

1. INTRODUZIONE

1.1. Problemi analitici quantitativi

I metodi chimico-analitici strumentali hanno lo scopo di quantificare o di determinare proprietà chimico-fisiche di uno o più *analiti* contenuti in una *matrice*.

Tali metodi consistono nel mettere in relazione un *segnale analitico* con la quantità (massa o concentrazione) o con la proprietà cercata per l'analita di interesse.

Anche le determinazioni “qualitative” (che rispondono alla domanda: l'analita c'è o non c'è?) sono in realtà quantitative, perché in ogni caso la risposta analitica va corredata di una informazione numerica che quantifica l'affidabilità della risposta stessa.

1.2. Errori nell'analisi quantitativa

Nessun risultato analitico ha senso se non corredata di:

- *errore*
- *livello di confidenza* = probabilità di dare una risposta vera
- *livello di significatività* = probabilità di dare una risposta falsa.

livello di confidenza + *livello di significatività* = 100%

1.3. Tipi di errore

Gli errori nell'analisi quantitativa si possono classificare in:

1.3.1. *errori grossolani.*

- Sono dovuti a sviste macroscopiche.
- Determinano la presenza di *outliers*

1.3.2. *errori casuali.*

- Fanno sì che le singole misure siano casualmente in eccesso o in difetto rispetto al *valore vero*.
- Sono dovuti a fluttuazioni incontrollabili delle condizioni sperimentali.
- Determinano la *precisione* della misura ed incidono sulla *ripetibilità* e *riproducibilità*.

1.3.3. *errori sistematici*

- Fanno sì che le singole misure siano tutte in eccesso o tutte in difetto rispetto al *valore vero*.
- Sono dovuti a non calibrazione degli strumenti o a pregiudizi dell'operatore (es: errore di parallasse)
- Determinano l'*esattezza* di una misura.

2. STATISTICA DELLE MISURE RIPETUTE

2.1 Media e deviazione standard

Supponiamo di avere effettuato n misure *ripetute* della grandezza X . Indichiamo i risultati di tali misure con x_i con $i=1, \dots, n$.

- Si definisce *media* delle misure ripetute la quantità:

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

- Si definisce *numero di gradi di libertà* la differenza tra il numero di misure ripetute e il numero di parametri da determinare.
- Si definisce *deviazione standard* delle misure ripetute la quantità:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \text{ dove } n-1 = n^\circ \text{ gradi di libertà}$$

Si dimostra che:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n-1} - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{n(n-1)}}$$

- Si definisce *varianza* delle misure ripetute la quantità: s^2 .
- Si definisce *coefficiente di variazione (CV)* o *deviazione standard relativa (RSD)* la quantità, espressa in %:

$$CV = RSD = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

2.2 Distribuzione dei risultati di una misura

Supponiamo di avere effettuato n misure *ripetute* della grandezza X .

- I risultati di tali misure $(x_i, i=1, \dots, n)$ sono un *campione* appartenente ad una *popolazione*=l'insieme di tutti i possibili risultati che verrebbero da infinite misure di X .

- Supponiamo che il risultato j -esimo x_j si presenti m_j volte. Si definisce *frequenza* del risultato j -esimo la quantità m_j . Si definisce *frazione* di misure che hanno dato risultato x_j la quantità:

$$f_j = \frac{m_j}{n}$$

- Si dimostra che:

$$\sum_{j=1}^k f_j = 1$$

- Si definisce *media pesata* delle misure ripetute la quantità:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{j=1}^k m_j x_j}{n}$$

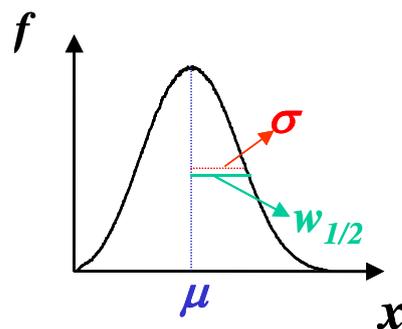
2.2.1. Distribuzioni

Nella misura di una grandezza X , si definisce *distribuzione* dei risultati la curva che descrive la *frequenza* dei possibili risultati in funzione del valore dei risultati stessi. La *distribuzione* dei risultati di una misura è una proprietà della *popolazione*.

Il modello matematico che descrive la *distribuzione* dei risultati di una misura è la *distribuzione Gaussiana* o *distribuzione normale*:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

2.2.2. Proprietà della distribuzione gaussiana



(1) Punto di massimo: $x = \mu$ $\mu = \text{valore vero}$

(2) Massimo: $f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}}$

(3) Punti di flesso: $x = \mu \pm \sigma$ $\sigma = \text{deviazione standard}$

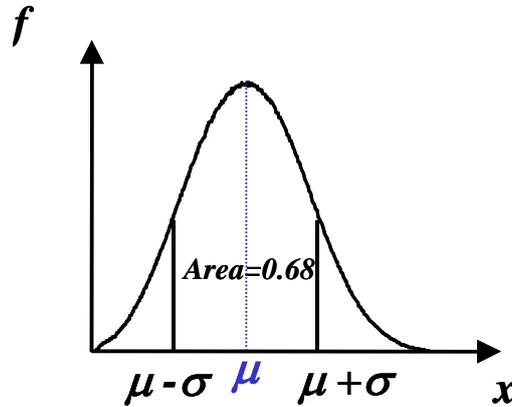
(4) Semi-larghezza a metà altezza $w_{1/2} = \sigma \sqrt{2 \ln 2}$

(5) Larghezza a metà altezza $W_{1/2} = \sigma \sqrt{8 \ln 2} \Rightarrow W_{1/2}^2 = 5.54 \sigma^2$

Probabilità che una misura cada tra $x=a$ e $x=b$ $P = \int_a^b f(x) dx$

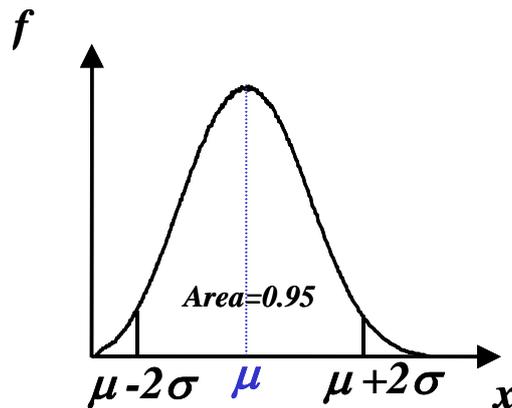
2.2.3. Distribuzione gaussiana: normalizzazione e probabilità

Condizione di normalizzazione $\int_{-\infty}^{+\infty} f(x) dx = 1$



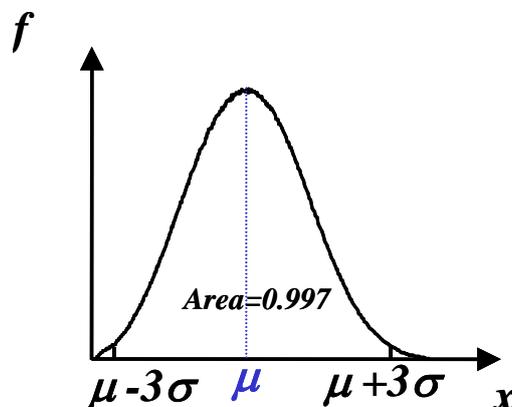
Probabilità che una misura cada tra $x = \mu - \sigma$ e $x = \mu + \sigma$:

68%



Probabilità che una misura cada tra $x = \mu - 2\sigma$ e $x = \mu + 2\sigma$:

95%



Probabilità che una misura cada tra $x = \mu - 3\sigma$ e $x = \mu + 3\sigma$:

99.7%

2.2.4. Intervallo di confidenza: caso ideale

Consideriamo il caso ideale in cui riusciamo ad eseguire infinite misure di X . Possiamo dire che:

il 95% dei risultati è compreso tra $x=\mu-2\sigma$ e $x=\mu+2\sigma$

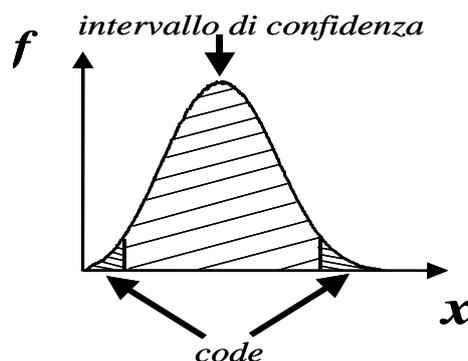
una ulteriore misura di X cadrà nell'intervallo $x=\mu\pm 2\sigma$
con una *probabilità* P del 95%.

all'*intervallo di confidenza* $x=\mu\pm 2\sigma$ associamo un
livello di confidenza del 95%.

Definizione: livello di significatività = 100% - livello di confidenza

livello di confidenza P = probabilità di cadere nell' intervallo di
confidenza

livello di significatività α = probabilità di cadere nelle *code* della
distribuzione



2.2.5. Intervallo di confidenza: caso reale

Consideriamo il caso reale in cui eseguiamo un numero finito n di misure di X , cioè abbiamo un *campione* appartenente ad una certa *popolazione*.

- La migliore stima di μ è la *media*:

$$\mu \approx \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

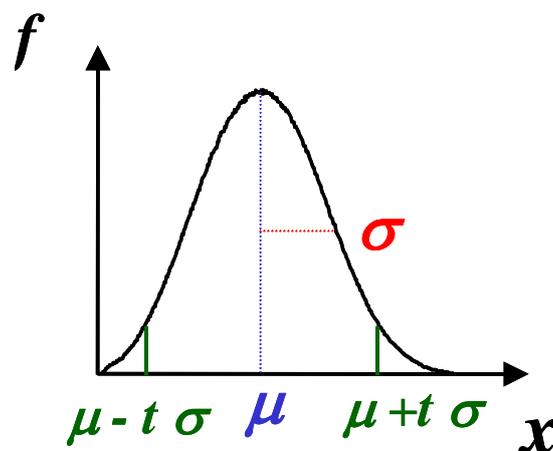
- La migliore stima di σ è la *deviazione standard* s :

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

- La migliore stima dell'*intervallo di confidenza* è:

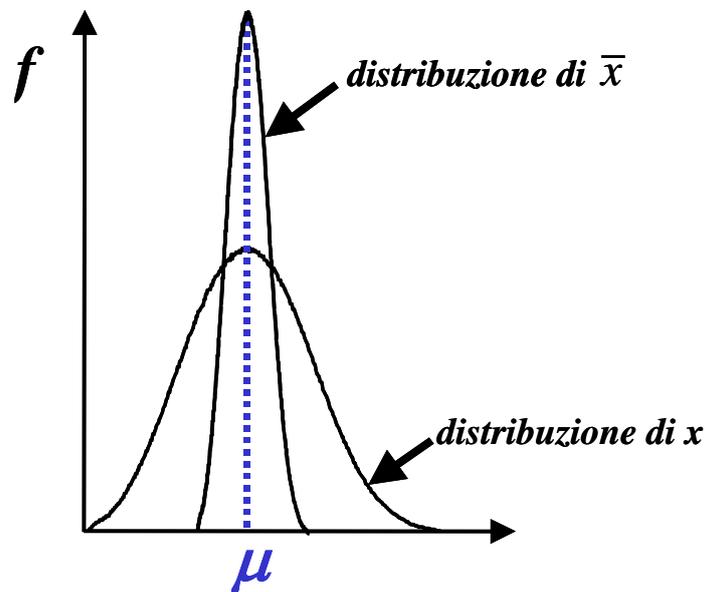
$$\bar{x} \pm t_{\alpha, n-1} s$$

dove t è un parametro statistico chiamato *t di Student*.



2.3 Distribuzione delle medie

Supponiamo di eseguire infiniti esperimenti in ciascuno dei quali misuriamo la *media* con n misure. Si dimostra che vale il *teorema del limite centrale*: la distribuzione delle medie ha lo stesso *valore vero* ma la sua *deviazione standard* è pari alla deviazione standard delle misure singole, divisa per la radice quadrata di n .



$$\sigma_{\bar{x}} = \frac{\sigma_x}{\sqrt{n}}$$

2.4 Intervallo di confidenza per la media

In base al teorema del limite centrale, l'intervallo di confidenza per una media è:

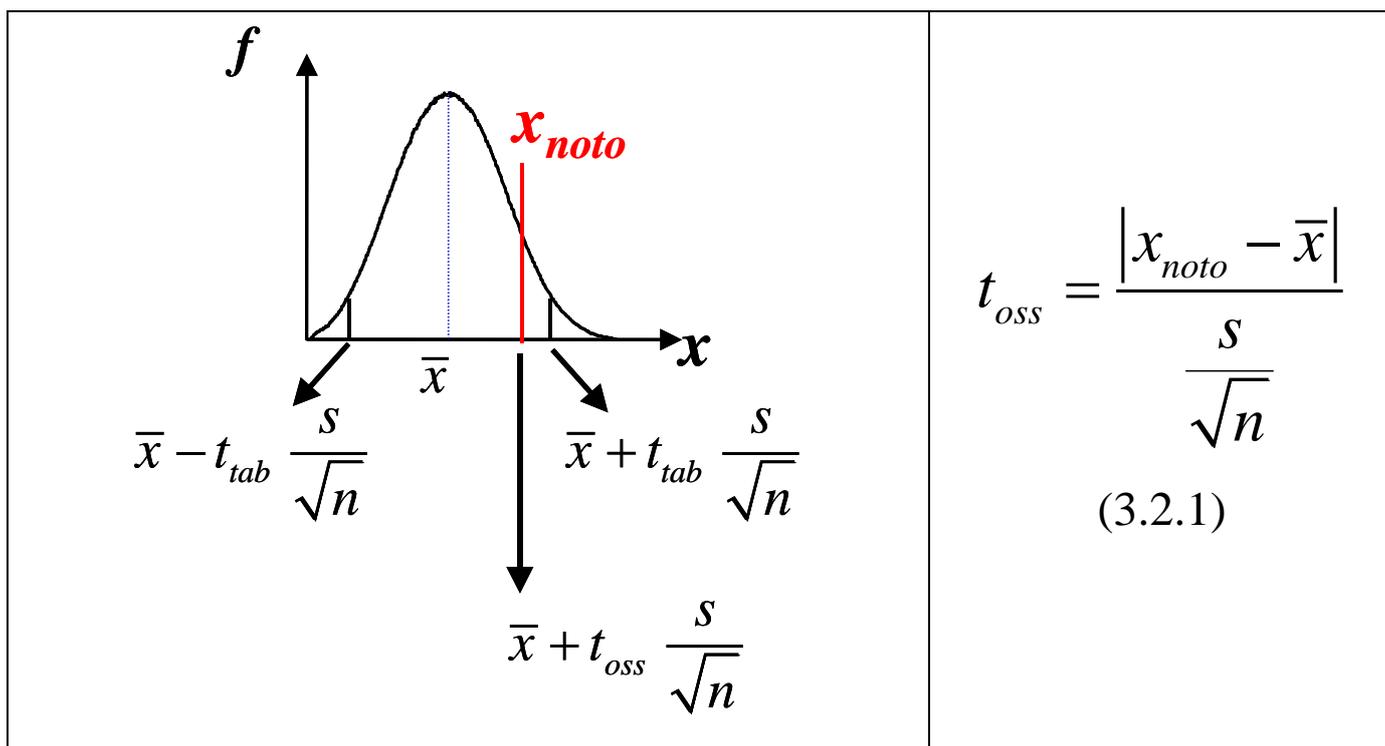
$$\bar{x} \pm t_{\alpha, n-1} \frac{s}{\sqrt{n}}$$

TESTS DI SIGNIFICATIVITÀ

3.1. Definizione di test di significatività

- Un *test di significatività* è un metodo statistico che consente di stabilire se più risultati siano o meno significativamente diversi.
- Si parte sempre da una *ipotesi nulla* H_0 , che è l'ipotesi che *non* ci sia differenza significativa tra i risultati confrontati. Si stabilisce quindi se l'*ipotesi nulla* è vera o falsa al livello di confidenza scelto.
- Principali test di significatività:
 - ✓ *t-test* per la verifica dell'*esattezza*.
 - ✓ *F-test* per la verifica della *precisione*.
 - ✓ *Q-test* per la verifica di *dati anomali*.
 - ✓ *Test* χ^2 per la verifica della *normalità* di una distribuzione
- Definizione: *accuratezza = esattezza & precisione*
- Definizione: *validazione = verifica di accuratezza*

3.2. *t*-test per il confronto di una media con un valore noto



$t_{oss} < t_{tab} \Rightarrow$ l'ipotesi nulla è accettata,
cioè non c'è differenza significativa tra \bar{x} e x_{noto}
al livello di confidenza scelto.

$t_{oss} > t_{tab} \Rightarrow$ l'ipotesi nulla è rigettata,
cioè c'è differenza significativa tra \bar{x} e x_{noto}
al livello di confidenza scelto.

Il livello di confidenza P scelto, ovvero il livello di significatività α scelto, e il valore di n determinano il valore numerico di t_{tab} .

Il *t*-test è un test di esattezza.

3.2.1. Esempio di confronto di una media con un valore noto

Si sottopone un campione a concentrazione nota ad un metodo analitico. Si vuole verificare se tale metodo dà il risultato atteso.

$$x_{\text{noto}} = 38.9 \text{ ppb}$$

Si eseguono 3 misure e si ottengono i risultati seguenti:

$$x_1 = 38.9 \text{ ppb}; x_2 = 37.4 \text{ ppb}; x_3 = 37.1 \text{ ppb}$$

$$\bar{x} = \frac{38.9 + 37.4 + 37.1}{3} = 37.8 \text{ ppb}$$

$$s = \sqrt{\frac{(38.9 - 37.8)^2 + (37.4 - 37.8)^2 + (37.1 - 37.8)^2}{3 - 1}} = 0.964 \text{ ppb}$$

$$t_{\text{tab}} = t_{0.05, 2} = 4.3$$

$$t_{\text{oss}} = \frac{|37.8 - 38.9|}{\frac{0.964}{\sqrt{3}}} = 1.98$$

Poiché $t_{\text{oss}} < t_{\text{tab}}$ l'ipotesi nulla è accettata, cioè non c'è differenza significativa tra il risultato ottenuto e il valore noto, al livello di confidenza del 95%.

Il *t-test* appena eseguito equivale a calcolare:

$$\bar{x} = 37.8 \pm 4.3 * \frac{0.964}{\sqrt{3}} = 37.8 \pm 2.4$$

$$35.4 < \bar{x} < 40.2 \text{ (intervallo di confidenza)}$$

Si osserva che x_{noto} cade dentro l'intervallo di confidenza.

3.3. *t*-test per il confronto tra due medie

Si vogliono confrontare due risultati ottenuti con due *tecniche diverse* sullo *stesso campione*:

risultato 1. \bar{x}_1, s_1, n_1, v_1

risultato 2. \bar{x}_2, s_2, n_2, v_2

Un simile problema si ha per esempio quando si vuole validare un metodo analitico mediante uno standard certificato. In questo caso il confronto tra le due medie è una *verifica di esattezza* del metodo sottoposto a validazione.

Verificare l'*ipotesi nulla* che non ci sia differenza significativa tra \bar{x}_1 e \bar{x}_2 equivale a verificare che non ci sia differenza significativa tra $|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|$ e lo zero.

3.3.1. Caso 1: s_1 e s_2 non sono significativamente diverse

Si esegue un t -test in cui:

$$t_{oss} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{\nu_1 s_1^2 + \nu_2 s_2^2}{\nu_1 + \nu_2} \text{ (varianza pooled)}$$

$\nu = \nu_1 + \nu_2 =$ numero di gradi di libertà del problema

$t_{oss} < t_{P,\nu} \Rightarrow$ ipotesi nulla accettata

non c'è differenza significativa tra i due risultati

Esempio.

Due metodi hanno dato i seguenti risultati sullo stesso campione.

$\bar{x}_1 = 28.0$ ppm, $s_1 = 0.3$ ppm, $n_1 = 10$ misure

$\bar{x}_2 = 26.3$ ppm, $s_2 = 0.2$ ppm, $n_2 = 9$ misure

$$s = \sqrt{\frac{(10-1) \cdot 0.3^2 + (9-1) \cdot 0.2^2}{10+9-1}} = 0.251$$

$$t_{oss} = \frac{|28.0 - 26.3|}{0.251 \cdot \sqrt{\frac{1}{10} + \frac{1}{9}}} = 14.7, \nu = 10+9-2=17$$

$$t_{tab} = t_{0.05,17} = 2.1$$

$t_{oss} > t_{tab} \Rightarrow$ c'è differenza significativa tra i due risultati.

3.3.2. Caso 2: s_1 e s_2 sono significativamente diverse

Si esegue un t -test in cui:

$$t_{oss} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$
$$\nu = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1}\right)^2}{n_1 + 1} + \frac{\left(\frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{n_2 + 1}}$$

e si arrotonda ν all'intero più vicino.

3.4. Paired *t*-test

Il test delle differenze accoppiate si applica quando si abbiano h campioni diversi e su ciascuno si esegua una singola misura col metodo 1 e una singola misura col metodo 2.

Siano:

$x_{i,1}$ il risultato ottenuto sul campione i -esimo col metodo 1

$x_{i,2}$ il risultato ottenuto sul campione i -esimo col metodo 2

$$\begin{pmatrix} x_{1,1} & x_{1,2} \\ \dots & \dots \\ x_{i,1} & x_{i,2} \\ \dots & \dots \\ x_{h,1} & x_{h,2} \end{pmatrix} \rightarrow \begin{pmatrix} d_1 \\ \dots \\ d_i \\ \dots \\ d_n \end{pmatrix} \rightarrow \bar{d}, s_{\bar{d}}, h-1 \text{ gradi di libert\`a}$$

Per verificare se ci sia differenza significativa tra i vari risultati ottenuti con le due tecniche, si fa l'ipotesi nulla che $\bar{d}=0$ e si esegue un *t*-test con:

$$t_{oss} = \frac{|\bar{d}|}{s_{\bar{d}}}$$

Esempio

Campione	metodo1	metodo2	d
1	71	76	-5
2	61	68	-7
3	50	48	2
4	60	57	3

$$\bar{d} = \frac{-5 - 7 + 2 + 3}{4} = -1.75$$

$$s_{\bar{d}} = \frac{\sqrt{\frac{(-5 + 1.75)^2 + (-7 + 1.75)^2 + (2 + 1.75)^2 + (3 + 1.75)^2}{4 - 1}}}{\sqrt{4}} = 2.50$$

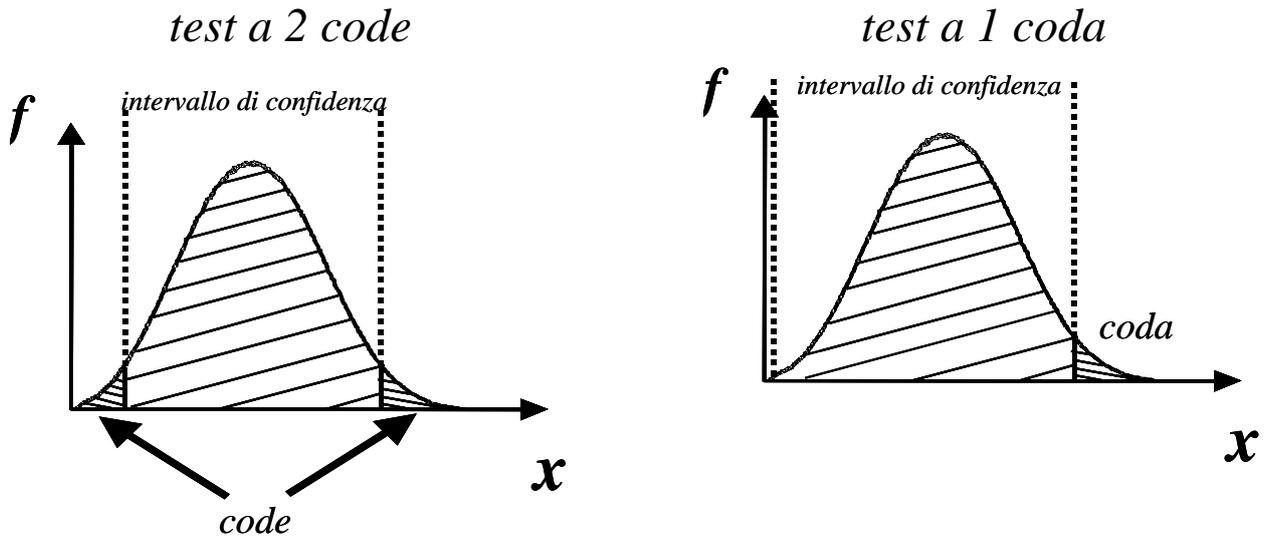
$$t_{oss} = \frac{1.75}{2.50} = 0.7$$

$$t_{0.05,3} = 3.18$$

$t_{oss} < t_{tab} \Rightarrow$ ipotesi nulla accettata:

i due metodi danno risultati *non significativamente differenti*.

3.5. Test a una coda, test a due code



I *t*-test finora descritti sono del tipo *a due code* perché si considera l'eventualità più generale che i dati di confronto rispetto ad una media possano cadere sia *al di sopra* (*coda* di destra) che *al di sotto* (*coda* di sinistra) rispetto all'*intervallo di confidenza*.

Quando c'è una motivazione sperimentale al fatto che il dato di confronto possa essere solo più grande o solo più piccolo rispetto ai dati trovati allora si applica un test *a 1 coda*.

Fissati un *livello di significatività* α e ν gradi di libertà, si ha:

$$t_{\alpha,\nu}^{1coda} = t_{2\alpha,\nu}^{2code}$$

$$t_{\alpha,\nu}^{1coda} < t_{\alpha,\nu}^{2code}$$

Dove non specificato, t è riferito al caso di *2 code*.

La funzione di Excel™ $\text{INV.T}(\alpha;\nu)$ è riferita al caso di *2 code*.

Esempio

Titolando 25 ml di un acido forte 0.1 M con una base forte 0.1 M, ci si è resi conto di avere usato come indicatore fenolftaleina troppo diluita e di avere apprezzato la comparsa del colore rosso in ritardo rispetto al punto equivalente, commettendo un errore in eccesso.

Si vuole verificare, con un *livello di confidenza* del 95%, se questo errore ha comportato una significativa mancanza di *esattezza*.

Risultati per il volume V di titolante aggiunto (ml).

25.06, 25.18, 24.87, 25.51, 25.34, 25.41

$$\bar{V} = 25.228 \text{ ml}$$

$$s = 0.238 \text{ ml}$$

$$t_{oss} = \frac{|25.228 - 25|}{\frac{0.238}{\sqrt{6}}} = 2.35$$

$$t_{0.05,5}^{1\text{coda}} = t_{0.10,5}^{2\text{code}} = 2.01$$

$t_{oss} > t_{tab} \Rightarrow$ il dato trovato è *significativamente* maggiore rispetto al dato atteso.

N.B. se si fosse usato come t_{tab} il valore $t_{0.05,5}^{2\text{code}} = 2.57$ si sarebbe concluso che il dato trovato *non* è *significativamente* differente rispetto al dato atteso.

3.6. *F*-test per il confronto tra deviazioni standard

Supponiamo di sottoporre a misura *uno stesso campione con due metodi diversi*.

Vogliamo confrontare le *precisioni* dei due metodi.

Dobbiamo confrontare le *varianze* s_1^2 e s_2^2 ottenute coi due metodi.

Definizione: $F_{\alpha, \nu_1, \nu_2} = \frac{s_1^2}{s_2^2}$, ν_1 e ν_2 = numeri di gradi di libertà.

A numeratore si pone sempre la varianza più grande.

Ipotesi nulla H_0 : che *non* ci sia differenza di precisione tra i 2 metodi.

3.6.1. *F*-test a 1 coda

Si applica quando si vuole verificare se il metodo 2 è *più preciso* del metodo 1, al *livello di significatività α* .

$$F_{oss} < F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}^{1coda} \Rightarrow H_0 \text{ accettata}$$

il metodo 1 *non* è più preciso del metodo 2.

3.6.2. *F*-test a 2 code

Si applica quando si vuole verificare se ci sia *differenza significativa* tra le *precisioni* dei due metodi, al *livello di significatività α* .

$$F_{oss} < F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}^{2code} \Rightarrow H_0 \text{ accettata}$$

le *precisioni* dei due metodi *non* sono *significativamente* differenti

$$F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}^{1coda} < F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}^{2code}$$

$$F_{\alpha, \nu_1, \nu_2}^{1coda} = F_{2\alpha, \nu_1, \nu_2}^{2code}$$

La funzione di Excel™ $\text{INV.F}(\alpha; \nu_1, \nu_2)$ è riferita al caso di *1 coda*.

Esempio

Un analista propone un nuovo metodo (metodo 2) ed afferma che esso è *più preciso* di un metodo già validato (metodo 1). I risultati sono:

Metodo	Media (mg ml ⁻¹)	s (mg ml ⁻¹)	Numero misure
1	72	3.31	8
2	72	1.51	8

$$F_{oss} = \frac{3.31^2}{1.51^2} = 4.8$$

$$F_{0.05,7,7}^{1\text{ coda}} = 3.787 = \text{INV.F}(0.05;7;7)$$

$$F_{oss} > F_{\alpha, v_1, v_2}^{1\text{ coda}} \Rightarrow H_0 \text{ rigettata}$$

il metodo 2 è più preciso del metodo 1.

Esempio

Un analista propone un nuovo metodo (metodo 2) e si chiede se la sua precisione sia *diversa* rispetto ad un metodo già validato (metodo 1).

I risultati sono:

Metodo	Media (mg ml ⁻¹)	s (mg ml ⁻¹)	Numero misure
1	28.0	0.3	10
2	26.25	0.23	10

$$F_{oss} = \frac{0.3^2}{0.23^2} = 1.7$$

$$F_{0.05,9,9}^{2\text{ code}} = 4.026 = \text{INV.F}(0.025;9;9)$$

$$F_{oss} < F_{\alpha, v_1, v_2}^{2\text{ code}} \Rightarrow H_0 \text{ accettata}$$

le precisioni del metodo 2 *non sono significativamente diverse*.

3.7. *Q*-test per la verifica di dati anomali

Supponiamo di avere sottoposto uno stesso campione a più misure con lo stesso metodo. Uno dei dati risulta ad occhio molto diverso dagli altri. Si vuole verificare se esso sia *anomalo*.

Definizione:

$$Q = \frac{|\text{valore sospetto} - \text{valore più vicino}|}{(\text{valore massimo} - \text{valore minimo})}$$

$Q_{oss} < Q_{tabulato} \Rightarrow$ il dato sospetto non è rigettabile

Valori critici di *Q* al livello di significatività del 5%

<i>Numero misure</i>	<i>Q</i>
4	0.831
5	0.717
6	0.621
7	0.570
8	0.524
9	0.492
10	0.464

Esempio

Dati raccolti (mg l⁻¹)

0.403, 0.410, 0.401, 0.380

$$Q = \frac{|0.380 - 0.401|}{0.410 - 0.380} = 0.7$$

Il dato sospetto risulta *non significativamente* anomalo al *livello di confidenza* del 95%.

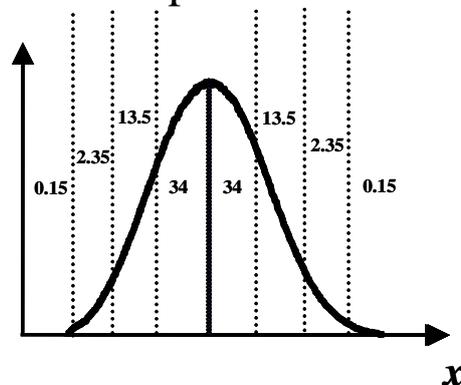
3.8. Test χ^2 per la verifica della normalità di una distribuzione

Supponiamo di avere effettuato n misure ($n > 50$) di una grandezza x . Vogliamo verificare se le misure ripetute sono conformi ad una distribuzione gaussiana.

Ipotesi nulla: non c'è differenza significativa tra la distribuzione delle misure osservate e una distribuzione gaussiana.

Dalle misure ripetute calcoliamo \bar{x} e s .

Suddividiamo l'asse x in k intervalli. È calcolabile la probabilità P_k che un dato cada nel k -esimo intervallo. Per es. nel caso $k=8$ intervalli ottenuti spostandosi di una σ a partire dalla media si ha:



Chiamiamo E_k il numero di misure che ci si attende che cada nell'intervallo k -esimo. È:

$$E_k = n P_k \quad (3.8.1)$$

Chiamiamo O_k il numero di misure che si osservano cadere nell'intervallo k -esimo.

Definiz.: $\chi^2 = \sum_k \frac{(O_k - E_k)^2}{E_k}$, $k =$ numero di gradi di libertà (3.8.2)

Fissato il *livello di significatività* α si ha che:

$$\chi_{oss}^2 < \chi_{\alpha, k}^2 \Rightarrow \text{i dati sono distribuiti normalmente} \quad (3.8.3)$$

I valori critici di χ^2 sono tabulati e calcolabili con la funzione di Excel™ $INV.CHI(\alpha; k)$

3.9. Test della frequenza cumulativa

Supponiamo di avere effettuato n misure ($n < 50$) di una grandezza x . Vogliamo verificare se le misure ripetute sono conformi ad una distribuzione gaussiana.

Ipotesi nulla: non c'è differenza significativa tra la distribuzione delle misure osservate e una distribuzione gaussiana.

Si ordinano i dati in modo crescente, assegnando a ciascuno un numero d'ordine k , chiamato anche *frequenza cumulativa*.

Si calcola:

$$f_{cum} = \frac{k}{n+1}$$

E si riporta in grafico f_{cum} in funzione dei dati.

Se i dati appartengono ad una distribuzione gaussiana si deve ottenere una sigmoide. Esempio.

dati	k	f_{cum}
74	1	0.071429
86	2	0.142857
88	3	0.214286
89	4	0.285714
99	5	0.357143
104	6	0.428571
107	7	0.5
109	8	0.571429
110	9	0.642857
111	10	0.714286
113	11	0.785714
115	12	0.857143
134	13	0.928571

