

# Corso di Metodologie Bioanalitiche Ambientali con Lab

## Mod-A

Orari del corso:

Mcoledì 10:30-12:30

Giovedì 10:30-12:0

Docente

Prof Elena Chianese

La determinazione della concentrazione delle diverse sostanze in un campione di composizione incognita avviene tramite la determinazione di una proprietà fisica riconducibile alla sostanza che si vuole determinare:

CONDUCIBILITÀ  
POTENZIALE ELETTRODICO  
ASSORBIMENTO  
EMISSIONE  
FLUORESCENZA  
RAPPORTO MASSA/CARICA  
RIPARTIZIONE  
POLARIZZABILITÀ  
.....

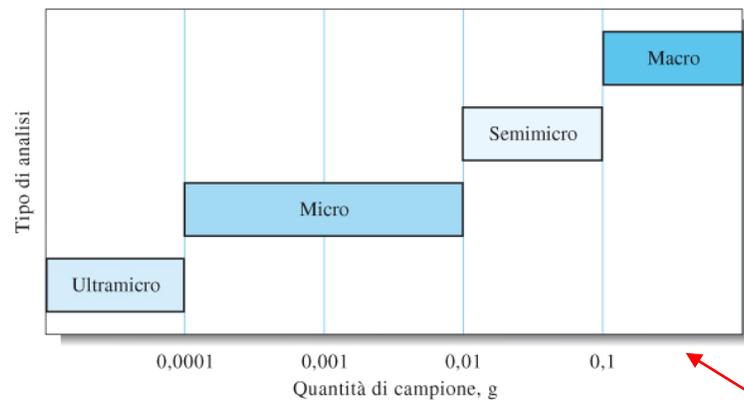
La relazione tra il segnale della proprietà fisica (*osservabile*) e la concentrazione della sostanza che lo genera può venir espressa come legge generale

$$S = f (C)$$

dove  $S$  è l'osservabile ed  $f$  rappresenta la funzione che lega la concentrazione  $C$  all'osservabile  $S$

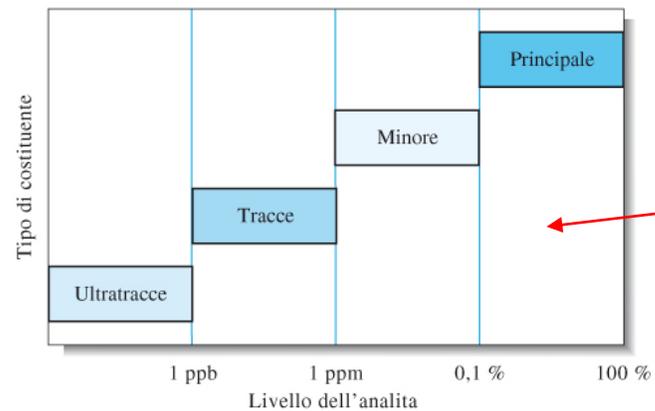
Osservabile	Metodi strumentali
Emissione radiazioni	Spettroscopia atomica UV-vis, a raggi X, di elettroni, Auger, fluorescenza, fosfoluminescenza
Assorbimento di radiazioni	Spettrofotometria atomica e molecolare UV-vis, IR, raggi X, NMR, EPR
Diffusione di radiazioni	Turbidimetria, Nefelometria, Raman,
Rifrazione di radiazioni	Rifrattometria, Interferometria
Diffrazione di radiazioni	Metodi di diffrazione a raggi X e di elettroni
Rotazione radiazioni	Polarimetria, Dicroismo circolare, Dispersione ottica rotatoria
Potenziale elettrico	Potenziometria
Carica elettrica	Coulombometria
Corrente elettrica	Polarografia, Amperometria
Resistenza elettrica	Conduttometria
Proprietà termiche	Calorimetria, Conducibilità termica
Radioattività	Metodi di attivazione e diluizione isotopica

**Figura 8-1** Classificazione delle analisi in base alla quantità del campione.

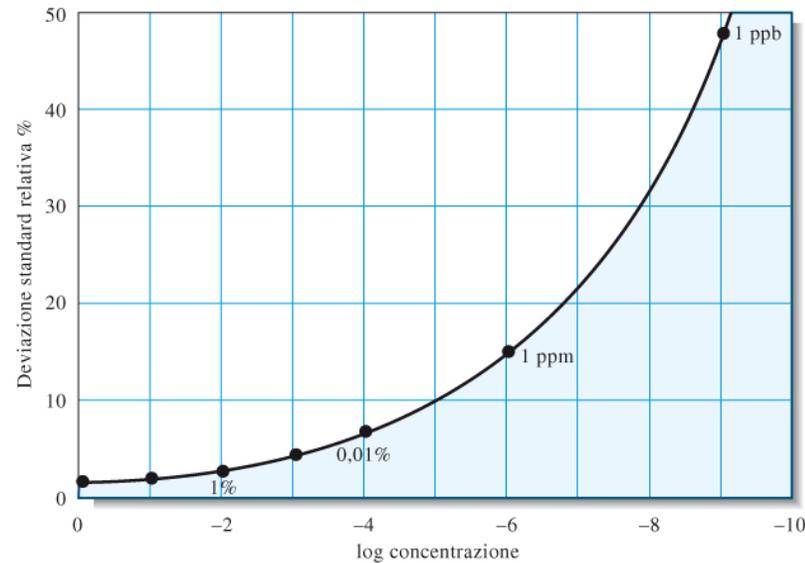


I metodi analitici sono differenziati sulla base della quantità del campione e sul livello di concentrazione atteso dei costituenti.

**Figura 8-2** Classificazione dei tipi di costituenti in base al livello dell'analita.



Livello dell'analita	Tipo di costituente
da 1 a 100%	Principale
da 0,01 (100 ppm) a 1%	Minore
da 1 ppb a 100 ppm	Tracce
< 1 ppb	Ultratracce



**Figura 8-3** Errore interlaboratorio come funzione della concentrazione dell'analita. Si noti che la deviazione standard relativa aumenta drammaticamente con la diminuzione della concentrazione dell'analita. Nell'intervallo delle ultratracce, la deviazione standard relativa tende al 100%. (Da W. Horowitz, *Anal. Chem.*, **1982**, *54*, 67A-76A., DOI: 10.1021/ac00238a002. Copyright 1982 American Chemical Society.)



SKOOG e WEST  
Fondamenti di Chimica Analitica - III Ed.  
Edises



SKOOG e WEST  
Fondamenti di Chimica Analitica - III Ed.  
Edises

La determinazione delle componenti in traccia ed ultratraccia è molto complessa ed affetta da interferenze e contaminazioni. Spesso si ricorre a camere speciali atte a diminuire tali disturbi della misura. L'affidabilità dei risultati tipicamente diminuisce con la diminuzione della concentrazione dell'analita. Se l'interferenza è causata dalle componenti stesse del campione da analizzare, si parla di effetto matrice.

# RELAZIONE PROPRIETÀ FISICHE-CONCENTRAZIONE

$$S = f(C)$$

esempi

Spettrofotometria UV-vis

$$A = \varepsilon l C$$

Spettrofotometria d'emissione atomica

$$I = k C$$

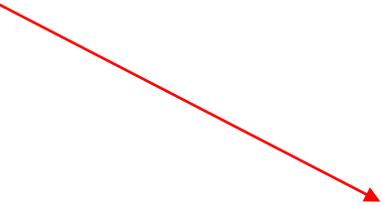
Potenziometria

$$E = E_0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{Red}{Ox}$$

Tali leggi o relazioni sono delle leggi limite, ossia la cui validità è limitata a delle condizioni ideali, in cui sussistano condizioni quali: assenza di interferenze, radiazioni monocromatiche, soluzioni diluite, forza ionica costante, etc...

La reazione strumentale, ossia il segnale, deve essere sempre correlato alla concentrazione di analita, tranne che nei metodi gravimetrici (detti assoluti)

Metodo nullo o isomatico: si confronta la risposta osservata per il campione a concentrazione incognita con la risposta ottenuta per altri campioni di composizione nota. Si attribuisce la concentrazione del campione con risposta più simile.



Nei metodi moderni non si usa più questo approccio se non nei casi in cui si voglia solo valutare se il livello di analita nel campione in esame si superiore o inferiore ad un valore soglia. Si usa un comparatore

Tra i metodi analitici, il più accurato è il metodo della titolazione.

In queste procedure, l'analita reagisce con un reagente standardizzato (titolante) in una reazione a stechiometria nota. La quantità di titolante viene variata fino al raggiungimento dell'equivalenza chimica, detto punto finale della titolazione, indicato dal cambiamento di un indicatore cromatico.

Conosciamo la titolazione dell'HCl con NaOH mediante la reazione:



Si aggiunge una soluzione a concentrazione nota di NaOH usando un indicatore per il controllo del volume aggiunto. Al punto finale le moli di NaOH aggiunte saranno uguali alle moli di HCl nella soluzione a titolo incognito.

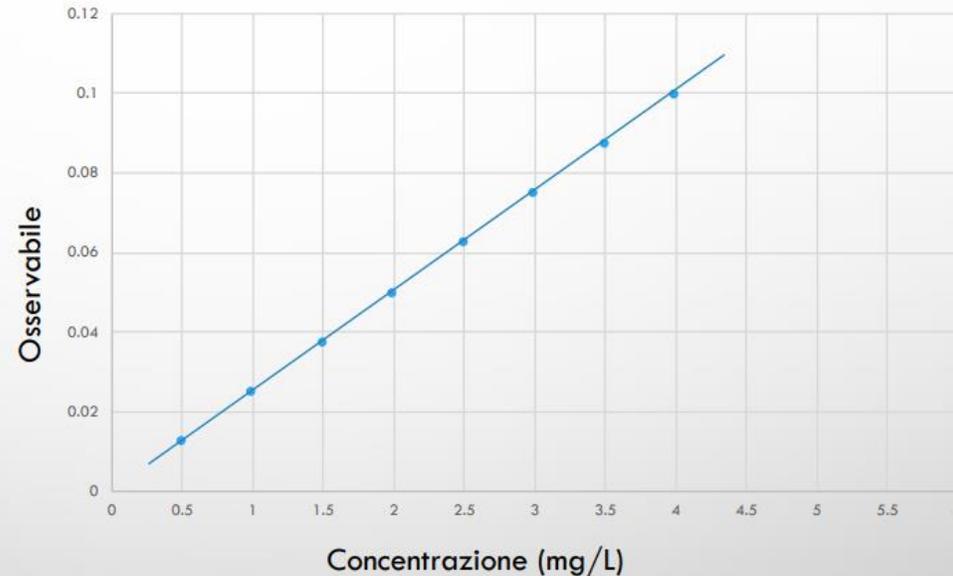
## Calibrazione mediante standard esterno

Per ovviare alle deviazioni alle leggi limite per i campioni reali, nelle analisi strumentali è norma lavorare con una curva di calibrazione.

Lo scopo di questo procedimento è:

Stimare le costanti di proporzionalità tra la risposta segnale e la concentrazione

Curva di calibrazione

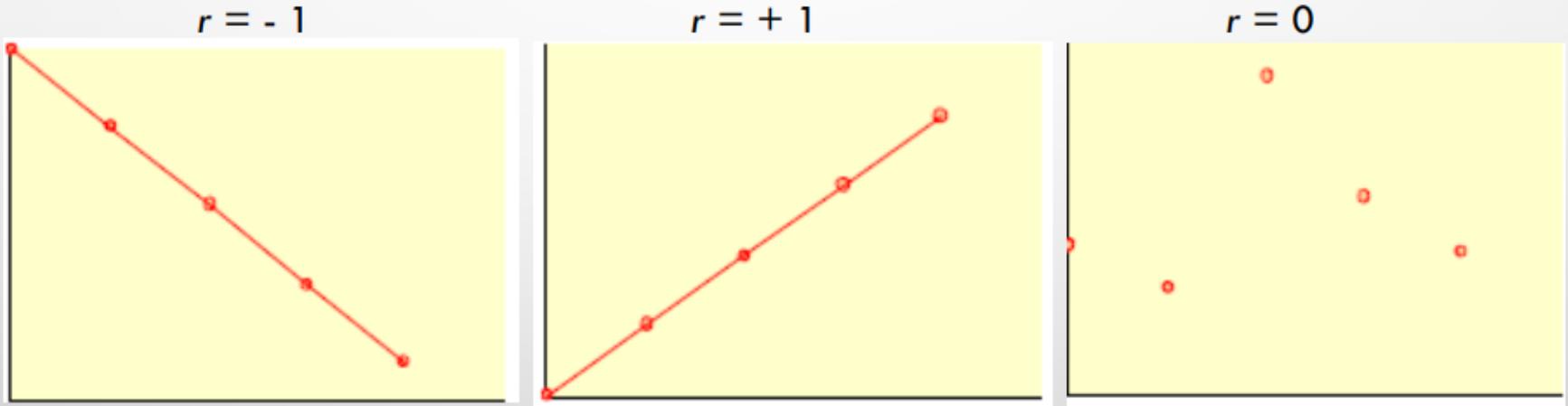


La curva di calibrazione (curva di lavoro) si ottiene preparando una serie di *standard a concentrazioni note* e crescenti di analita. Consente di trovare una relazione tra risposta analitica e concentrazione dell'analita.

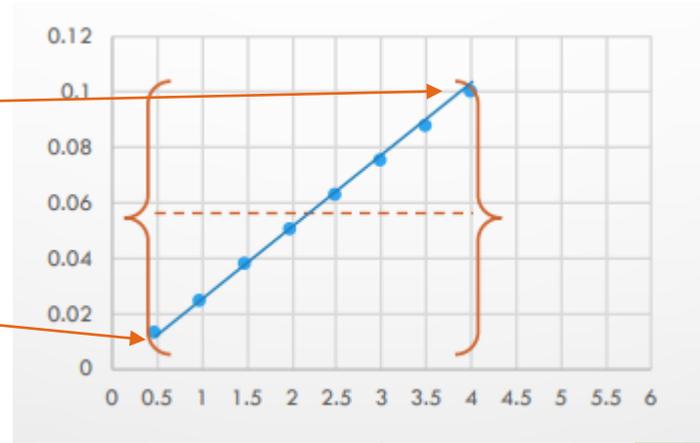
Gli standard vengono letti prima del campione. Le letture degli standard vengono utilizzate per costruire le curve di calibrazione

I grafici dose/risposta seguono nella maggioranza dei casi una relazione lineare

Uno dei modi più usati per verificarlo è il coefficiente di correlazione lineare  $r$ , che può assumere valori da  $-1$  a  $+1$

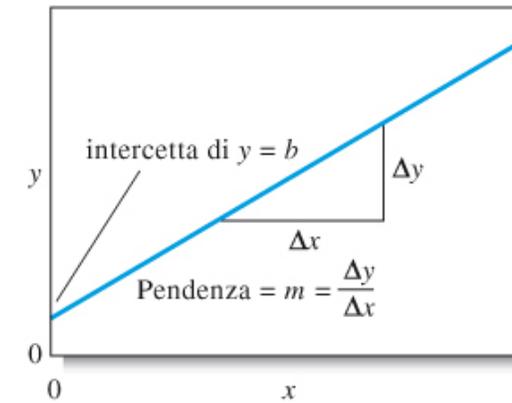
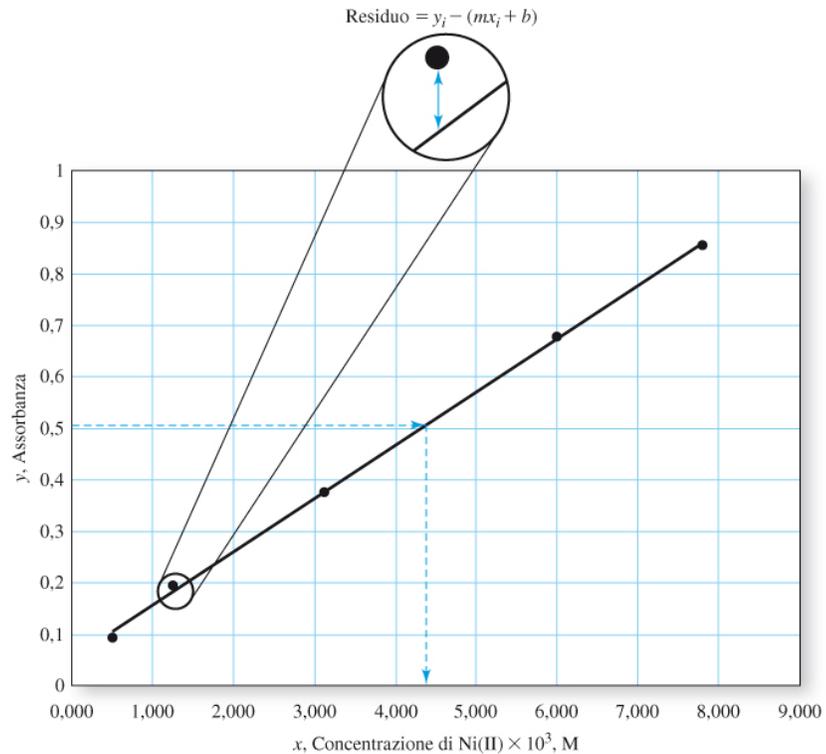


La concentrazione dello standard minima e quella massima rappresentano gli estremi dell'intervallo di calibrazione. Le concentrazioni degli analiti determinati con una tecnica strumentale devono essere contenute nell'intervallo di calibrazione



La retta di calibrazione segue una legge del tipo:  $y = mx + b$

**Figura 8-9** Curva di calibrazione in funzione della concentrazione dell'analita per una serie di standard. I dati degli standard vengono mostrati con dei cerchi pieni. La curva viene utilizzata in modo inverso per ricavare la concentrazione di un campione incognito caratterizzato da un valore di assorbanza di 0,505. Il valore dell'assorbanza viene posizionato sulla curva e la concentrazione relativa a tale valore viene quindi ottenuta tracciando una retta parallela all'asse delle  $y$  fino a intersecare l'asse delle  $x$  (linea tratteggiata). I residui sono le deviazioni verticali tra i punti sperimentali (standard) e quelli previsti dalla curva, come mostrato nell'inserito.



**Figura 8-10** Pendenza e intercetta di una linea retta.

Il metodo della calibrazione esterna si basa sull'assunto che l'analita nel campione si comporti esattamente come l'analita nello standard.

Poiché ciò non è sempre vero, occorre tenere in considerazione il bianco ed il suo segnale strumentale. Si distinguono;

- Bianco ideale
  - bianco di solvente
  - bianco del reagente.

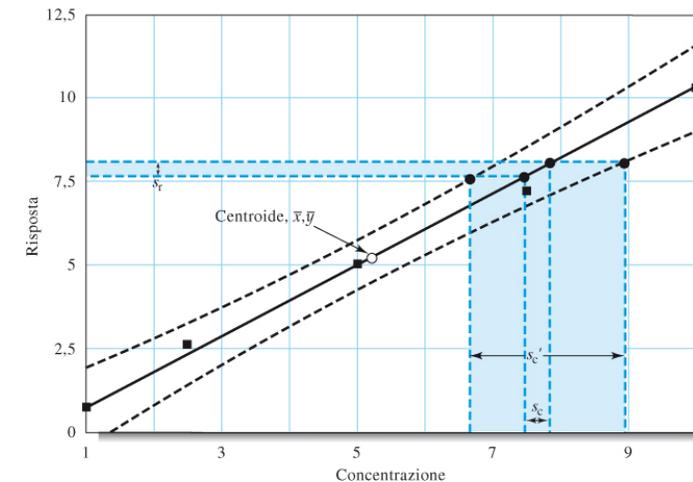
Nonostante l'uso dei bianchi di riferimento, possono comunque esserci fonti di incertezza ed errore:

- Errori nella preparazione degli standard
- Errata conservazione degli standard
- Forma chimica diversa dell'analita rispetto a quella nello standard

La determinazione dell'analita è migliore quanto più siamo vicini al *centroide* della retta di calibrazione.

Prof.ssa Elena Chianese

**Figura 8-11** Effetto dell'incertezza sulla curva di calibrazione. Le linee tratteggiate mostrano i limiti di fiducia per le concentrazioni determinate mediante la linea di regressione. Si noti che l'incertezza aumenta alle estremità del grafico. Solitamente, noi stimiamo l'incertezza della concentrazione dell'analita solo dalla deviazione standard della risposta. L'incertezza della curva di calibrazione può aumentare significativamente l'incertezza della concentrazione dell'analita da  $s_x$  a  $s'_x$ , come mostrato.



È comunque possibile tentare di minimizzare gli errori associati ad una misura.

### Separazione:

Purificare il più possibile l'analita di interesse separandolo dalla matrice. Si usano metodi di separazione quali filtrazioni, scambio ionico, cromatografia etc.



Tempi di misura più lunghi  
Costi maggiori  
Perdita di analita nelle diverse fasi della separazione

### Metodo di saturazione

Aggiunta di grandi quantità delle sostanze interferenti così da rendere l'interferenza indipendente dalla concentrazione dell'interferente stesso



Perdita di sensibilità strumentale

### Modificatori di matrice

Specie non interferenti aggiunte in quantità tali da rendere l'interferenza indipendente dalla concentrazione degli interferenti. Oppure **agenti mascheranti** che reagiscono selettivamente con le sostanze interferenti



Aumento delle impurezze

### Metodo della diluizione

Se l'interferente origina una risposta minima se a basse concentrazioni, è possibile diluire la soluzione



Perdita del segnale per la riduzione di concentrazione anche dell'analita

### Metodo della corrispondenza della matrice

Riproduzione quanto più fedele della matrice, da usare come bianco, al fine di riprodurre le interferenze.



Limitazioni dovute alla purezza dei reagenti, rischio di aggiunta di analita dai reagenti

### Metodo delle aggiunte standard

Si usa quando la matrice non è facilmente riproducibile e le interferenze non possono essere eliminate. Si arricchisce il campione aggiungendo almeno due aliquote successive e note di analita. Si leggono i segnali e si ottiene una curva di calibrazione da cui si estrapola il segnale dell'analita nel campione di partenza.



Conoscenza dell'ordine di grandezza della concentrazione dell'analita da determinare.

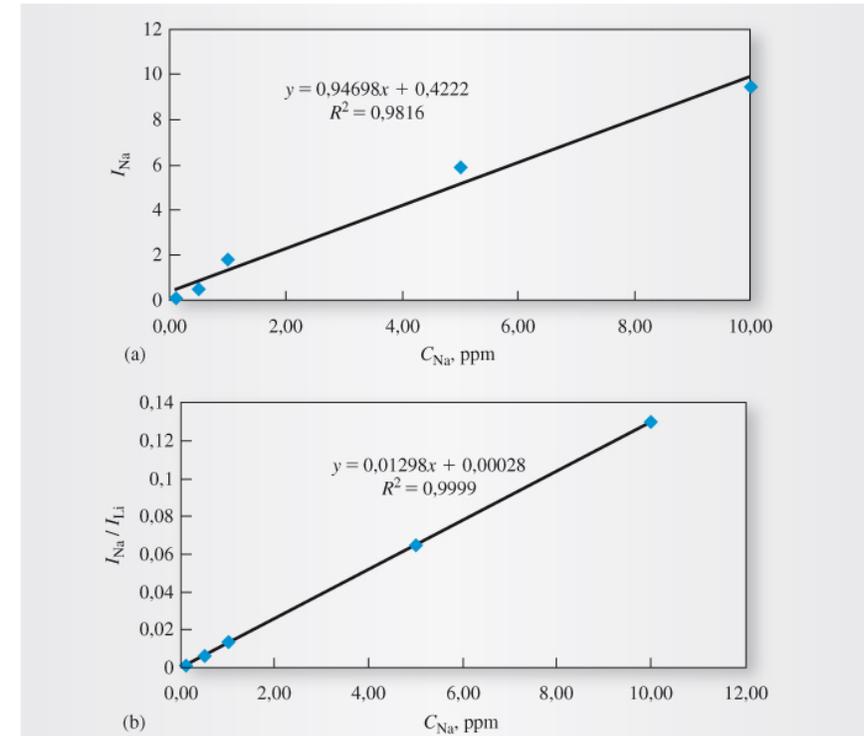
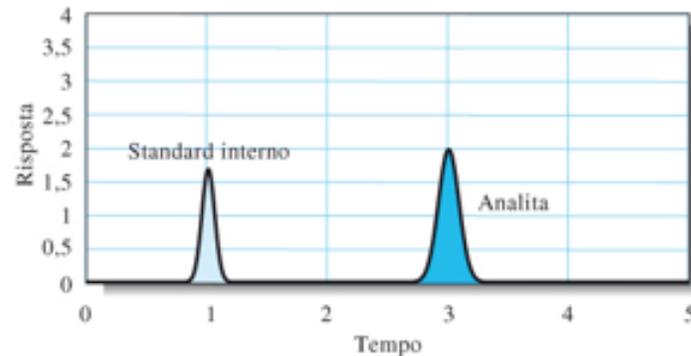
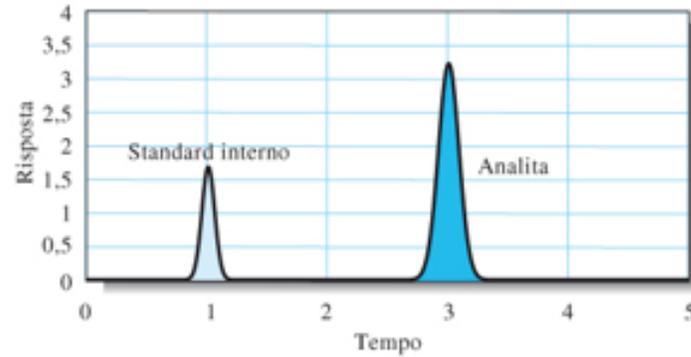
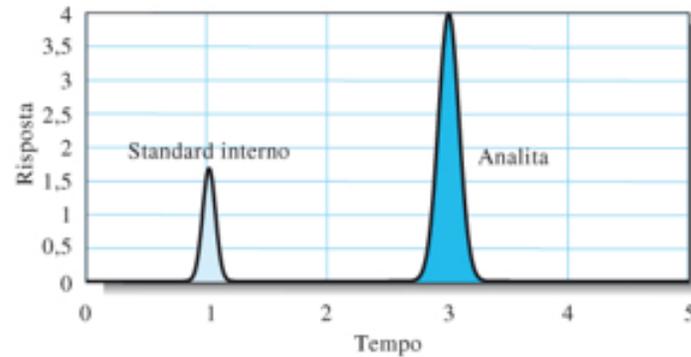
# Metodo dello standard interno

## Metodo dello standard interno

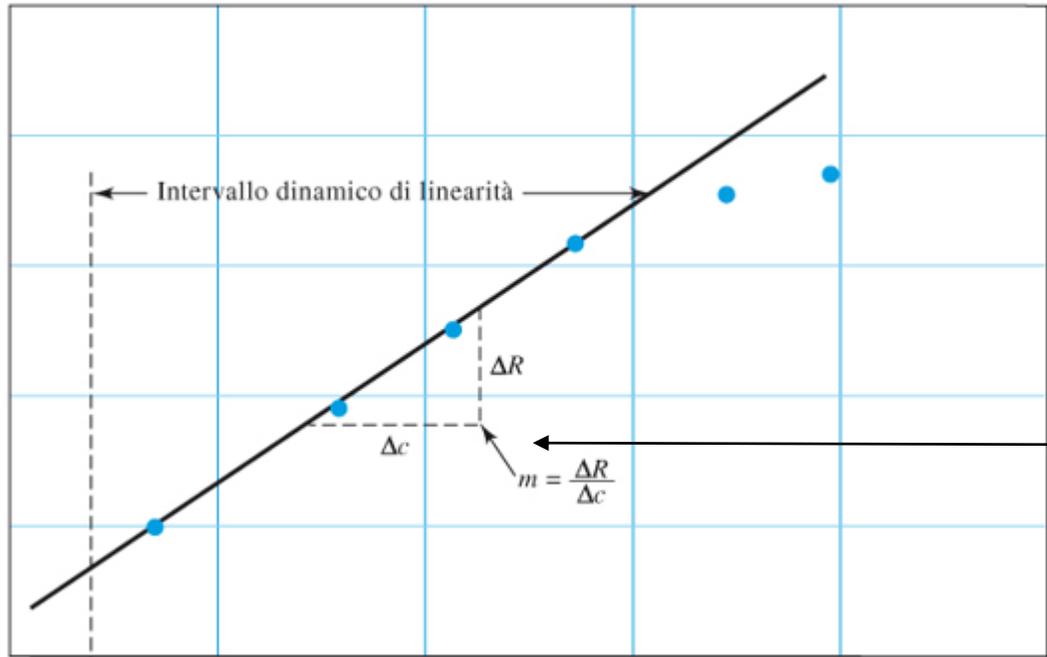
Si aggiunge a tutti i campioni ed alle soluzioni standard una quantità fissa di una specie di riferimento, non interferente. Si legge non il segnale ma il rapporto tra segnali dell'analita e del riferimento.



Aggiunta di impurezze, aggiunte di interferenti diversi da quelli del campione.



**Figura 8-13** In (a) l'intensità di emissione in fiamma del Na viene riportata in grafico in funzione della concentrazione del Na. In (b) viene mostrata la curva di calibrazione del metodo dello standard interno ottenuta riportando in grafico il rapporto delle intensità del Na e del Li in funzione della concentrazione di Na.



Abbiamo già affrontato i concetti di accuratezza e precisione di una misura. Parliamo ora di **sensibilità**

La **sensibilità di calibrazione** è variazione di segnale per unità di variazione della concentrazione dell'analita.

È la pendenza della retta di interpolazione; se l'interpolazione è lineare, la sensibilità è costante.

Il limite di rivelabilità (DL) è la più piccola concentrazione che si possa misurare; ogni tecnica analitica ha un suo DL, calcolato come:

$$DL = \frac{k s_b}{m}$$

$k=2$  (intervallo di fiducia al 92,1%) o  $3$  (98,3%)

La curva di calibrazione ha un intervallo di linearità, il valore inferiore è dato dal DL mentre il valore superiore corrisponde al limite entro cui si osserva ancora linearità (deviazioni dalla linearità del 5%).