^2 + s_b^2 + s_c^2}$
moltiplicazione/divisione	$y = a \cdot b / c$	$s_y = y \cdot \sqrt{\left(\frac{s_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{s_b}{b}\right)^2 + \left(\frac{s_c}{c}\right)^2}$
esponenziale	$y = a^\lambda$	$s_y = y \cdot \lambda \cdot \frac{s_a}{a}$
logaritmo	$y = \log_{10} a$	$s_y = 0.434 \cdot \frac{s_a}{a}$

Taratura

Procedimento attraverso il quale si ottiene una buona stima del valore vero della misura fornita da uno strumento. Con essa eliminiamo l'errore sistematico.

TEST STATISTICI

I test statistici sono strumenti ideati per verificare ipotesi di lavoro e per assegnare un valore di probabilità ai risultati. Grazie ad essi per esempio possiamo andare a verificare se esiste una **differenza statisticamente significativa** tra due serie di dati provenienti da due campioni differenti ma che riguardano lo stesso argomento.

Un test statistico implica sempre la formulazione di:

- **Ipotesi nulla H0**: è l'ipotesi di indifferenza statistica, è quella da verificare, le differenze osservate sono dovute solamente ad errori casuali. E' accettata da una probabilità di $1-\alpha$. E' verificata se le due serie di dati non hanno una differenza statisticamente significativa.
- **Ipotesi alternativa H1**: è l'ipotesi di significatività statistica delle differenze osservate. E' accettata quando l'ipotesi nulla viene rifiutata ad un livello di significatività α . E' verificata se le due serie di dati hanno una differenza statisticamente significativa.

Regola di decisione: se il valore calcolato è maggiore del valore critico allora rifiuto l'ipotesi H0 e accetto H1

Test t Student per l'accuratezza (confronto con valore noto e confronto di medie)

- H0: \bar{x} è statisticamente uguale ad un valore noto μ , $\bar{x} = \mu$
- H1: \bar{x} è significativamente diversa da un valore noto μ , $\bar{x} \neq \mu$
- H0: le 2 medie sono statisticamente uguali, $\bar{x}_1 = \bar{x}_2$
- H1: le 2 medie sono significativamente diverse, $\bar{x}_1 \neq \bar{x}_2$

Nel caso in cui voglio confrontare una media sperimentale (\bar{x}) con un valore noto (μ):

$$t_{calc} = \frac{\bar{x} - \mu}{s_m}$$

dove s_m è la deviazione standard della media

Se $t_{calc} > t_{crit}$, allora rigetto H0 al livello di significatività α . Il t_{crit} è il valore critico di student a seconda della percentuale di significatività (è tabellato). $v = n-1$

Nel caso in cui voglio confrontare 2 medie sperimentali:

$$t_{calc} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_d}$$

dove s_d è la deviazione standard della differenza tra le medie.

Nel caso in cui le due varianze siano diverse (secondo il test di fisher) allora uso la seguente formula:

$$s_d = \sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}$$

e i gradi di libertà ce li dice excel

Altrimenti uso:

$$s_d = s_p \cdot \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}$$

e i gradi di libertà sono uguali a n_1+n_2-2

Nel caso in cui le misure ottenute su ciascun campione sono a coppie, bisogna utilizzare il **test T per dati accoppiati**, in cui la deviazione standard è sostituita dalla deviazione standard della differenza tra le coppie di dati:

$$t_{calc} = \frac{\bar{d} - 0}{s / \sqrt{n}} \quad d.f. = n - 1$$

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^n d_i}{n}$$

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

Test F per la precisione (confronto di varianze)

H0: le 2 varianze sono statisticamente uguali, $s_1^2 = s_2^2$

H1: le 2 varianze sono significativamente diverse, $s_1^2 > s_2^2$

Il test F di Fisher viene utilizzato per valutare la precisione di due serie di dati, è quindi un confronto tra varianze. Più precisamente viene effettuato calcolando il rapporto tra le due varianze:

$$F_{calc} = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad s_1^2 > s_2^2$$

Se $F_{calc} > F_{crit}$ H0 viene rifiutata e accettata H1. Anche in questo caso F_{crit} è un valore tabellato a seconda della percentuale di significatività dove $v = n_1 + n_2 - 2$.

Riassumendo posso dire che per esempio in due serie di dati, presi da due campioni differenti, entrambi riguardanti la concentrazione di ferro se:

- $T_{calc} > t_{crit}$ la concentrazione di ferro è significativamente diversa nei due punti di campionamento, o viceversa **non** è significativamente diversa nei due punti di campionamento
- $F_{calc} > F_{crit}$ la variabilità della concentrazione di ferro è significativamente diversa nei due punti di campionamento, o viceversa **non** è significativamente diversa nei due punti di campionamento

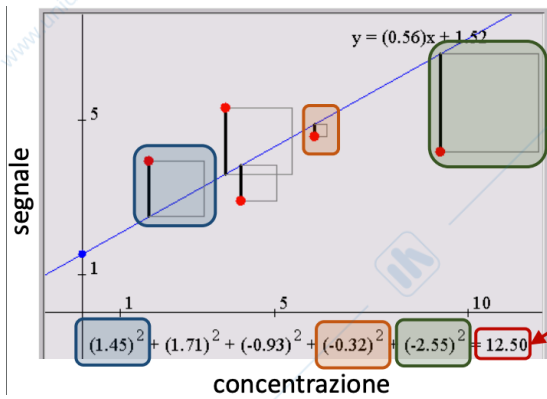
TEORIA DELLA CALIBRAZIONE

La calibrazione in chimica analitica è l'operazione che determina la relazione univoca e riproducibile tra la quantità fisica misurata (y) e le quantità chimiche di interesse (x), che caratterizzano i tipi di analita.

$$y(\pm s_y) = m(\pm s_m) \cdot x + q(\pm s_q) \quad \rightarrow \quad x(\pm s_x) = \frac{y(\pm s_y) - q(\pm s_q)}{m(\pm s_m)}$$

dove m è la **pendenza**, q l'**intercetta** (stima dell'errore sistematico) e x è la concentrazione del campione incognito.

Per la costruzione della retta esistono algoritmi automatici, ma è possibile immaginarsi che più l'unione dei punti formi una retta precisa più i nostri dati sperimentali saranno precisi (non sarà mai una retta perfetta). Questi algoritmi automatici utilizzano il **metodo dei Minimi Quadrati** che calcola le differenze tra segnale sperimentale e quello stimato dal modello. Questo metodo assume che sulle concentrazioni degli standard (ascisse) non ci siano errori, o meglio, minimizza i quadrati dei residui dei punti rispetto alla retta. **RSS = 12.50**



$$RSS = \sum_{i=1}^n r_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2$$

dove \hat{y} è la distanza del segnale dalla retta.

Dal punto di vista sperimentale significa che nella preparazione degli standard bisogna minimizzare il più possibile gli errori.

Per calcolare i parametri della retta di calibrazione:

$$m = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

$$q = \bar{y} - m \cdot \bar{x}$$

in cui

$$S_{yy} = \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \approx \text{var}(y)$$

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \approx \text{var}(x)$$

$$S_{xy} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) \approx \text{cov}(x, y)$$

dove la x indica la concentrazione dello standard e y il segnale.

Il **coefficiente di determinazione R^2** ci permette di valutare la qualità della retta di calibrazione

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (r_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}$$

Al numeratore abbiamo la somma dei quadrati dei residui che abbiamo accennato prima (RSS) mentre denominatore abbiamo il **TSS** (che è uguale al S_{yy}) che è il fattore di normalizzazione. R^2 è compreso tra 0 e 1, se è = 1 la retta è perfetta, se è = 0 la x non è in grado di spiegare l'andamento della y.

Nel caso vi sia la presenza di dati anomali, per esempio un punto che si discosta di molto dalla retta è possibile eliminarlo.

La **sensibilità** è definita come la variazione del segnale (y) per unità di variazione della concentrazione di analita (x) ed equivale a:

$$\text{sensibilità} = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

in questo caso nella retta $y = mx + q$, y è il segnale, m è la sensibilità, x la concentrazione e q è il segnale del bianco.

Una stima dell'errore casuale da una retta di calibrazione l'abbiamo con l'errore standard della stima:

$$s_y = \sqrt{\frac{RSS}{n-2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

$$s_q = s_y \cdot \sqrt{\frac{1}{n - \left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2 / \sum_{i=1}^n x_i^2}}$$

$$s_m = \frac{s_y}{\sqrt{S_{xx}}}$$

dove s_y è l'incertezza del segnale misura, s_m è l'incertezza della pendenza e s_q è l'incertezza dell'intercetta.

Se noi riprendiamo le due equazioni di inizio capitolo, notiamo che nella prima la x non è associata ad un'incertezza perché essendo la concentrazione degli standard che io ho preparato, assumiamo non essere affetta di errore. A destra la x rappresenta la concentrazione del campione incognito che viene stimata dalla retta di calibrazione, e per questo è associata ad un'incertezza s_x .

Quest'ultima è chiamata incertezza della predizione inversa, la quale non si può calcolare tramite le regole della propagazione dell'incertezza perché quel metodo è applicabile nel caso in cui le grandezze sono tra loro indipendenti, ma si calcola come:

$$s_x = \frac{s_y}{|m|} \cdot \sqrt{\frac{1}{r} + \frac{1}{n} + \frac{(\bar{y}_c - \bar{y})^2}{m^2 \cdot S_{xx}}}$$

dove r è il numero di repliche di incognito, n è il numero di standard, y_c è il segnale medio incognito e y è il segnale medio standard.

Il motivo per il quale si aggiungono anche i bianchi nella retta di calibrazione è perché così aumentano i punti della retta e nella formula s_x , $1/n$ è più piccolo e di conseguenza anche s_x sarà più piccolo.

METODI DI CALIBRAZIONE

Tra i metodi di calibrazione abbiamo la calibrazione mediante **standard esterno**:

1. si prepara una soluzione madre a concentrazione accuratamente nota dell'analita
2. si preparano gli standard diluendo la soluzione madre in matracci tarati, è importante che l'intervallo delle concentrazioni degli standard includa la concentrazione del campione incognito
3. si prepara il bianco che si suddivide in:
 - **bianco ideale** che è identico al campione ma senza analita
 - **bianco del solvente** che contiene lo stesso solvente in cui è disciolto il campione
 - **bianco del reagente** che contiene il solvente più tutti i reagenti
 - **bianco del metodo** che è sottoposto a tutti i trattamenti del campione
4. si effettuano le misurazioni del segnale per ogni standard e per il bianco
5. si sottrae il segnale del bianco ai segnali degli standard
6. si costruisce la retta di calibrazione

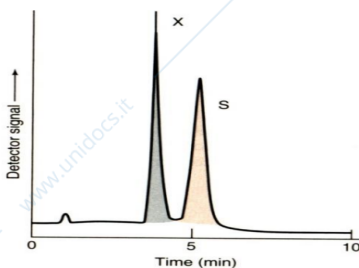
Nonostante la correzione del segnale con il bianco, ci possono essere errori:

- un esempio di **errore sistematico proporzionale** può derivare dal fatto che noi abbiamo pesato 20ppm di analita, ma poi effettivamente nel trasferimento perdiamo qualche ppm e quindi la soluzione madre non sarà precisamente di 20ppm, anche se questo è il valore che

a cui noi ci riferiamo perché è quello che abbiamo pesato. Questo porta poi a un conseguente errore nella stima di concentrazione dell'incognito, e quindi avremo una variazione della pendenza della retta di calibrazione.

- un altro errore sistematico avviene per l'uso della buretta (**errore costante**), l'effetto è una modificazione della intercetta della retta con conseguente errore nella stima di concentrazione del campione incognito.

Un altro metodo di calibrazione è quello mediante **standard interno**. Per standard interno si intende una specie con proprietà chimiche e fisiche simili all'analita, assente nel campione da analizzare. Questo metodo consente di ottenere la massima precisione in un'analisi quantitativa.



Nel grafico della Gascromatografia è rappresentato il segnale dato dal Gascromatografo, questo segnale si chiama cromatogramma. Sull'asse delle x abbiamo il tempo mentre su quello delle y il detector signal, ovvero un segnale che è proporzionale alla quantità di un certo analita. Noi abbiamo una miscela che entra nel gascromatografo, il quale è in grado di separare i componenti della miscela in funzione delle loro affinità con le componenti dello strumento. Dopo un lasso di tempo compare un picco, relativo all'idrocarburo ad esempio, dovuto al fatto che lo strumento ha separato il primo componente della miscela. L'area di questo picco è proporzionale alla concentrazione dell'analita in quella miscela. Il secondo picco è relativo allo standard interno e la sua area ci può dare una stima della sua concentrazione in quella miscela. Quindi noi prepariamo 5 standard a concentrazione nota dell'analita, a questi standard aggiungiamo però sempre la stessa quantità di standard interno che sappiamo essere assente nel nostro campione incognito. Dopodiché misuriamo ogni standard con lo strumento. Ci aspetteremmo che il picco dello standard interno sia uguale per ogni standard ma questo non avviene perché la cromatografia distribuisce dei segnali che non sono riproducibili, ovvero che non vi è accordo tra i risultati di misurazioni successive dello stesso, condotte in condizioni di misurazione diverse. Il rapporto dei segnali dell'analita e dello standard interno viene usato come risposta (Y) nella calibrazione.

Gli **effetti matrice** sono variazioni del segnale indotte da tutto ciò che è presente nel campione, escluso l'analita. Per verificare la presenza di effetti matrice si può confrontare la pendenza delle rette di calibrazione ottenute con una serie di standard operando in due solventi diversi. Se l'intercetta delle 2 rette è praticamente zero e le 2 pendenze non differiscono per più del 5% si può affermare che non esistono effetti matrice.

Quando si ha un significativo effetto matrice viene utilizzato il metodo dell'aggiunta standard il quale può essere singolo o multiplo.

Nel **metodo dell'aggiunta singola** ad un'aliquota V_x di campione a concentrazione incognita c_x si aggiunge un volume V_s di soluzione standard a concentrazione molare nota c_s . Si misura il segnale prima e dopo l'aggiunta.

$$\frac{c_x}{c'_x + c'_s} = \frac{S_I}{S_F}$$

$$c'_x = \frac{V_x c_x}{V_t}$$

$$c'_s = \frac{V_s c_s}{V_t}$$

dove c'_x e c'_s sono rispettivamente le concentrazioni nella soluzione finale dell'incognito e dello standard, S_I è il segnale iniziale del campione incognito e S_F è il segnale finale.

Per esempio nella determinazione dello ione sodio, abbiamo un campione di tot ml con concentrazione di Na^+ incognita che produce un segnale di 4 mv, al campione vengono aggiunti 5ml di NaCl 2.08 M e questa volta produce un segnale di 7mV. Utilizzando la formula blu soprastante riesco a calcolare c_x .

Nel **metodo delle aggiunte multiple** vengono preparate aliquote identiche V_x del campione a concentrazione molare incognita c_x , si aggiunge un volume variabile V_s a concentrazione molare nota a ciascuna aliquota incognita, si diluiscono tutte le aliquote a un volume totale uguale e infine si effettuano le misure del segnale per ogni campione.

Siccome so che il segnale è proporzionale alla concentrazione di analita posso riscrivere la formula in questo modo

$$S_{tot} = S_x + S_s = m'c'_x + m'c'_s$$

$$c'_s = \frac{V_s c_s}{V_t} \quad k = \frac{m'}{V_t}$$

dove m' indica la variazione della pendenza dopo l'aggiunta dell'incognito

allora:

$$S_{tot} = kV_x c_x + kV_s c_s$$

si ricava la retta di calibrazione tramite la formula: $S_{tot} = mV_s + q$, dove $m = kc_s$ e $q = kV_x c_x$

VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO

Una volta sviluppato un metodo, c'è bisogno che questo venga validato, cioè che sia in grado fornire le informazioni che io mi aspettavo di ottenere. Consiste quindi in una serie di procedure che vengono adottate affinché i risultati ottenuti siano adeguati agli scopi e che quindi ci assicurano di dare una risposta accurata e precisa.

La **ripetibilità** è la precisione stimata con esperimenti replicati sullo stesso campione effettuati dallo stesso operatore.

La **riproducibilità** è la precisione stimata con esperimenti effettuati da operatori diversi.

La media delle varianze di p laboratori è chiamata **varianza di ripetibilità** s_r^2 (intra-laboratorio)

$$s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p s_i^2}{p}$$

La **varianza di inter-laboratorio** s_L^2 è definita come:

$$s_L^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{(p-1)} - \frac{s_r^2}{2}$$

dove \bar{x} medio è la media tra tutte le misure di tutti i laboratori.

La **varianza di riproducibilità** s_R^2 è definita come la somma delle due varianze appena descritte. I valori critici (limiti) di ripetibilità (r) e riproducibilità (R), ovvero quei valori al di sotto del quale io mi aspetto di trovare la differenza tra due misurazioni replicate con una certa probabilità in condizioni di ripetibilità o riproducibilità, sono definiti come:

$$r = f\sqrt{2} s_r$$

$R = f\sqrt{2} s_R$, dove f è la t_{crit} di student che corrisponde al 95% di confidenza, $\sqrt{2}$ è dovuta al fatto che r e R si riferiscono alla differenza tra 2 singole repliche (misure in duplicato)

Il **dato anomalo** è un risultato isolato che sembra essere esterno all'intervallo degli errori casuali forniti da una procedura. Per eliminarli si ricorre al test di Cochran o al test di Dixon.

Il **test di Cochran** mette in evidenza il laboratorio le cui misure duplicate hanno differenze troppo alte

$$C = \frac{d_{\text{max}}^2}{\sum_{i=1}^p d_i^2}$$

dove d_{max} è la differenza più grande tra tutte le misure duplicate, d_i le differenze delle repliche dell' i -esimo laboratorio. Il valore di C ottenuto viene confrontato con i valori critici al 1% e 5% delle tabelle di Cochran per un numero di gradi di libertà pari al numero di misure duplicate.

Se il valore di C è minore del valore critico al 5% questo significa che la differenza tra le 2 misure ripetute del lab con la d_{max}^2 non è significativamente maggiore delle differenze riscontrate negli altri laboratori.

Il **test di Dixon** viene utilizzato per determinare se una misura estrema è significativamente diversa dalle altre. Può essere applicato su misure singole o medie provenienti da diversi laboratori. Per effettuare questo test le misure devono essere ordinate in ordine crescente. Q = valore più grande tra:

$$Q = \frac{d_1}{w} = \frac{x_2 - x_1}{x_p - x_1}$$

Se $Q > Q_{\text{CRIT}}$ allora il dato anomalo sarà rigettato al livello di fiducia specificato e si proseguirà in modo iterativo sui dati rimanenti.

Il Q critico dipende dal livello di fiducia e dal numero di repliche.

Il metodo più comune per valutare l'accuratezza quando non è disponibile un materiale di riferimento standard, o la matrice del campione non è riproducibile, è il **test di recupero**, il quale è in grado di valutare la presenza di effetti matrice.

$$R\% = \frac{(C_f - C_i)}{C_n} \cdot 100$$

dove C_i è la concentrazione dell'incognito, C_n è la concentrazione nota e C_f è la concentrazione finale dopo l'aggiunta di C_n .

Indicativamente se il valore del recupero percentuale è compreso tra 95-105% si può affermare che non esistono apprezzabili effetti matrice nell'intervallo di concentrazione considerato.

Una caratteristica importante del metodo analitico è la più piccola concentrazione di analita che può essere definita tramite i limiti di rivelabilità e di quantificazione (**LOD**, **LOQ**). Queste stime vengono fatte misurando il segnale di bianchi del campione replicati dal quale otteniamo la media del segnale (\bar{y}_{bianco}) e la deviazione standard (s_{bianco}).

Il limite di rivelabilità LOD è la più piccola quantità di analita che fornisce un segnale significativamente differente dal segnale bianco.

$$y_{\text{LOD}} = \bar{y}_{\text{bianco}} + 3 \cdot s_{\text{bianco}}$$

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_{\text{bianco}}}{m}$$

Il limite di quantificazione LOQ è la più piccola quantità di analita misurabile con un'accuratezza ragionevole

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_{\text{bianco}}}{m}$$

La sensibilità m di calibrazione è la pendenza della retta di calibrazione alla concentrazione di interesse

$$m = \frac{S - S_{BL}}{C}$$

Robustezza: capacità di un metodo analitico di non essere influenzato da variazioni come pH, temperatura ecc.

Limite e intervallo di linearità: intervallo di concentrazione di analita per il quale la risposta strumentale è direttamente proporzionale alla concentrazione.

ANALISI DELLA VARIANZA ANOVA

Anova è uno strumento che ci permette di confrontare più medie sperimentali di una certa risposta analitica, ottenute con differenti livelli di un fattore di analisi.

H_0 in questo caso ci dice che le medie tra di loro sono tutte confrontabili, non c'è una differenza significativa.

H_1 dice che almeno 2 medie sono diverse tra loro.

In una serie di dati in cui ogni operatore ha trovato 3 dati, la variazione (varianza) all'interno dei gruppi è detta **within** mentre la variazione (varianza) tra i gruppi è detta **between**, ottenuta dopo aver fatto la media dei 3 dati di ciascun operatore. Quando H_0 è vera, la variazione tra between è

simile a within, quando H_0 è falsa, la variazione between è maggiore della variazione within e quindi in questo caso ci sono almeno 2 medie che sono diverse tra loro.

La **grande media** (\bar{y}) è la media di tutte le repliche di tutti gli operatori.

Varianza Between (tra gruppi):

$$MS_B = \frac{\sum_{i=1}^L n_i \cdot (\bar{y}_i - \bar{y})^2}{L-1}$$

dove L è il numero di gruppi e il denominatore (cerchiato

in rosso prende il nome di SS_{between} ed è la somma dei quadrati dovuti al fattore.

Varianza Within (nei gruppi):

$$MS_W = s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^L (n_i - 1) s_i^2}{n - L}$$

dove n è il numero totale di repliche e il denominatore

prende il nome di SS_{within} , ovvero la somma dei quadrati dovuti agli errori.

Varianza totale: $MS_{\text{TOT}} = \frac{SS_{\text{bet}} + SS_{\text{wit}}}{n-1} = \frac{SSTOT}{n-1}$, dove SS_{TOT} è la somma totale dei quadrati.

$$F_{\text{calc}} = \frac{MS_B}{MS_W}$$

Se F_{calc} è maggiore di F_{crit} , scartiamo H_0

SPETTROSCOPIA

La spettroscopia è una tecnica analitica che ci permette di studiare la materia sfruttando le sue interazioni con la radiazione elettromagnetica (vedi capitolo di chimica sulle radiazioni elettromagnetiche con relative equazioni).

Fenomeno di assorbimento: quando inseriamo la cuvetta nello spettrofotometro questo invia una radiazione monocromatica (P_0), ovvero data da una sola lunghezza d'onda. In questo modo il nostro campione assorbe parte dell'energia e passa dallo stato fondamentale ad uno stato eccitato, l'altra parte di energia (P) viene trasmessa dal nostro campione ed è possibile misurarne il potere radiante. La relazione tra P e P_0 è proporzionale alla concentrazione.

Lo spettrofotometro non misura mai P_0 ma misura P , potere radiante trasmesso dal nostro campione, e lo rapporta con il potere radiante del bianco che diventa il nostro P_0 .

Nel **fenomeno di emissione** abbiamo sempre assorbimento e trasmissione di P , ma in questo caso l'analita nel passare dallo stato eccitato allo stato fondamentale emette a sua volta dei suoi fotoni

$$\text{Trasmittanza } T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Assorbanza } A = -\log_{10}(T) = \log_{10}\left(\frac{P_0}{P}\right)$$

L'assorbanza è la quantità di radiazione che viene assorbita. Entrambe non hanno unità di misura

Legge di Lambert-Beer: relaziona in modo lineare la concentrazione e l'assorbanza

$$A = \epsilon bc$$

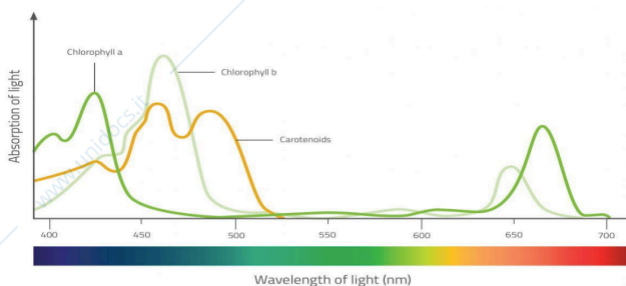
dove b è il cammino ottico cioè lo spessore della soluzione, c è la concentrazione ed ϵ è l'assorbività, cioè la capacità dell'analita di assorbire radiazioni.

Specifiche e limitazioni alla legge di Lambert-Beer:

- la radiazione è monocromatica e quindi misuro l'assorbanza ad una determinata lunghezza d'onda. Per questo motivo andiamo a chiudere lo sportello durante la misurazione, altrimenti la luce ambientale entrerebbe nello spettrofotometro (stray light) e non avremo più un'unica lunghezza d'onda.
- le soluzioni sono diluite, in quanto a concentrazioni superiori a 0.01 M abbiamo una deviazione della linearità a causa dell'interazioni delle molecole che modificano l'assorbività e quindi l'assorbanza. Tendenzialmente si lavora su soluzioni 0.0001 M
- non vi deve essere la presenza di elettroliti e deviazioni chimiche i quali creano interazioni che vanno in conflitto con l'assorbività.
- la cuvetta usata per i bianchi deve essere la stessa utilizzata per gli standard, altrimenti aggiungiamo un errore sistematico alla legge
- per miscele di composti, l'assorbanza totale della soluzione è additiva

SCelta DELLA LUNGHEZZA D'ONDA

La scelta della lunghezza d'onda viene fatta in base agli spettri di assorbimento, ovvero curve ottenute da un diagramma in cui vi è l'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda, che si possono ottenere misurando il segnale di uno standard. Queste curve variano da sostanza a sostanza e presentano dei massimi caratteristici in corrispondenza di alcune lunghezze d'onda. Nell'analisi quantitativa lo spettro è essenziale per la scelta della lunghezza d'onda più appropriata da utilizzare. Questa viene scelta in modo che: l'assorbimento sia massimo, perché più è alto più è possibile rilevare quantità piccole di sostanza e quindi per motivi di sensibilità; sia il centro di un picco largo, in modo che piccole variazioni di lunghezza d'onda comportino errori minimi sulla misura dell'assorbanza e quindi per motivi di precisione; nel caso di miscele di sostanze, per la determinazione di una sostanza, si sceglierà una lunghezza d'onda dove le altre sostanze assorbono il meno possibile.



In questo caso si sceglierà una lunghezza d'onda di circa 675 alla quale, anche se non abbiamo il picco maggiore della clorofilla a, non abbiamo altri interferenti come invece accade a lunghezze d'onda minori.

COMPONENTI STRUMENTALI PER LA SPETTROSCOPIA

All'interno dello spettrofotometro c'è una sorgente che emette radiazione, questa deve poi essere in qualche modo modulata selezionando una lunghezza d'onda, arriva al campione e viene poi misurata da un rilevatore.

La maggioranza degli strumenti dispongono di sorgenti continue, cioè che emettono una luce policromatica, costituite da lampade al deuterio per radiazioni UV e lampade a incandescenza per il visibile.

Per quanto riguarda l'IR abbiamo strumenti diversi, in quanto le sorgenti nell'infrarosso devono emettere radiazioni a lunghezze d'onda più alte e sono costituite da solidi inerti riscaldati. Inoltre queste sorgenti sono molto più esposte a delle fluttuazioni del segnale rispetto all'UV-visibile. Attraverso i **Monocromatori** si seleziona la lunghezza d'onda. Esso è costituito da un foro di entrata, in cui entra radiazione policromatica, essa viene poi convogliata nel reticolo di diffrazione e infine inviata su un altro specchio che le riflette verso una fenditura di uscita dove uscirà la radiazione con una lunghezza d'onda monocromatica, mentre le altre lunghezze d'onda vengono trattenute all'interno del monocromatore.

APPLICAZIONI QUALITATIVE E QUANTITATIVE DELLA SPETTROSCOPIA DI ASSORBIMENTO

La spettroscopia **UV-visibile** ha più finalità quantitative mentre **IR** qualitative, anche se in realtà tutte e due possono essere utilizzate per entrambi i tipi di analisi.

La differenza tra UV-visibile e IR è che il primo è associato a delle lunghezze d'onda più basse, quindi più energetiche, che riescono a stimolare le transizioni di tipo elettronico, vibrazionale e rotazionale, mentre nell'IR abbiamo solo transizioni di tipo vibrazionale e rotatorio.

Gli assorbimenti nell'UV-visibile in genere son dovuti all'eccitazione di elettroni di legame.

Cromofori: gruppi funzionali insaturi che sfruttano il fatto che gli elettroni di legame pi greco possono essere stimolati con la radiazione che si trova nel visibile.

Per applicazioni di tipo qualitativo, in cui voglio riconoscere la struttura dell'analita che sto analizzando, i cromofori ci aiutano molto.

Quando abbiamo analizzato il ferro in laboratorio, la nostra soluzione si è colorata una volta che abbiamo aggiunto la fenantrolina. L'assorbimento in quel caso non è dovuto alla presenza di cromofori ma ad un complesso. Alcuni di essi possono dare **assorbimento per trasferimento di carica** tramite un processo di ossido-riduzione interna, grazie a ciò infatti siamo riusciti a ottenere una spettroscopia di assorbimento del ferro.

Più in generale possiamo utilizzare UV-visibile per analisi di miscele, titolazioni oppure analizzare la stechiometria di reazione.

L'assorbività di un elemento è tabellata, tuttavia essa varia a seconda delle condizioni in cui si trova un laboratorio.

La spettroscopia IR viene utilizzata principalmente per applicazioni qualitative in quanto da un segnale molto poco riproducibile. Per convenzione nel grafico di un'analisi qualitativa con IR non si rappresenta l'assorbanza ma la trasmittanza, quindi i picchi di assorbimento sono in basso e associati ad una bassa trasmittanza e inoltre sulle ascisse non abbiamo la lunghezza d'onda ma il numero d'onda, ovvero $1/\text{lunghezza d'onda}$