

Corso di Metodologie Bioanalitiche Ambientali con Lab

Mod-A

Orari del corso:

Mecoledì 10:30-12:30

Giovedì 10:30-12:00

Docente

Prof Elena Chianese

Argomenti del corso ed obiettivi

- Conoscenze di base in un laboratorio di Chimica Analitica -Preparazione di soluzioni a titolo noto (unità di concentrazione); errori associati alle misure.
- Valutazione degli errori in chimica analitica - Errori sistematici. Errori casuali. Media e deviazione standard.
- Sistemi certificati per la misura dei contaminanti atmosferici
- Campionamento - Metodiche di campionamento. Rappresentatività del campione. Contenitori, stabilizzazione e conservazione del campione.
- Spettroscopia molecolare di assorbimento UV-vis - Strumentazione. Lo spettro di assorbimento. La legge di Lambert-Beer
- Spettroscopia di emissione e di assorbimento atomica –Strumentazione. Spettroscopia a fiamma e sorgenti a plasma.
- Trattamento statistico dei dati - Livelli di fiducia. Verifica di ipotesi. Limiti di rilevabilità. Metodi di minimi quadrati e curve di calibrazione.

Testi consigliati:

Chimica analitica strumentale, Skoog, Holler, Crouch, **Ed. Edises**

Fondamenti di Chimica Analitica di Skoog e West, F. J. Holler, S. R. Crouch, **Ed. Edises**

La chimica analitica è quella parte della chimica che copre le attività volte all'identificazione, alla caratterizzazione chimico-fisica e alla determinazione quali-quantitativa dei componenti di un dato campione.

La chimica analitica strumentale descrive le tecniche di laboratorio e le strumentazioni che consentono di ottenere tali informazioni.

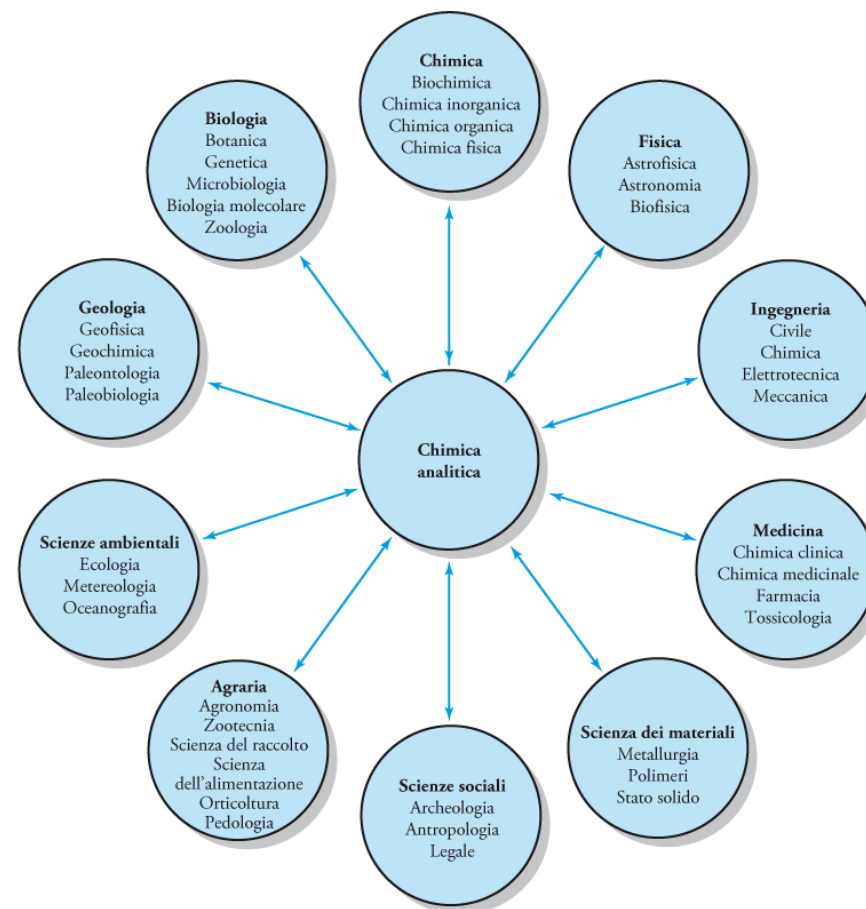


Figura 1-1 Relazione tra la chimica analitica, altre branche della chimica e le altre scienze. La posizione centrale della chimica analitica nel diagramma riflette la sua importanza e la portata delle sue interazioni con molte altre discipline.

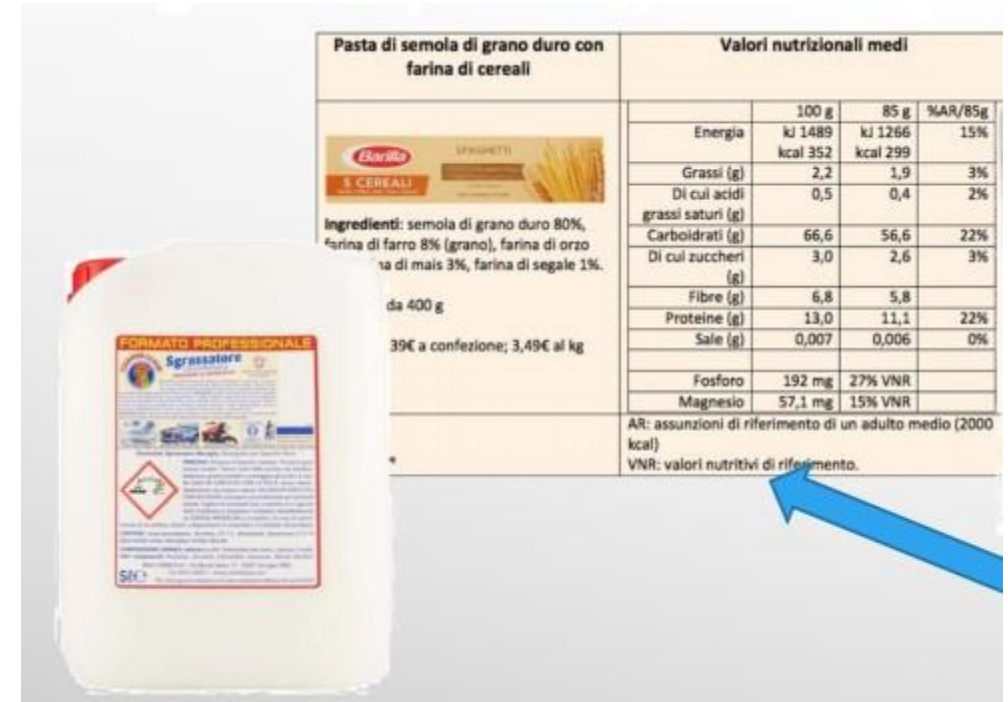
...nel quotidiano:

Nei test di gravidanza una porzione di campione (urina) viene depositata su una striscia e per azione capillare fluisce verso la parte dello stick in cui vi è depositato l'anticorpo legato a nanoparticelle che, se legate, danno un complesso di colore rosso.

L'ormone hcG (in questo caso l'antigene), presente in caso di gravidanza, si lega con l'anticorpo formando il complesso colorato che viene evidenziato come striscia rossa.



Esempio di risposta qualitativa: c'è/non c'è



Pasta di semola di grano duro con farina di cereali	Valori nutrizionali medi		
	100 g	85 g	%AR/85g
Elarillo SPAGHETTI + CEREALI Ingredienti: semola di grano duro 80%, farina di farro 8% (grano), farina di orzo 3%, farina di mais 3%, farina di segale 1%. da 400 g 39€ a confezione; 3,49€ al kg	Energia	kJ 1489 kcal 352	kJ 1266 kcal 299 15%
	Grassi (g)	2,2	1,9 3%
	Di cui acidi grassi saturi (g)	0,5	0,4 2%
	Carboidrati (g)	66,6	56,6 22%
	Di cui zuccheri (g)	3,0	2,6 3%
	Fibre (g)	6,8	5,8
	Proteine (g)	13,0	11,1 22%
	Sale (g)	0,007	0,006 0%
	Fosforo	192 mg	27% VNR
	Magnesio	57,1 mg	15% VNR

AR: assunzioni di riferimento di un adulto medio (2000 kcal)
VNR: valori nutritivi di riferimento.

I prodotti che comunemente usiamo, riportano le informazioni relative alla loro composizione:

- Cosa c'è
- Quanto ce n'è?

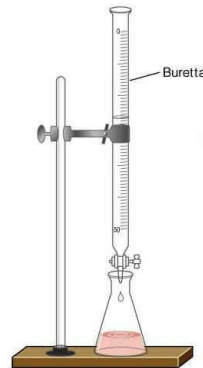
In generale, il risultato di una analisi quantitativa si ottiene da due misure:

Massa o volume del campione da analizzare

Misura di una quantità che sia proporzionale all'analita da analizzare quale massa, volume, intensità di luce o carica elettrica.

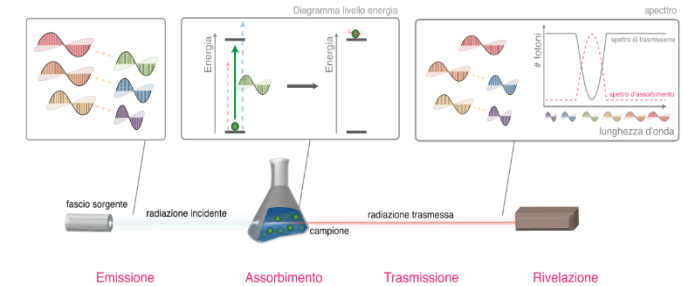
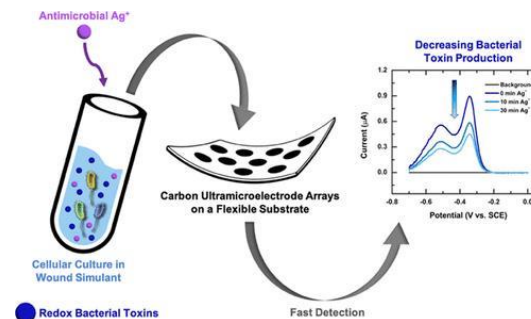
Questa informazione completa l'analisi ed in base alla natura del parametro misurato si distinguono i metodi analitici in:

- Metodi gravimetrici



Metodi volumetrici

- Elettroanalitici



- Spettroscopici

La misura di una grandezza fisica è un'operazione attraverso la quale viene stabilito quante volte un campione di riferimento della medesima grandezza fisica, preso come unità di misura, è contenuto nella grandezza che si voglia misurare.

Se G è la grandezza da misurare e U_G l'unità di misura scelta, vale la relazione:

$$G = nU_G$$

In campo scientifico esiste l'accordo di utilizzare definite unità di misura, quelle individuate dal Sistema Internazionale

	<i>grandezza</i>	<i>dimensione</i>	<i>simbolo SI</i>
Unità di misura fondamentali	<i>lunghezza</i>	<i>metro</i>	<i>m</i>
	<i>massa</i>	<i>chilogrammo</i>	<i>Kg</i>
	<i>tempo</i>	<i>secondo</i>	<i>s</i>
	<i>temperatura</i>	<i>grado Kelvin</i>	<i>K</i>
	<i>corrente elettrica</i>	<i>ampere</i>	<i>A</i>
	<i>intensità di corrente</i>	<i>candela</i>	<i>cd</i>
	<i>quantità di sostanza</i>	<i>mole</i>	<i>mol</i>

Unità di misura
derivate

grandezza	unità	simbolo	definizione	dimensioni
forza	newton	N		Kg m s^{-2}
energia	joule	J	$\text{N}\cdot\text{m}$	$\text{Kg m}^2 \text{s}^{-2}$
pressione	pascal	Pa	$\text{N}\cdot\text{m}^{-2}$	$\text{Kg m}^{-1} \text{s}^{-2}$
potenza	watt	W	$\text{J}\cdot\text{s}^{-1}$	$\text{Kg m}^2 \text{s}^{-1}$
quantità carica elett.		coulomb	C	$\text{A}\cdot\text{s}$
diff. di potenziale	volt	V	$\text{W}\cdot\text{A}^{-1}$	$\text{Kg m}^2 \text{s}^{-3} \text{A}^{-1}$
flusso magnetico	weber	Wb	$\text{V}\cdot\text{s}$	$\text{Kg m}^2 \text{s}^{-2} \text{A}^{-1}$
frequenza	hertz	Hz		s^{-1}
campo magnetico	tesla	T	$\text{Wb}\cdot\text{m}^{-2}$

Prefissi del sistema SI

le frazioni ed i multipli di queste unità sono

fattore	prefisso	simbolo	fattore	prefisso	simbolo
10^{-1}	deci	d	10^1	deca	da
10^{-2}	centi	c	10^2	etto	h
10^{-3}	milli	m	10^3	kilo	k
10^{-6}	micro	μ	10^6	mega	M
10^{-9}	nano	n	10^9	giga	G
10^{-12}	pico	p	10^{12}	tera	T
10^{-15}	femto	f	10^{15}	peta	P
10^{-18}	atto	a	10^{18}	exa	E

Dovendo «quantificare» un analita, useremo la grandezza «massa»; le masse di una sostanza vanno sempre riferite all'estensione del campione analizzato, espressa anch'essa come massa o volume.

Dobbiamo quindi trovare la *concentrazione* dell'analita. La concentrazione è la grandezza che esprime la quantità di sostanza presente in un'unità di volume/peso.

La sostanza disciolta è detta SOLUTO

Il mezzo in cui la sostanza è disciolta è detto SOLVENTE

• Molarità	moli per L di soluzione
• Molalità	moli per kg di solvente
• Normalità	equivalenti per L di soluzione
• Frazione molare	moli su moli totali
• Percento	Peso su peso totale
	volume su volume totale
• Ppm (ppb, ppt)	mg (μg/pg) per kg di soluzione

In chimica analitica le unità di misura più utilizzate per esprimere la concentrazione di un analita in soluzione sono

👉 $\frac{g}{L}$, grammi di analita per litro di soluzione, e le concentrazioni collegate quali $\frac{mg}{L}$ e $\frac{\mu g}{L}$.

👉 molarità, indicata col simbolo M , uguale al numero di moli di analita (g/PM) per litro di soluzione.

Le due unità di misura delle concentrazioni sono legate tra loro dalla relazione

$$\frac{\frac{g}{PM}}{L} = \frac{n_{moli}}{L} = M$$

...riguardiamo gli esercizi di chimica generale!!

Un problema tipico di un laboratorio di chimica analitica è l'ottenimento di soluzioni a titolo (concentrazione) diversa rispetto ad una soluzione di partenza (soluzione madre). Nel caso in cui otteniamo soluzioni a concentrazione più bassa, parliamo di diluizione.

V_1, C_1 volume e concentrazione della soluzione di partenza
 V_2, C_2 volume e concentrazione della soluzione finale (più diluita).

Dobbiamo ricordare che anche aggiungendo una maggiore quantità di solvente, la quantità assoluta (in massa o in moli) di soluto resta invariata, pertanto vale la relazione:

$$V_1 \times C_1 = V_2 \times C_2$$

m di soluto

Possiamo affermare che questa è la relazione fondamentale della chimica analitica!!

Se voglio conoscere il volume della soluzione finale per avere una concentrazione C_2 , uso la relazione:

$$\frac{V_1 \times C_1}{C_2} = V_2$$

Aggiungeremo al volume V_1 prelevato, tanto solvente da arrivare al volume V_2 così calcolato, ottenendo la concentrazione finale C_2

Mettiamo in pratica questa relazione!

In laboratorio molto spesso si parte da soluzioni concentrate per preparare soluzioni diluite.

Quando si parla di un acido concentrato si intende una soluzione satura dell'acido in questione e la concentrazione di questi acidi è data in percentuale in peso. Nell'etichetta è anche riportata la densità, cioè il peso in grammi di un mL di soluzione.

H_2SO_4 96%

HNO_3 75%

HCl 37%

CH_3COOH 99%

Partendo da queste informazioni, la prima cosa che dobbiamo fare, è ottenere la concentrazione espressa come Molarità (M)

% \longrightarrow MOLARITÀ

HCl 37% m/m (w/w)

$d=1.19 \text{ g/ml}$

Massa di soluzione per volume di soluzione

1L pesa 1190 g

$$37 : 100 = x : 1190$$

Dalla composizione % ricaviamo la massa di HCl

In 1 L ci sono $\frac{1190 \times 37}{100} = 440.3 \text{ g HCl}$

cioè $\frac{440.3}{36.46} = 12.079 = 12.1 \text{ moli di HCl}$

Con il peso molare calcoliamo le moli di HCl

HCl 12.1 M

Preparazione di un litro di soluzione 2M da una soluzione di HCl concentrato

La concentrazione dell'acido cloridrico concentrato è = 12.1 M

Devo preparare un litro di soluzione di HCl 2 M. Applico la formula

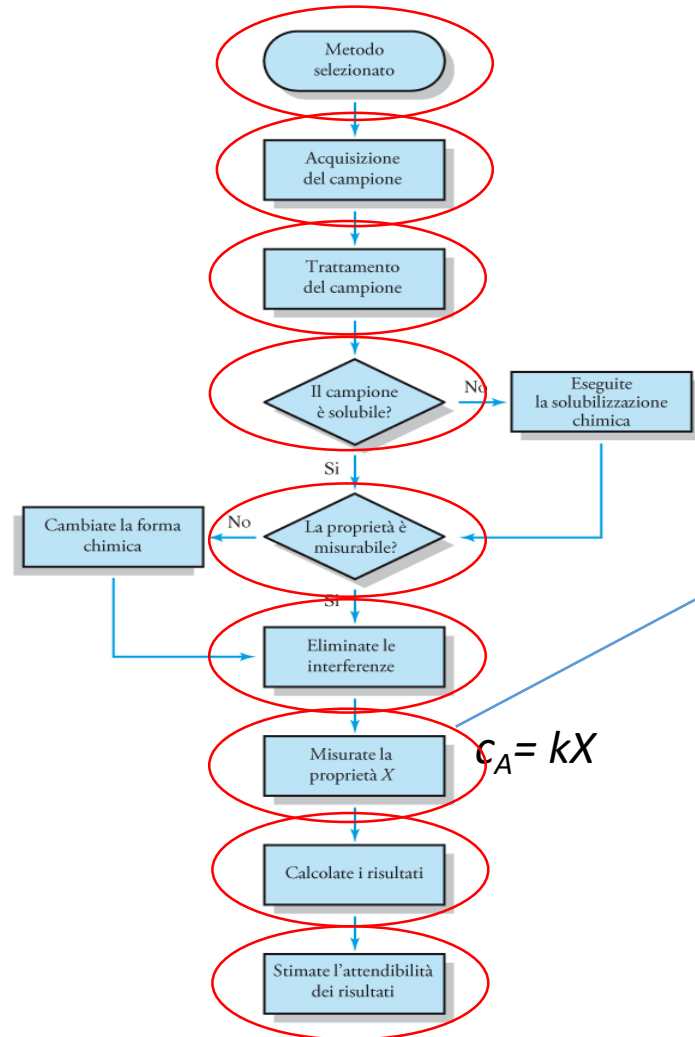
$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_x$$

$$2M \times 1L = 12.1M \times V_x$$

$$V_x = \frac{V_1 \times C_1}{C_2} = \frac{1L \times 2M}{12M} = 0.1666 L = 166 \text{ mL}$$

Servono, quindi, 166 mL di soluzione concentrata da portare ad un volume di 1 L con acqua distillata.

Rispondiamo alla stessa domanda utilizzando l'acido solforico, vogliamo cioè ottenere una concentrazione 5 volte più bassa di quella di partenza.



$$C_A = kX$$

Figura 1-2 Diagramma di flusso che mostra le fasi in un'analisi quantitativa. Ci sono numerosi percorsi possibili tra le fasi in un'analisi quantitativa. Nell'esempio più semplice, rappresentato dal percorso centrale verticale, selezioniamo un metodo, acquisiamo e trattiamo il campione, dissolviamo il campione in un solvente opportuno, misuriamo una proprietà dell'analisita, calcoliamo i risultati e stimiamo l'affidabilità dei risultati. In funzione della complessità del campione e della scelta del metodo, possono essere necessari diversi altri percorsi.

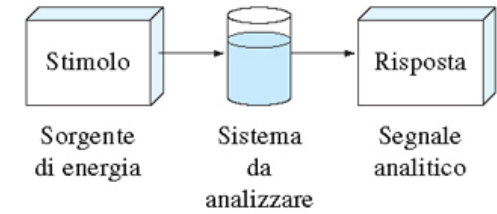


FIGURA 1-1 Diagramma a blocchi dell'intero processo di misura di uno strumento.



Holler, Skoog, Crouch
Chimica Analitica Strumentale, II Ed.
 EdiSES

L'operazione più semplice che ci capiterà di fare è la pesata di un campione da analizzare oppure di un soluto da cui preparare una soluzione.

Lo strumento per effettuare la pesata è la bilancia.

Le bilance, in funzione della loro capacità, sono classificate:

	<i>Capacità (g)</i>	<i>Precisione (mg)</i>
Tecniche (Macro)	1000-5000	10-100
Analitiche	150-200	0,1
Semimicro	10-30	0,01
Micro	0,5-3	0,001
Ultra-micro	0,025	0,0001



Ogni misura è affetta da *errore*

- Gli errori si combinano tra loro in modo da rendere ogni nuova misura più o meno diversa dalla precedente
- L'incertezza della misura sperimentale non può mai essere eliminata completamente perciò il valore vero di una quantità è sempre sconosciuto
- L'entità dell'errore può essere valutata
- È possibile definire i limiti entro cui il valore vero di una quantità misurata cade con un dato livello di probabilità

Precisione: accordo tra risultati di misurazioni successive.

Accuratezza: accordo tra il risultato sperimentale ed il valore vero

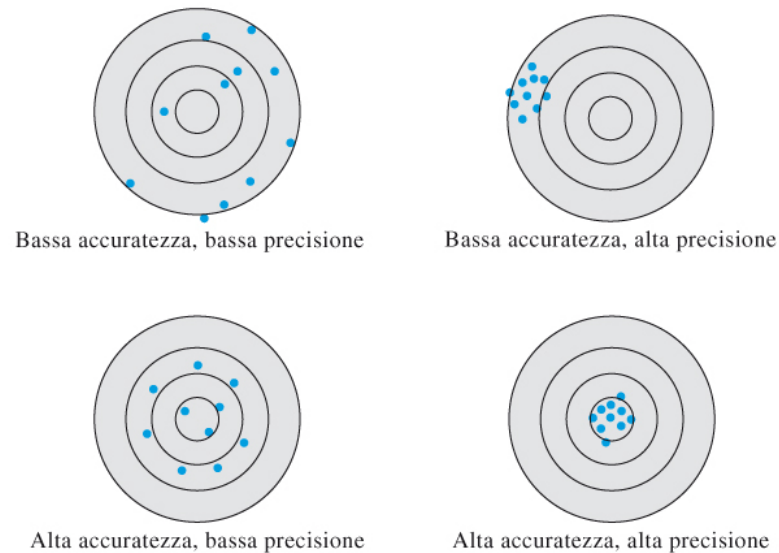


Figura 5-2 Illustrazione dell'accuratezza e della precisione usando un modello che fa riferimento a frecce scagliate su un bersaglio. Si noti che si possono avere risultati caratterizzati da una elevata precisione (in alto a destra) con una media non accurata e una media accurata (in basso a sinistra) con punti a bassa precisione.

Perché una misura può essere poco precisa e/o poco accurata? Perché commettiamo degli errori! Che tipo di errori?

Gli errori possono essere **casuali** o **sistematici**.

```
graph TD; A[Gli errori possono essere casuali o sistematici.] --> B[sono gli errori dovuti a fenomeni casuali e non controllabili, che influenzano la lettura della misura. Sono errori casuali tutte quelle incertezze sperimentali che possono essere rilevate mediante la ripetizione delle misure: non possono mai essere eliminati del tutto, ma la loro influenza sulla misurazione può essere fortemente ridotta grazie a strumenti statistici. Proprio questi strumenti sono oggetto di questo corso: grazie a questi strumenti, al ripetersi delle misure, si possono determinare dei parametri in modo tale che le misurazioni che si ottengono oscillano attorno ad un valore pressoché costante.]; A --> C[sono gli errori insiti nello strumento di misura. Non possono essere eliminati del tutto ma è possibile ridurre l'errore usando uno strumento più preciso. Le fonti principali di questi errori sono, il difetto dello strumento usato, l'interazione strumento - sperimentatore, l'interazione strumento - fenomeno in esame, le errate condizioni di lavoro o l'imperfetta realizzazione del fenomeno. Gli errori sistematici sono difficili da individuare e da ridurre poiché, per loro stessa natura, si ripetono appunto sistematicamente ad ogni misurazione.]; B --> D[influenzano la precisione]; C --> E[influenzano l'accuratezza];
```

•sono gli errori dovuti a fenomeni casuali e non controllabili, che influenzano la lettura della misura. Sono errori casuali tutte quelle incertezze sperimentali che possono essere rilevate mediante la ripetizione delle misure: non possono mai essere eliminati del tutto, ma la loro influenza sulla misurazione può essere fortemente ridotta grazie a strumenti statistici. Proprio questi strumenti sono oggetto di questo corso: grazie a questi strumenti, al ripetersi delle misure, si possono determinare dei parametri in modo tale che le misurazioni che si ottengono oscillano attorno ad un valore pressoché costante.

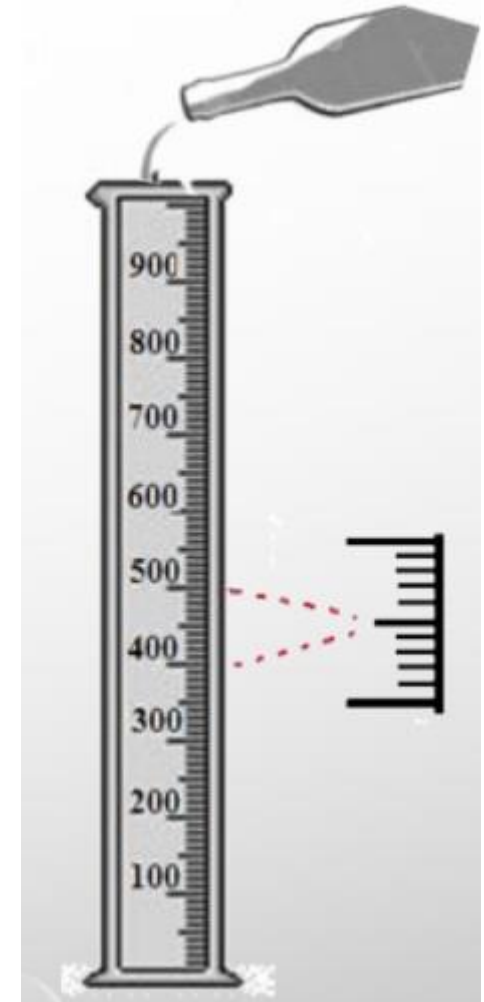
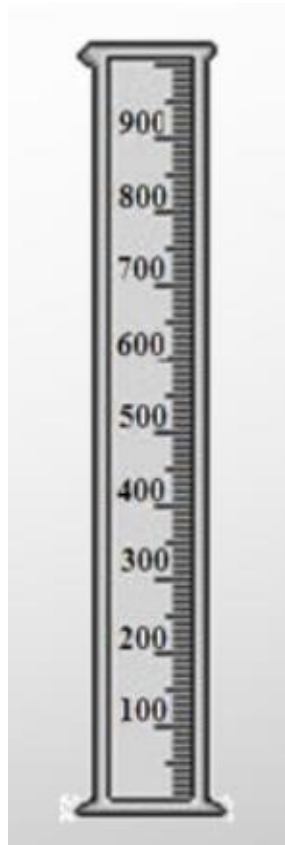
influenzano la **precisione**

•sono gli errori insiti nello strumento di misura. Non possono essere eliminati del tutto ma è possibile ridurre l'errore usando uno strumento più preciso. Le fonti principali di questi errori sono, il difetto dello strumento usato, l'interazione strumento - sperimentatore, l'interazione strumento - fenomeno in esame, le errate condizioni di lavoro o l'imperfetta realizzazione del fenomeno. Gli errori sistematici sono difficili da individuare e da ridurre poiché, per loro stessa natura, si ripetono appunto sistematicamente ad ogni misurazione.

influenzano l' **accuratezza**

Abbiamo una bottiglia da 500 ml e vogliamo verificare il volume di acqua che può contenere, utilizzando un cilindro graduato da 1000 ml.

Riempiamo più volte la bottiglia ed ogni volta misuriamo nel cilindro la quantità d'acqua che abbiamo utilizzato. Annotiamo ogni volta il volume



	mL misurati
Misura 1	510
Misura 2	490
Misura 3	510
Misura 4	480
Misura 5	530
Misura 6	480
Misura 7	490
Misura 8	520
Misura 9	500
Misura 10	480

Se ripetiamo 10 volte questa operazione, possiamo immaginare di ottenere un insieme di dati come quello in tabella. Come usiamo queste informazioni?

La prima cosa che possiamo fare è calcolare il valor medio o media aritmetica: somma dei valori diviso numero dei valori.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

Nel nostro caso:

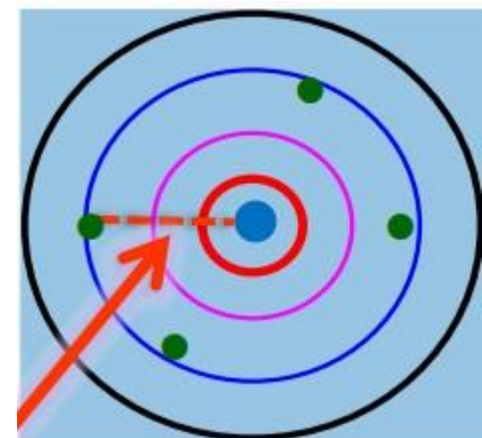
$$\bar{x} = \frac{510+490+510+480+530+480+490+520+500+480}{10} = 499 \text{ ml}$$

Questa informazione di base, ossia un valore prossimo al valore «vero» deve essere corredato di altre informazioni.

La prima informazione necessaria è lo scarto:

$$d_i = |x_i - \bar{x}|$$

Esso rappresenta la distanza tra una singola misura ed il valore medio, \bar{x}



Lo scarto ci consente di ricavare un'altra informazione fondamentale, la deviazione standard:

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

Data una serie di dati ripetuti la deviazione standard rappresenta l'incertezza della misura.

La deviazione standard è un indice della dispersione dei dati rispetto al valor medio. La nostra misura sarà data dal valore medio delle misure \pm un valore che tenga conto della dispersione dei dati.

Consente di definire un intervallo «intorno» al valor medio all'interno del quale si troverà il valore vero. Il risultato sarà espresso come valor medio \pm la deviazione standard.

Con i nostri dati, la deviazione standard è pari a 18, quindi il risultato sarà espresso come:

$$499 \pm 18 \text{ ml}$$

Il valore «vero» sarà compreso nell'intervallo:

$$481-517 \text{ ml.}$$

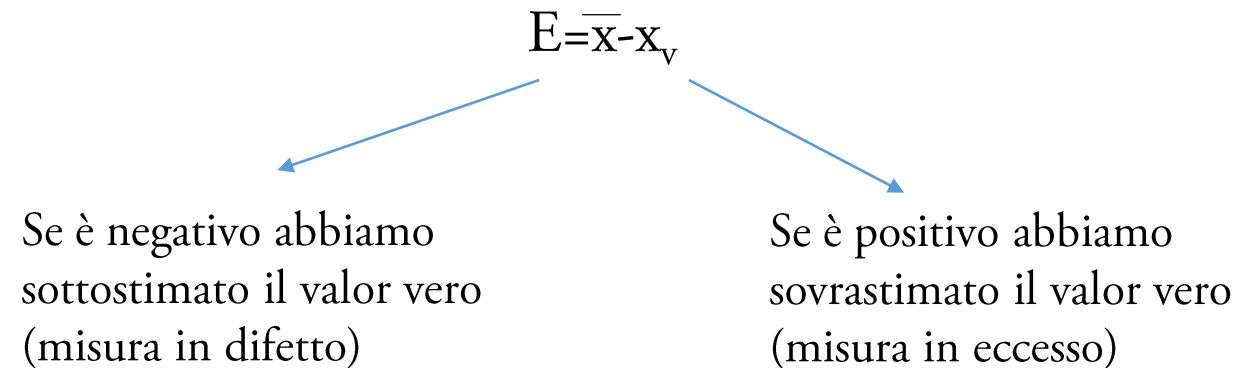
Il rapporto tra la deviazione standard ed il valore medio fornisce una stima della precisione della misura; se esprimiamo questo rapporto come percentuale, otteniamo la precisione percentuale.

Immaginiamo di avere a disposizione il valore «vero» di una grandezza, ad esempio di un volume, che supponiamo essere 100ml.

Misuriamo questo volume più volte (usando il sistema della bottiglia e del cilindro come fatto in precedenza) ottenendo la serie di misure:

	Volume, ml
Valore vero	100
Misura 1	98
Misura 2	102
Misura 3	96
Misura 4	95
Misura 5	101
Misura 6	103
Misura 7	97
Media	

Lo scarto tra valore medio e valore medio ci dà *l'errore assoluto* associato alla misura



Non sempre questo modo di esprimere l'errore è utile, non ci consente di capire quando è «importante l'errore» commesso

Usiamo quindi l'errore relativo e l'errore relativo percentuale:

Errore relativo:

Rapporto tra scarto e valore vero

$$E = \frac{\bar{x} - x_v}{x_v}$$

In questo modo otteniamo una grandezza adimensionale, non dipendente dunque dall'unità di misura scelta, e abbiamo una stima dell'importanza dell'errore commesso rispetto al valore della grandezza misurata.

Errore relativo percentuale:

Rapporto tra scarto e valore vero, per cento

$$E = \frac{\bar{x} - x_v}{x_v} \cdot 100$$

L'errore relativo viene normalizzato su base percentuale. Possono essere confrontati gli errori commessi su diverse grandezze misurate. Oppure possiamo confrontare gli errori commessi con diverse tecniche misurate.



Materiali standard di riferimento del NIST.

Dalla tabella della slide 22 calcolare: valor medio, deviazione standard, scarto, errore relativo ed errore percentuale.

Vediamo quali considerazioni possiamo fare utilizzando i parametri finora definiti.

Consideriamo due serie di misure:

1. Distanze misurate (km)
100
98
102
99
97
103
101

Valore vero: 98

Distanze misurate (m)
289
300
299
311
303
297

Valore vero: 332

La prima cosa che possiamo fare è calcolare il valore medio delle misure effettuate e lo scarto rispetto al valore vero:

Media serie 1: 100

Media serie 2: 300

Scarto serie 1: $\text{media} - \text{valore vero} = 100 - 98 = 2$

Scarto serie 2: $\text{media} - \text{valore medio} = 300 - 332 = -32$

Considerazioni: lo scarto, ossia l'errore nella prima serie è minore, in valore assoluto rispetto allo scarto nella seconda serie.

Gli errori così calcolati sono dipendenti dalla dimensione (in un caso km e nell'altro m). Per fare una valutazione indipendente dall'unità di misura, possiamo considerare l'errore relativo.

$$E = \frac{\bar{x} - x_v}{x_v} = \frac{100 \text{ Km} - 98 \text{ Km}}{98 \text{ Km}} = \frac{2 \text{ Km}}{98 \text{ Km}} = 0.020$$

$$E = \frac{\bar{x} - x_v}{x_v} = \frac{300 \text{ m} - 332 \text{ m}}{332 \text{ m}} = -\frac{32 \text{ m}}{332 \text{ m}} = -0.096$$

Possiamo infine normalizzarlo, considerando l'errore percentuale:

$$E = \frac{\bar{x} - x_v}{x_v} \cdot 100 = \frac{100 \text{ Km} - 98 \text{ Km}}{98 \text{ Km}} \cdot 100 = \frac{2 \text{ Km}}{98 \text{ Km}} \cdot 100 = 2 \%$$

$$E = \frac{\bar{x} - x_v}{x_v} \cdot 100 = \frac{300 \text{ m} - 332 \text{ m}}{332 \text{ m}} \cdot 100 = -\frac{32 \text{ m}}{332 \text{ m}} \cdot 100 = -9.6 \%$$

Osserviamo che:

-la prima serie ha un errore percentuale inferiore a quello commesso nella seconda serie, dunque lo *strumento utilizzato è più attendibile*.

- Lo strumento utilizzato nella prima serie sovrastima del 2%, lo strumento utilizzato nella seconda serie sottostima del 10%

- Lo scarto rappresenta la misura dell'errore sistematico, cioè strumentale.

Consideriamo le due serie di misure e calcoliamo le deviazioni standard

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

1. Distanze misurate (km)
100
98
102
99
97
103
101

Valore vero: 98
Valore medio: 100
Scarto: 2
Std dev: 2,2

Distanze misurate (m)
289
300
299
311
303
297

Valore vero: 332
Valore medio: 300
Scarto: -32
Std dev: 6,6

La deviazione standard:

- Consente di valutare la precisione della misura
- Consente di valutare un intervallo di precisione intorno alla misura
- Le misure vanno espresse come: media \pm dev std

Dalla deviazione standard e dal valor medio possiamo calcolare la precisione percentuale di ciascuna serie di misure:

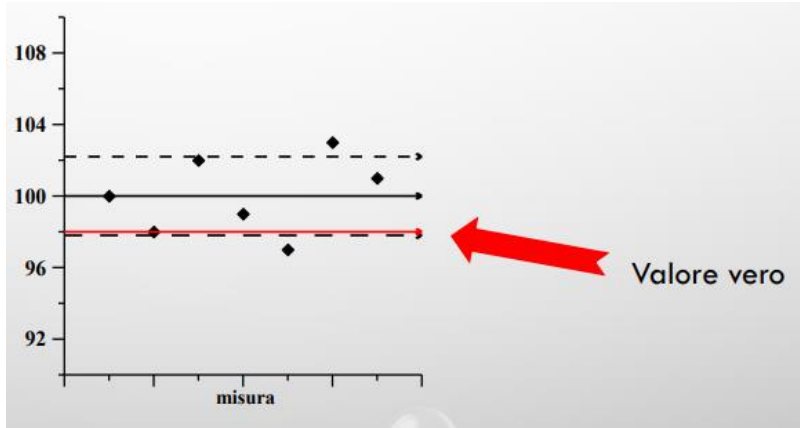
$$\text{Precisione \%} = (\text{dev std}/\text{media}) * 100$$

In entrambi i casi avremo 2!!

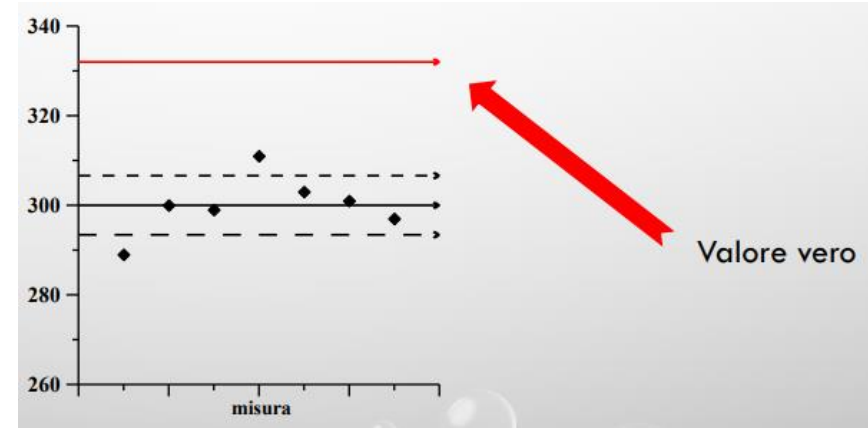
La precisione percentuale rappresenta l'errore casuale associato alla misura.

Tirando le somme, l'analisi dei dati cosa ci consente di affermare?

- Lo strumento utilizzato per la prima serie di misure fornisce dati il cui valore medio è vicino al valore vero.
- Lo strumento usato per la seconda serie di misure fornisce dati la cui media è lontana dal valore vero; il valore vero non è incluso nell'intervallo ottenuto considerando la media e la deviazione standard



Serie 1



Serie 2

- Possiamo affermare che lo strumento utilizzato per la serie 2 è starato poiché il valor è fuori dall'intervallo individuato dalla dev standard e dal valor medio. L'errore strumentale è elevato, l'accuratezza è bassa.
- Invece le informazioni che abbiamo sull'errore casuale (operatore etc) ci dicono che le due serie di misure sono state eseguite con lo stesso errore casuale (con la precisione)