Determinazione di un segnale analitico in presenza di rumore distribuito in modo gaussiano

Ipotizzando che il responso y di un metodo analitico sia correlato linearmente alla concentrazione c, per una generica misura del responso si può scrivere la relazione:

$y = \beta_0 + \beta_1 c + \varepsilon$

dove ε è l'errore random associato alla misura.

Nell'ipotesi che la deviazione standard dei dati non sia dipendente dalla concentrazione e che l'errore sia distribuito in modo gaussiano, si ha:

$\varepsilon \sim N(0, \sigma_y)$, e quindi si può scrivere anche:

$y \sim N(\beta_0 + \beta_1 c, \sigma_y)$

In definitiva, i valori del segnale Y ottenuti alle varie concentrazioni sono distribuiti in modo gaussiano intorno ad un valore che dipende linearmente dalla concentrazione ($\beta_0 + \beta_1 c$) ed è caratterizzato da una deviazione standard pari a σ_y.

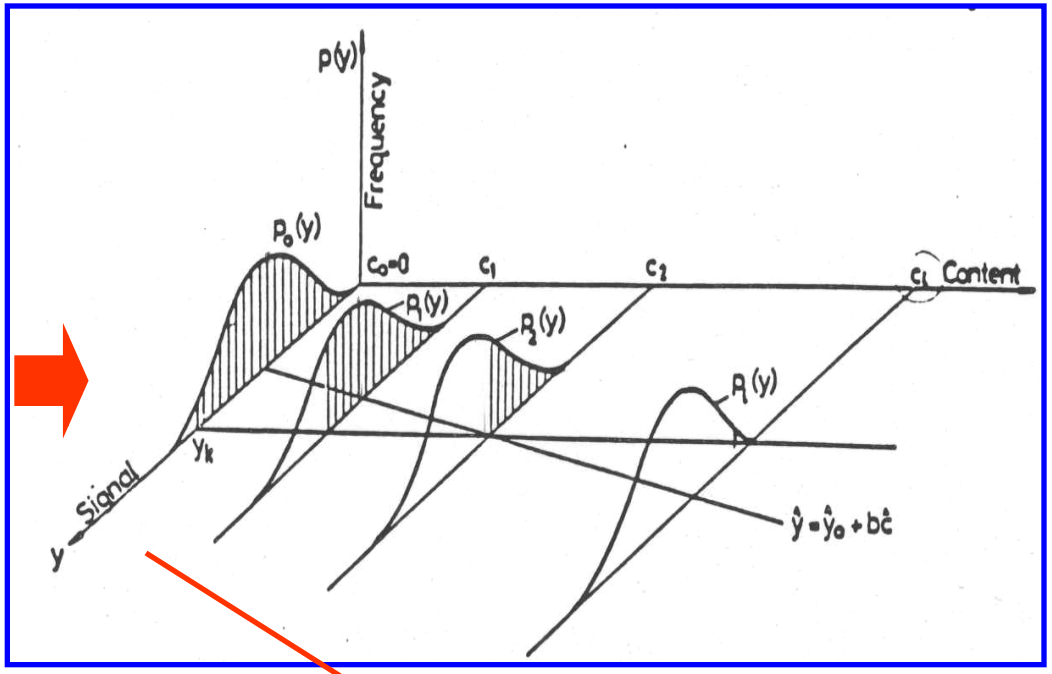
Quando si considera una soluzione in tutto simile a quelle standard impiegate per realizzare la retta di calibrazione "Y contro c" ma priva dell'analita (c = 0), ossia la soluzione di bianco, il segnale registrato sarà:

$y = \beta_0 + \varepsilon = y_0$

Dunque anche il valore del segnale associato alla soluzione di bianco avrà una sua distribuzione.

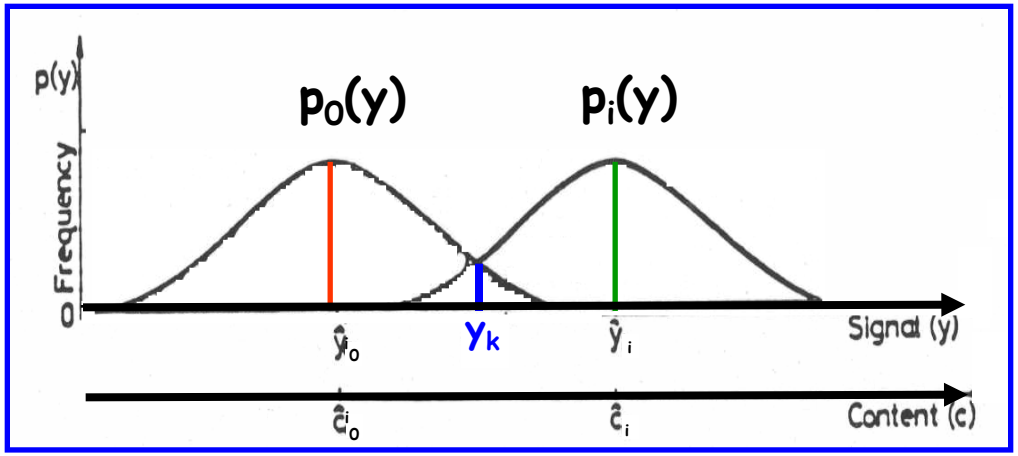
Nella terminologia della chimica analitica strumentale la grandezza ε viene definita "rumore", ad indicare la variabilità del segnale che uno strumento fornisce anche in assenza di analita in grado di generarlo (quindi quello correlato al solvente puro o alla matrice priva dell'analita di interesse).

Indicando con $p_0(y)$ la funzione densita' di probabilita' relativa ai valori del segnale del bianco e con $p_i(y)$ quelle dei segnali corrispondenti alle varie concentrazioni c_i, si puo' usare una rappresentazione tri-dimensionale per visualizzare la situazione piu' generale (ossia quella in cui $\beta_0 \neq 0$):



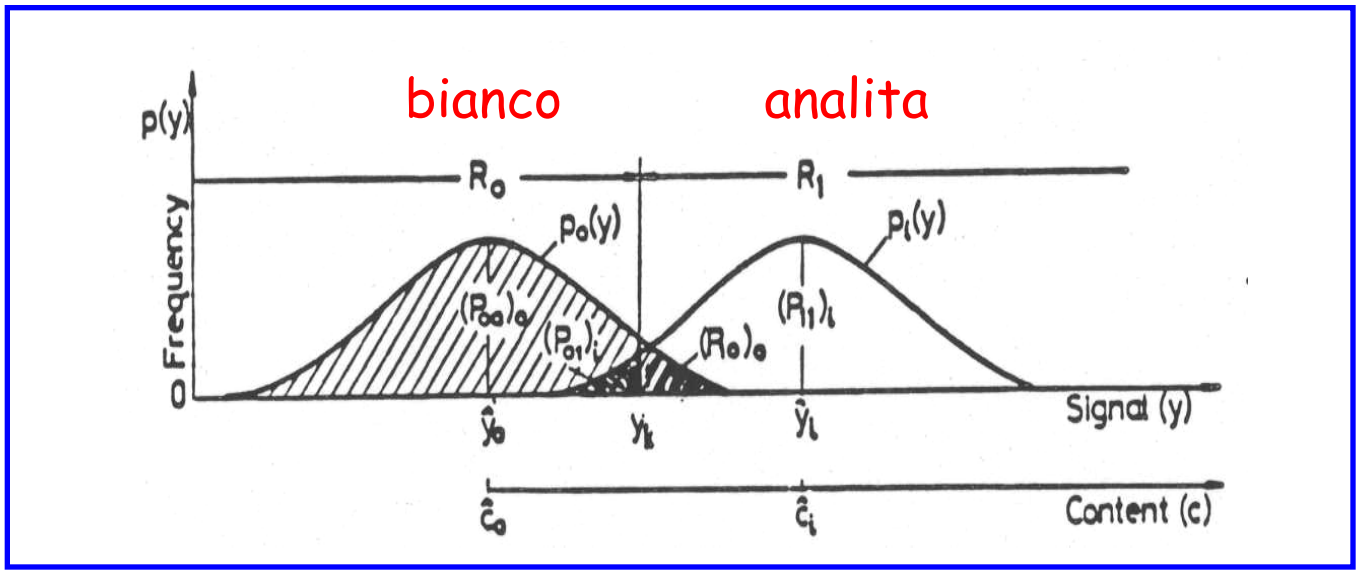
Se si guardasse la figura da sinistra a destra, in direzione perpendicolare all'asse che rappresenta il segnale y, si osserverebbe questa immagine:

più elevata è la concentrazione c_i, minore è la sovrapposizione fra le curve di densità di probabilità $p_0(y)$ e $p_i(y)$.



Soglia di decisione e rapporto segnale/rumore

La decisione sull'attribuzione di un segnale all'analita o al bianco sulla base delle rispettive densità di probabilità è una procedura analoga al confronto fra due medie:



Anche in questo caso si deve definire un valore critico del segnale, definito soglia di decisione, y_k, che suddivide l'intervallo dei valori di y in due regioni:

R_0 è la regione in cui il segnale si ritiene derivante solo dal bianco ($y \leq y_k$)

R_1 è la regione in cui si può ritenere il segnale derivante dall'analita ($y > y_k$)

Detta σ_y la deviazione standard caratteristica delle due distribuzioni, supposta uguale per entrambe, si definisce rapporto segnale/rumore la quantità:

$$r_{(S/N)} = (y_i - y_0)/\sigma_y$$

Tale rapporto, a parità di rumore, sarà tanto più elevato quanto maggiore sarà la concentrazione c_i, e quindi il segnale y_i.

Le probabilità corrispondenti alle diverse decisioni possibili possono essere calcolate mediante opportuni integrali delle due funzioni densità di probabilità disponibili.

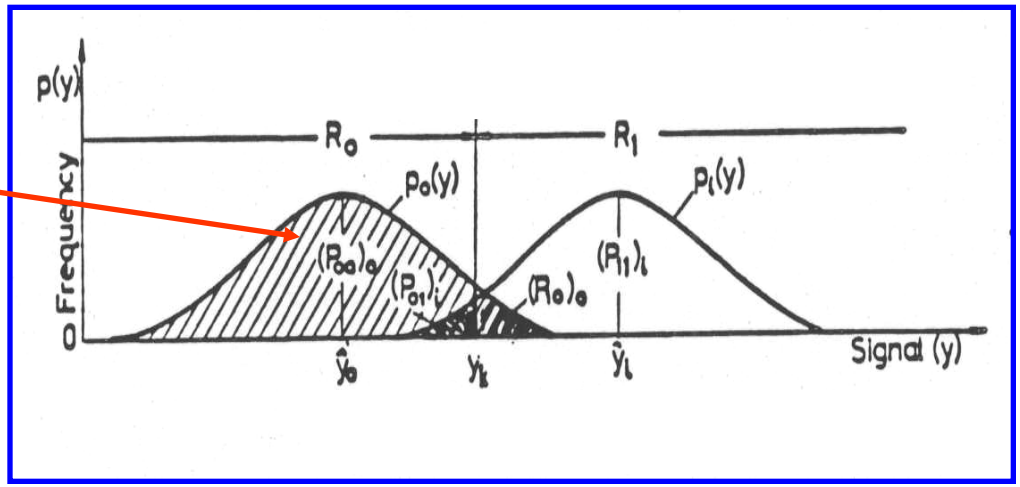
Si usa il seguente simbolismo per indicare le diverse probabilità:

$(P_{xy})_z$ dove:

x = 0/1 rappresenta l'affermazione che l'analita non sia/sia presente;
y = 0/1 indica che realmente l'analita non sia/sia presente;
z = 0/i indica che si usa la funzione $p_0(y)$ o $p_i(y)$ rispettivamente.

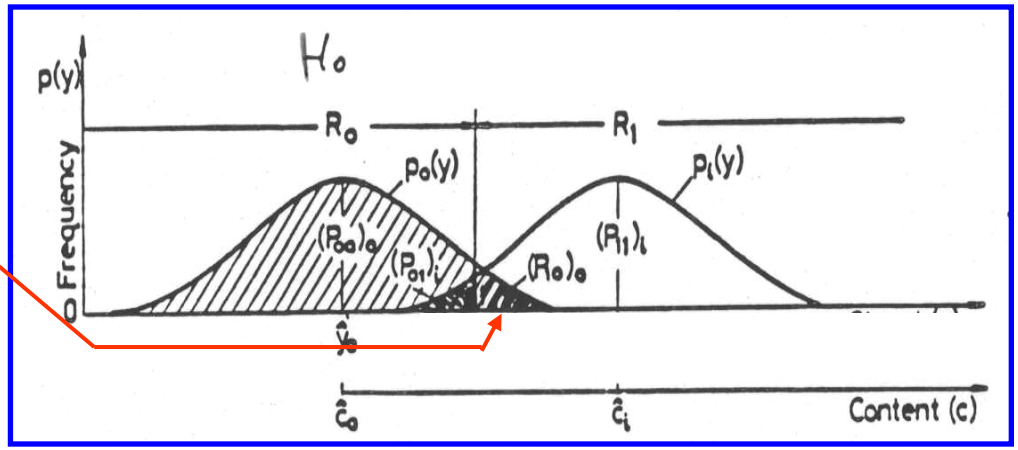
$(P_{00})_0$: probabilità di affermare che l'analita sia assente quando ciò è vero

$$(P_{00})_0 = \int_{-\infty}^{y_k} p_0(y)dy$$



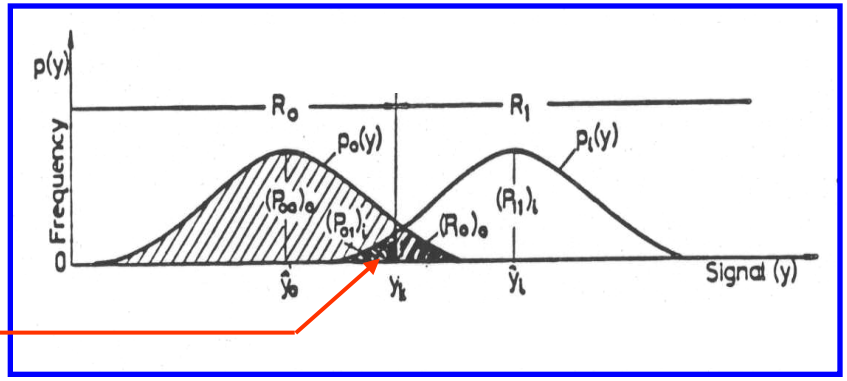
$(P_{10})_0$: probabilità di affermare che l'analita sia presente quando ciò NON è vero (ossia il segnale deriva comunque dal bianco)

$$(P_{10})_0 = \int_{y_k}^{+\infty} p_0(y)dy$$



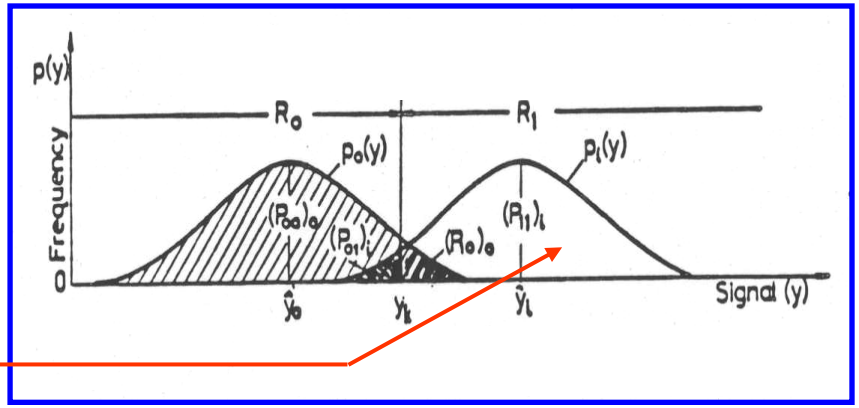
$(P_{01})_i$: probabilità di affermare che l'analita NON sia presente quando invece lo è

$$(P_{01})_i = \int_{-\infty}^{y_k} p_i(y)dy$$



$(P_{11})_i$: probabilità di affermare che l'analita sia presente quando ciò è vero

$$(P_{11})_i = \int_{y_k}^{+\infty} p_i(y)dy$$



Criterio di Neyman-Pearson per la soglia di decisione

Il criterio di Neyman-Pearson consiste nel determinare la soglia di decisione in base alla probabilità di falsa rivelazione, ossia la probabilità di stabilire che l'analita sia presente quando ciò non è vero, corrispondente alla grandezza $(P_{10})_0$.

Poiché si è supposto che le funzioni di densità di probabilità p(y) siano gaussiane, la funzione $p_0(y)$ avrà la forma:

$$p_0(y) = \frac{1}{\sigma_y \sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(y - y_0)^2}{2\sigma_y^2} \right]$$

e quindi:

$$(P_{10})_0 = \frac{1}{\sigma_y \sqrt{2\pi}} \int_{yk}^{+\infty} \exp\left[-\frac{(y - y_0)^2}{2\sigma_y^2} \right] dy$$

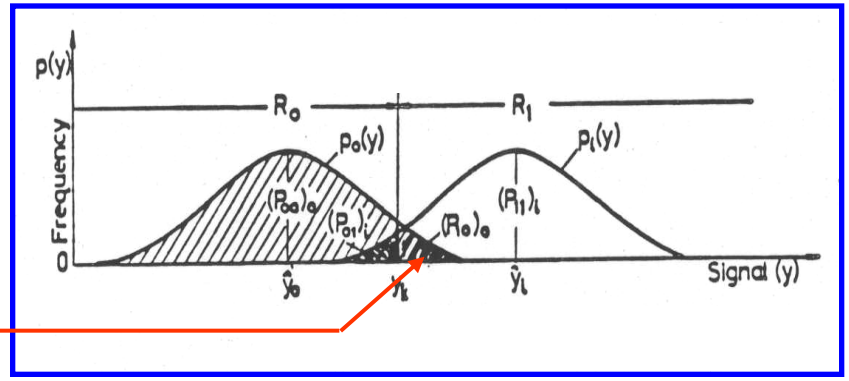
Se si introduce la variabile normale standardizzata $z = (y-y_0)/\sigma_y$ si può scrivere:

$$(P_{10})_0 = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{z_k}^{+\infty} \exp\left[-\frac{z^2}{2}\right] dz$$

dove $z_k = (y_k-y_0)/\sigma_y$ rappresenta il valore standardizzato corrispondente alla soglia di decisione ed è, di fatto, l'incognita dell'equazione ora scritta, in quanto l'integrale, se sviluppato, è funzione di z_k.

Per valori di $(P_{10})_0$ via via più piccoli z_k aumenta e, automaticamente, anche y_k aumenta, dunque si sposta verso destra nel seguente grafico:

$(P_{10})_0$



Fissato un valore per la probabilità $(P_{10})_0$ si determina automaticamente il valore di soglia standardizzato z_k e la corrispondente soglia di decisione:

$y_k = y_0 + z_k \sigma_y$

La regola su cui si basa la decisione è dunque:

✓ se $y \leq y_0 + z_k \sigma_y$ si stabilisce che l'analita non è presente nel campione;

✓ se $y > y_0 + z_k \sigma_y$ si stabilisce che l'analita è presente nel campione.

Se si replicano N misure sul campione sottoposto al test le condizioni del criterio di Neyman-Pearson diventano:

se $\bar{y} \leq y_0 + z_k \sigma_y/\sqrt{N}$ $\Rightarrow$ l'ipotesi che l'analita sia assente può essere accettata

se $\bar{y} > y_0 + z_k \sigma_y/\sqrt{N}$ $\Rightarrow$ l'ipotesi che l'analita sia presente può essere accettata

Il criterio tiene conto dunque della media dei valori ottenuti dalle N misure del segnale sul campione sottoposto al test.

Calcolo della soglia di decisione

Supponiamo di voler stabilire la soglia di decisione y_k corrispondente ad una probabilità di falsa rivelazione dell'1%, ossia a $(P_{10})_0 = 0.01$.

Tale probabilità corrisponde a considerare sulla curva di densità di probabilità normale standardizzata un valore di z corrispondente ad un'area sottesa pari al 99%, ossia z = 2.33.

Essendo $z_k = 2.33$ la soglia di decisione, in termini di y_k, sarà:

$$y_k = y_0 + 2.33\ \sigma_y$$

pertanto la regola di decisione sarà:

se: $y \leq y_0 + 2.33\ \sigma_y$ l'analita è assente

se: $y > y_0 + 2.33\ \sigma_y$ l'analita è presente

Nel caso di N misure replicate la soglia di decisione sarà invece:

$y_k = y_0 + 2.33\ \sigma_y/\sqrt{N}$

e quindi la regola di decisione sarà:

se $\bar{y} \leq y_0 + 2.33\ \sigma_y/\sqrt{N}$ l'analita è assente

se $\bar{y} > y_0 + 2.33\ \sigma_y/\sqrt{N}$ l'analita è presente

Limite di rivelabilità in chimica analitica

Per limite di rivelabilità (LOD) in chimica analitica si intende:

"*la minima concentrazione di analita che può essere rivelata ad un certo livello di fiducia (o ad un certo rapporto segnale/rumore, S/N) con un particolare metodo analitico strumentale*".

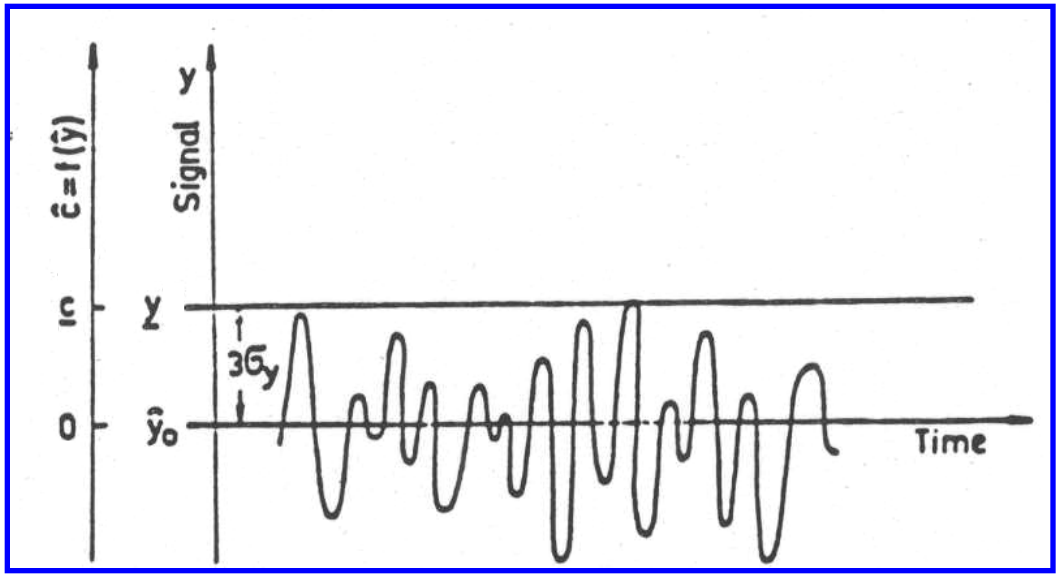
Questo parametro, fondamentale per valutare quanto sia sensibile un metodo analitico, è strettamente legato alla soglia di decisione, quindi presuppone una determinazione su base statistica.

Criterio di Kaiser per il limite di rivelabilità

Il criterio di Kaiser stabilisce che il limite di rivelabilità sia dato dalla concentrazione di analita a cui corrisponde un segnale pari a:

$$\underline{y} = y_0 + 3\,\sigma_y$$

dove y_0 è il valore medio del segnale ottenuto dal bianco mentre σ_y è la deviazione standard di tale segnale.



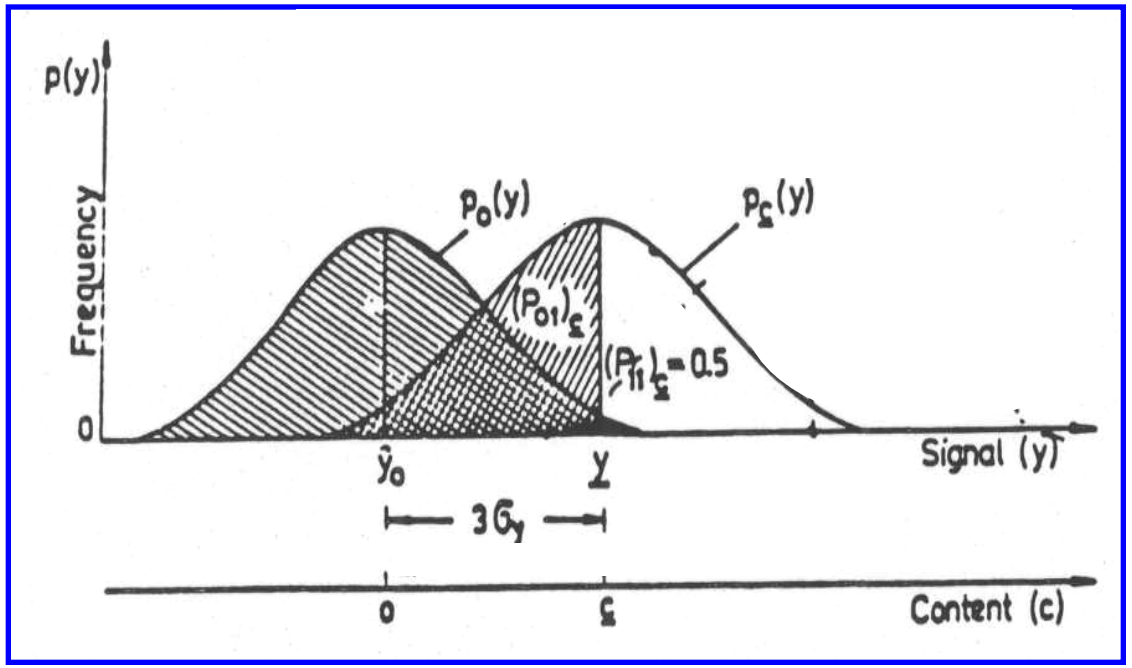
La curva riportata in figura rappresenta la congiunzione dei punti corrispondenti a centinaia di valori di responsi del bianco misurati nel tempo ed è di fatto una rappresentazione del rumore associato alla misura.

Il criterio di Kaiser equivale a considerare per la soglia di decisione un valore $z_k = 3$, ossia fissare una probabilità di falsa rivelazione $(P_{10})_0 =$ **0.0013 (0.13 %)**.

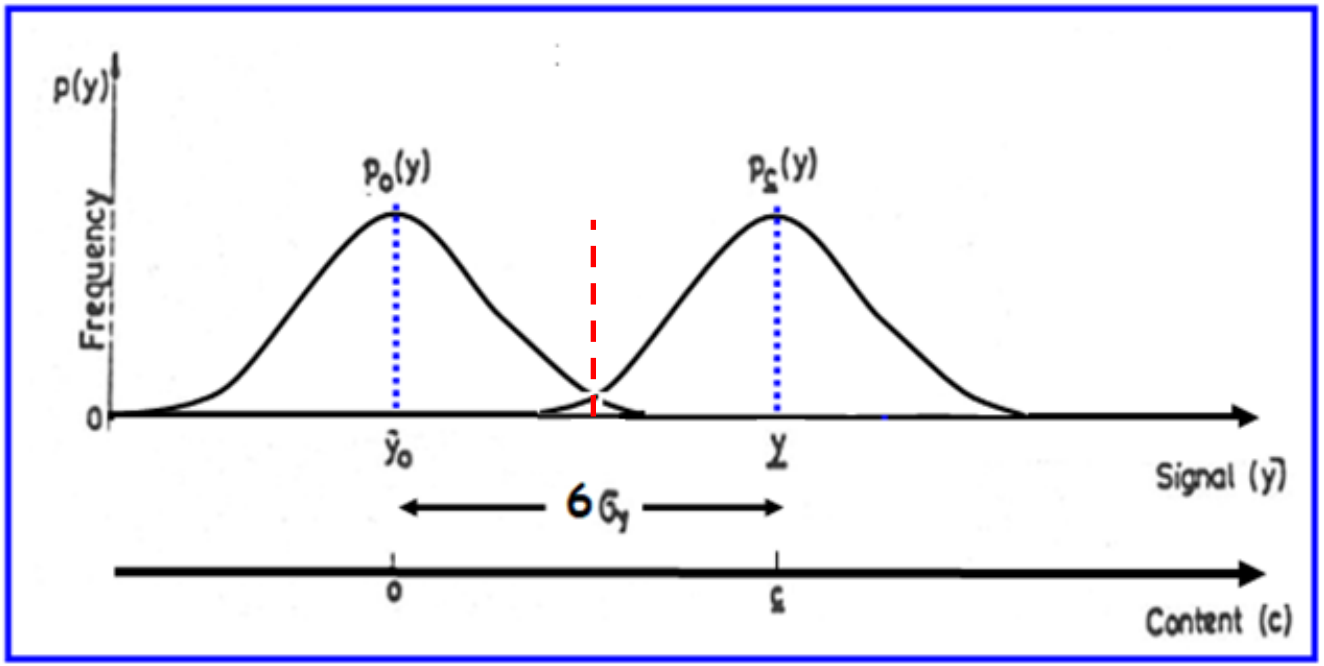
Dal valore di $\underline{y}$ così stabilito si ricava poi il corrispondente valore di concentrazione $\underline{c}$, ossia il LOD associato ad un rapporto S/N = 3.

Il criterio di Kaiser non si preoccupa della probabilità di affermare che non ci sia analita nel campione quando invece esso è presente, $(P_{01})_{\underline{c}}$.

Tuttavia, se si fissa a $3\sigma_y$ la differenza fra $\underline{y}$ e y_0 tale probabilità può essere pari anche al 50 %, quindi molto elevata, come evidenziato dal seguente grafico:



Si può dimostrare che soltanto se la differenza fra $\underline{y}$ e y_0 fosse pari a 6 σ_y, mantenendo la soglia di decisione a 3 σ_y, tale probabilità sarebbe praticamente trascurabile:



In queste condizioni il valore di $\underline{c}$ sarebbe la minima concentrazione di analita rivelabile con buona precisione da una singola misura.

Talvolta si usa proprio tale valore, ossia il LOD a S/N = 6, come limite di rivelabilità di un metodo analitico strumentale, tuttavia il criterio di Kaiser resta il più diffuso nella definizione del valore del LOD.

Relazione fra limite di rivelabilità e rapporto segnale/rumore

A prescindere dal valore numerico di z_k adottato per il limite di rivelabilità, si può notare che esso corrisponde alla quantità:

$(\underline{y}-y_0)/\sigma_y$

che, per definizione, rappresenta il rapporto segnale/rumore (S/N) in corrispondenza del segnale $\underline{y}$.

Nell'ipotesi che il segnale y dipenda linearmente dalla concentrazione si può scrivere:

$y = y_0 + b_1 c$ ossia $\underline{y} = y_0 + b_1 \underline{c}$

dove b_1 è la pendenza della retta che rappresenta la dipendenza del segnale dalla concentrazione.

Il limite di rivelabilità, $\underline{c}$, sarà dato dunque da:

$$\underline{c} = (\underline{y}-y_0)/b_1$$

Detto $\underline{r}_{(S/N)}$ il rapporto segnale su rumore in corrispondenza del segnale $\underline{y}$, si può ricavare la relazione:

$$\underline{c} = \underline{r}_{(S/N)}\, \sigma_y / b_1$$

Fissato un certo rapporto segnale/rumore il limite di rivelabilità sarà tanto più basso (e quindi migliore):

- ✓ quanto maggiore è la pendenza b_1, ossia la sensibilità del metodo
- ✓ quanto più precisa è la misura di y, ossia quanto minore è σ_y.

Stima del limite di rivelabilità direttamente dal rapporto segnale/rumore

La relazione:

$\underline{c} = \underline{r}_{(S/N)}\, \sigma_y / b_1$

si puo' sfruttare per una determinazione del limite di rivelabilita' a partire da una misura diretta del rapporto segnale/rumore. Le diverse fasi della procedura sono:

1) Determinazione di $r_{(S/N)}$ a diverse concentrazioni c dell'analita

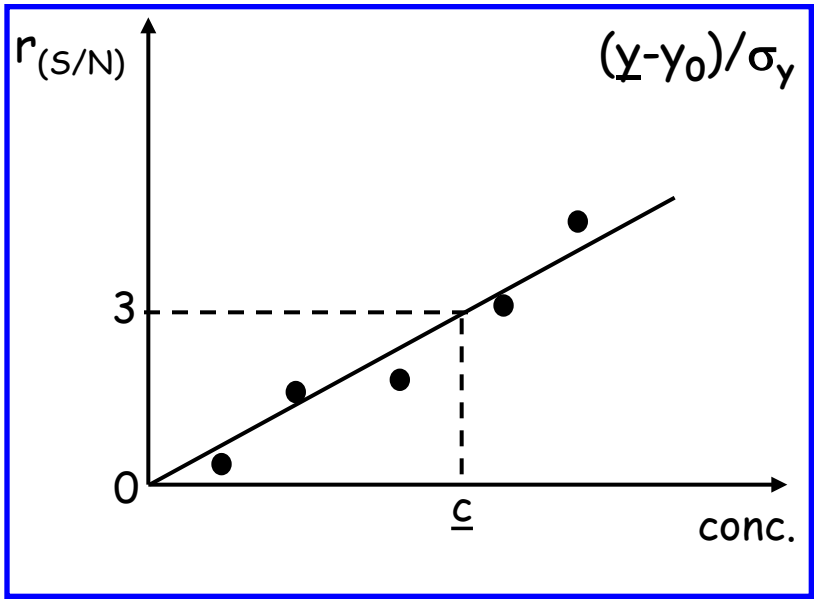
La determinazione prevede:

- la misura del segnale del bianco su un certo numero di replicati, con valutazione della sua deviazione standard, che rappresenta il rumore;
- la misura del segnale analitico in una serie di soluzioni standard dell'analita effettuando piu' replicati per ciascuna soluzione;

- il calcolo del valore medio e della deviazione standard di $r_{(S/N)}$ alle varie concentrazioni.

2) Interpolazione dei dati di $r_{(S/N)}$ in funzione di c con il metodo dei minimi quadrati.

I dati di $r_{(S/N)}$ ottenuti in funzione di c vengono trattati con la regressione lineare convenzionale o pesata, a seconda dei casi.



3) Determinazione del limite di rivelabilita'

Il LOD si ricava scegliendo il valore di $r_{(S/N)}$ che si desidera adottare, ad esempio 3, e ricavando il corrispondente valore di c dalla retta di regressione (esattamente come si fa per una concentrazione a partire dal segnale).

Stima del limite di rivelabilità dalla regressione lineare

Siano date n coppie di valori (c_i, y_i), che rappresentano il set di dati ottenuto per effettuare la calibrazione di un metodo analitico.

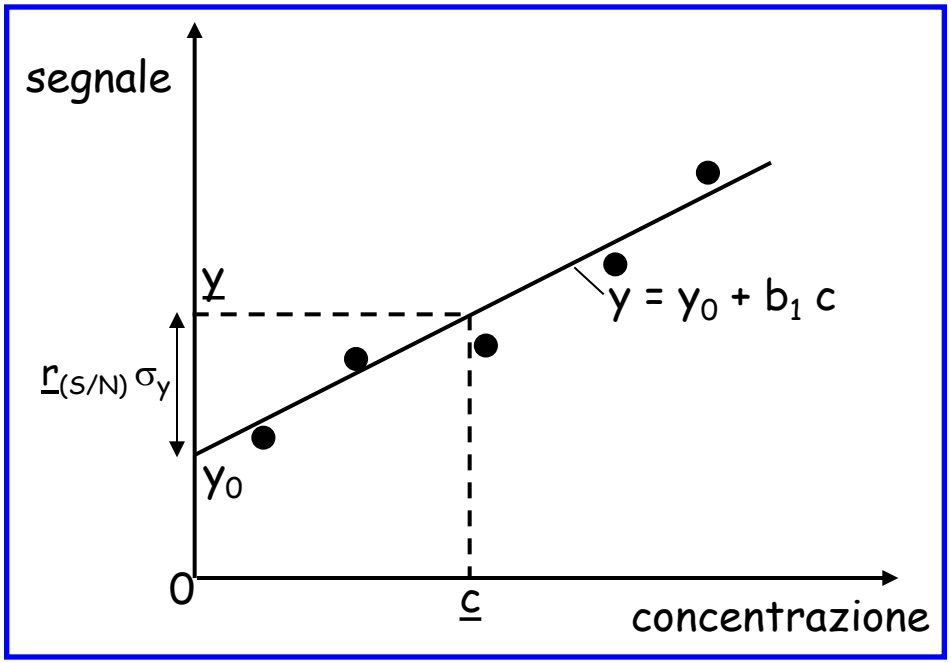
Le ipotesi fondamentali per la stima del limite di rivelabilità a partire dalla regressione lineare sono:

- ✓ le concentrazioni c_i si possono ritenere affette da un'incertezza trascurabile;

- ✓ i segnali y_i sono affetti da un'incertezza distribuita in modo gaussiano.

Procedura

Si valuta inizialmente il valore del segnale, $\underline{y}$, a cui corrisponde il rapporto segnale/rumore, $\underline{r}_{(S/N)}$, prescelto per il limite di rivelabilità, tipicamente 3.



Essendo:

$$(\underline{y} - y_0)/\sigma_y = \underline{r}_{(S/N)}$$

risulta:

$$\underline{y} = y_0 + \underline{r}_{(S/N)}\,\sigma_y$$

Se l'equazione della retta di regressione è $y = y_0 + b_1 c$, si ricava facilmente che il limite di rivelabilita' e' dato da:

$$\underline{c} = (\underline{y} - y_0)/b_1 = \underline{r}_{(S/N)}\,\sigma_y / b_1$$

In generale si adotta il criterio di Kaiser, per cui: $\underline{r}_{(S/N)} = 3$, mentre al posto di σ_y si possono usare:

✓ il valore della deviazione standard sui residui della regressione lineare:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

oppure:

✓ il valore della deviazione standard sull'intercetta, che nella nuova notazione è:

$$s_{y_0} = s_{y/x}\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} x_i^2}{n\sum_{i=1}^{n}(x_i - \overline{x})^2}}$$

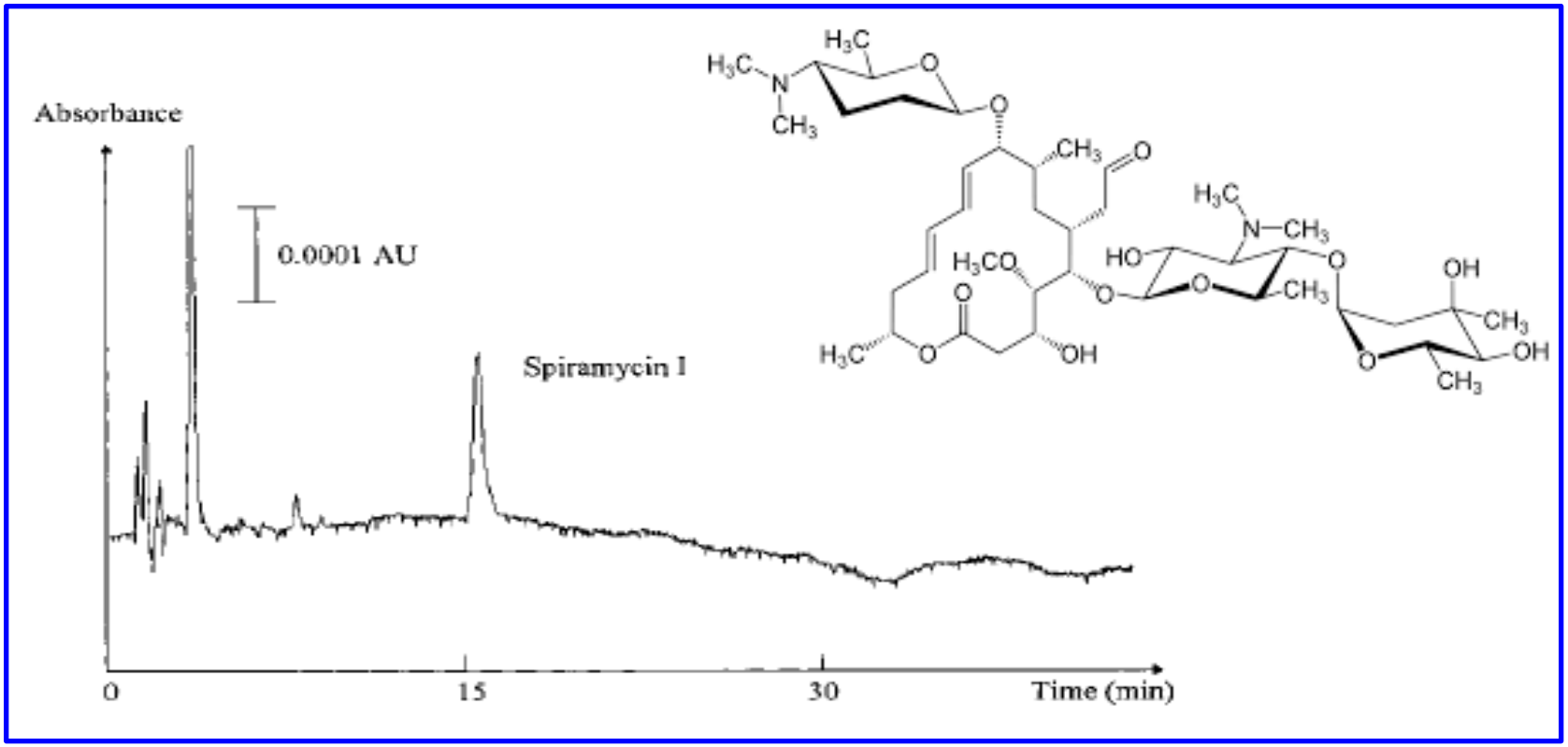
Dalle equazioni riportate si deduce che il valore indicato per il limite di rivelabilita' dipende:

- ✓ dal rapporto segnale/rumore scelto (a sua volta legato alla probabilità di falsa rivelazione adottata)

- ✓ dallo stimatore adottato per σ_y, ossia $s_{y/x}$ o s_{y_0}, che a loro volta cambieranno a seconda che si usi una regressione lineare convenzionale o pesata.

Confronto fra diversi metodi per la determinazione del LOD: un esempio sperimentale (*Analytical Chemistry*, 1999, **71**, 2672)

Un esempio concreto di confronto fra diverse stime del LOD è stato riportato a proposito della determinazione dell'antibiotico spiramicina mediante HPLC di ripartizione in fase inversa su colonna C8 con rivelazione UV (232 nm).

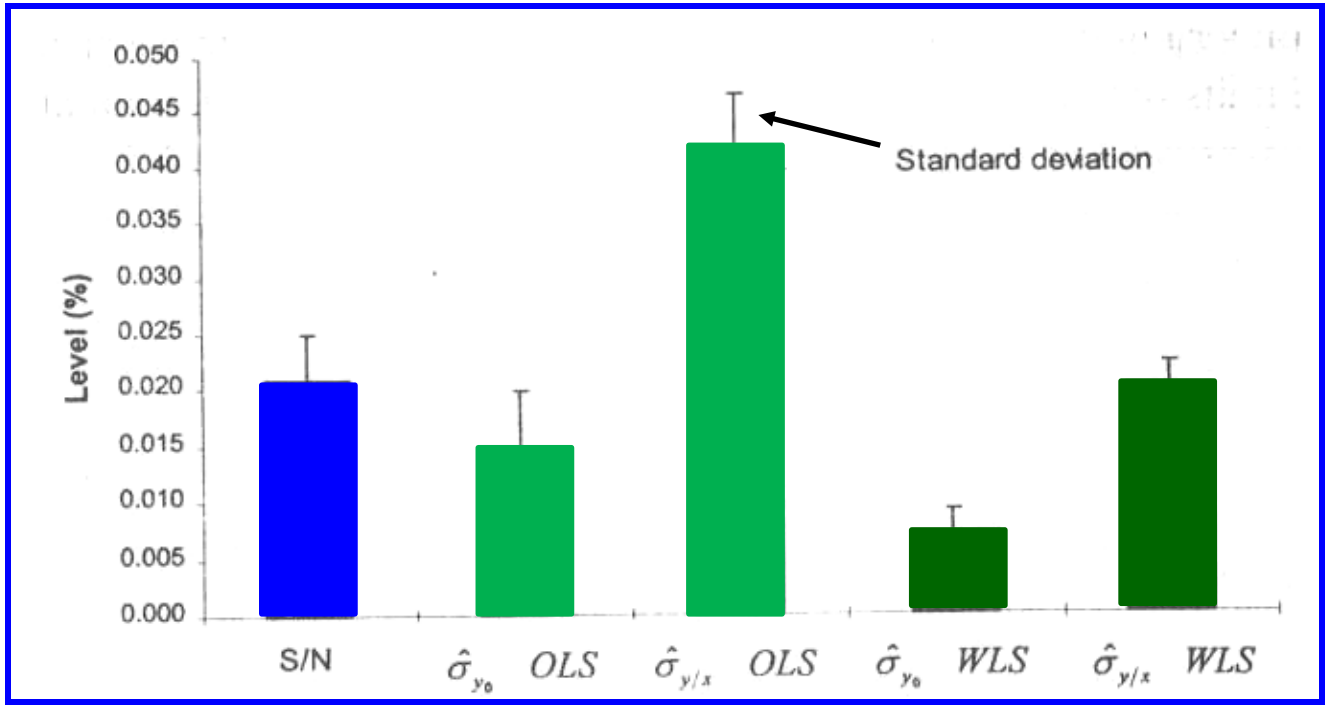


Sono state effettuate 6 misure replicate su 8 soluzioni di spiramicina a concentrazione variabile da 0 a 2.5 ppm.

Il LOD del metodo e' stato valutato scegliendo in tutti i casi il criterio di Kaiser, ossia ad un $r_{(S/N)} = 3$, ma usando 5 approcci diversi:

- ✓ determinazione diretta del $r_{(S/N)}$ in funzione della concentrazione di spiramicina (S/N);
- ✓ determinazione con i minimi quadrati convenzionali (Ordinary Least Squares, OLS) usando $s_{y/x}$;
- ✓ determinazione con i minimi quadrati convenzionali (Ordinary Least Squares, OLS) usando s_{y0};
- ✓ determinazione con i minimi quadrati pesati (Weighted Least Squares, WLS) usando $s_{y/x}$;
- ✓ determinazione con i minimi quadrati pesati (Weighted Least Squares, WLS) usando s_{y0}.

Come si può notare, sono stati ottenuti valori di LOD (espressi come percentuale della massima concentrazione adottata nella calibrazione, ossia di 2.5 ppm) diversi a seconda dei casi.



In ogni caso essi individuano l'ordine di grandezza della sensibilità del metodo (le diverse stime del LOD sono comprese fra 25 e 75 ppb).