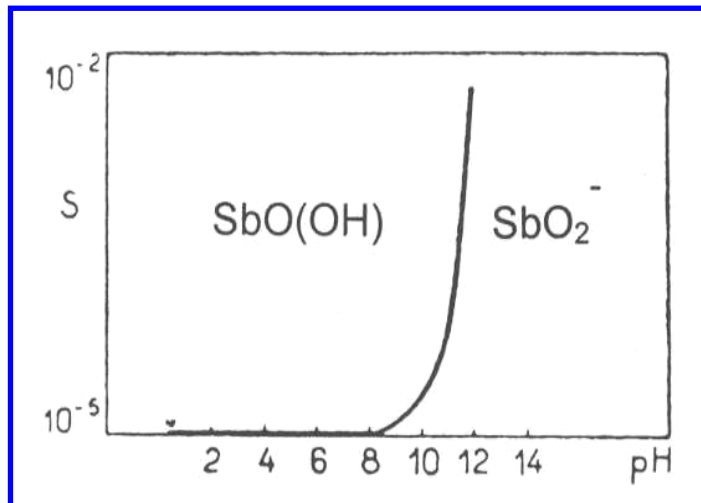
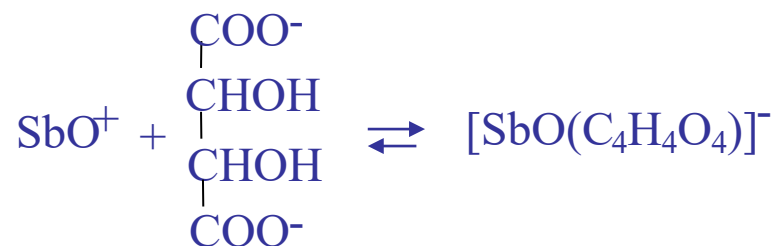


## Esercitazione 1a: determinazione fotometrica dell'antimonio



Reazioni fondamentali:



### Principio del metodo

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

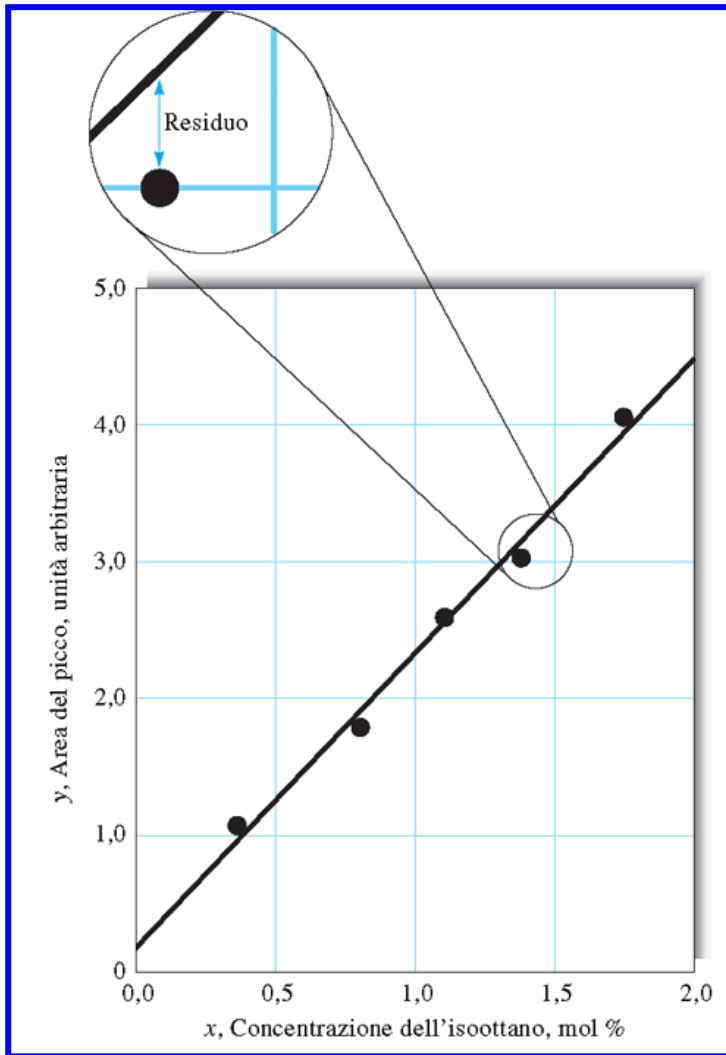


L' $\text{HSbI}_4$  presenta una **banda di assorbimento nella regione UV-visibile** che può essere sfruttata per una determinazione quantitativa dell'antimonio per via fotometrica (colorimetrica).

## Fasi dell'esercitazione

- ✓ Determinazione dello spettro di assorbimento dell' $\text{HSbI}_4$  nella regione 395-485 nm  $\Rightarrow$  scelta della lunghezza d'onda di lavoro;
- ✓ costruzione di una retta di taratura;
- ✓ calcolo del limite di rivelabilità (LOD) del metodo;
- ✓ analisi di un campione incognito 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 trattati 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.

**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 la definizione comunemente accettata il **LOD** (*limit of detection*) e':

"il valore di concentrazione 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,  $s_a$ "

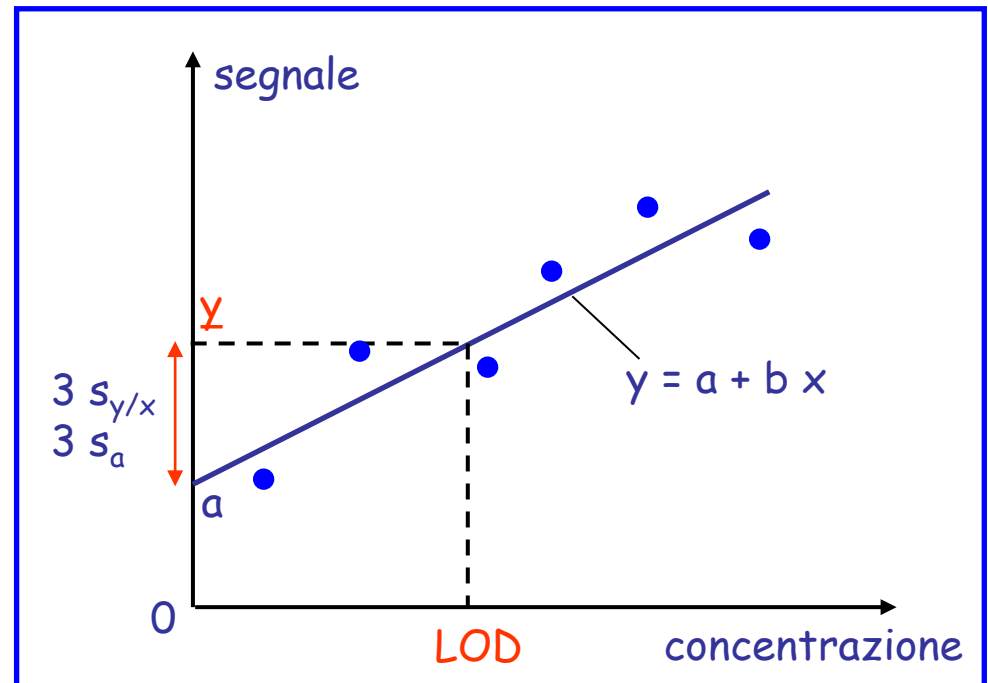
$$y_1 = a + 3 s_{y/x} = a + b (\text{LOD})_1$$

$$y_2 = a + 3 s_a = a + b (\text{LOD})_2$$



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

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



# Titolazioni spettrofotometriche

Schema generale della titolazione:



S = sostanza da titolare (concentrazione incognita), con assorbività'  $\epsilon_S$

T = titolante (concentrazione nota), con assorbività'  $\epsilon_T$

P = prodotto della titolazione, con assorbività'  $\epsilon_P$

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:

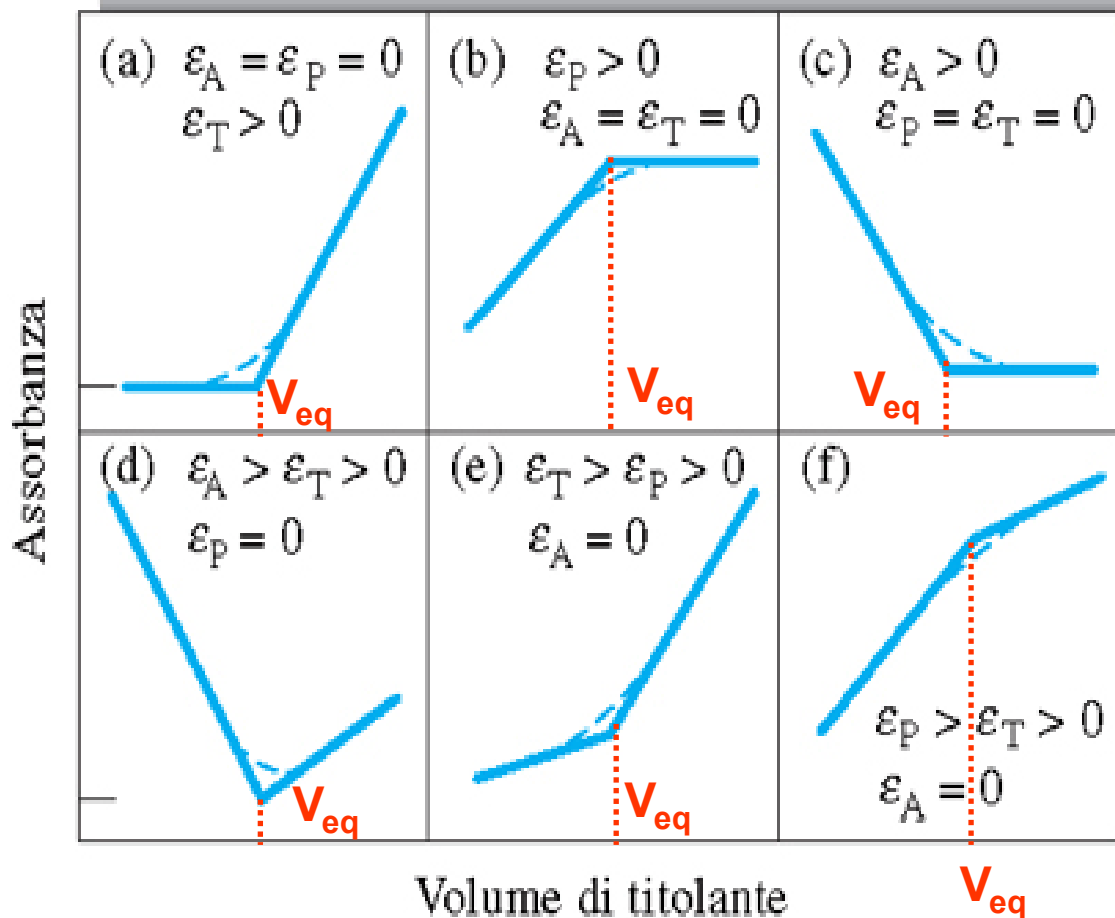
$$A_{ppe}^{corr} = b c_S \varepsilon_S + b c_S (\varepsilon_P - \varepsilon_S) f$$

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

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.

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

## Esercitazione 1b: titolazione spettrofotometrica del rame (II)

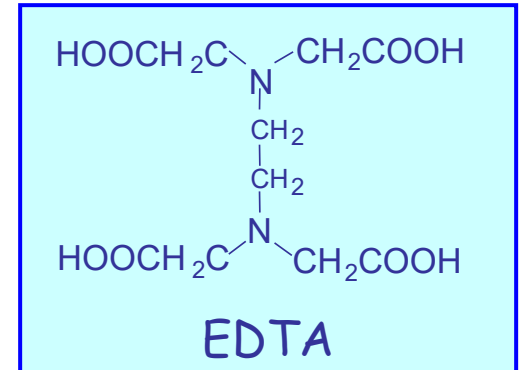
E' una **titolazione complessometrica del rame (II)**, inizialmente complessato con ammoniaca, mediante EDTA:



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

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

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, è

$a' + b'V_{pe} = a'' + b''V_{pe}$  e quindi:

$$V_{pe} = \frac{a' - a''}{b'' - b'}$$

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**.

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:

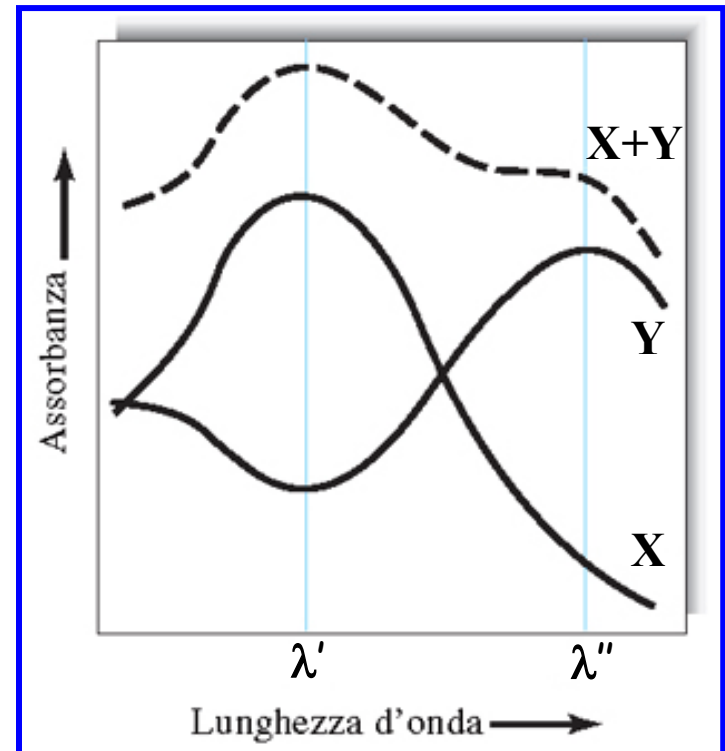
- ✓ tutte le specie obbediscano alla legge di Lambert-Beer
- ✓ non vi siano interazioni fra di loro

Miscela di due componenti (X e Y)

Le assorbanze alle lunghezze d'onda  $\lambda'$  e  $\lambda''$  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 calibrazioni con 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  $\epsilon'_X$ ,  $\epsilon''_X$ ,  $\epsilon'_Y$ ,  $\epsilon''_Y$ , si possono calcolare [X] e [Y] nella miscela a partire da due misure di assorbanza ( $A'$  e  $A''$ ):

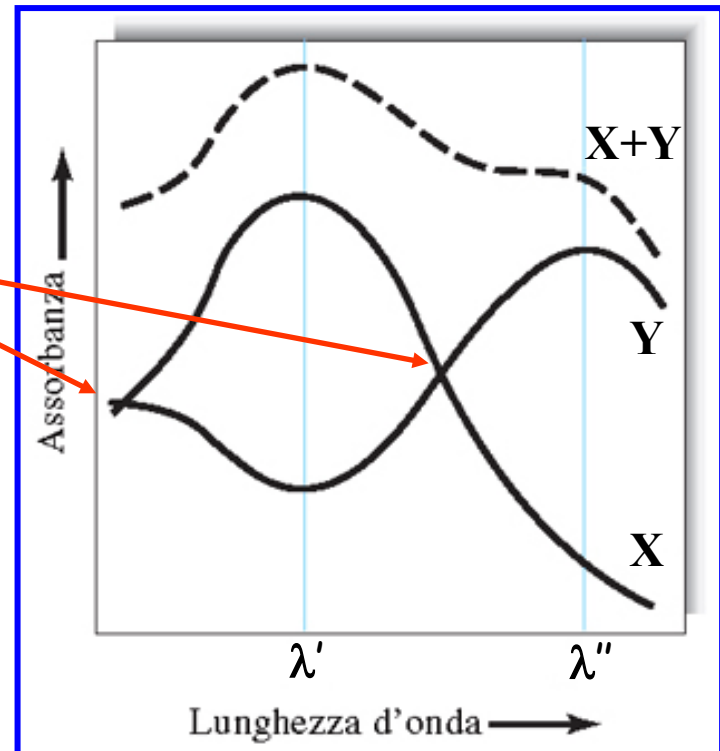
$$[X] = \frac{\begin{vmatrix} A' & \epsilon'_Y b \\ A'' & \epsilon''_Y b \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \epsilon'_X b & \epsilon'_Y b \\ \epsilon''_X b & \epsilon''_Y b \end{vmatrix}} \quad [Y] = \frac{\begin{vmatrix} \epsilon'_X b & A' \\ \epsilon''_X b & A'' \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} \epsilon'_X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

## 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**:



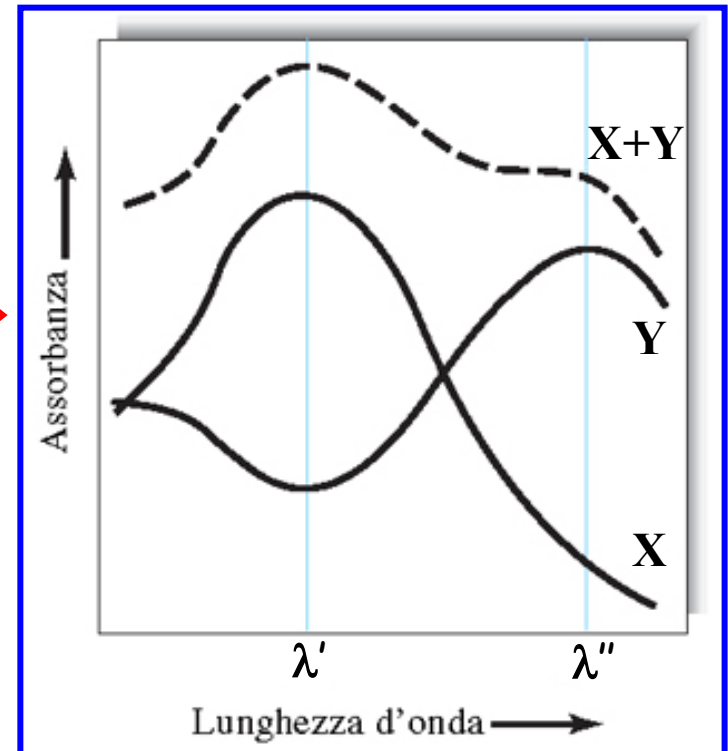
## Scelta delle lunghezze d'onda migliori per l'analisi spettrofotometrica di miscele a due componenti

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:  
 $\epsilon'_{X} \gg \epsilon''_{X}$



## Miscele ad n componenti (n>2)

In questo caso da **n misure** di assorbanza ad altrettante  $\lambda$  si potrebbe risalire alle concentrazioni degli n componenti:

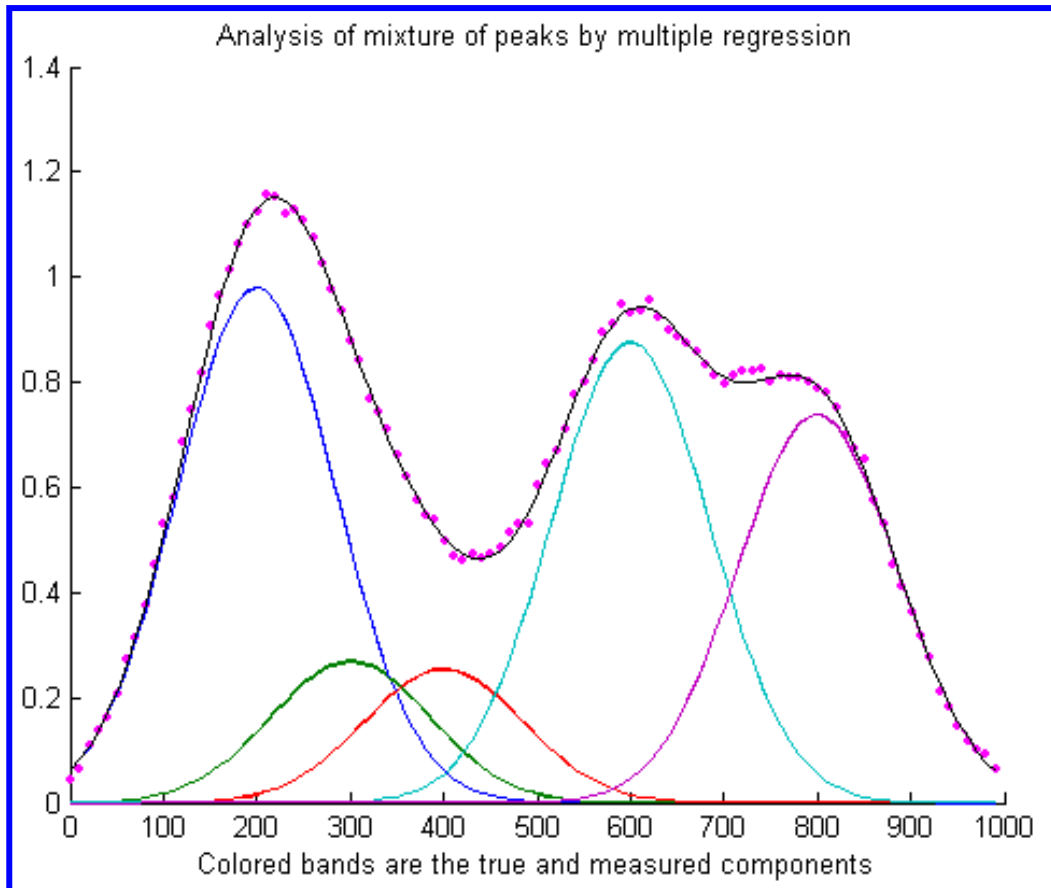
$$A^{(j)} = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^{(j)} b [X_i] \quad \text{con } j = 1, \dots, n$$

l'imprecisione sui valori di  $[X_i]$  sarebbe pero' alta.

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 (come parametri) mediante computer con il metodo dei minimi quadrati non lineare, impostando la condizione che la sommatoria:

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

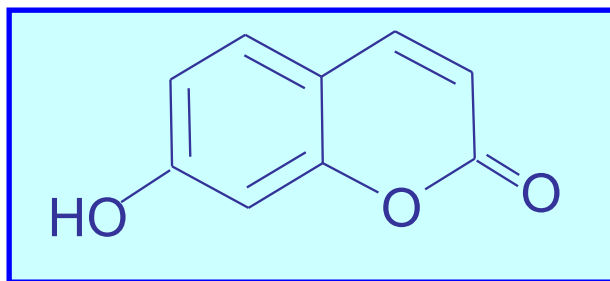
Il software di ottimizzazione ha bisogno, in input, di un set di  $j_{\max}$  valori di  $\varepsilon$  per ciascun potenziale componente della miscela e di stime iniziali delle concentrazioni dei vari componenti. Successivamente esso determina le concentrazioni calcolando, per ciascuna delle  $j_{\max}$  lunghezze d'onda, l'assorbanza teorica e minimizzandone lo scarto rispetto a quella sperimentale.



Risultato della ricostruzione di uno spettro sperimentale, costituito da 100 misure di assorbanza, dalla combinazione degli spettri di 5 specie.

## 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<sup>-</sup>) per via spettrofotometrica.

Per l'equilibrio:  $\text{HUmb} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{Umb}^-$

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

ossia

$$\text{p}K_a = \text{pH} + \log \frac{[\text{HUmb}]}{[\text{Umb}^-]}$$

I valori di [HUmb] e [Umb<sup>-</sup>] vengono calcolati da misure dell'assorbanza delle loro miscele a vari pH, usando le lunghezze d'onda 325 nm ( $\lambda_{\max}$  per HUmb) e 365 nm ( $\lambda_{\max}$  per Umb<sup>-</sup>) e risolvendo il sistema:

$$A(325) = \varepsilon^{\text{HUmb}}(325) [\text{HUmb}] + \varepsilon^{\text{Umb}^-}(325) [\text{Umb}^-]$$

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

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

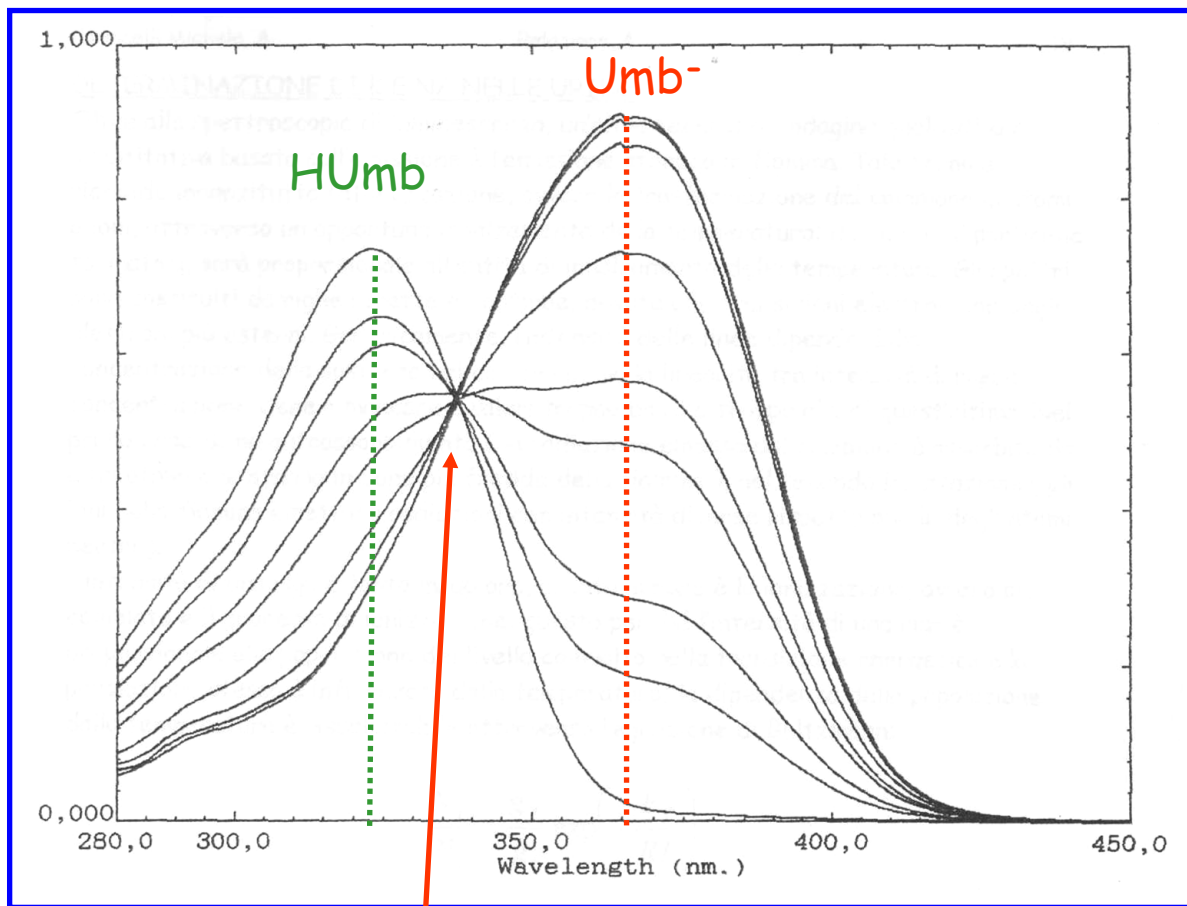
- ✓ Preparare soluzioni di umbelliferone a diversi valori di pH;
- ✓ misurare le assorbanze a 325 e a 365 nm per le soluzioni a diverso pH, ricavando i valori delle  $\epsilon$  per le due specie  $\text{HUmb}$  e  $\text{Umb}^-$  dalle assorbanze delle due soluzioni a pH estremo;
- ✓ risolvere per ciascun valore di pH i due sistemi di equazioni lineari, ricavando le coppie di valori di  $[\text{HUmb}]$  e  $[\text{Umb}^-]$  corrispondenti;
- ✓ applicare il metodo dei minimi quadrati all'equazione:

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

usando i due set di dati.

L'intercetta della retta di regressione fornisce il pKa dell'umbelliferone.





punto isosbestico