CALIBRAZIONI PER ANALISI QUANTITATIVA

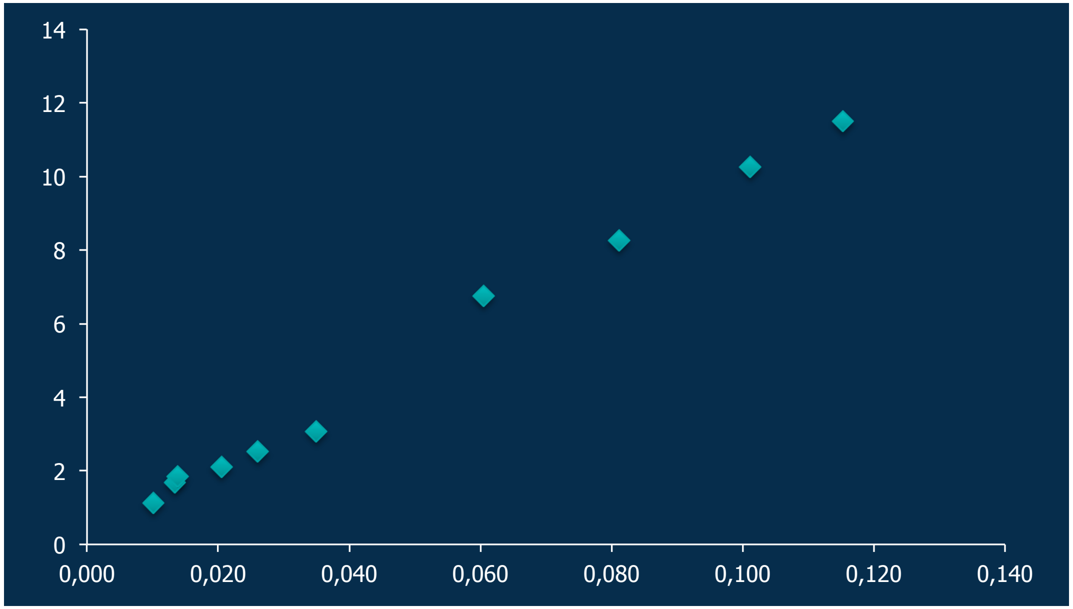
Metodo dei minimi quadrati

Supponiamo di aver raccolto sperimentalmente N coppie di valori X_i, Y_i

Y	X
0.0123	1.025
0.0134	2.050
0.0139	2.075
0.0205	2.100
0.0261	2.525
….	….
….	….
0.1012	10.250
0.1153	11.500

Consideriamo che X sia la variabile affetta da un errore sperimentale minore rispetto alla variabile Y.

Riportando questi valori in un piano x, y si ha:



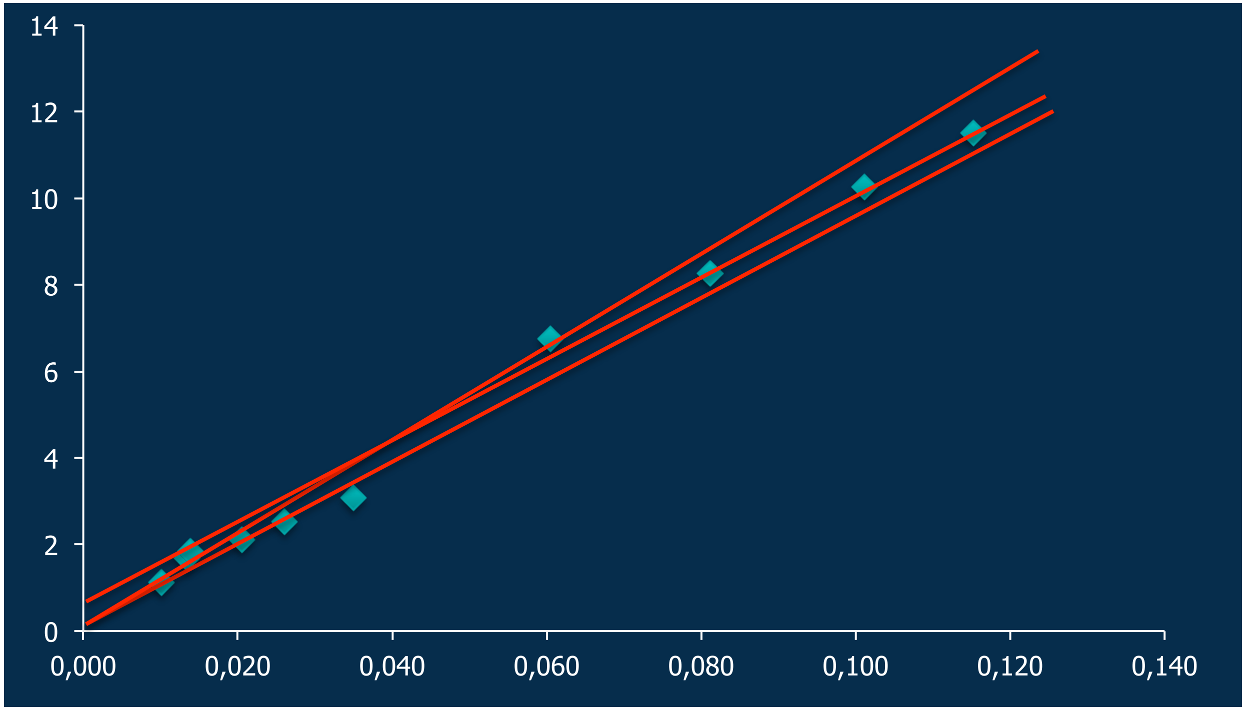
E' possibile trovare una relazione lineare tra i punti di sopra: $$\boxed{Y = a + bX}$$

Metodo dei minimi quadrati

Si cerchi di tracciare con un righello quella retta che lascia i punti ugualmente dispersi sopra e sotto la retta.

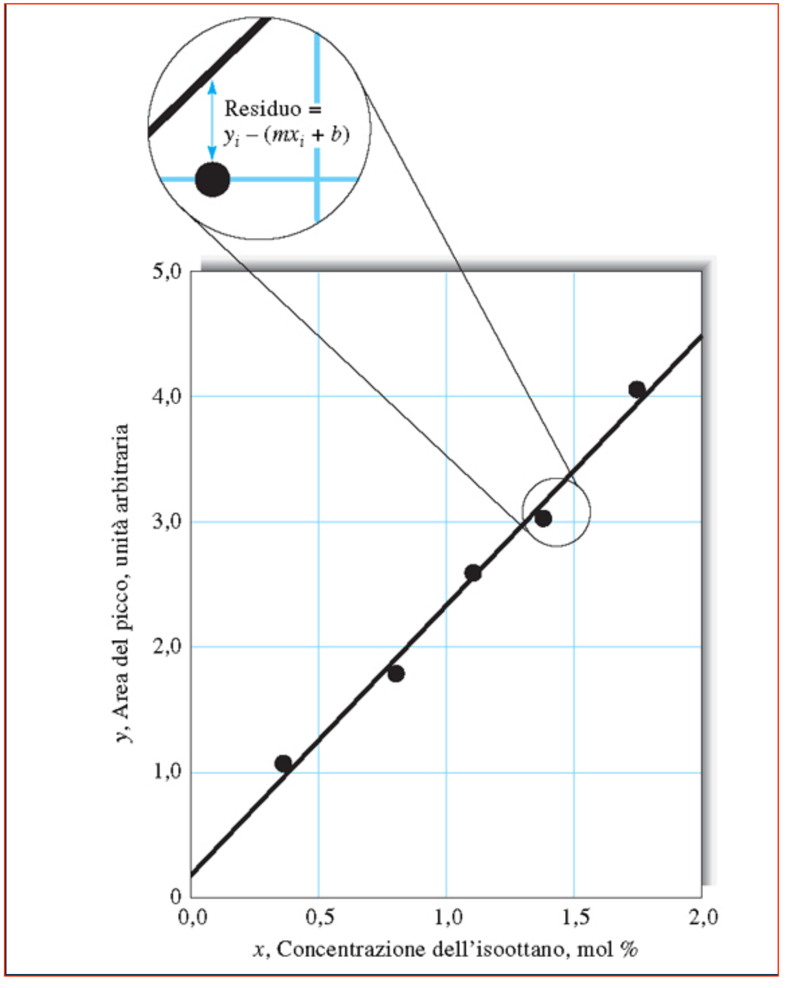
Per fare questo è possibile operare su due gradi di libertà:

1. far variare l'inclinazione del righello (pendenza)
2. far variare la distanza del righello dall'asse delle X (intercetta).



Metodo dei minimi quadrati

Si In termini matematici si tratta di individuare quella retta che renda minima la somma dei quadrati degli scarti (residui) tra i valori sperimentali Y_i ed i corrispondenti valori (stesso valore X_i) calcolati sulla retta a + b X_i



$$Z = \sum_i \left[Y_i - \left(a + bX_i \right) \right]^2$$

Metodo dei minimi quadrati

Per individuare questa retta, e cioè i valori di a e b, bisogna trovare il minimo di Z rispetto alle variabili a e b.

Per trovare il minimo di una funzione si devono trovare i valori delle variabili per cui la derivata prima è zero. Quindi occorre fare la derivata della funzione Z rispetto ad a e b.

$$Z = \sum_i \left[Y_i - \left(a + bX_i \right) \right]^2$$

$$Z = \sum_i (Y^2 + a^2 + b^2 X_i^2 - 2aY_i - 2bX_iY_i + 2abX_i) = \sum_i Y^2 + Na^2 + b^2 \sum_i X_i^2 - 2a \sum_i Y_i - 2b \sum_i X_i Y_i + 2ab \sum_i X_i$$

$$\frac{dZ}{da} = 2Na - 2\sum_i Y_i + 2b\sum_i X_i = 0$$

$$\frac{dZ}{db} = 2b\sum_i X_i^2 - 2\sum_i X_i Y_i + 2a\sum_i X_i = 0$$

Metodo dei minimi quadrati

…che si riducono a due equazioni

$$aN \qquad + b\sum_i X_i \ = \sum_i Y_i$$

$$a\sum_i X_i + b\sum_i X_i^2 = \sum_i X_i Y_i$$

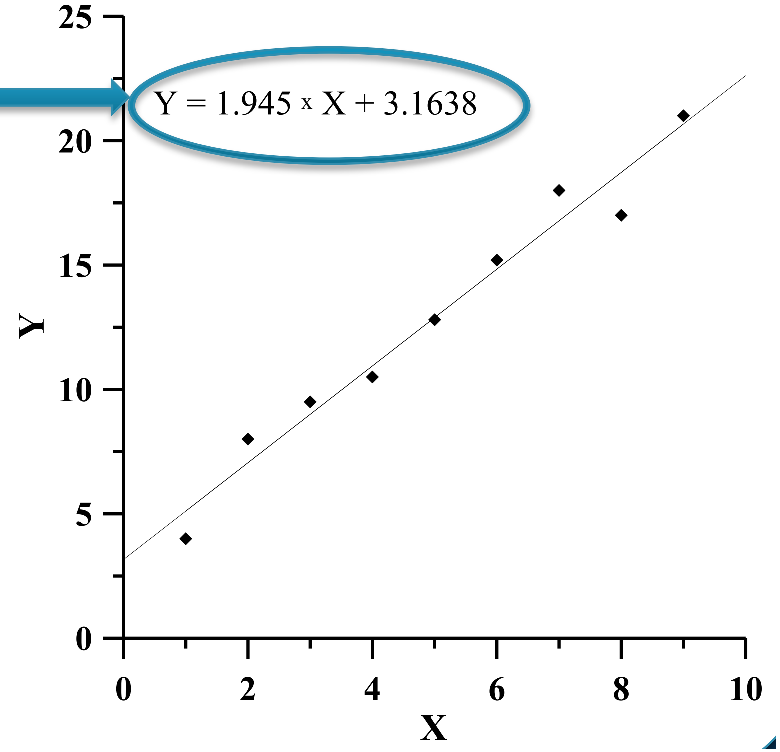
Risolvibili con il metodo di Kramer

$$a = \frac{\begin{matrix} \sum_i Y_i & \sum_i X_i \\ \sum_i X_i Y_i & \sum_i X_i^2 \end{matrix}}{\begin{matrix} N & \sum_i X_i \\ \sum_i X_i & \sum_i X_i^2 \end{matrix}} \qquad b = \frac{\begin{matrix} N & \sum_i Y_i \\ \sum_i X_i & \sum_i X_i Y_i \end{matrix}}{\begin{matrix} N & \sum_i X_i \\ \sum_i X_i & \sum_i X_i^2 \end{matrix}}$$

$$a = \frac{\sum_i Y_i \sum_i X_i^2 - \sum_i X_i \sum_i X_i Y_i}{N\sum_i X_i^2 - (\sum_i X_i)^2} \qquad b = \frac{N\sum_i X_i Y_i - \sum_i X_i \sum_i Y_i}{N\sum_i X_i^2 - (\sum_i X_i)^2}$$

Metodo dei minimi quadrati

X	Y	X^2	XY	D	a	b
1	4	1	4	540	3.1638	1.945
2	8	4	16			
3	9.5	9	28.5			
4	10.5	16	42			
5	12.8	25	64			
6	15.2	36	91.2			
7	18	49	126			
8	17	64	136			
9	21	81	189			
45	116	285	696.7			

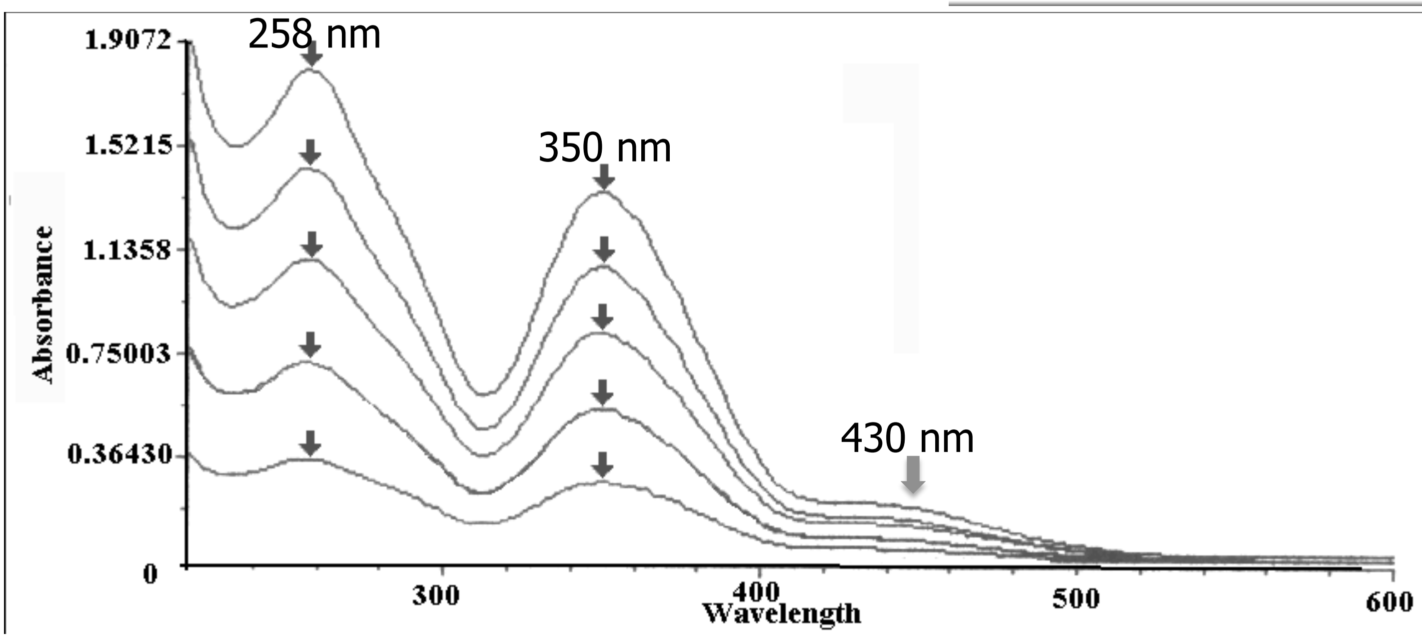


SENSIBILITA' DI UN METODO ANALITICO

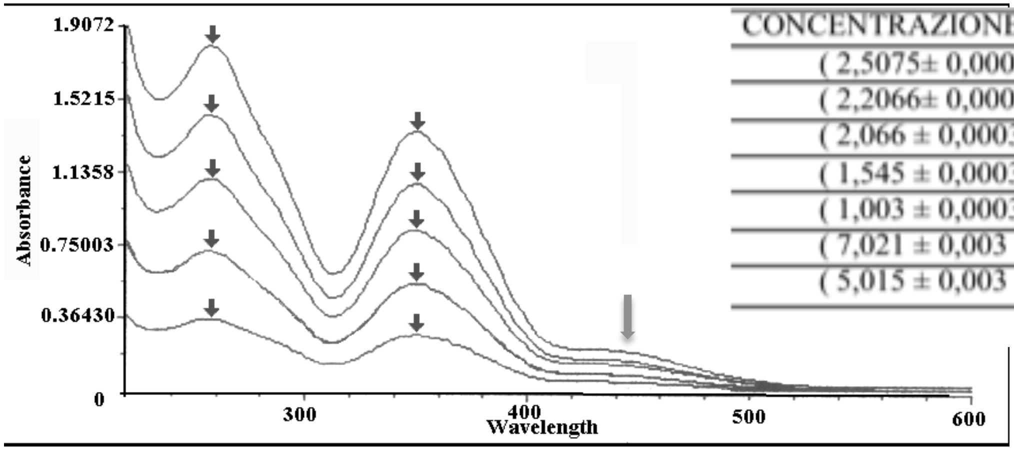
Per sensibilità di un metodo o di uno strumento si intende **la sua capacità di discriminare tra piccole differenze di concentrazione di analita.**
Per una risposta lineare la sensibilità corrisponde alla pendenza della retta.

Esempio
Retta di taratura di una soluzione di $K_2Cr_2O_7$

CONCENTRAZIONE
(2,5075± 0,0003) * 10-4 M
(2,2066± 0,0003) * 10-4 M
(2,066 ± 0,0003) * 10-4 M
(1,545 ± 0,0003) * 10-4 M
(1,003 ± 0,0003) * 10-4 M
(7,021 ± 0,003) * 10-5 M
(5,015 ± 0,003) * 10-5 M

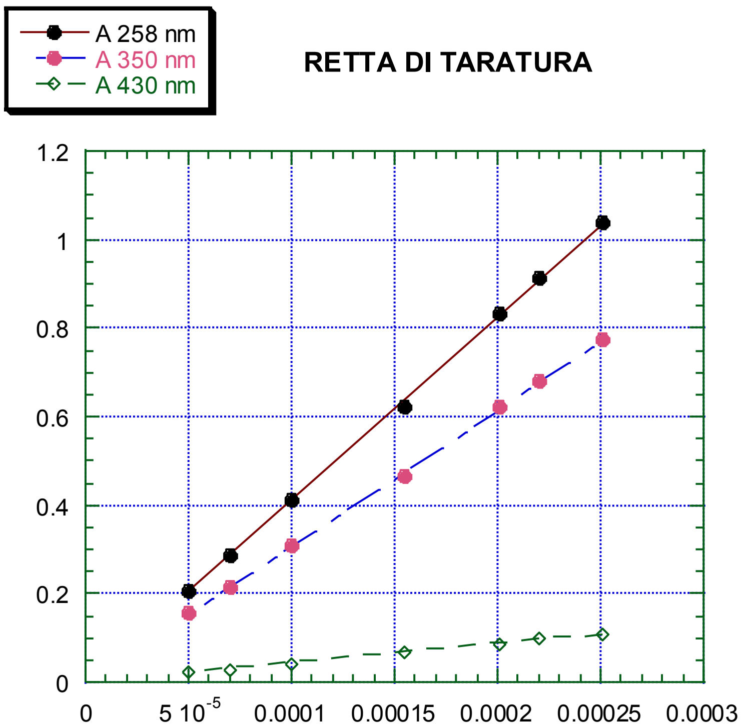


SENSIBILITA' DI UN METODO ANALITICO



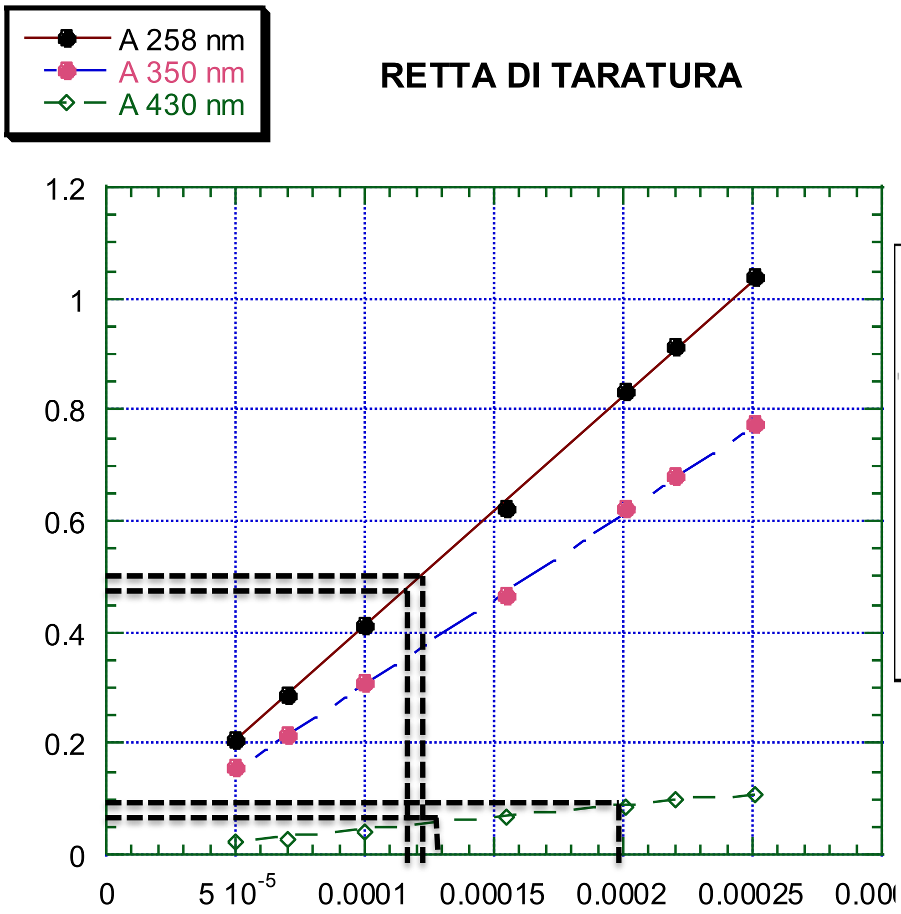
CONCENTRAZIONE	A 258	A 350	A 430
(2,5075± 0,0003) * 10-4 M	1,037	0,773	0,108
(2,2066± 0,0003) * 10-4 M	0,913	0,680	0,098
(2,066 ± 0,0003) * 10-4 M	0,831	0,622	0,086
(1,545 ± 0,0003) * 10-4 M	0,624	0,465	0,067
(1,003 ± 0,0003) * 10-4 M	0,411	0,308	0,041
(7,021 ± 0,003) * 10-5 M	0,287	0.214	0,028
(5,015 ± 0,003) * 10-5 M	0,206	0.157	0,022

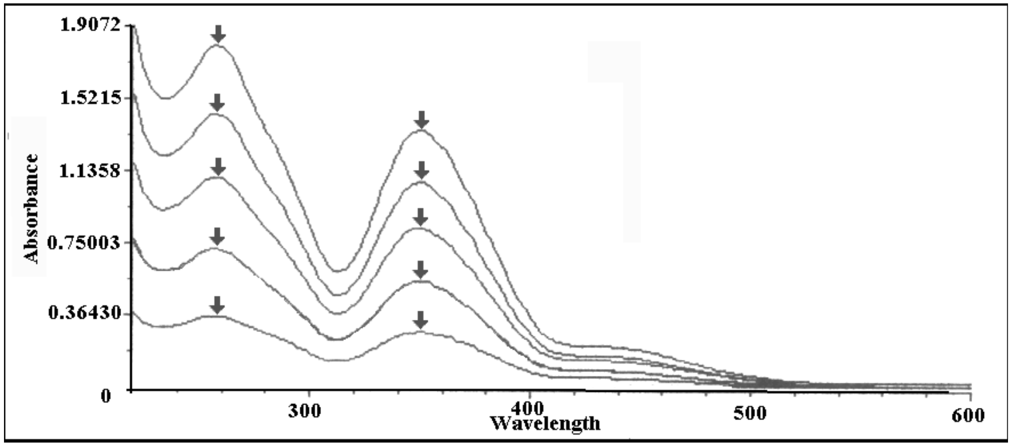
RETTA DI TARATURA



SENSIBILITA' DI UN METODO ANALITICO

RETTA DI TARATURA

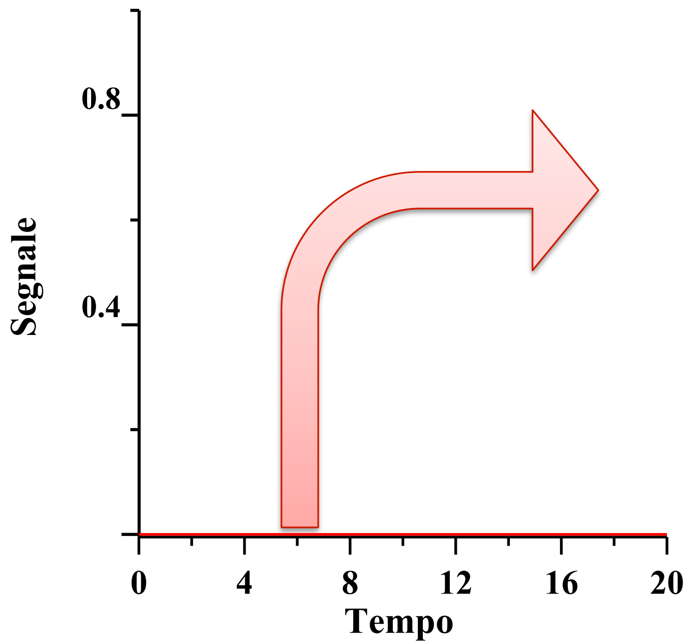


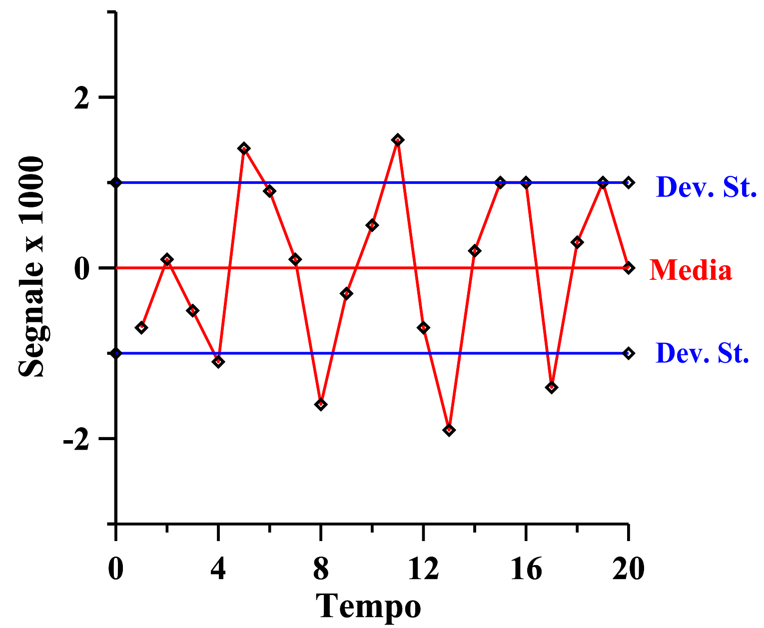


LIMITE DI RILEVABILITA' DI UN METODO ANALITICO

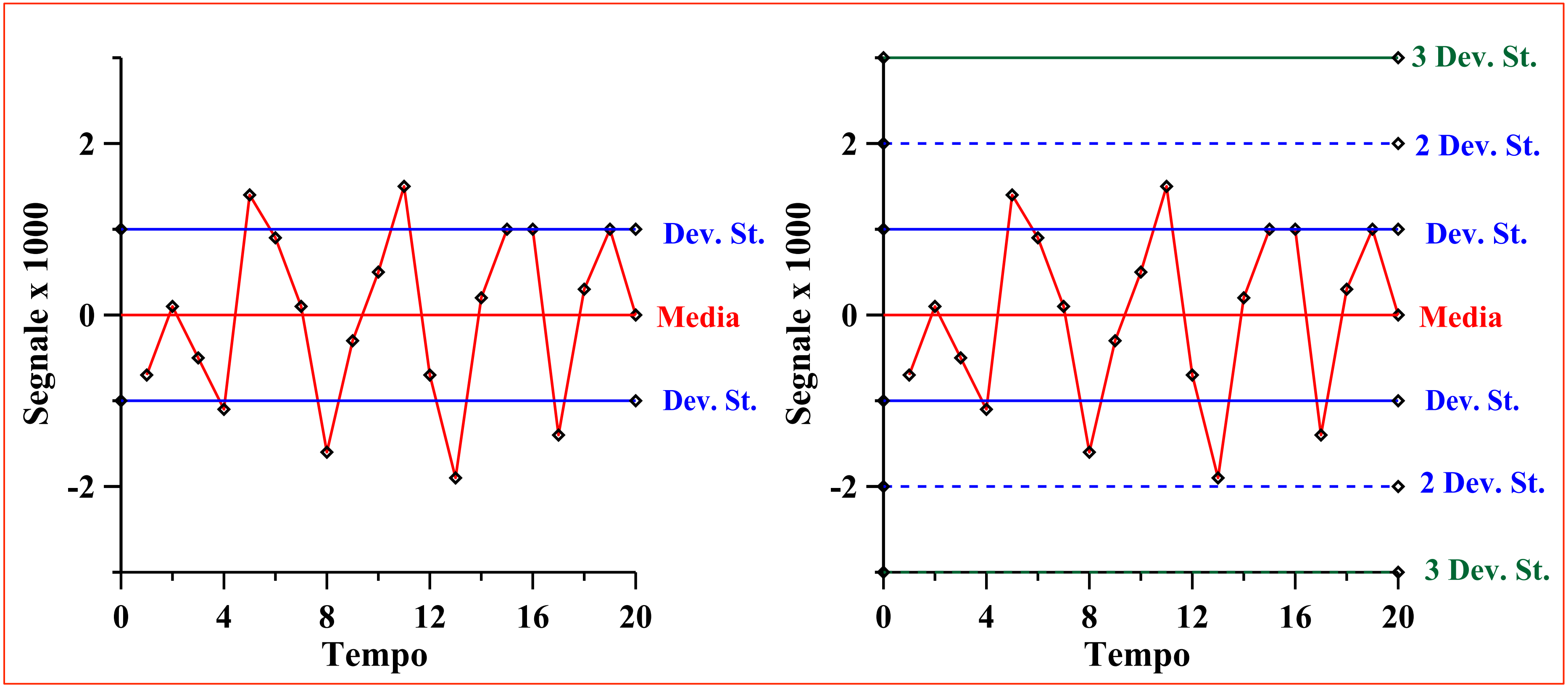
Per limite di rivelabilità di un metodo o di uno strumento si intende la concentrazione (o quantità) di sostanza che può essere rivelata ad un livello di fiducia noto.

È possibile distinguere tra un segnale analitico e le fluttuazioni statistiche del bianco quando il primo è almeno k volte superiore alle variazioni casuali del secondo.



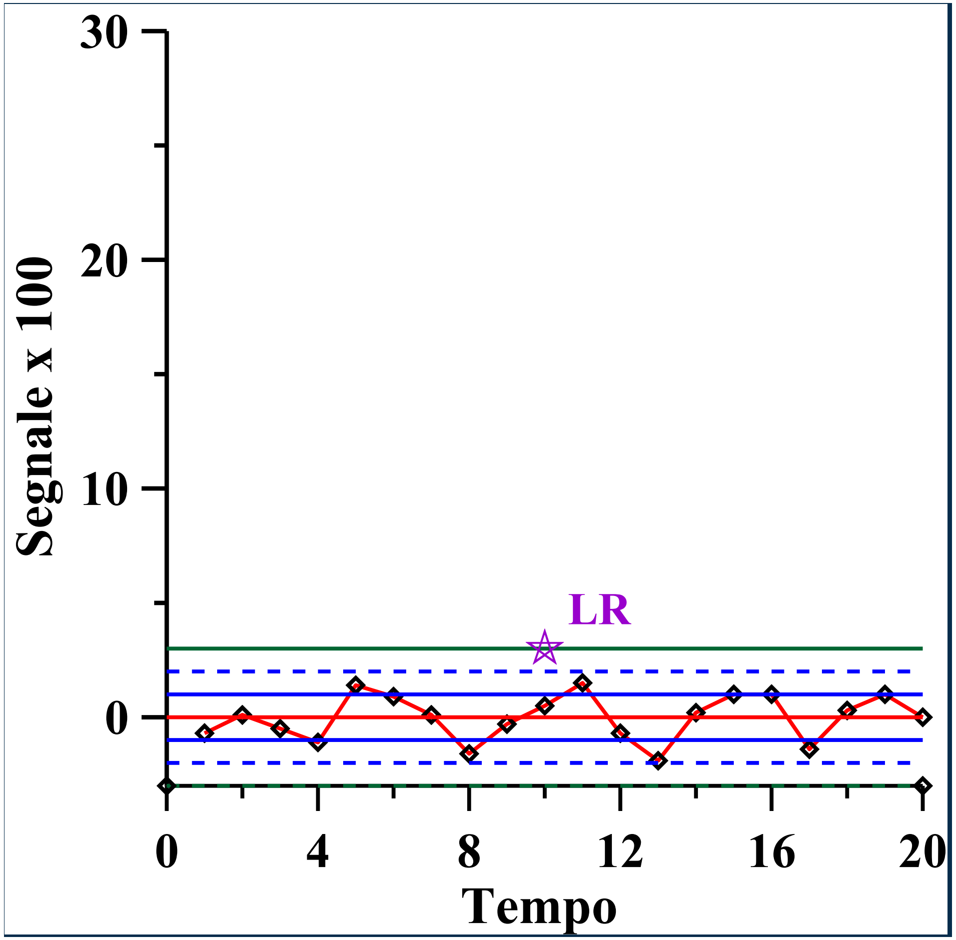


LIMITE DI RILEVABILITA' DI UN METODO ANALITICO



LIMITE DI RILEVABILITA' DI UN METODO ANALITICO

Un segnale di intensità pari a 3 volte la standard deviation del rumore di fondo viene riconosciuto come un segnale reale. K=3

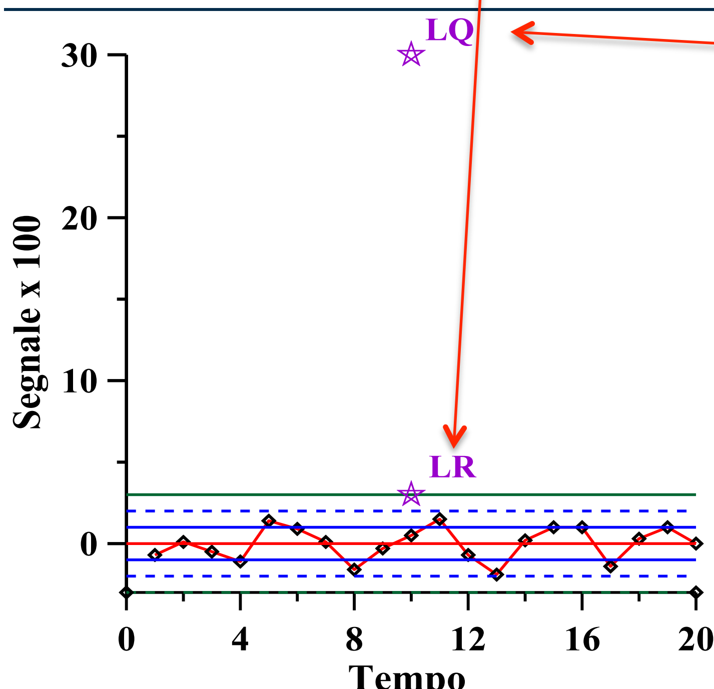


LIMITE DI **RILEVABILITA'** E DI **QUANTIFICAZIONE**

Il limite di rivelabilità è molto importante, per es. nelle analisi ambientali e alimentari per le sostanze tossiche e nocive.

Queste sostanze, che siano elementi inorganici (Pb, Hg, As, ...) o sostanze organiche (pesticidi, ...), devono tutte essere determinate a valori di concentrazioni bassissimi.

Nei certificati d'analisi deve essere riportato il metodo utilizzato nella determinazione con il suo limite di rivelabilità.



LIMITE DI QUANTIFICAZIONE

Un segnale di intensità pari a 30 volte la standard deviation del rumore di fondo è relativo alla concentrazione (quantità) minima del range operativo per un'analisi chimica quantitativa.

LIMITE DI **RILEVABILITA'** E DI **QUANTIFICAZIONE**

Ricordiamo che: se la deviazione standard del bianco rappresenta il rumore di fondo dello strumento in assenza di analita

Il segnale corrispondente al limite di rilevabilità è **3 x Dev. standard bianco**

- Errore percentuale di una misura al limite di rilevabilità:
  ELR = 3 x Dev Std bianco x 100 = 33%
- Errore percentuale di una misura al limite di quantificazione
  ELQ = 30 x Dev Std bianco x 100 = 3%

INTERVALLO DI LAVORO

limit of detection (LOD),
limit of quantification (LOQ)
dynamic range
limit of linearity (LOL)

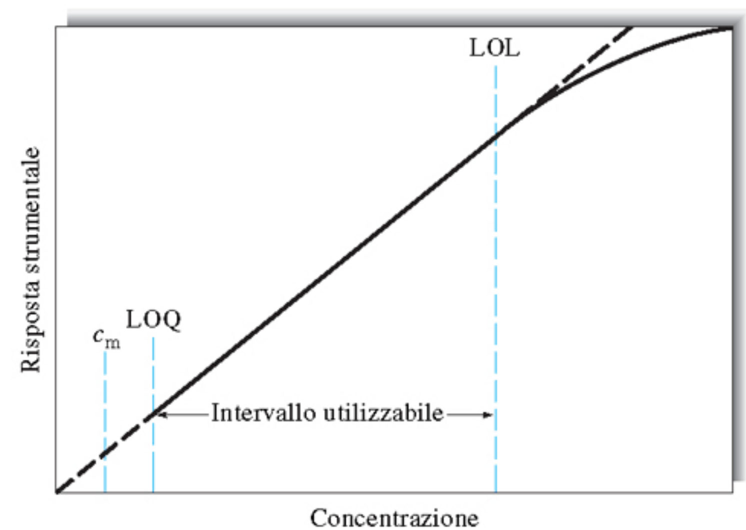
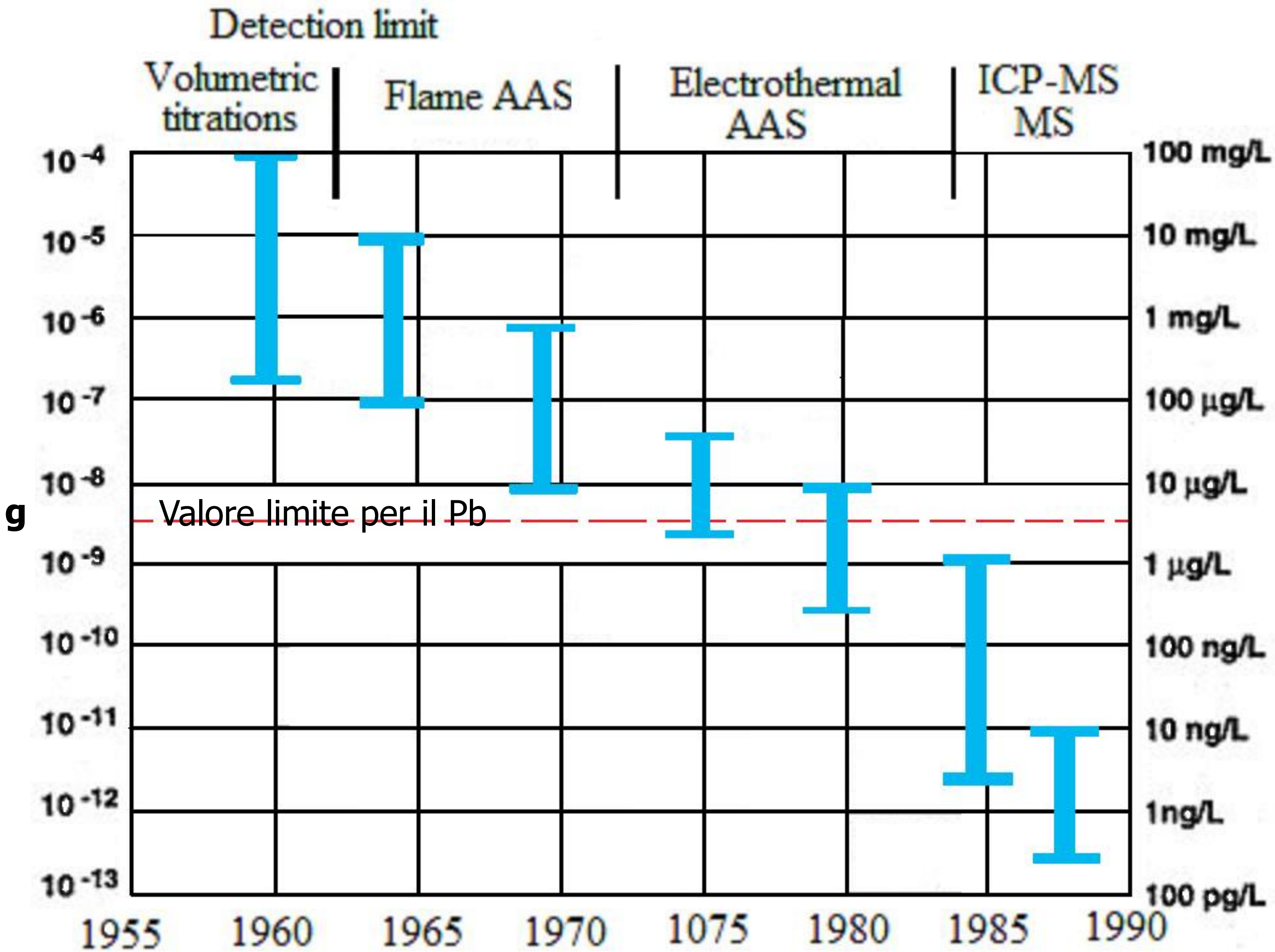


FIGURA 1-13 Intervallo utile di un metodo analitico. LOQ = limite di misurazione quantitativa; LOL = limite di risposta lineare.

LIMITE DI **RILEVABILITA'** E DI **QUANTIFICAZIONE**



EFFETTO MATRICE E LEGGI LIMITE

Le relazioni che legano la risposta strumentale alla concentrazione sono leggi limite

- soluzioni diluite
- assenza di interferenti
- monocromaticità della radiazione
- forza ionica costante

.....

CURVE DI CALIBRAZIONE

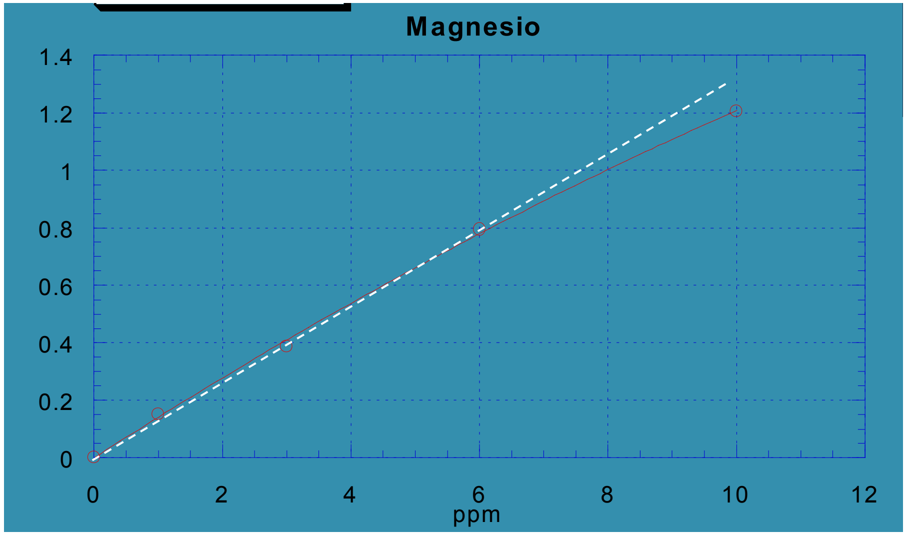
Per ovviare alle deviazioni delle risposte, nelle analisi strumentali è norma lavorare con una curva di calibrazione.

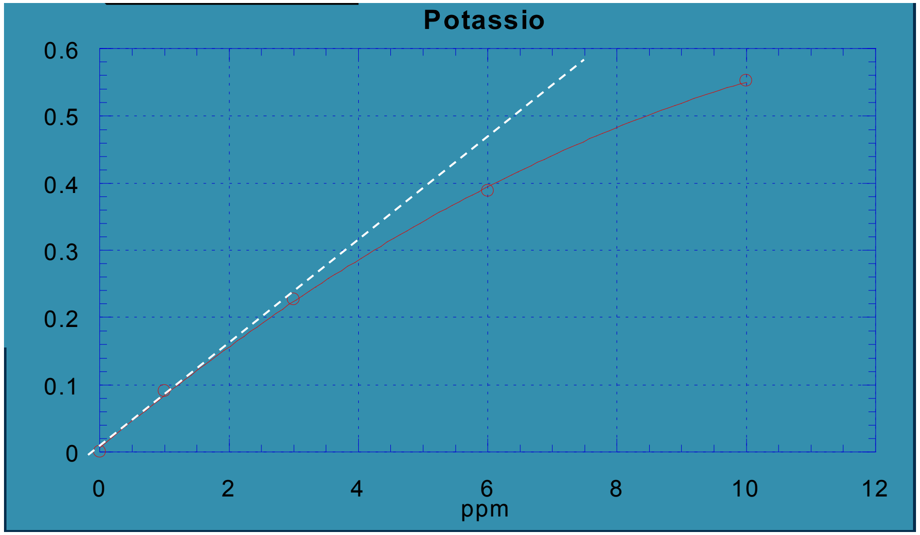
Le finalità di questo procedimento sono:

- valutare la risposta segnale – concentrazione
- stimare le costanti di proporzionalità

DEVIAZIONI DALLA LINEARITA'

La risposta strumentale spesso presenta delle deviazioni





EFFETTO MATRICE

La composizione del campione può essere molto complessa ed influenzare la risposta strumentale.

La variazione di segnale analitico causata da tutto ciò che è presente nel campione escluso l'analita viene definita come effetto matrice

EFFETTO MATRICE

Le cause dell'effetto matrice possono essere di tipo chimico o fisico:

- complessazione dell'analita
- formazioni di composti mascheranti
- variazione dell'attivìità
- alterazione del pH

  ....
- variazioni delle proprietà fisiche del mezzo
- ....

Alcuni esempi di matrici:

- soluzioni ad alta concentrazione di soluti (scarichi, acque salmastre, salamoie, bibite zuccherine, ..)
- miscele acqua-solvente organico (processi industriali, vini, bibite alcooliche, ...)
- soluzioni con alto contenuto proteico (fluidi biologici, alimenti, ...)
- soluzioni ad elevata acidità (scarichi, estrazione di metalli da matrici solide, ...)