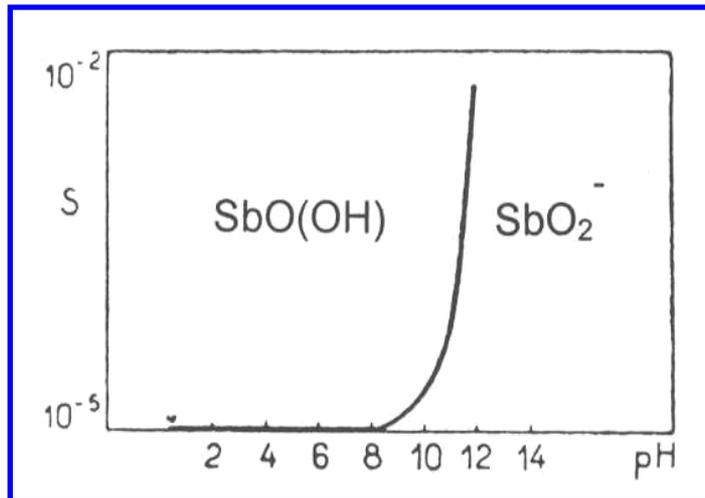
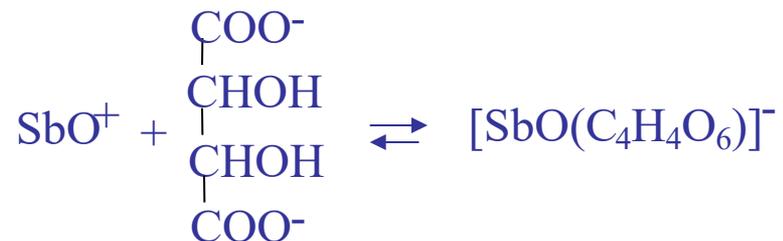


Esercitazione 1a: determinazione fotometrica dell'antimonio



Reazioni fondamentali:



Principio del metodo

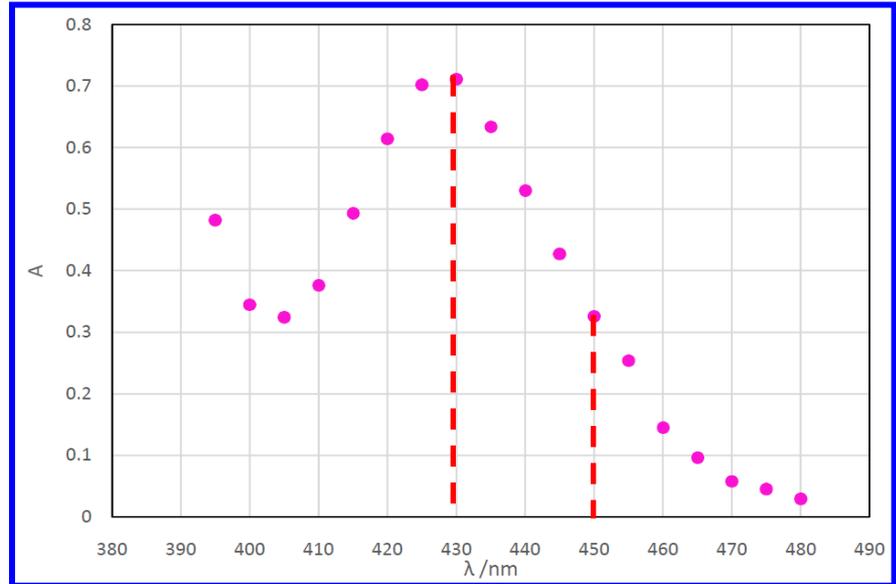
L'antimonio (III), presente come complesso antimonile-tartrato $[\text{SbO}(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)]^-$, reagisce con lo ione I^- formando l'acido tetraiodo-antimonico:



L' HSbI_4 presenta un **assorbimento nella regione UV-visibile** che può essere sfruttato per una determinazione quantitativa dell'antimonio per via fotometrica (colorimetrica).

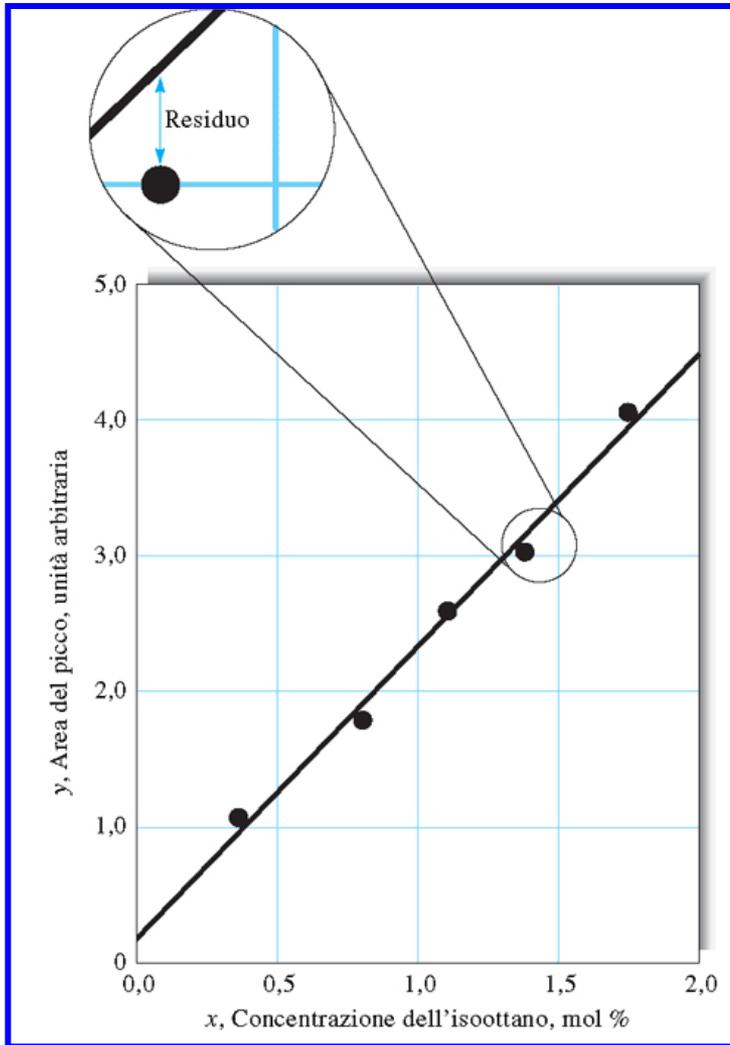
Fasi dell'esercitazione

- ✓ Preparazione di **cinque soluzioni standard** di HSbI_4 ed acquisizione dei dati di assorbanza in **duplicato** per ciascuna di esse a due lunghezze d'onda, ossia a 430 nm (massimo della banda) e 450 nm (parte discendente della banda):



- ✓ costruzione di una **retta di taratura** con i dati ottenuti per ciascuna delle due lunghezze d'onda;
- ✓ calcolo del **limite di rivelabilità** (LOD) del metodo in entrambi i casi;
- ✓ analisi di un **campione incognito** alle due lunghezze d'onda con valutazione della concentrazione dello ione antimonio in esso contenuto

Retta di taratura: metodo dei minimi quadrati



Nella maggior parte dei casi la dipendenza dalla concentrazione di analita del segnale fornito da un metodo di analisi è lineare

I dati possono quindi essere elaborati con il **metodo dei minimi quadrati lineari**:

Segnale = bianco + costante × concentrazione

$$y = a + b \times x$$

Obiettivo del metodo: determinare i valori dei parametri a e b per i quali i **quadrati degli scarti (residui)** fra i valori sperimentali di y e quelli calcolati dal modello siano minimi.

Assunzioni del metodo: si puo' ritenere che i valori di x (concentrazione) **NON** siano affetti da un'incertezza rilevante e che l'incertezza dei valori di y (segnale) non dipenda da x (condizione di **omoschedasticità**).

Equazioni: dette (x_i, y_i) , con $i = 1, \dots, n$, le coppie di dati sperimentali acquisiti per la costruzione della retta di taratura, i parametri della retta di regressione con i minimi quadrati sono:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

dove:

$$\bar{x} = \sum_i \frac{x_i}{n} \quad \bar{y} = \sum_i \frac{y_i}{n}$$

È possibile calcolare anche la deviazione standard sui parametri della regressione lineare (s_a , s_b) a partire dalla deviazione standard sui residui, $s_{y/x}$:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{dove } \hat{y}_i = a + bx_i$$

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Il termine $\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$ rappresenta la quantità che viene minimizzata con il metodo dei minimi quadrati.

Il metodo tende quindi automaticamente a minimizzare anche l'incertezza sui parametri della retta di regressione.

Calcolo della concentrazione di un campione incognito dalla retta di taratura

Detto y_0 il valore medio dei segnali ottenuti da m misure replicate su un campione incognito, la concentrazione x_0 di quest'ultimo si può calcolare noti i parametri della retta di regressione:

$$x_0 = (y_0 - a) / b$$

l'incertezza sul valore di x_0 è data dall'Equazione:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \left[\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right]^{1/2}$$

L'incertezza diminuisce, quindi:

- ✓ al diminuire della deviazione standard sui residui ($s_{y/x}$)
- ✓ all'aumentare della pendenza della retta (b), del numero dei suoi punti (n) e del numero delle misure replicate sul campione incognito (m)

Calcolo del limite di rivelabilità (LOD) dalla retta di taratura

Secondo una delle definizioni più comunemente accettate il **LOD** (*limit of detection*) è il valore della concentrazione di analiti al quale corrisponde un segnale (y) che differisce dal bianco per almeno:

3 volte il valore della deviazione standard sui residui, $s_{y/x}$, oppure

3 volte il valore della deviazione standard sull'incertezza, s_a .

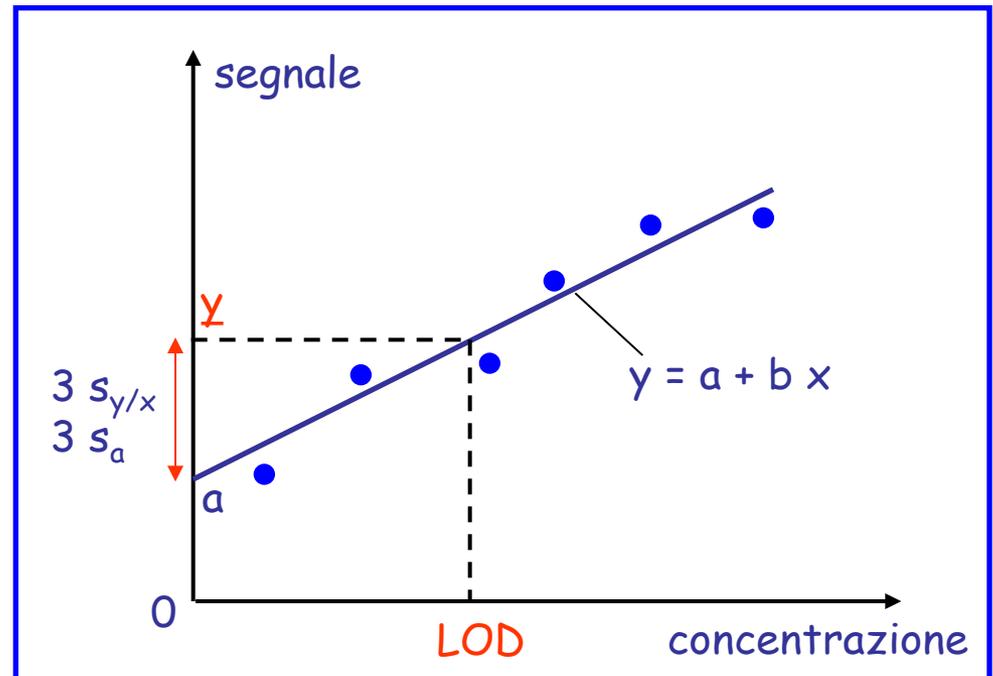
$$\underline{y}_1 = a + 3 s_{y/x} = a + b (\text{LOD})_1$$

$$\underline{y}_2 = a + 3 s_a = a + b (\text{LOD})_2$$



$$\text{LOD}_1 = 3 s_{y/x} / b$$

$$\text{LOD}_2 = 3 s_a / b$$



Titolazioni spettrofotometriche

Schema generale di una titolazione con stechiometria 1:1 :



S = sostanza da titolare (concentrazione incognita), con assorbività' ϵ_S

T = titolante (concentrazione nota), con assorbività' ϵ_T

P = prodotto della titolazione, con assorbività' ϵ_P

Ipotesi:

- ✓ e' valida la legge di Lambert-Beer, quindi $A = \epsilon bc$;
- ✓ la reazione fra S e T e' **completamente spostata verso P**;

Simbolismo:

V_0, c_S = volume e concentrazione della soluzione da titolare;

V, c_T = volume aggiunto e concentrazione della soluzione titolante;

$f = (c_T V / c_S V_0)$ = frazione titolata \Rightarrow **$f = 1$ al punto equivalente**

Equazioni:

In ogni momento della titolazione l'assorbanza totale e' data da:

$$A = \varepsilon_S b [S] + \varepsilon_T b [T] + \varepsilon_P b [P] = b (\varepsilon_S [S] + \varepsilon_T [T] + \varepsilon_P [P])$$

Prima del punto equivalente ($f < 1$) risulta:

$$[S] = \frac{c_S V_0 - c_T V}{V + V_0} = \frac{c_S V_0}{V + V_0} (1 - f) \quad [T] = 0 \quad [P] = \frac{c_T V}{V + V_0} = \frac{c_S V_0}{V + V_0} f$$

L'assorbanza totale della soluzione è data quindi dall'equazione:

$$A_{\text{ppe}} = b \frac{c_S V_0}{V + V_0} [(1 - f) \varepsilon_S + f \varepsilon_P]$$

Dopo il punto equivalente ($f > 1$) risulta:

$$[S] = 0 \quad [T] = \frac{c_T V - c_S V_0}{V + V_0} = \frac{c_S V_0}{V + V_0} (f - 1) \quad [P] = \frac{c_S V_0}{V + V_0}$$

L'assorbanza totale della soluzione è data quindi dall'equazione:

$$A_{\text{dpe}} = b \frac{c_S V_0}{V + V_0} [(f - 1) \varepsilon_T + \varepsilon_P]$$

In entrambi i casi occorre però considerare che la diluizione progressiva della soluzione da titolare porta ad una diminuzione dell'assorbanza.

Si può introdurre quindi un **valore di assorbanza corretto per la diluizione**:

$$A^{\text{corr}} = A \times \frac{V + V_0}{V_0}$$

Le equazioni di A_{ppe} e A_{dpe} possono essere riscritte nelle forme:

$$A_{ppe} = A_{ppe}^{corr} \times \frac{V_0}{V + V_0} = b \frac{c_S V_0}{V + V_0} [(1 - f) \varepsilon_S + f \varepsilon_P]$$

$$A_{dpe} = A_{dpe}^{corr} \times \frac{V_0}{V + V_0} = b \frac{c_S V_0}{V + V_0} [(f - 1) \varepsilon_T + \varepsilon_P]$$

e in definitiva, mettendo a fattor comune la frazione f :

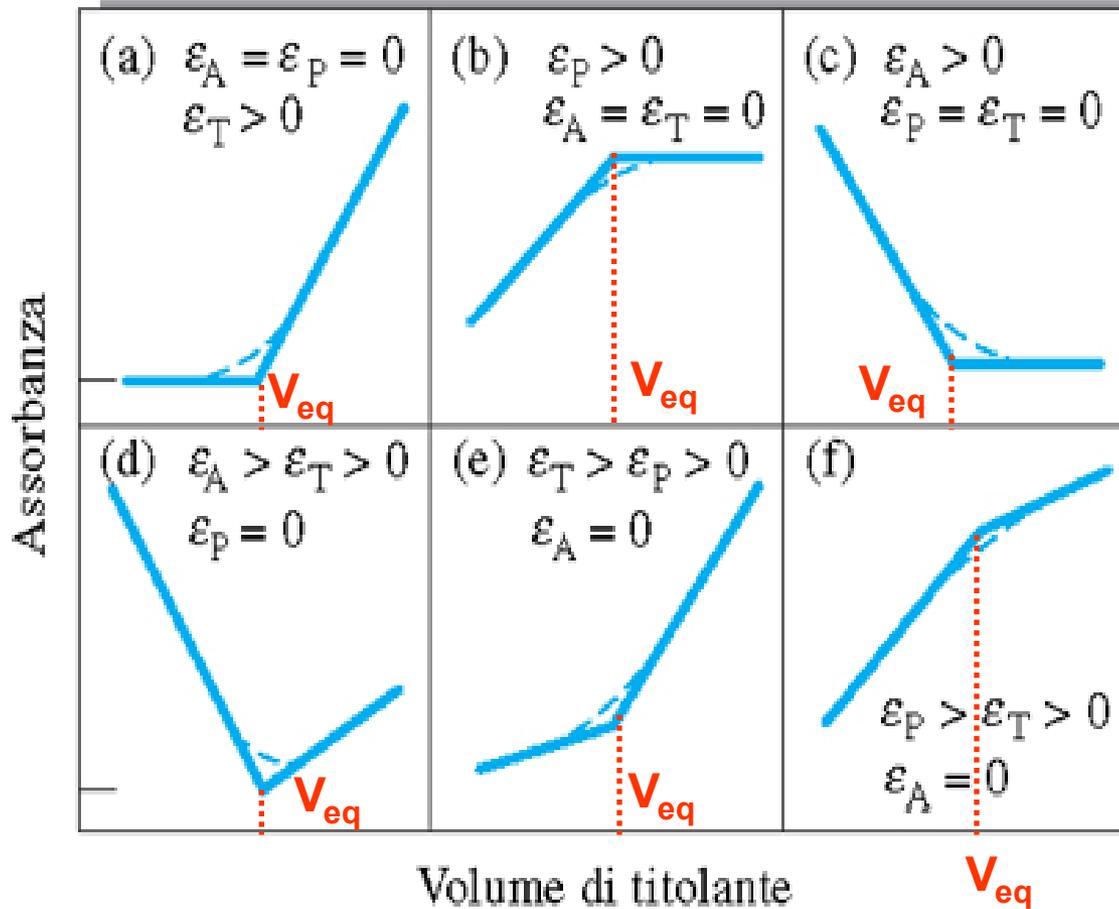
$$A_{ppe}^{corr} = b c_S \varepsilon_S + b c_S (\varepsilon_P - \varepsilon_S) f$$

$$A_{dpe}^{corr} = b c_S (\varepsilon_P - \varepsilon_T) + b c_S \varepsilon_T f$$

Gli andamenti delle assorbanze (corrette per il fattore di diluizione) prima e dopo il punto equivalente sono **lineari** rispetto alla frazione di analita titolata (f), ossia rispetto al volume di titolante aggiunto.

$$A_{\text{ppe}}^{\text{corr}} = b c_S \varepsilon_S + b c_S (\varepsilon_P - \varepsilon_S) f$$

$$A_{\text{dpe}}^{\text{corr}} = b c_S (\varepsilon_P - \varepsilon_T) + b c_S \varepsilon_T f$$

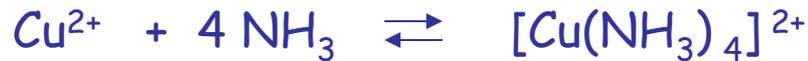


Si noti che la pendenza del tratto finale non può mai essere negativa, mentre quella del primo tratto può esserlo se l'assorbidità molare del prodotto della titolazione è inferiore a quella del titolando

L'intersezione dei due tratti lineari fornisce il volume al punto equivalente V_{pe} .

Esercitazione 1b: titolazione spettrofotometrica del rame (II)

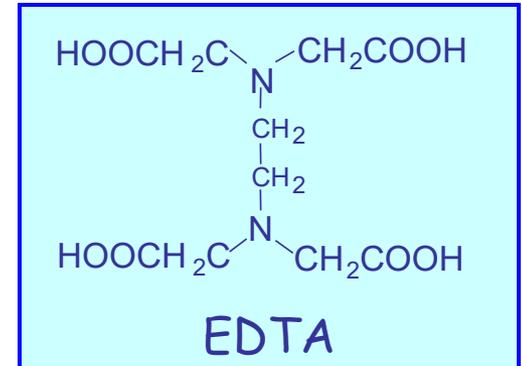
E' una **titolazione complessometrica del rame (II)**, inizialmente complessato con ammoniaca, mediante EDTA:



alla lunghezza d'onda di lavoro, $\lambda = 600 \text{ nm}$, risulta:

| | $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ | EDTA^{4-} | $[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}$ | NH_3 |
|------------|-----------------------------------|--------------------|---------------------------------|---------------|
| ϵ | > 0 | 0 | > 0 | 0 |

inoltre: $\epsilon_{[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}} > \epsilon_{[\text{Cu}(\text{EDTA})]^{2-}}$



Fasi dell'esercitazione

- ✓ Determinazione della **curva di titolazione**, ossia del grafico dell'assorbanza (corretta per il fattore di diluizione) in funzione del volume di titolante;
- ✓ **interpolazione dei due tratti della curva di titolazione** con il metodo dei minimi quadrati e determinazione del volume equivalente;
- ✓ calcolo del **volume equivalente e della sua incertezza**:

dette $A' = a' + b'V$ e $A'' = a'' + b''V$ le equazioni di regressione dei due tratti rettilinei della curva di titolazione, la condizione di intersezione, che si verifica al punto equivalente, corrisponde all'equazione:

$$a' + b'V_{pe} = a'' + b''V_{pe} \quad \text{e quindi:} \quad V_{pe} = \frac{a' - a''}{b'' - b'}$$

L'incertezza ($s_{V_{pe}}$) su V_{pe} si otterrà a partire dalle incertezze sui parametri (a' , a'' , b' , b'') delle regressioni lineari, in base alla **legge sulla propagazione dell'errore random**.

Se la grandezza y è una funzione di n **variabili x_i fra loro indipendenti**, ciascuna affetta da un'incertezza (deviazione standard) s_{x_i} , l'incertezza sulla grandezza y è data dall'equazione:

$$s_y = \sqrt{\sum_i s_{x_i}^2 \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2}$$

Nel caso del volume al punto equivalente si avrà:

$$s_{V_{pe}} = \sqrt{s_{a'}^2 \left(\frac{\partial V_{pe}}{\partial a'} \right)^2 + s_{b'}^2 \left(\frac{\partial V_{pe}}{\partial b'} \right)^2 + s_{a''}^2 \left(\frac{\partial V_{pe}}{\partial a''} \right)^2 + s_{b''}^2 \left(\frac{\partial V_{pe}}{\partial b''} \right)^2 =}$$

$$= \sqrt{s_{a'}^2 \left(\frac{1}{b''-b'} \right)^2 + s_{b'}^2 \left(\frac{(a'-a'')}{(b''-b')^2} \right)^2 + s_{a''}^2 \left(\frac{-1}{b''-b'} \right)^2 + s_{b''}^2 \left(-\frac{(a'-a'')}{(b''-b')^2} \right)^2}$$

Analisi spettrofotometrica di miscele

È possibile determinare per via spettrofotometrica le concentrazioni di più specie in una miscela, anche se i loro spettri di assorbimento si sovrappongono, purché:

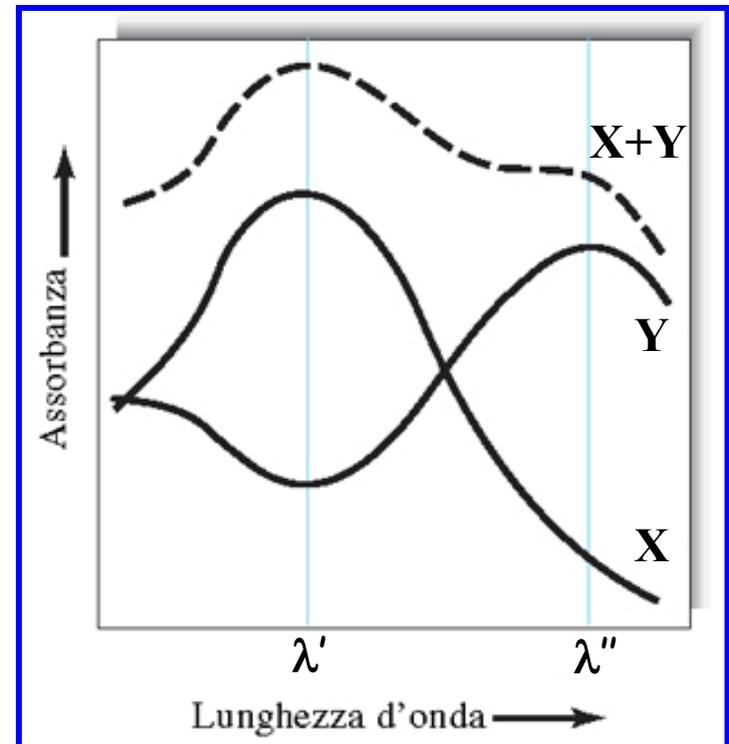
- ✓ tutte le specie obbediscano alla legge di Lambert-Beer
- ✓ non vi siano interazioni fra di loro

Miscela di due componenti (X e Y)

Le assorbanze alle lunghezze d'onda λ' e λ'' sono:

$$A' = \varepsilon'_X b [X] + \varepsilon'_Y b [Y]$$

$$A'' = \varepsilon''_X b [X] + \varepsilon''_Y b [Y]$$



Le assorbività di X e Y alle due lunghezze d'onda possono essere ottenute da precedenti analisi di soluzioni contenenti **una sola** delle due specie:

$$A'_X = \epsilon'_X b [X]_{\text{nota}} \rightarrow \epsilon'_X = A'_X / b [X]_{\text{nota}}$$

$$A''_X = \epsilon''_X b [X]_{\text{nota}} \rightarrow \epsilon''_X = A''_X / b [X]_{\text{nota}}$$

$$A'_Y = \epsilon'_Y b [Y]_{\text{nota}} \rightarrow \epsilon'_Y = A'_Y / b [Y]_{\text{nota}}$$

$$A''_Y = \epsilon''_Y b [Y]_{\text{nota}} \rightarrow \epsilon''_Y = A''_Y / b [Y]_{\text{nota}}$$

Noti i valori di ϵ'_X , ϵ''_X , ϵ'_Y , ϵ''_Y , si possono calcolare [X] e [Y] nella miscela a partire da due misure di assorbanza (A' e A''):

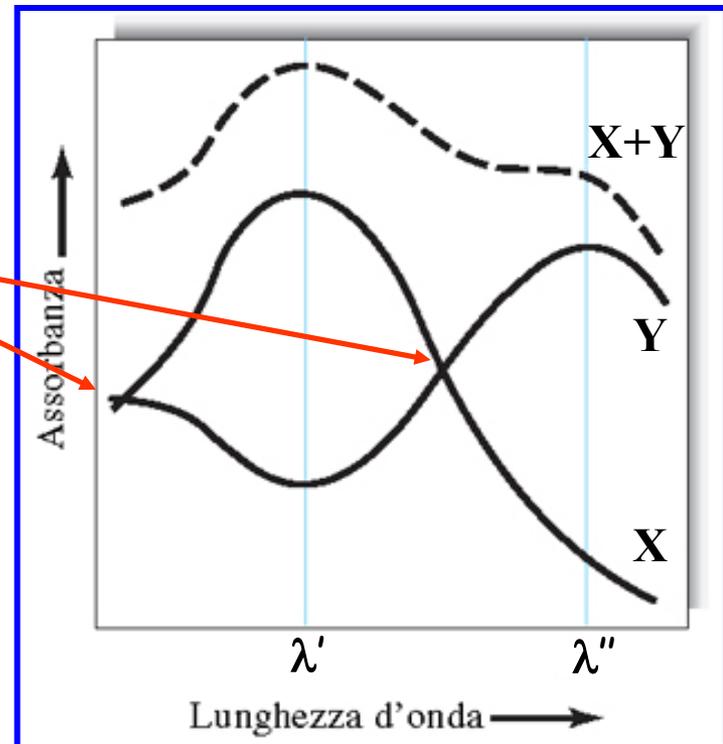
$$[X] = \frac{\begin{vmatrix} A' & \epsilon'_Y b \\ A'' & \epsilon''_Y b \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \epsilon'_X b & \epsilon'_Y b \\ \epsilon''_X b & \epsilon''_Y b \end{vmatrix}} \quad [Y] = \frac{\begin{vmatrix} \epsilon'_X b & A' \\ \epsilon''_X b & A'' \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \epsilon'_X b & \epsilon'_Y b \\ \epsilon''_X b & \epsilon''_Y b \end{vmatrix}}$$

Casi possibili per miscele a due componenti:

❖ Se $\epsilon'_X = \epsilon'_Y$ e $\epsilon''_X = \epsilon''_Y$ il determinante del sistema è nullo \Rightarrow il sistema è indeterminato ed è possibile, al massimo, calcolare la somma di $[X]$ e $[Y]$, ad esempio da:

$$A' = \epsilon'_X b [X] + \epsilon'_Y b [Y] = \epsilon'_X b ([X] + [Y])$$

❖ Se $\epsilon'_X = \epsilon'_Y$ o $\epsilon''_X = \epsilon''_Y$ gli spettri di assorbimento delle due specie, alla stessa concentrazione, si intersecano in un punto detto **punto isosbastico**:



Scelta delle lunghezze d'onda migliori per l'analisi spettrofotometrica di miscele a due componenti

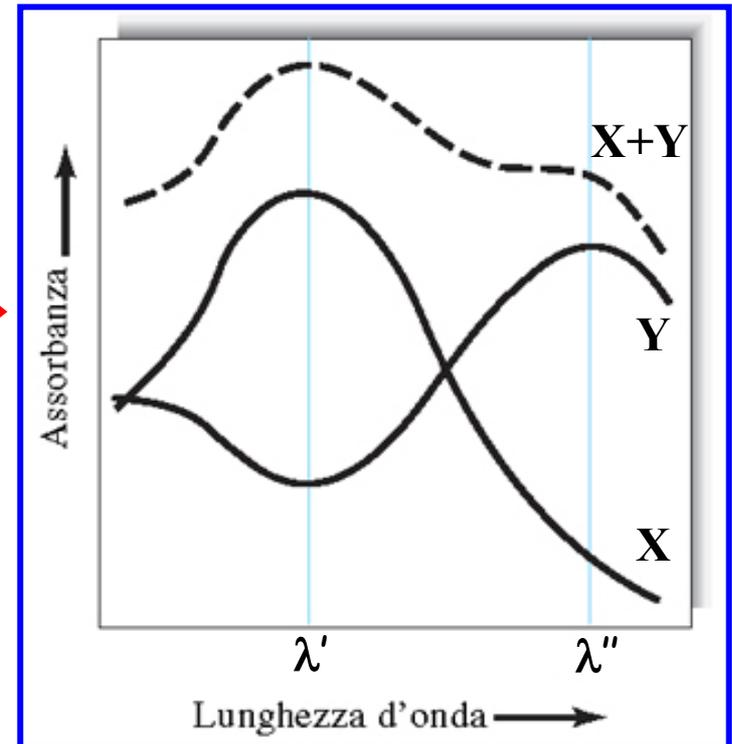
Si può dimostrare che la massima precisione nella determinazione di [X] e [Y] si ottiene quando il determinante del sistema è massimo, ossia:

$$= b^2 (\epsilon'_X \epsilon''_Y - \epsilon''_X \epsilon'_Y) \gg 0$$

in particolare:

- il valore di [X] è più preciso se:
 $\epsilon''_Y \gg \epsilon'_Y$
- il valore di [Y] è più preciso se:
 $\epsilon'_X \gg \epsilon''_X$

Occorre dunque scegliere le due lunghezze d'onda di lavoro in modo tale che in corrispondenza di esse le assorbanze delle specie siano molto diverse fra loro.



Miscele ad n componenti (n > 2)

In questo caso servono almeno n misure di assorbanza ad altrettante λ per poter risalire alle concentrazioni degli n componenti attraverso la soluzione di un sistema costituito dalle seguenti equazioni:

$$A^{(j)} = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^{(j)} b[X_i] \quad \text{con } j = 1, \dots, n$$

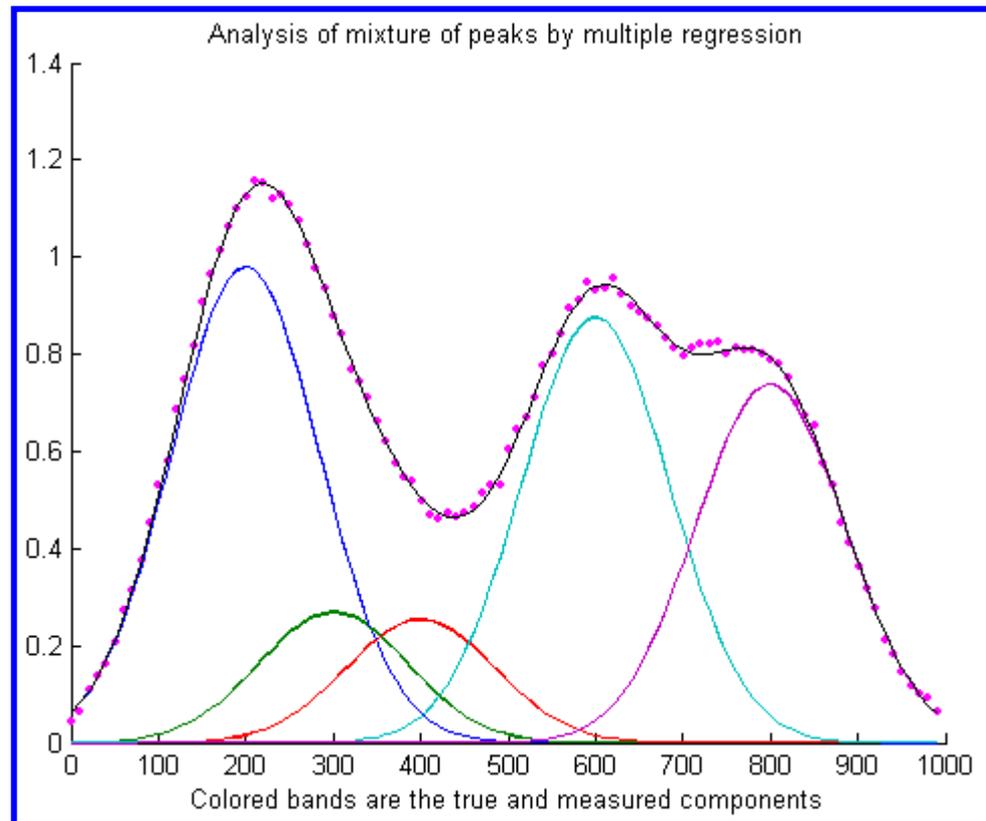
l'imprecisione sui valori di $[X_i]$ sarebbe però alta in questo caso.

Si preferisce quindi *sovradeterminare il sistema*, ossia effettuare un numero di misure di A superiore a quello delle concentrazioni incognite ($j_{\max} > n$). Queste ultime vengono poi ottimizzate mediante software, impostando la condizione che la sommatoria:

$$\sum_{j=1}^{j_{\max}} [A_{\text{sper}}^{(j)} - A_{\text{calc}}^{(j)}]^2 \quad \text{sia minima.}$$

Il software di calcolo delle concentrazioni ha bisogno, in input, di un set di j_{\max} valori di ε per ciascun potenziale componente della miscela e dei valori di assorbanza sperimentale della miscela alle j_{\max} lunghezze d'onda scelte.

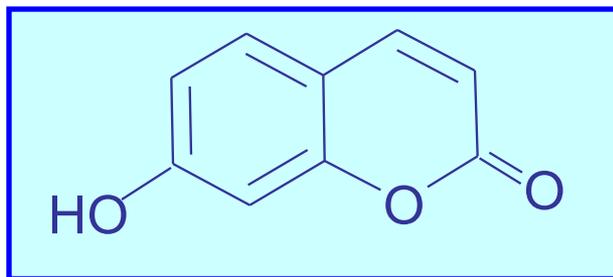
Successivamente esso determina, mediante regressione multipla, le concentrazioni in modo che sia minimizzata la sommatoria dei quadrati delle differenze fra le assorbanze teorica e sperimentale ottenute a tutte le lunghezze d'onda di lavoro.



Noti le concentrazioni e i valori di ε è possibile anche ricostruire graficamente lo spettro sperimentale e le componenti spettrali associate ai diversi composti presenti nella miscela, come mostrato nella figura a lato, in cui sono state effettuate 100 misure di assorbanza su una miscela di 5 componenti.

Esercitazione 2: determinazione spettrofotometrica della costante di dissociazione acida di un indicatore

L'esercitazione consiste nel determinare la K_a dell'indicatore **umbelliferone (7-idrossi-cumarina)**:



misurando le concentrazioni delle sue forme indissociata (HUmb) e dissociata (Umb⁻) per via spettrofotometrica.

Per l'equilibrio: HUmb \rightleftharpoons H⁺ + Umb⁻

$$K_a = \frac{[H^+][Umb^-]}{[HUmb]}$$

ossia

$$pK_a = pH + \log \frac{[HUmb]}{[Umb^-]}$$

I valori di [HUmb] e [Umb⁻] vengono calcolati da misure dell'assorbanza delle loro miscele a vari pH, usando le lunghezze d'onda 323 nm (λ_{\max} per HUmb) e 365 nm (λ_{\max} per Umb⁻) e risolvendo il sistema:

$$A(323) = \varepsilon^{\text{HUmb}}(323) [\text{HUmb}] + \varepsilon^{\text{Umb}^-}(323) [\text{Umb}^-]$$

$$A(365) = \varepsilon^{\text{HUmb}}(365) [\text{HUmb}] + \varepsilon^{\text{Umb}^-}(365) [\text{Umb}^-]$$

poiché la somma delle concentrazioni delle due forme dell'indicatore è nota (essendo fissata dall'operatore): $[\text{HUmb}] + [\text{Umb}^-] = c$, si può in alternativa usare il sistema:

$$A(365) = \varepsilon^{\text{HUmb}}(365) [\text{HUmb}] + \varepsilon^{\text{Umb}^-}(365) [\text{Umb}^-]$$

$$c = [\text{HUmb}] + [\text{Umb}^-]$$

Fasi dell'esercitazione

- ✓ Preparare soluzioni di umbelliferone a sei diversi valori di pH;
- ✓ misurare le assorbanze a 323 e a 365 nm per le soluzioni a diverso pH, ricavando i valori delle ϵ per le due specie HUm e Um⁻ dalle assorbanze delle due soluzioni a pH estremo (circa 6 e 9);
- ✓ risolvere per ciascuno dei restanti 4 valori di pH i due sistemi di equazioni, ricavando le coppie di valori di [HUm] e [Um⁻] corrispondenti;
- ✓ applicare il metodo dei minimi quadrati all'equazione:

$$\log ([\text{HUm}] / [\text{Um}^-]) = \text{pKa} - \text{pH}$$

usando i due set di dati.

L'intercetta della retta di regressione fornisce una stima del pKa dell'umbelliferone.

