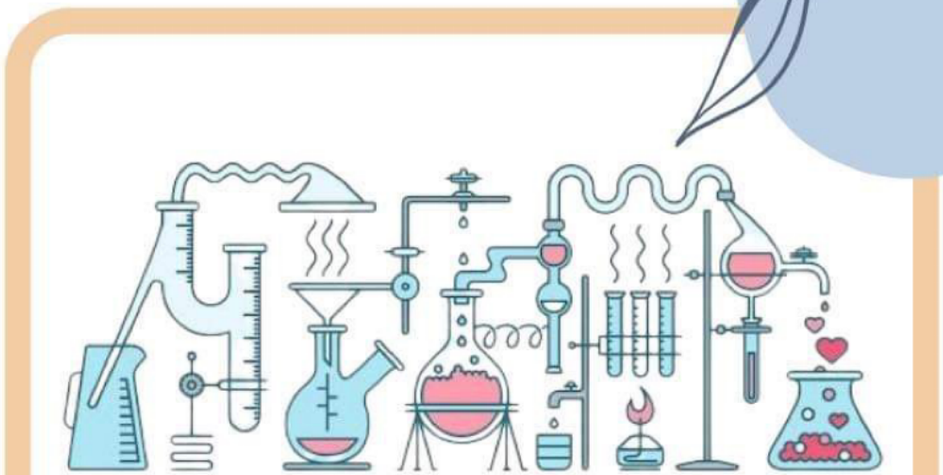
تفريغ تحليل آلي



اسم الموضوع: Introduction ch1

إعداد الصيدلانى/ـة: Jeneen Alhasan

Soul Academy

لجان الدُّفعات

INTRODUCTION TO INSTRUMENTAL ANALYSIS

OUTLINE:

Classification of Analytical Methods

Types of Instrumental Methods

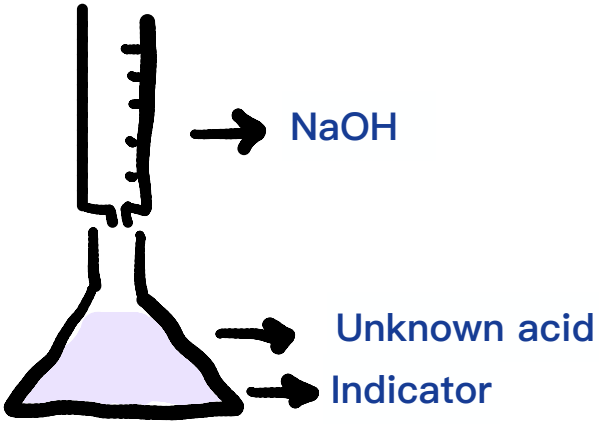
Instruments for Analysis

Selecting an Analytical Method

Calibration of an Instrumental Methods

احنا اخدنا analytical chemistry (الكيمياء التحليلية) و كان التركيز يقاس على اساس rxn و الanalyte هو الunknown فمثلا انا معي unknown حمض و اخدت burette و ضفت indicator و هاد الunknown بدي اعرف كم تركيزه و شو هو عن طريق اضافة known base مثل NaOH معروفة التركيز و بلشت اعمل titration و التغير رح يكون باللون يعني بكون violet بعدين بختفي اللون او كان مختفي اللون بعدين تحول ل violet و بهاي النقطة بقدر احسب تركيز الحمض الunknown من خلال حجم الNaOH اللي صارلها titration

الpka للacids منقدر نعرف نوع الحمض منه



Definitions

Analytical Chemistry: The Science of Chemical Measurements.

ال**chemical** زي استخدام ال**indicator** بال**titration**

ال**unknown**

***Analyte*:** The compound or chemical species to be measured, separated or studied.

هل ال**acid** صار موجود او شو المادة الموجودة يعني التعرف على النوع

1. ***Qualitative*** instrumental analysis is that measured property that indicates *presence* of analyte in matrix

التركيز

2. ***Quantitative*** instrumental analysis is that magnitude of measured property that is proportional to *concentration* of analyte in matrix

CLASSICAL AND INSTRUMENTAL METHODS

**ال classical ما الها علاقة بالاجهزة

CLASSICAL: ال basics الاساسيات تبعت ال analytical chemistry كانوا يستخدموا :

Qualitative - identification by color, indicators, boiling points, odors

Quantitative - mass or volume (e.g. gravimetric, volumetric)

وزنة powder مثلا

INSTRUMENTAL:

Qualitative- chromatography, electrophoresis and identification by measuring physical property (e.g. spectroscopy, electrode potential)

Quantitative- measuring property and determining relationship to concentration (e.g. spectrophotometry, mass spectrometry). Often, same instrumental method used for qualitative and quantitative analysis.

Identification by color
مثلا اذا كان المركب لونه ازرق بعرف انه المركب copper sulfate لانه الازرق بدل على وجود copper

الindicator زي اللي منستخدمهم بالacid base titration بتغير لونهم

الboiling point هو physical property

الodors اللي هي الروائح .. كل مركب اله رائحة مميزة و هاد بالمختبر الاورغانيك اكتر اشي

بالinstrumental رح نستخدم الاجهزة في تحديد الquantitative و الqualitative للمادة
مثلا بدل ما استخدم indicator بستخدم PH meter و مبدأ عمله انه انا عندي acid و الPh اقل من ٧ و بس اجي اضيف known base بدي اضيف تراكيز لحد ما نوصل ل7 ph و كمية الbase اللي استهلكتها حتى اوصل للneutral اللي هو ph=7 بقدر استخدمها حتى اطلع تركيز الunknown acid و منه بقدر اطلع الpka و من الpka بقدر اعرف شو نوع الacid

الchromatography و الelectrophoresis هي الاجهزة اللي بتقيس الphysical properties سواء quatitative او qualitative و في اجهزة بتقيس qualitative فقط و في اجهزة بتقيس qualitative و quantitative .. مثلا جهاز الUV spectrometry بقيس qualitative و quantitative بينما الinfrared فقط qualitative .. الNMR فقط qualitative بحددوا نوع المادة او بساهم فى تحليل المادة بس ما بحددلى الكمية

Types of Instrumental Methods

Example methods

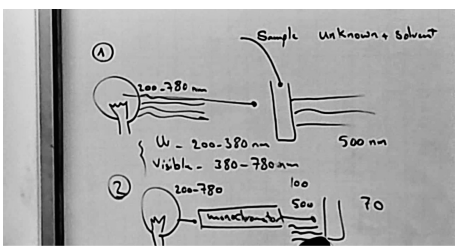
Source: Spectroscopy Technique يستخدم ضوء	Radiation emission	Emission spectroscopy, fluorescence, phosphorescence, luminescence – escence
	Radiation absorption	Absorption spectroscopy spectrophotometry, photometry, nuclear magnetic resonance NMR
Electrical Technique يعتمد على الجهد الكهربائي او الطاقة الكهربائية	Electrical potential	Potentiometry
	Electrical charge	Coulometry
	Electrical current	Voltammetry - amperometry, polarography
	Electrical resistance	Conductometry
Thermal Technique حرارة	Thermal	Thermal gravimetry, calorimetry

الspectroscopy يستخدم ضوء و العينة بتكون بالcuvette بتكون مصنوعة من البلاستيك او الكوارتز و العينة اللي فيها هي الunknown+solvent يعني sln و هاد الcontainer اللي هو الcuvette بكون transparent شفاف و مناخد مصدر طاقة اللي هو الضوء و الضوء اللي رح استعمله حسب انا على اي موجة بشتغل مثلا موجة UV طولها الموجي
٢٠٠- ٣٠٠ بينما الvisible طولها الموجي ٣٨٠-٧٨٠ .. اذا اخدنا هدول الضوئين مع بعض بكون الطول الموجي من ٢٠٠ ل ٧٨٠ و رتبنا الاطوال الموجية مثلا ٢٠٠ ، ٢٠١ ، ٢٠٢.....٧٨٠ و بعدين منحط العينات .. اغلب الاحيان اذا منحط solvent ما بيمتص ضوء .. العينة فقط هي اللي بتمتص الضوء ف اذا زبطت هاي الاطوال الموجية على الsln اللي فيه الsolvent و المادة اللي بدي احللها رح تسحب المادة هاي طول موجي واحد فقط مثلا سحبت الطول الموجي ٥٠٠ بقدر اعرف المادة من خلالها

بالنسبة للادوية بروح عالpharmacopoeia بعد ما طلعت الطول الموجي اللي بتسحبه المادة و بكون مكتوب الاطوال الموجية و المواد جنبها لانه المادة الها fingerprint يعني بس طول موجي واحد بتسحب يعني كل مادة الها طول موجي معين و مجرد ما عرفت نوع المادة بعرف التركيز

يعني الخطوة الاولى بكون الضو ساقط على المادة و المادة بتتأثر بالضو بس مو كل المواد بتتأثر بالضو و كل مادة بصيرلها امتصاص الها fingerprint يعني طول موجي معين هاي الخطوة qualitative

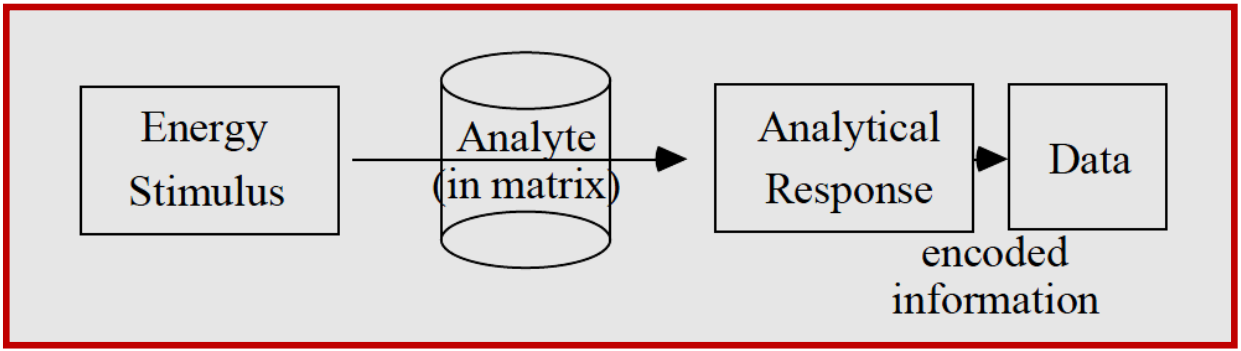
الخطوة الثانية quantitative بدي اعرف تركيز المادة عن طريق الجهاز الmonochromator اللي فيه الاطوال الموجية من ٢٠٠ ل ٧٨٠ بخليه يستبعد كل هدول الاطوال و يمرر بس ال٥٠٠ للعينة فعلى فرض مرت ١٠٠ موجة من ال٥٠٠ نانومتر و هي وحدة قياس الطاقة فالعينة كل مادة فيها رح تمتص موجة



الelectrical technique تطبيق عليه هو الPh meter اللي بقيس كم الph عن طريق electrode بدخله بsln و في معه شاشة ببين قيمة الph فمثلا الelectrode معبى جواه مادة standard و بتعطيني H+ بكميات ثابتة و بدي ادخل هاد الelectrode بsln مثلا عندي قاعدة و القاعدة بتعطيني OH- بدي يكونوا الH+ حرين ليعطوني جهد كهربائي معين و بدي يكونوا مش حرين حتى تيجي الOH تمسك مع الH فبتقل الشحنة الموجبة لانه صارت neutral فبقل الجهد الكهربائي او بيرتفع و هاد الانخفاض او الارتفاع بالجهد الكهربائي بقدر اقيس منه كم الPh

اخر طريقة اللي هي الthermal technique الحرارة .. طريقة تحليل المادة انه باخد وزنة و بحطها بcrucible بعدين بحطها بالoven الفرن فكل الماد العضوية اللي موجودة بالمادة رح تتحول لغازات يعني النيتروجين بتحول لNO2 و الكربون بتحول لCO2 و الهيدروجين لH2O بضل الheavy metals ما بتتحول لغازات و بتترسب و في عندي الash من خلال هدول ال٢ بقدر احدد كم تركيز الheavy metals عن طريق التسخين و ببلش يتوهج و بس يستقر باخد الطول الموجي و بعرف التركيز

Instrumental Methods

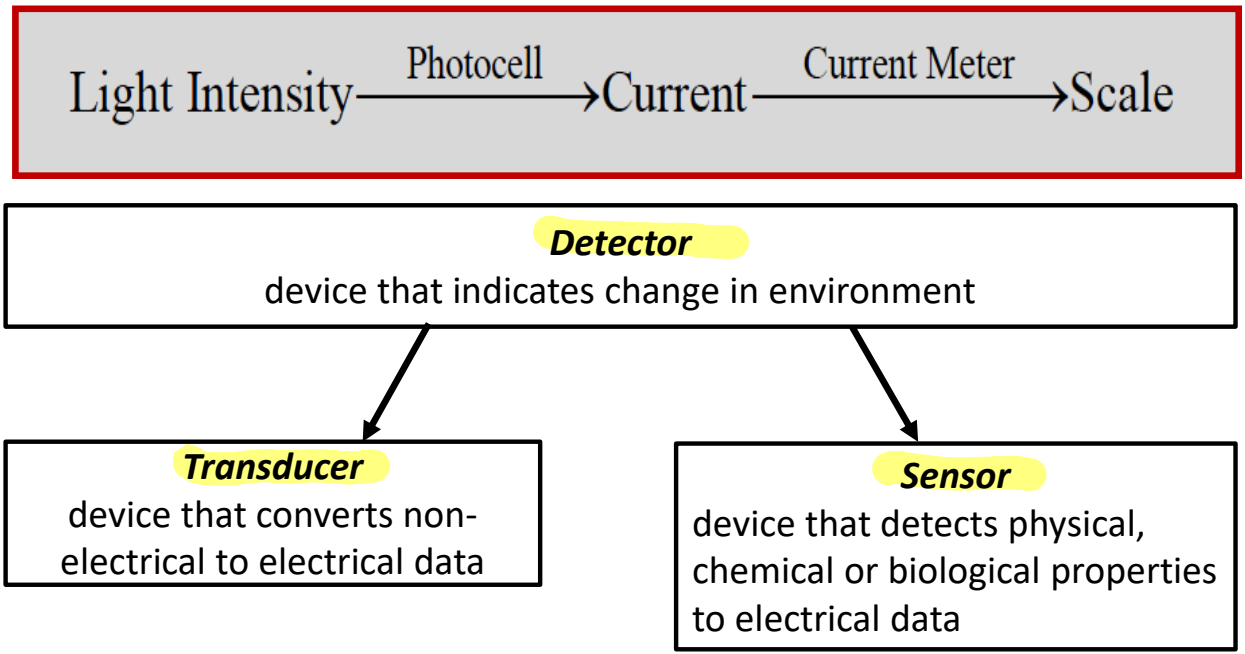


Block diagram for the overall process of instrumental measurement.

Example:	**spectrophotometry**
Instrument:	**spectrophotometer**
Stimulus:	**monochromatic light energy**
Analytical response:	**light absorption**
Transducer:	**photocell**
Data:	**electrical current**
Data processor:	**current meter**
Readout:	**meter scale**

DATA DOMAINS: way of encoding analytical response in electrical or non-electrical signals.

Interdomain conversions: transform information from one domain to another.



Block diagram of a fluorometer

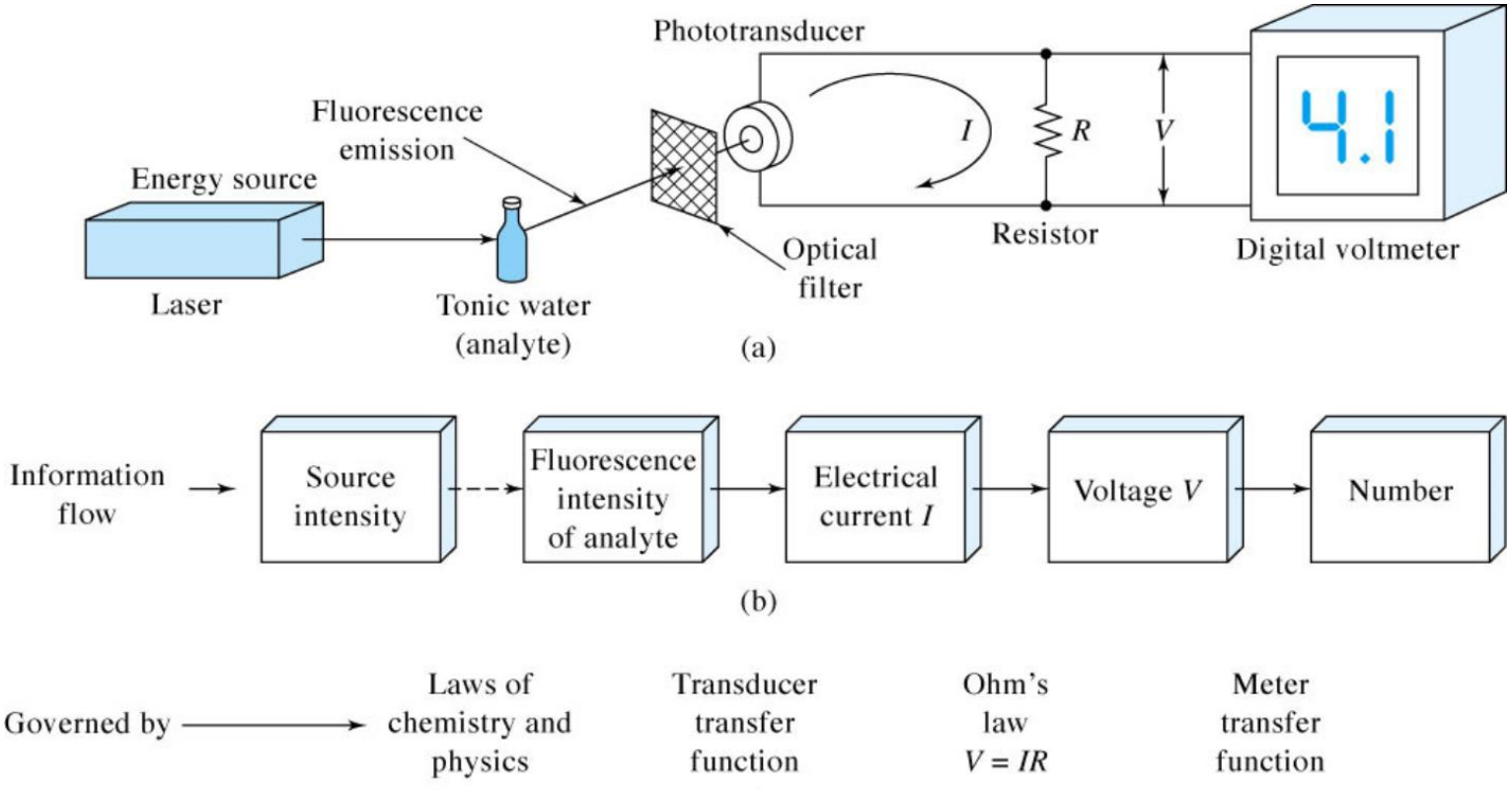


FIGURE 1-3 A block diagram of a fluorometer showing (a) a general diagram of the instrument, (b) a diagrammatic representation of the flow of information through various data domains in the instrument, and (c) the rules governing the data domain transformations during the measurement process.

المياه الغازية بتيجي بنكهات مختلفة و هاي النكهات الها لون مش زي المي العادية و الCO2 و المياه العادية ما الهم امتصاص بمنطقة الUV و هاي المواد المضافة عالمياه الغازية هي مواد كيميائية فالمشكلة بالنكهات المضافة و بدي احللها فبسقط عليها الاطوال الموجية و العبوة تاعت المياه لازم تكون شفافة transparent و المادة اللي جوا الH2O ما بتمتص والCO2 ما بتمتص اللي بمتص هو الflavour النكهة و في فلتر وظيفته انو اذا في احتمالية وجود مواد اخرى يستبعدها

الاطوال الموجية الخارجة من الزجاج مش زي الداخلة و بتكون اقل و بتحول الضو الخارج الى تيار كهربائي و بعدين بيمر بمقاومة كهربائية resistence و المقاومة بتحدد شدة التيار الكهربائي يعني عدد الموجات اللي بتوصل و بتحول التيار من اشي غير محسوب not countable الى رقم digit حتى احسب تراكيز و نوعية و كمية و الاشي اللي رح يحوله يا منسميه transducer او sensor

مقياس الحرارة thermometer هو الsensor و فكرته انه عندي molecules of mercury في درجة حرارة الغرفة 25c بكون في بعد معين بينه و بين الmolecule اللي جنبه .. لو بدي ادخل الthermometer بمي سخنة او ادخله بجسم حتى اقيس درجة الحرارة ف رح تزيد درجة الحرارة تاعت الMercury و ببلشوا يبعدوا عن بعض و بزيد الحجم لنفس الكمية بسبب الطاقة الحركية فببلش الthermometer يطلع .. يعني اكتسب حرارة من الخارج و الحرارة زادت الطاقة الحركية و بعدت ال molecules عن بعض و زاد الحجم

الtransducer بحول الضو الى رقم

الtransducer و الsensor يعتبروا detector لأنهم بعطوا نتيجة .. الtransducer بعطيني قيمة الامتصاص و الsensor بعطيني درجة الحرارة

Figures of Merit

في حسابات رياضية بتبين انه اذا الطريقة اللي استخدمتها اعطتني ارقام او قيم رياضية احصائية ضمن الرينج المقبول معناته بقدر استخدم الmethod اما اذا كانت القيم الرياضية خارج الرينج المقبول ما بقدر استخدم الmethod و هاي الاحصائيات منسميها figures of merit

Performance Characteristics: Figures of Merit

How to choose an analytical method? How good is measurement?

How well a calibration curve follows a straight line?- **Linearity**.

How reproducible? – **Precision**

How close to true value? - **Accuracy/Bias**

How small a difference can be measured? – **Sensitivity**

What range of amounts? - **Dynamic Range**

How much interference? - **Selectivity**

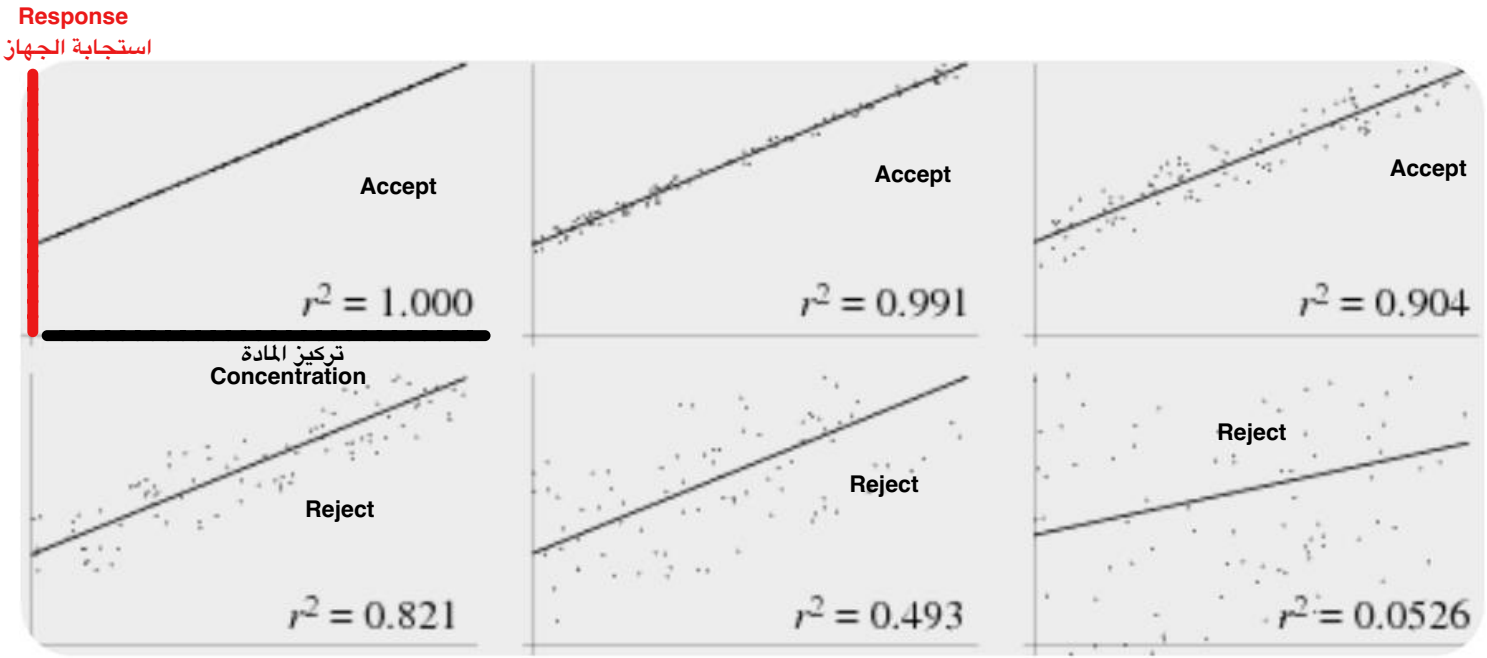
FIGURES OF MERIT: Linearity

- How well a calibration curve follows a straight line.
- R^2 (Square of the correlation coefficient)

$$R^2 = \frac{[\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}$$

يعني هل اذا زدت تركيز الماء بزيد استجابة الجهاز بشكل طردي؟

اذا كانت استجابة الجهآز مع التركيز linear اللي هو اذا كان r^2 اكبر من 0.88 فال method يمكن استخدامه accept
و اذا كان اقل من 0.88 فال method لا يمكن استخدامه reject و ال optimum linearity بكون r^2 يساوي واحد



FIGURES OF MERIT: PRECISION

اذا حضرت تركيز و رجعت حضرت نفس العينة كل ساعة و كانت بعد قيم العينة عن الmean تاعهم قليل بكون الجهاز ممتاز و دقيق

INDETERMINATE OR RANDOM ERRORS

Standard deviation: $$s = \sqrt{\frac{\sum_{i-0}^{i=N} (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

Variance: s^2

Relative standard deviation: $RSD = \frac{s}{\bar{x}}$

Standard deviation of mean: $s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$

FIGURES OF MERIT: ACCURACY

DETERMINATE ERRORS (operator, method, instrumental)

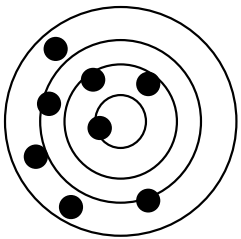
$$\text{Bias:} \quad \text{bias} = \bar{x} - x_{\text{true}}$$

يعني أنا حضّرت تركيز واحد و عدته اكتر من مرة و اخدت الmean اله و قارنته مع reference جاي من الشركة

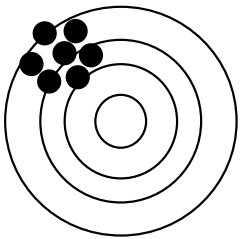
كلما كان الفرق بين القراءات و الtrue value قليل بكون الجهاز دقيق

هون باخد 2 parameters

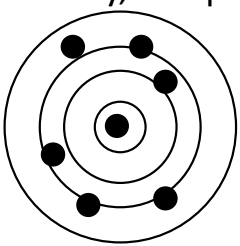
Illustrating the difference between "accuracy" and "precision"



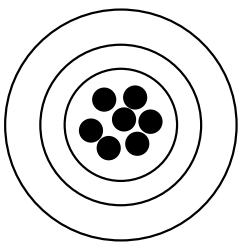
Low accuracy, low precision



Low accuracy, high precision



High accuracy, low precision



High accuracy, high precision

وجود النقاط في الوسط هو الaccuracy
بعد النقاط عن بعض هو الprecision

FIGURES OF MERIT: SENSITIVITY

Indicates the response of the instrument to changes in analyte concentration or a measure of a method's ability to distinguish between small differences in concentration in different samples. Effected by slope of calibration curve.

استجابة الجهاز

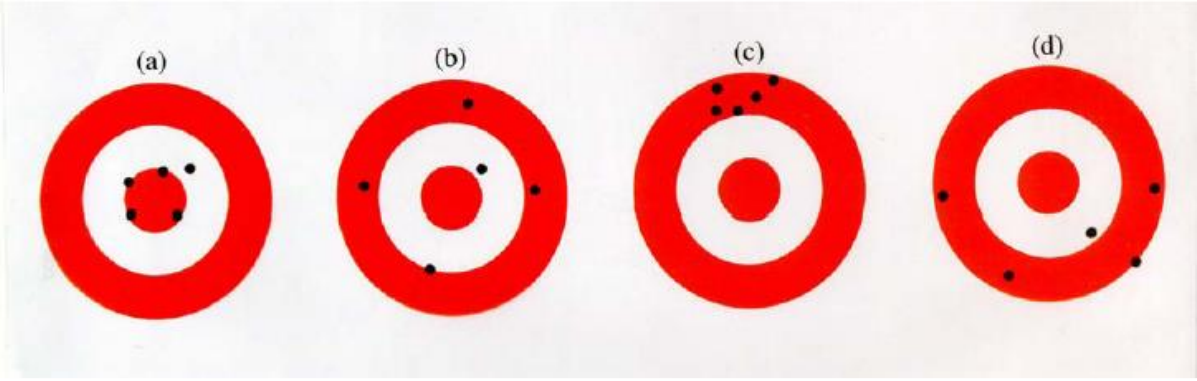
Sensitivity = ɣ= m/Ss

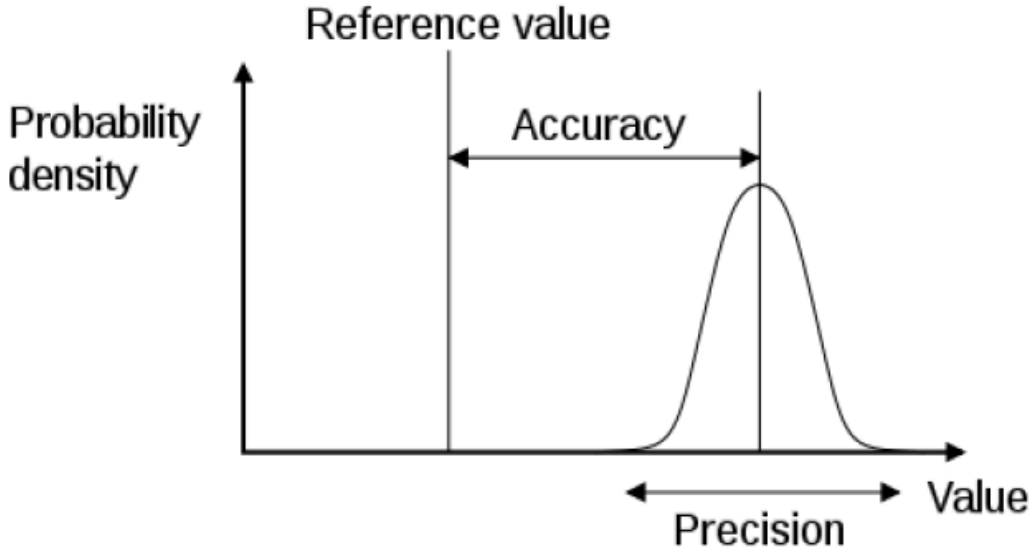
m = slope;

Ss is the standard deviation of measurement

(larger slope of calibration curve m, more sensitive measurement)

Accuracy vs Precision





FIGURES OF MERIT: LIMIT of DETECTION (LOD)

Signal must be bigger than random noise of blank

Minimum signal: $\text{Signal}_{min} = \text{Av. Signal}_{blank} + ks_{blank}$

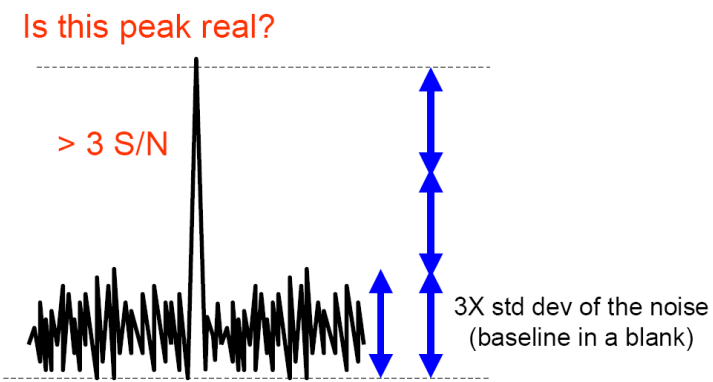
From statistics k=3 or more (at 95% confidence level)

Typically 3 times the signal-to-noise (based on standard deviation of the noise)

or

LOD =3 x Standard deviation of blank/ Slope

LOD=3 xS_b/m



FIGURES OF MERIT: DYNAMIC RANGE

At limit of detection we can say confidently analyte is present but cannot perform reliable quantitation

LOQ (limit of quantification): [lowest] at which quantitative measurements can reliably be made. Equal to 10 x Average Signal for blank *i.e.* 10Sbl. or

LOQ =10 x Standard deviation of blank/ Slope

LOQ=10 xSb/m

Limit of linearity (LOL): when signal is no longer proportional to concentration

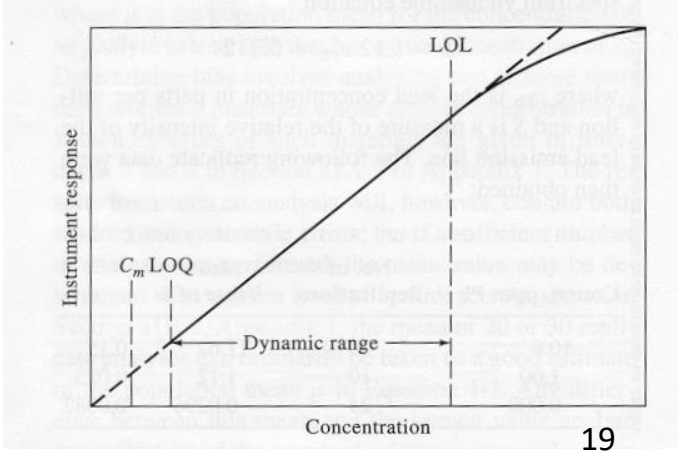
Dynamic range: the maximum range over which an accurate measurement can be made

From limit of quantitation to limit of linearity

LOQ: 10 s of blank

LOL: 5% deviation from linear

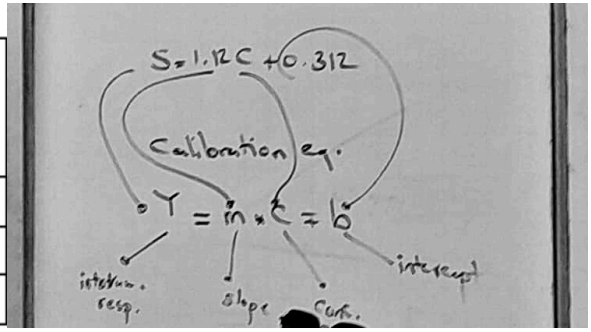
Dynamic range: $\frac{\text{LOL}}{\text{LOQ}}$ 10^2 to $>10^6$



Example:

An analysis of the calibration data for the determination of lead based upon its flame emission spectrum yielded an equation: $S = 1.12C + 0.312$ where C is the Pb concn in ppm and S is a measure of the relative emission intensity. The following replicate data were obtained:

Concn (C), ppm	No. of replicates	Mean value of S	Std. dev.
10.0	10	11.62	0.15
1.00	10	1.12	0.025
0.000	24	0.0296	0.0082



Blank just solvent

Calculate (a) the calibration sensitivity, (b) the analytical sensitivity at 1 and 10 ppm of Pb,(c) the limit of detection limit (LOD), and ,(d) the limit of quantification limit (LOQ)

Example Solution:

a) calibration sensitivity is the slope of the calibration curve = 1.12

b) Using $\gamma = m/S_s$: at 10 ppm $\gamma = 1.12 / 0.15 = 7.5$ at 1 ppm

$\gamma = 1.12 / 0.025 = 45$

c) LOD= 3 x Sb/ slope= 3 x 0.0082/1.12 = 0.0219

d) LOQ= 10 x Sb/ slope= 10 x 0.0082/1.12 = 0.0732

FIGURES OF MERIT: LIMIT of DETECTION (LOD)

Signal must be bigger than random noise of blank

Minimum signal: $\text{Signal}_{min} = \text{Av. Signal}_{blank} + ks_{blank}$

From statistics k=3 or more (at 95% confidence level)

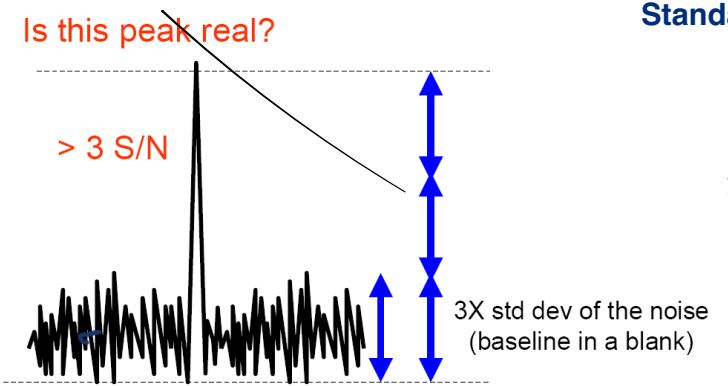
Typically 3 times the signal-to-noise (based on standard deviation of the noise)

or

LOD =3 x Standard deviation of blank/ Slope

$LOD = 3 \times S_b / m$

Standard deviation of blank — **Slope**



ال LOD هو اقل تركيز يمكن ال method او الجهاز قراءته بدقة

FIGURES OF MERIT: DYNAMIC RANGE

At limit of detection we can say confidently analyte is present but cannot perform reliable quantitation

LOQ (limit of quantification): [lowest] at which quantitative measurements can reliably be made. Equal to 10 x Average Signal for blank *i.e.* 10Sbl. or

LOQ =10 x Standard deviation of blank/ Slope

LOQ=10 xSb/m

اعلى تركيز

Limit of linearity (LOL): when signal is no longer proportional to concentration

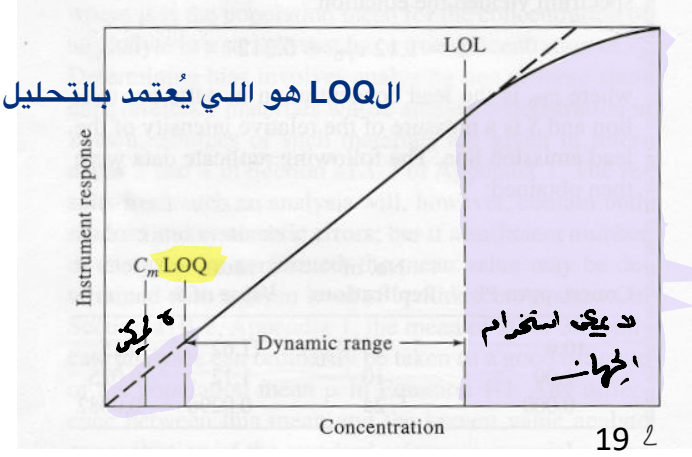
Dynamic range: the maximum range over which an accurate measurement can be made

From limit of quantitation to limit of linearity

LOQ: 10 s of blank

LOL: 5% deviation from linear

$$\text{Dynamic range: } \frac{\text{LOL}}{\text{LOQ}} \qquad 10^2 \text{ to} > 10^6$$



الLOQ هو نفس الLOD بس بدل ما اضرب ب3 بضرب ب10 فهو اقل تركيز يمكن قراءته بدقة عالية

الLOL هو اعلى تركيز يمكن للmethod قراءته بدقة عالية

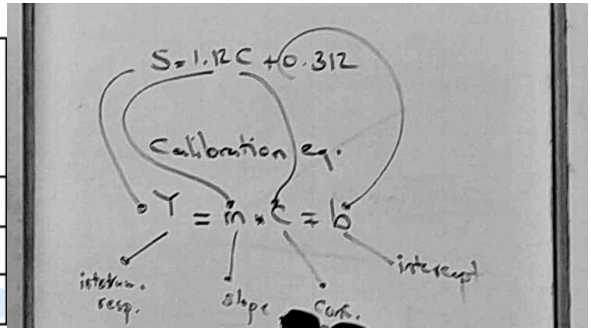
فالdynamic range بكون من LOQ ل LOL

اذا عينة الاشي اللي بدي احلله مثل البنادول تركيزه حسب الingredients المكتوبة للtablet كانت 500g و الشركة طورت طريقة للتحليل و كل ساعة او نص ساعة بسحبوا عينات من الtablet للتحليل فتركيز ال500 معناته الmethod تاعته لازم تكون شغالة من ال100 (LOQ) لل700 او 1000 (LOL) بحيث انه ال500 جاي within the range و اذا الmethod طلع التركيز الmaximum معه 450 و الشركة بتنتج tablet تركيزه 1000 فبكون مش مطابق للشروط و بتيجي ادارة الغذاء و الدواء بتسحب عينات من المنتج تاع الشركة و يطلع معهم التركيز غير مطابق فما بنزل الدوا للسوق فلازم اطلع certificate شهادة بتأكد انه الmethod شغال من ضمن الrange و احسب الLOD و LOQ و LOL

Example:

An analysis of the calibration data for the determination of lead based upon its flame emission spectrum yielded an equation: $S = 1.12C + 0.312$ where C is the Pb concn in ppm and S is a measure of the relative emission intensity. The following replicate data were obtained:

Concn (C), ppm	No. of replicates	Mean value of S	Std. dev.
10.0	10	11.62	0.15
1.00	10	1.12	0.025
0.000	24	0.0296	0.0082



Blank just solvent

Calculate (a) the calibration sensitivity, (b) the analytical sensitivity at 1 and 10 ppm of Pb,(c) the limit of detection limit (LOD), and ,(d) the limit of quantification limit (LOQ)

Example Solution:

a) calibration sensitivity is the slope of the calibration curve = 1.12

b) Using $\gamma = m/S_s$: at 10 ppm $\gamma = 1.12 / 0.15 = 7.5$ at 1 ppm

$\gamma = 1.12 / 0.025 = 45$

c) LOD= 3 x Sb/ slope= 3 x 0.0082/1.12 = 0.0219 ppm

d) LOQ= 10 x Sb/ slope= 10 x 0.0082/1.12 = 0.0732 ppm

CALIBRATION METHODS

Basis of *quantitative* analysis is magnitude of *measured property* is proportional to *concentration* of analyte

Intercept

قراءة الجهاز للعينة Slope Conc

$$\text{Signal} \propto [x] \quad \text{or} \quad \text{Signal} = m[x] \mp \text{Signal}_{\text{blank}}$$

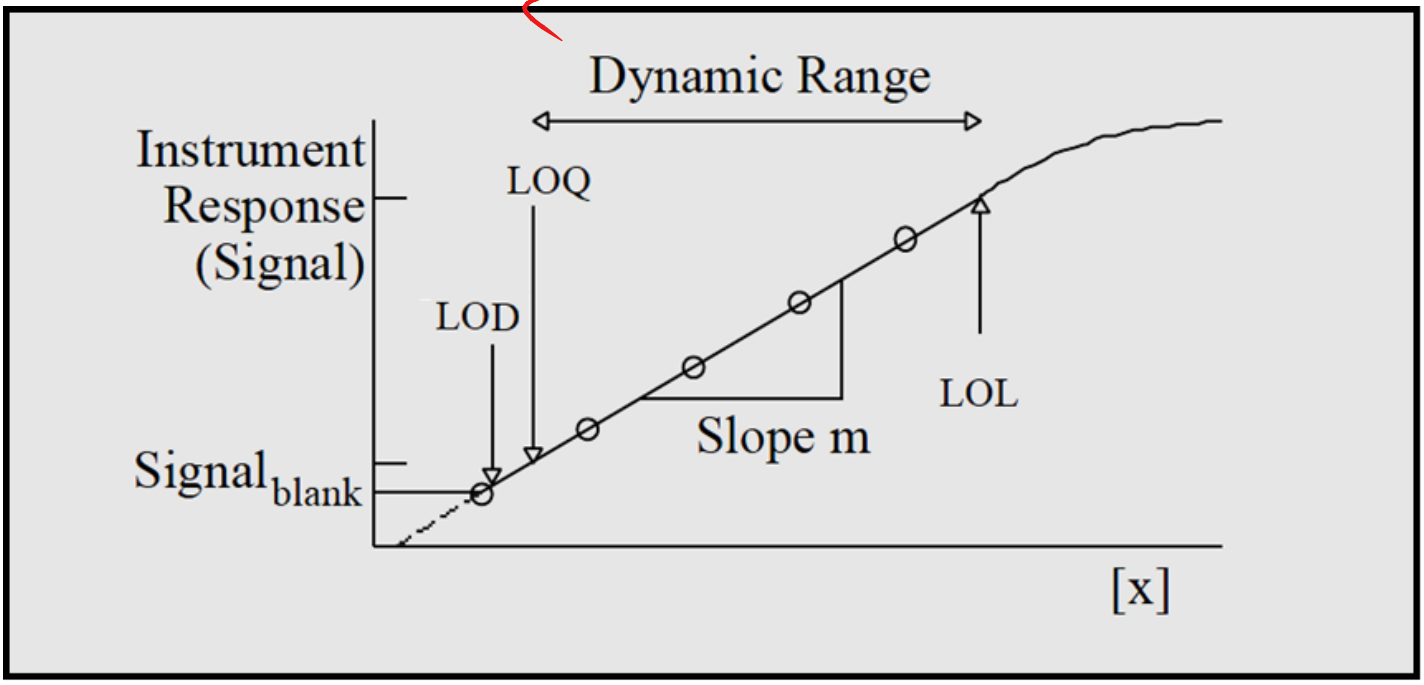
$$[x] = \frac{\text{Signal} - \text{Signal}_{\text{blank}}}{m}$$

عملية التحليل فيها خطوتين .. الخطوة الاولى qualitative انه هاي المادة موجودة فعليا بالعينة و الخطوة التانية quantitative منستخدم فيها الcalibration لحساب التركيز فالغاية من الcalibration هو حساب التركيز

$Y = mx \mp b$

calibration Equation

CALIBRATION CURVES (WORKING or ANALYTICAL)



SAMPLE PROBLEM:

Ex:-

Analyte Concentration (ppm*)	Absorbance
1) 0.0 (blank)	0.05
2) 0.9	0.15
3) 2.0	0.24
4) 3.1	0.33
5) 4.1	0.42

x

y استجابة الجهاز

عرفت انها قيم التراكيز من خلال الوحدة ppm

انا عندي مادة و بدي احللها لquantitative و qualitative فبجيب reference لنفس المادة و بحللها بالمختبر بجهاز معين و بجيب عينة من المريض و بحطه بالجهاز ف اذا طلعوا نفس الشي معناته المواد مطابقة و هيك بكون قارنت المادة مع الreference و حللتها qualitative و بستنتج انه المادة اللي بدي احللها موجودة بالurine او البلازما (عينة المريض) .. هسا بدي احلل quantitative فبحضّر calibration equation يعني بجيب مادة standard و بحضّر منها تراكيز مختلفة عالاقل سبع تراكيز و بحطهم بالجهاز حتى اطلّع response و تطلع القراءات لكل تركيز و طبقنا الr² و طلعت اكبر من 0.88 فالmethod صحيح و الprecision مطابق و الAccuracy كمان مطابق و الLOD LOQ LOL كله تمام فبحسب الcalibration method

عشان احسبه معطيني تراكيز مختلفة بالجدول و من ضمنها الblank و جنب التراكيز معطيني قيم الY اللي هو استجابة الجهاز (قراءة الجهاز للعينة)

قيم الX اللي همة التراكيز عددهم 5 (N=5)

اول اشي بحسب الslope من خلال المعادلة $y = mx + b$ و بحسب الstandard deviation للXX والXY

Define Variance and Covariance:

mean of x

$$S_{xx} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1} \qquad S_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{N-1}$$

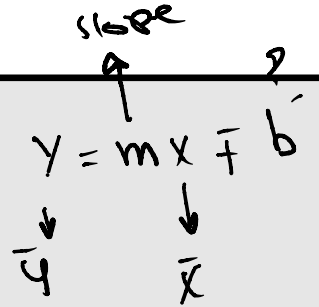
mean of y

$$\bar{x} = 2.02 \quad \bar{y} = 0.238$$

$$S_{xx} = \frac{\left(2.02^2 + 1.12^2 + 0.02^2 + 1.08^2 + 2.08^2\right)}{4} = \frac{10.828}{4} = 2.707$$

$$S_{xy} = \frac{(-2.02 \times -0.188) + (-1.12 \times -0.088) + (-0.02 \times 0.002) + \ldots}{4}$$

$$= \frac{0.9562}{4} = 0.23905$$



$$\text{Slope: } m = \frac{S_{xy}}{Sx} = \frac{0.23905}{2.707} = 0.0883$$

*هاد كله بقدر احسبه عالالة حاسبة

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

$$\text{Intercept: } = 0.238 - (0.0883 \times 2.02)$$

$$= 0.0596$$

عشان احسب الintercept بعوض الX̄ و الȲ و الslope بالمعادلة

Calibration expression is

Absorbance=0.0883[Analyte (ppm)]+0.0596

اخر خطوة باخد عينة المريض و بحطها بالجهاز و بطلع Y تاعت عينة المريض اللي بعرفها نوعًا qualitative بس ما بعرف كم quantitative و بعوض Y بالمعادلة عشان احسب التركيز و هيك بكون حللت المادة quantitative

Calibration Techniques

طرق تحضير الcalibration

Calibration Techniques

رح بيجي سؤال جدول

- 1. External Calibration Curve Method
- 2. Standard Additions Method
- 3. Internal Standard Method

ما رح يجي السؤال اذا هي external او standard

internal او

External Calibration Curve Method

1. Most convenient when a large number of similar samples are to be analyzed.

2. Most common technique.

3. Facilitates calculation of Figures of Merit.

اول طريقة هي الexternal و هي اسهل اشي و ما فيها متطلبات كتير و بستخدم هاي الطريقة لما تكون العينة متوفرة بكميات كبيرة و سهل نحسب منها الr^2 و الLOD و الLOQ...

External Calibration Curve Procedure

1. Prepare a series of standard solutions (analyte solutions with known concentrations).

2. Plot [analyte] vs. Analytical Signal.

3. Use signal for unknown to find [analyte].

external اسمه هيك عشان calibration ال بتحضير دخل اله ما sample ال

External

Example: Pb in Blood by GFAAS

X	استجابة الجهاز Y
[Pb] (ppb)	Signal (mAbs)
0.50	3.76
1.50	9.16
2.50	15.03
3.50	20.42
4.50	25.33
5.50	31.87

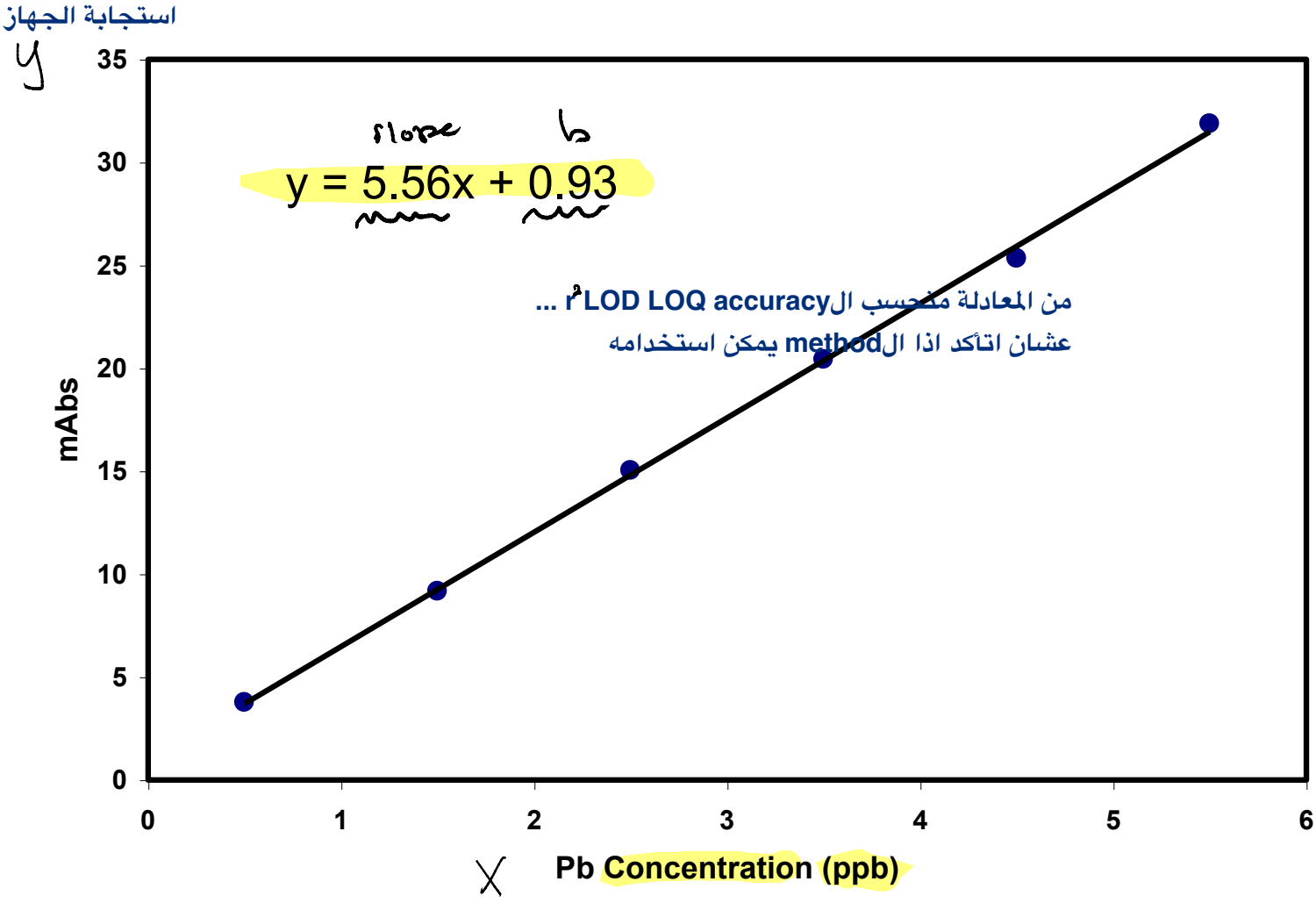
Results of linear regression:

$$S = mC \pm b$$

$$m = 5.56 \text{ mAbs/ppb}$$

$$b = 0.93 \text{ mAbs}$$

مثال : بركة مي بشربوا منها و متوقع يكون فيها رصاص و الرصاص toxic carcinogic compound فعشان احللها باخد distilled water المي العادية اللي عندي باللاب و باخد ملح الرصاص اللي عندي باللاب برضو و بحضر منهم stock بتركيز معين مثل1000ppm (mg/L) و من الstock بعمل تخفيف dilution بتراكيز مختلفة و منسميهم standard solutions


استجابة الجهاز
y
35
30
25
20
15
10
5
0
mAbs
slope
b
y = 5.56x + 0.93
من المعادلة مخحسب الr² LOD LOQ accuracy ...
عشان اتأكد اذا الmethod يمكن استخدامه
0
1
2
3
4
5
6
X
Pb Concentration (ppb)

Calculate the LOD for Pb

20 blank measurements gives an average signal

0.92 mAbs

with a standard deviation (Sb) of

$$\sigma_{bl} = 0.36 \text{ mAbs}$$

LOD = 3 Sb/m = 3 x 0.36 mAbs / 5.56 mAbs/ppb

LOD = 0.2 ppb

Find the LOL for Pb

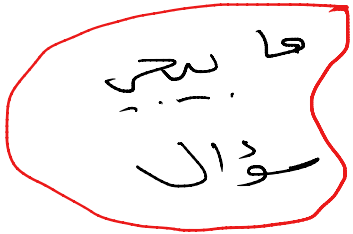
Lower end = LOD = 0.2 ppb

(include this point on the calibration curve)

$$S_{LOD} = 5.56 \times 0.2 + 0.93 = 2.0 \text{ mAbs}$$

(0.2 ppb (X) , 2.0 mAbs (Y))

في طريقتين لحساب الLOL .. اول طريقة انه كل ما اعمل تركيز باخد X,Y و احسب منهم r^2 ف اذا كان اكبر من 0.88 بقدر استخدم الmethod و بضلني اضيف تراكيز و احسب r^2 لحد ما يطلع معي اقل من 0.88 و بكون التركيز مش داخل الLOL و التركيز اللي قبله هو اللي بكون اعلى تركيز LOL فالreference عندي هو ال r^2



Find the LOL for Pb

Upper end = collect points beyond the linear region and estimate the 95% point.

Suppose a standard containing 18.5 ppb gives rise to s signal of (Y practical= 98.52 mAbs)

بالعادة الYpractical بتكون اقل من الYtheoritical

This is approximately 5% below the expected value of (Y theoretical=103.71 mAbs)

(18.50 ppb , 98.52 mAbs)

الطريقة التانية انه انا عندي X,Y و بحسب الcalibration و كان الرينج عندي من 1ppm ل 100ppm كله تمام و طلع معي theoritically تركيز 120 فبروح بحط هاد التركيز بالجهاز و بطلع Ypratical .. اذا كان الفرق بين Ytheoritical و Ypractical اكبر من 5% بكون التركيز لا يمكن تحليله بدقة و بكون التركيز اللي قبله هو الLOL

Standard Addition Method
Reduce matrix effect

matrix يعني المركبات الموجودة بالعينة

شروط استخدام الstandard:

1. Most convenient when a small number of samples are to be analyzed.

2. Useful when the analyte is present in a complicated matrix and no ideal blank is available.

يعني العينة اللي باخدها بتكون urine or plasma بينما الexternal العينة اللي اخدتها كانت water

Standard Addition Procedure

1. Add one or more increments of a standard solution to sample aliquots of the same size. Each mixture is then diluted to the same volume.

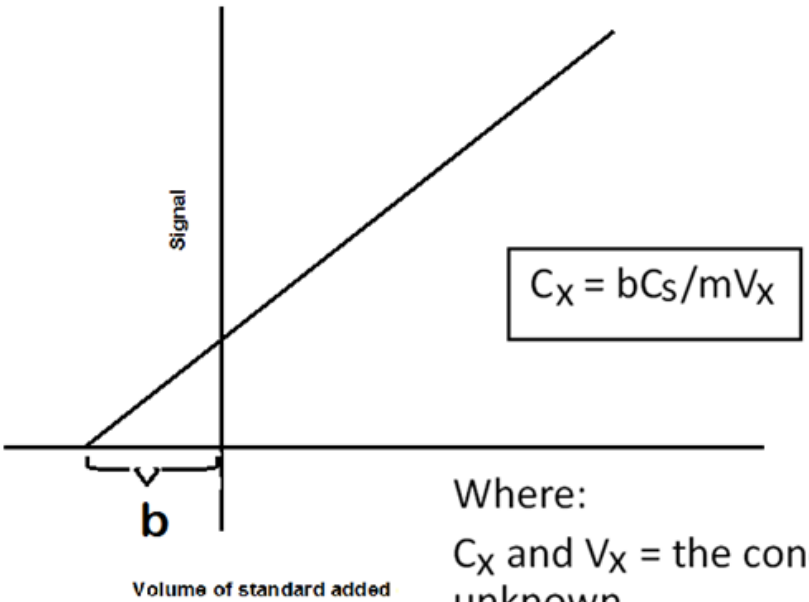
2. Prepare a plot of Analytical Signal versus:
   a) volume of standard solution added, or
   b) concentration of analyte added.

Standard Addition Procedure

3. The x-intercept of the standard addition plot corresponds to the amount of analyte that must have been present in the sample (after accounting for dilution).

4. The standard addition method assumes:
   a) the curve is linear over the concentration range
   b) the y-intercept of a calibration curve would be 0

Calculation of standard addition



$$C_X = bC_S/mV_X$$

Where:

C_X and V_X = the concentration and the volume of unknown

C_S and V_S = the concentration and the volume of added standard

Example: Fe in Drinking Water

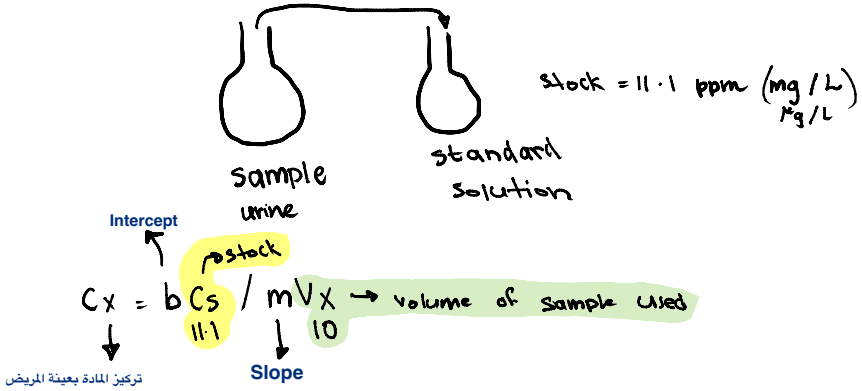
Sample Volume (mL)	Standard Volume (mL)	Signal (V)
10	0	0.215
10	5	0.424
10	10	0.685
10	15	0.826
10	20	0.967

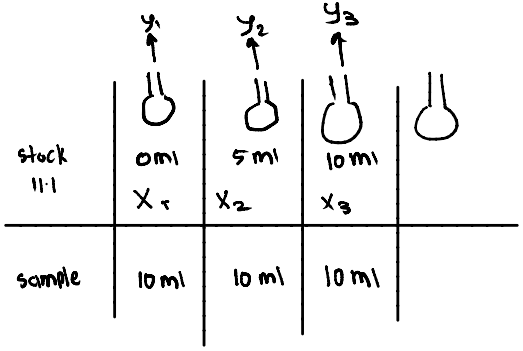
The concentration of the Fe standard solution is 11.1 ppm

All solutions are diluted to a final volume of 50 mL

حجم الـvolumetric flask الفاضي

المطلوب : معرفة التركيز





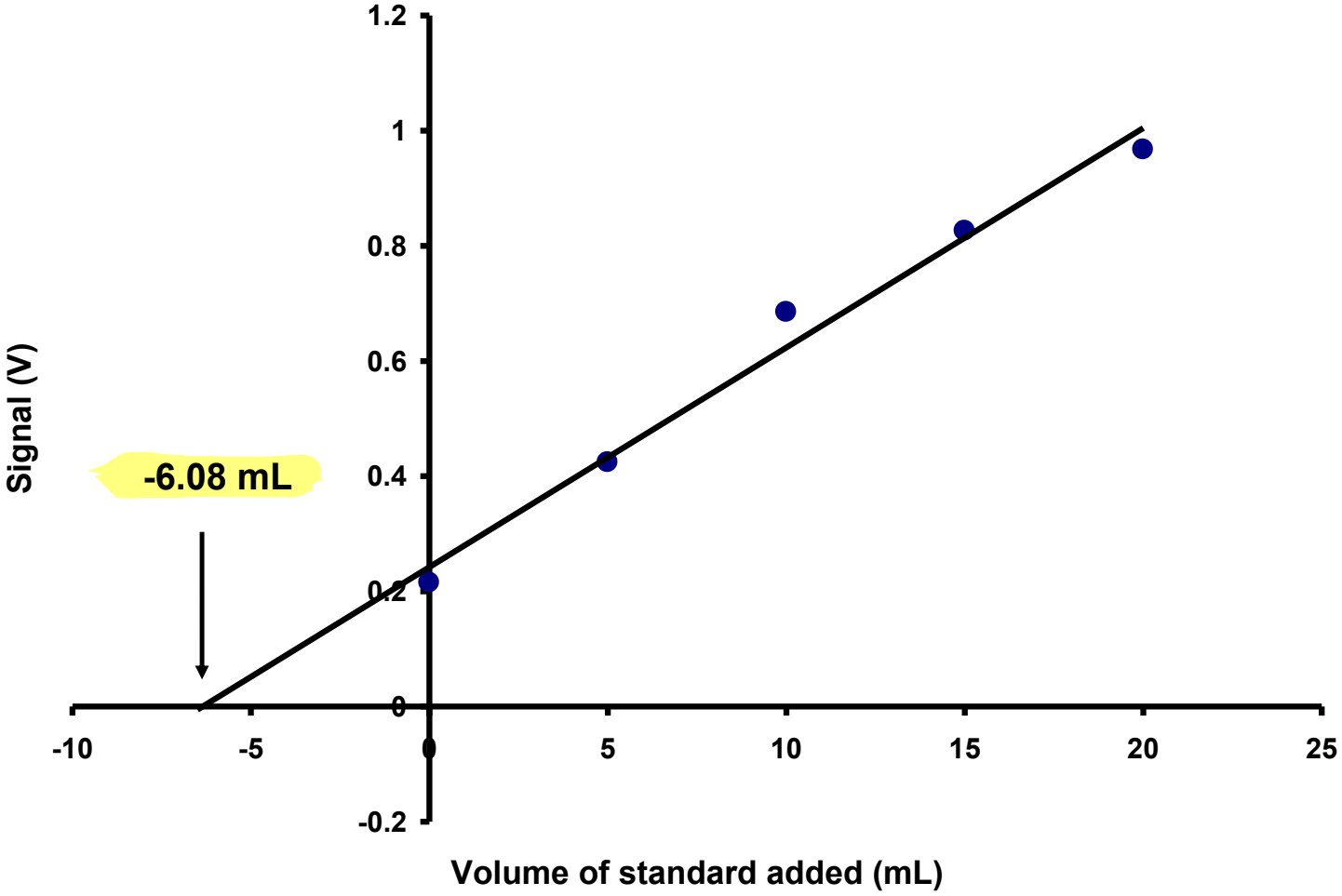
العينة الاولى ما رح اضيف stock و باخد قيمة ثابتة من العينة 10ml و بكمل الحجم لل50 بالpure urine
العينة التانية ضفت 5ml و التالتة 10ml بينما العينة بضيف كمية ثابتة لكل عينة 10ml و بكمل الحجم تاعهم لل50ml

في طريقتين لحساب التركيز ، الطريقة الاولى اني اخد ورقة بيانية و ارسم رسمة x,y .. ال y هي استجابة الجهاز و ال x هي الحجم x1 x2 x3 ..

ال y1 بعوض صفر عند ال x بس بضل اله استجابة من كمية العينة sample

بعد ما اعبي المعلومات عالرسم البيانات برسم خط يمر بكل النقاط زي اللي بالسلايد اللي بعد طلع معي الاستجابة y -6.08 فبروح بسحب من ال stock الحجم 6.08ml و بنزله بـ volumetric flask 50ml فاضي و بكمل ال volume بـ pure urine و تركيز المركب بعينة المريض بتكافئ تركيز المركب بهاي العينة الطريقة هاي بس للتوضيح

الطريقة اللي رح نعتمدها انه من ال x,y منطلع معادلة calibration و بعدين من المعادلة $Cx = bCs/mVx$ بطبق مباشرة


1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
-10
-5
0
5
10
15
20
25
Signal (V)
-6.08 mL
Volume of standard added (mL)

[Fe] = ?

Done

اعتمدوا الطريقة اللي شرحها الدكتور

x-intercept = -6.08 mL

Therefore, 10 mL of sample diluted to 50 mL would give a signal equivalent to 6.08 mL of standard diluted to 50 mL.

$$V_{sam} \times [Fe]_{sam} = V_{std} \times [Fe]_{std}$$

10.0 mL x [Fe] = 6.08 mL x 11.1 ppm

[Fe] = 6.75 ppm

Internal Standard Method

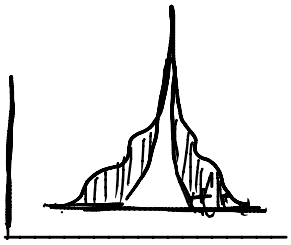
Reduce matrix and instrument effects

1. Most convenient when variations in analytical sample size, position, or matrix limit the precision of a technique.
2. May correct for certain types of noise.

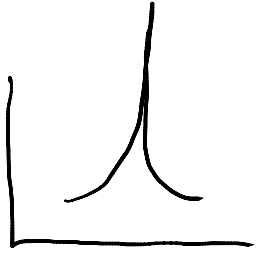
* ال**calibration** هي وسيلة لتقدير ال**quantity** و ما اله دخل بال**quality**

- ال**external** حضّرت عينة المريض و دخلتها بجهاز المريض مباشرة و ما دخلت بال**calibration**
- ال**standard** استخدمت عينة المريض في تحضير ال**calibration**
- ال**internal** ضفت مادة اخرى على العينة و بسمي المادة **internal**

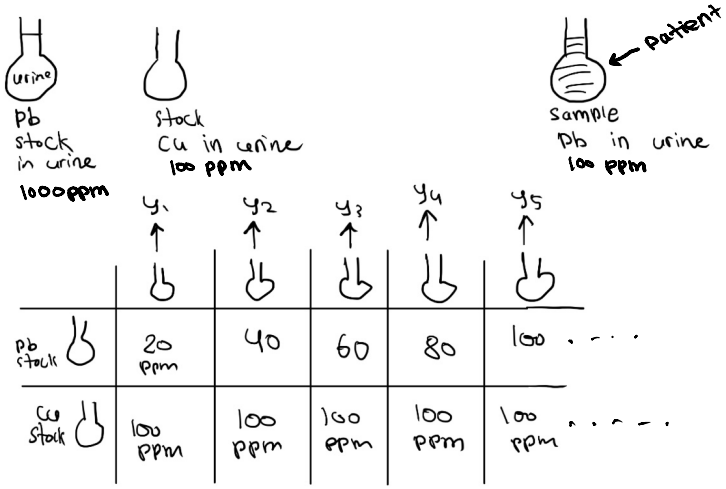
في بعض المركبات بكون عندها مشكلة خاصة بال biological system او الbiological fluid لما اجي احلل و خاصة المركبات الدوائية او عناصر معينة .. ف لما اخد مثلا عينة urine لمريض و بدي اقيس الرصاص .. بتكون الspectra (الاستجابة) تاعته عاملة هيك:



العينة الحقيقية بدون الmatrix بتكون smooth ما فيها مشاكل و بتكون هيك :



المشكلة انه نسبة من الmatrix بتكون ملزقة sticked على العينة اللي بدي احللها ، فهيك لو اخد العينة اللي فوق زي ما هي مع الmatrix و احكي انها استجابة العينة رح تكون نسبة الخطأ عالية لأنه مش sample لحالها و في معها matrix ، في هاي الحالة باجي عالطريقة التالتة اللي هي internal standard method



عشان احل مشكلة الmatrix ، بروح باخد مادة اخرى و الها نفس الخصائص للanalyte ، مثلا اذا اخدت عينة رصاص باخد معه نحاس لأنهم الphysical properties اله قريبة جدا من الرصاص و بدلالة النحاس بقدر احلل الرصاص ، الطريقة :

بحضر عينة المريض اللي هي عبارة عن رصاص بالurine و بحضر stock للرصاص بpure urine و stock للنحاس in pure urine و من هدول الsolutions رح احضر calibration و باخد عالأقل 7 volumetrics عينات من الstock

بالstandard ضفت volume بس هون ضفت تركيز

النحاس تركيزه ثابت بس الرصاص باخد تراكيز مختلفة تصاعدي

بعدين بدخلهم للجهاز و الجهاز رح يقرأ لكل عينة 2 peaks .. استجابة للنحاس و استجابة للرصاص لأنه مادتين موجودين بالعينة و لكل عينة بقسم Ypb / Ycu

	Signal		
X [Pb] (ppm)	Pb	100 ppm Cu	y Pb/Cu
20	112	1347	0.083
40	243	1527	0.159
60	326	1383	0.236
80	355	1135	0.313
100	558	1440	0.388

من الX,Y بطلع الslope و الintercept و منهم بطلع الcalibration

اخر خطوة ، باخد عينة المريض و بضيف كمية 100 ppm من النحاس و بحركه و بدخله للجهاز و برضو رح يطلع 2 peaks فبقسم Ypb / Ycu عشان تطلع معي قيم Y و الX هي تركيز الرصاص اللي بدي احللها

Internal Standard Procedure

1. Prepare a set of standard solutions for analyte (A) as with the calibration curve method, but add a constant amount of a second species (B) to each solution.

2. Prepare a plot of SA/SB versus [A].

3. External calibration equation

$$SA/SB = mC + b$$

Notes

1. The resulting measurement will be independent of sample size and position.

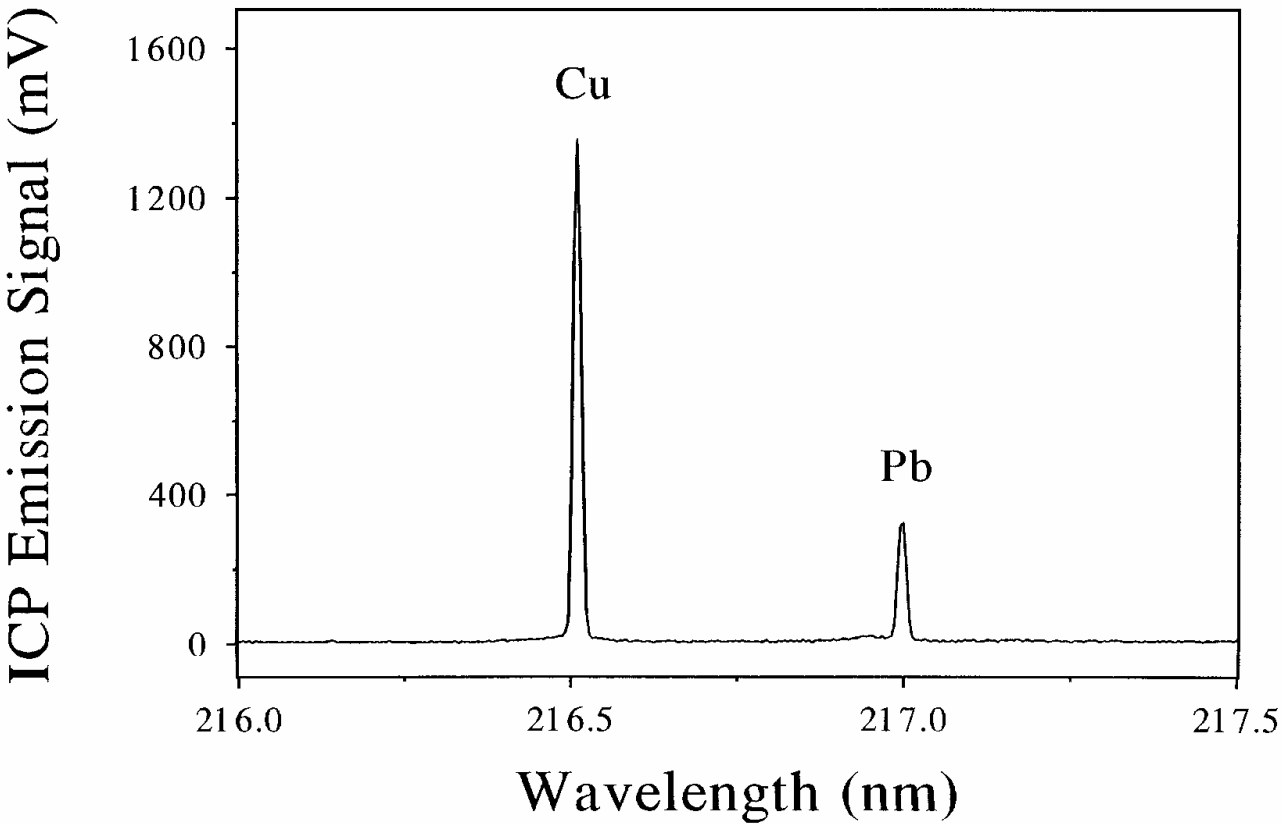
2. Species A & B must not produce signals that interfere with each other. Usually they are separated by wavelength or time.

Example: Pb by ICP Emission

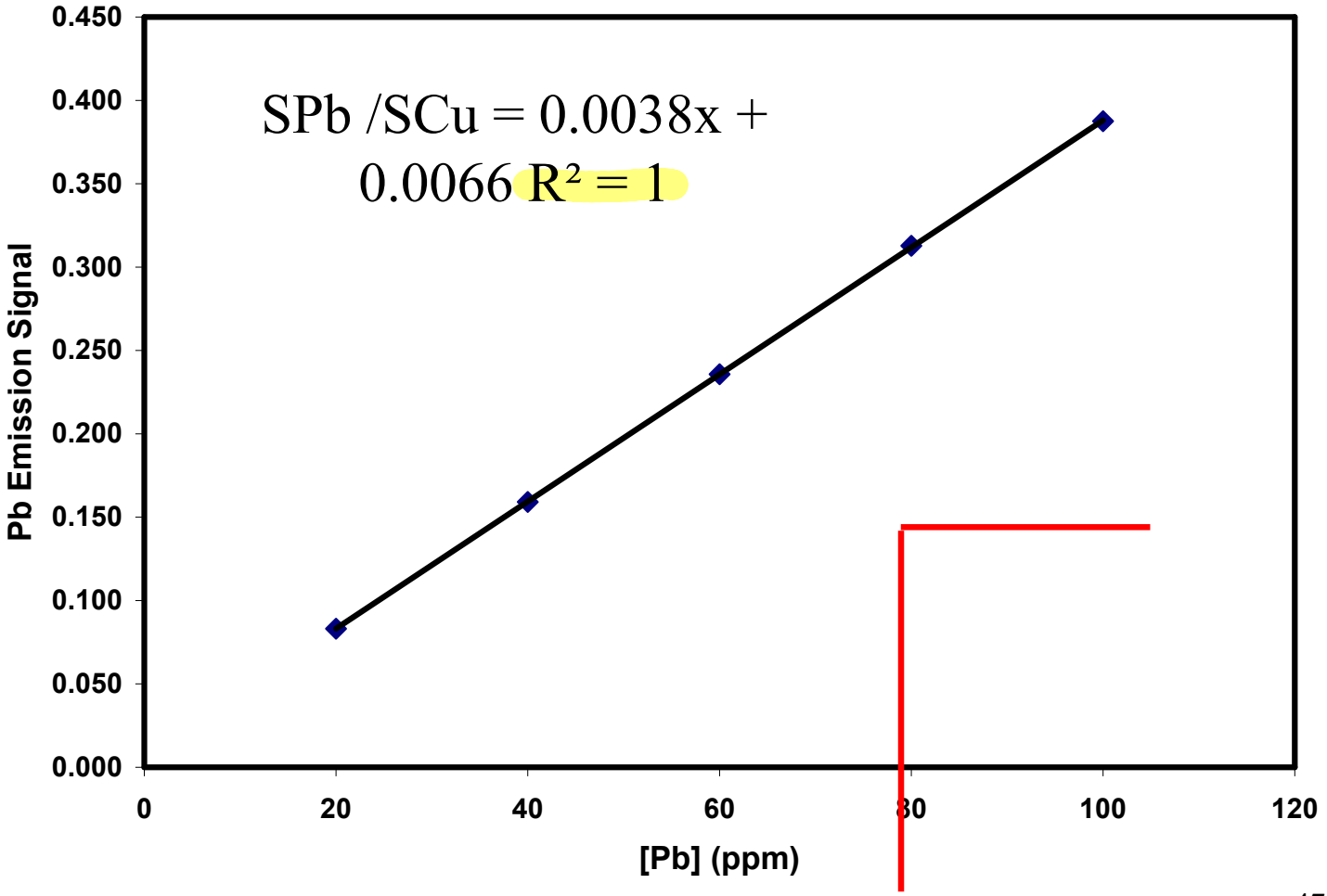
Each Pb solution contains
100 ppm Cu.

	Signal		
x [Pb] (ppm)	Pb	100 ppm Cu	y Pb/Cu
20	112	1347	0.083
40	243	1527	0.159
60	326	1383	0.236
80	355	1135	0.313
100	558	1440	0.388

كلهم 100 ppm بس القيم مش مستقرة لانه الجهاز
مش رح يعطي قيمة ثابتة


ICP Emission Signal (mV)
1600
1200
800
400
0
Cu
Pb
216.0
216.5
217.0
217.5
Wavelength (nm)

Internal Standard Correction



Results for an unknown sample after adding 100 ppm Cu

يعني هون حلل عينة المريض 5 مرات و اخد ال mean الهم عشان يزيد الدقة

	Signal		
Run	Pb	Cu	Pb/Cu
1	346	1426	0.243
2	297	1229	0.242
3	328	1366	0.240
4	331	1371	0.241
5	324	1356	0.239
mean	325	1350	0.241

حتى يزيد الدقة اخد ال mean و عوضها بال calibration

$$0.241 = 0.0038\ X + 0.0066$$

$$X = 61.684 \text{ ppm of Pb}$$

Another way for Internal Standard method calculation

الطريقة الثانية:

- In a single-point internal standardization, we prepare a single standard containing the analyte and the internal standard and use it to determine the value of *K*.

بس يعطيني السؤال قيمة واحدة بستخدم هاد القانون

تركيز الinternal standard — استجابة الunkown

$$K = \left(\frac{C_{IS}}{C_A}\right)_{std} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}}\right)_{std}$$

تركيز الunknown — استجابة الinternal standard

- Where, CA is the standard concentration of the analyte, SA instrument response of analyte, CIS, and SIS the are the concentration and the response of internal added compound , respectively.

اول اشي بطلع الK للsolutions اللي حضّرتهم ف باخد تركيز الinternal اللي هو 100ppm من خلال الجدول و باخد قيمة من قيم الPb مثلا 60ppm و بضرب ب استجابة الرصاص لتركيز ال60 مقسومة على استجابة النحاس بعدين باخد الK و بعيد القانون بس هاي المرة للunknown و بعوض تركيز الIS اللي هو 100ppm و بعوض قيمة K اللي طلعت معي و تركيز الunknown بدي اياه و بعوض استجابة الunknown و استجابة الIS

A sixth spectrophotometric method for the quantitative analysis of Pb^{2+} in blood uses Cu^{2+} as an internal standard. A standard containing 1.75 ppb Pb^{2+} and 2.25 ppb Cu^{2+} yields a ratio of $(S_A/S_{IS})_{std}$ of 2.37. A sample of blood is spiked with the same concentration of Cu^{2+}, giving a signal ratio, $(S_A/S_{IS})_{samp}$, of 1.80. Determine the concentration of Pb^{2+} in the sample of blood.

SOLUTION allows us to calculate the value of K using the data for the standard

$$K = \left(\frac{C_{IS}}{C_A}\right)_{std} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}}\right)_{std} = \frac{2.25 \text{ ppb Cu}}{1.75 \text{ ppb } Pb^{2+}} \times 2.37 = 3.05 \frac{\text{ppb } Cu^{2+}}{\text{ppb } Pb^{2+}}$$

The concentration of Pb^{2+}, therefore, is

$$C_A = \frac{C_{IS}}{K} \times \left(\frac{S_A}{S_{IS}}\right)_{samp} = \frac{2.25 \text{ ppb } Cu^{2+}}{3.05 \dfrac{\text{ppb } Cu^{2+}}{\text{ppb } Pb^{2+}}} \times 1.80 = 1.33 \text{ ppb } Cu^{2+}$$