

الانحدار الخطي والمنحنيات القياسية

Linear Regression and Calibration Graph

- في المواضيع المدروسة سابقا وخصوصا الاختبارات المعنوية (Q, F, t) كان المطلوب هو مجرد الحكم عن طريق المعالجة الإحصائية على معلومات كمية أو بيانات data تحليلية وهل هي مقبولة أو لا.
- سوف نناقش في المواضيع التالية الطريقة العلمية الصحيحة التي يمكن الحصول منها على هذه المعلومات والبيانات التحليلية بطريقة تقلل من الأخطاء العشوائية بها.

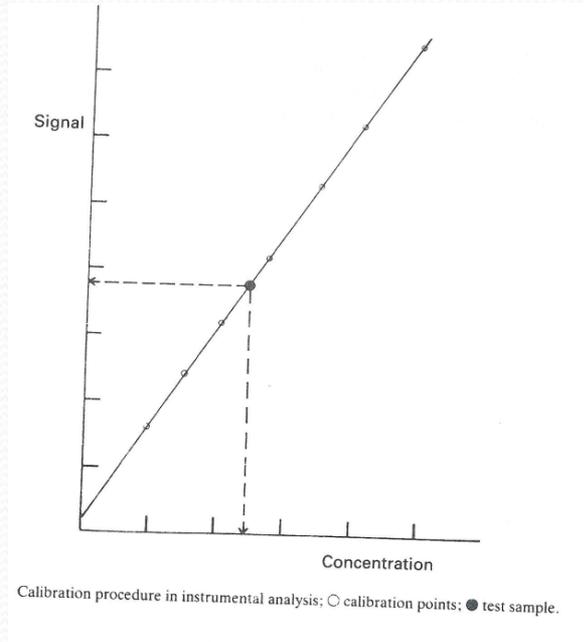
الفكرة العامة لمنحنى التعبير القياسي Standard Calibration Curve

كما هو معلوم من البديهيات في مجال التحليل الكيميائي عدم الاقتصار على إجراء تجربة أو قياس واحد فقط لإعطاء نتائج عن المادة المجهولة المحللة ولذا لابد من تكرار التجربة ثلاث مرات على الأقل وأخذ المتوسط.

ولأنه نظريا يمكن حساب التركيز المجهول باستخدام قانون بيير على سبيل المثال بمعرفة الحدود الأخرى ($A = \epsilon bc$) لكن هذه الطريقة تسمى **طريقة القراءة الواحدة** single-point measurement وهي قائمة على قراءة واحدة لامتناس A للمحلل المجهول ولكن بسبب المشاكل المتعلقة بالحيود عن قانون بيير (وبسبب احتمالية وجود الأخطاء العشوائية والأخطاء المنتظمة) وكمحاولة لتحسين أداء الطريقة ولمحاولة تقليل أثر الأخطاء العشوائية لهذا نلجأ لاستخدام **طريقة القراءات المتعددة** multi-points وهي طريقة رسم أو حساب منحنى التعبير القياسي حيث نرسم قيمة مقاسة y كدالة لتركيز معلوم x لعدة محاليل قياسية.

● فكرة الطريقة

- تحضر سلسلة من المحاليل القياسية للمادة المراد تحليلها (يكون عددها بين 3-5) وتكون معروفة التركيز وبزيادة مطردة في التركيز مع مراعاة أن تكون هذه المحاليل القياسية مقاربة لمحلول المادة المجهولة من حيث الحرارة والمذيب و pH. الخ. بعد ذلك تقاس شدة الامتصاص الطيفي A لهذه المحاليل القياسية بواسطة جهاز التحليل الطيفي وذلك عند طول الموجه المثالي (λ_{max}) ثم نرسم العلاقة بين Y كدالة لـ X ونحصل على خط مستقيم يسمى الخط البياني أو منحنى التعبير calibration curve
- وفي السابق كان يرسم هذا الخط بشكل تخميني برسم أفضل خط يمر بالنقاط المتحصل عليها وباستخدام المسطرة وهي محاولة لتخمين estimate منحنى التعبير وليس حساب حقيقي له وهي طريقة ولا شك غير دقيقة إطلاقاً فضلاً عما تحتويه من الأحكام الشخصية التي قد تزيغ بقصد أو بغير قصد.



- لذا بدلا من استخدام التخمين والمسطرة نستخدم الطرق والمعالجة الإحصائية statistics لنحدد أفضل الخطوط المستقيمة straight-line الذي يمر بالنقاط المقاسة وهنا نستخدم **تقنية إحصائية تسمى التحليل الانحداري regression analysis** كأداة وهي طريقة للحصول على هذا الخط أو المنحنى المستقيم بطريقة علمية صحيحة. وتوجد عدة طرق إحصائية مختلفة وأسهلها وأبسطها وأكثرها استخداما هي طريقة:

- **طريقة التقليل التربيعي الخطي Linear Least Square**

- الجدير بالذكر أن هذه الطريقة الإحصائية مبنية على عدد من الافتراضات منها:

- **الافتراض الأول**

تفترض أنه توجد علاقة خطية بين المتغير المقاس (Y) measured variable والمتغير المستقل (X) independent variable

• ويمكن التعبير الرياضي عن هذه العلاقة الخطية بالمعادلة التالية:

$$Y = m X + b \quad \bullet \quad \text{حيث أن:}$$

• **Y المتغير المقاس** (المتغير غير المستقل dependent variable) بمعنى أنه مثلا يعتمد على تركيز المادة المحللة فكلما زاد التركيز زادت قيمة Y المقاسة.

• **X المتغير المستقل** (independent variable) مثل تركيز المادة المحللة.

• **m الميل** (slope) ميل المنحنى الخطي calibration line

• **b القاطع** (intercept) على محور الصادات (قيمة Y عندما تكون قيمة $X = 0$)

• الافتراض الثاني

• أن أي حيود لأي نقطة أو قيمة منفردة عن الخط المستقيم يكون السبب لذلك حدوث أخطاء عشوائية عند عملية القياس. بمعنى أن الأخطاء تقع في قيم Y وأن قيم X صحيحة بشكل كبير نظرا لاستخدامنا محاليل قياسية معلومة التركيز.

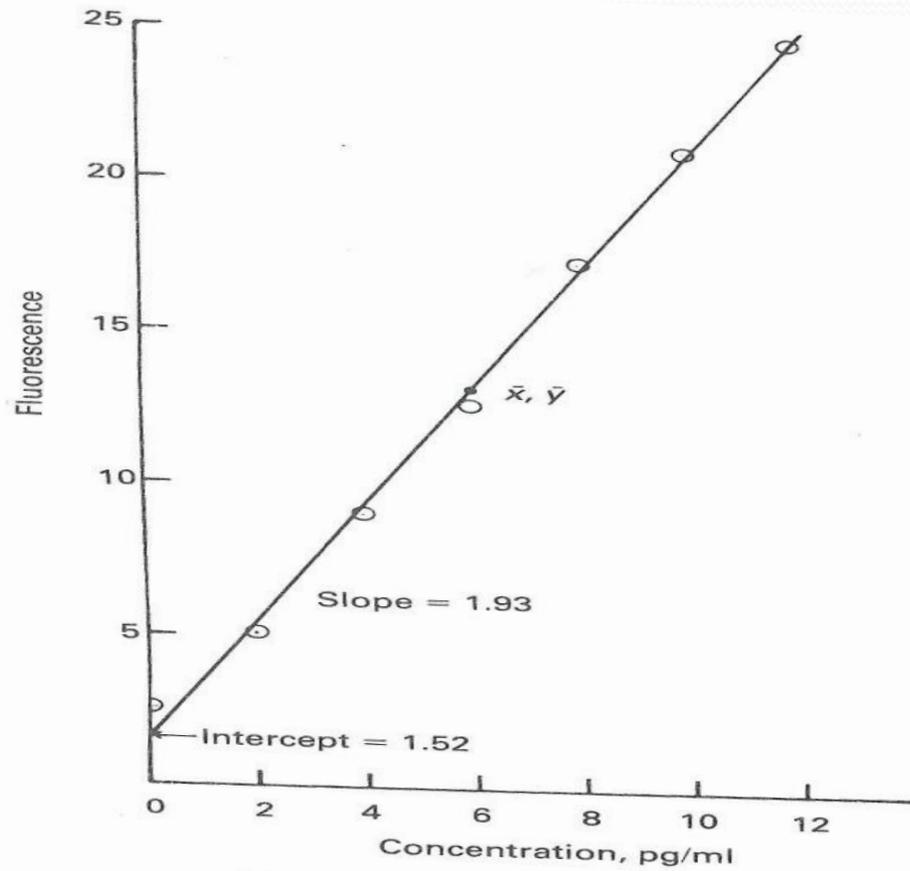


Fig. 5.3. Calibration plot for the data on p. 106.

• حساب قيمة الميل والقاطع

- في السابق كان يمكن حساب الميل m وذلك بعد رسم المنحنى القياسي calibration line عن طريق التخمين estimation ومن ثم نحسب الميل من المعادلة:

$$m = \Delta Y / \Delta X \quad \bullet$$

- (الميل = فرق الصادات على فرق السينات)

- ولكن هذه الطريقة غير دقيقة تماما من الناحية العلمية لأن رسم المنحنى القياسي تم أصلا بالتخمين وهذا ولا شك سوف يؤثر ويؤرجح قيمة الميل أو حتى قيمة القاطع b وبدلا عن ذلك نستخدم المعالجة الإحصائية لحساب قيمة الميل والقاطع بالمعادلات التالية:

$$m = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \sum Y_i}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \quad \bullet$$

$$b = \overline{Y} - m\overline{X}$$

● مثال:

- لقياس تركيز أحد المبيدات الحشرية في المنتجات الزراعية وباستخدام إحدى الطرق الطيفية تم قياس تراكيز متزايدة من المبيد لرسم المنحنى القياسي من النتائج التالية:

10.0	7.5	5.0	2.5	1.0	التركيز (ppm)
1.08	0.880	0.567	0.281	0.116	الامتصاص

- باستخدام معادلة الانحدار الخطي إحسبي تركيز المبيد في إحدى العينات إذا كانت قيمة الامتصاص لها
- $A = 0.760$

● الحل:

- نحسب أولاً قيمة الميل والقاطع باستخدام المعادلات السابقة:

● حساب الميل

X_i	Y_i	X_i^2	$X_i Y_i$
1	0.116	1	0.116
2.5	0.281	6.25	0.703
5.0	0.567	25	2.835
7.5	0.88	56.25	6.6
10.0	1.07	100	10.74
<u>26</u>	<u>2.918</u>	<u>188.5</u>	<u>20.99</u>

وبالتعويض في المعادلة:

$$m = \frac{n \sum X_i Y_i - \sum X_i \sum Y_i}{n \sum X_i^2 - (\sum X_i)^2} \quad \bullet$$

$$m = \frac{5 (20.99) - (26) (2.918)}{5 (188.5) - (26)^2} = 0.109 \quad \bullet$$

● حساب القاطع

● بالتعويض في المعادلة:

● إذا حسبنا قيمة متوسط $X = (5.2)$ ومتوسط $Y = (0.584)$

$$b = 0.584 - (0.109) (5.2) = 0.017 \quad \bullet$$

• وبالتالي تصبح معادلة الانحدار الخطي:

$$Y = m X + b \bullet$$

$$Y = 0.109 X + 0.017 \bullet$$

• ومن هذه المعادلة نحسب تركيز العينة المجهولة:

$$0.76 = 0.109 X + 0.017 \bullet$$

$$X = 6.82 \text{ ppm} \bullet$$

• واجب (٧):

• كمية عنصر الكروم في إحدى العينات الصناعية قدرت بواسطة الامتصاص الذري اللهبى وأعطت النتائج التالية:

التركيز (ng/mL)	0.0	15	30	45	60
الامتصاص	0.311	0.377	0.437	0.496	0.562

• باستخدام معادلة الانحدار الخطي إحسبي تركيز الكروم في إحدى العينات إذا كانت قيمة الامتصاص $A = 0.487$

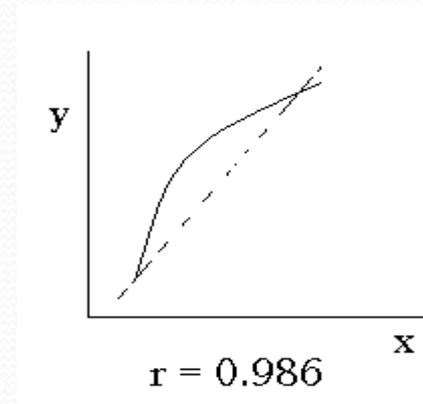
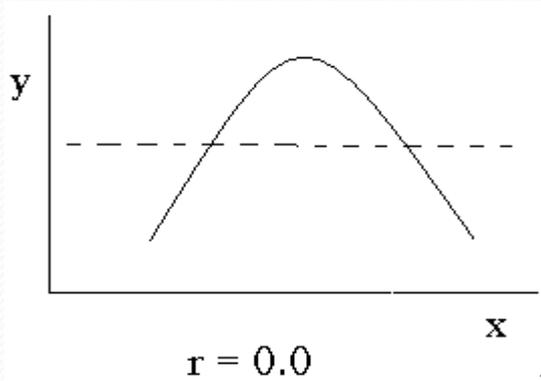
The correlation coefficient **معامل الارتباط**

- سبق الحديث ان طريقة التقليل التربيعي الخطي Linear Least Square قائمة على افتراضين أحدهما أنه توجد علاقة خطية بين العامل المستقل (X) والعامل التابع (Y) وللحكم على صحة هذه الفرضية نستخدم (معامل الارتباط) الذي يرمز له بالرمز (r) كمقياس لمدى صحة هذا الافتراض ودرجة ارتباط العاملين X و Y في علاقة خطية linear أو علاقة طردية proportional
- يمكن حساب قيمة معامل الارتباط من العلاقة التالية:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\sum X_i^2 - n \bar{X}^2) (\sum Y_i^2 - n \bar{Y}^2)}}$$

● ملاحظات عامة

- (١) أعلى قيمة لمعامل الارتباط $r = 0.9999$ وهذا يدل على الارتباط التام بين المتغيرين X و Y
- (٢) عندما تكون قيمة $r = 0.0$ هذا يدل على عدم وجود أي ارتباط وأن العامل X مستقل تماما عن العامل Y
- (٣) ينبغي التعامل بحرص مع قيمة r فأحيانا قد تكون مضللة نوعا ما فمثلا قيمة معامل الارتباط التالية $r = 0.986$ توحي أن العلاقة خطية عالية ولكن عند رسم العلاقة كما في الشكل التالي تكون العلاقة على شكل منحني وليس فعلا علاقة خطية. وفي المقابل القيمة $r = 0.0$ قد تعني أن قيمة العامل X مستقلة تماما عن العامل Y بينما قد تكون على علاقة القطوع في الرياضيات:



٤) القيم الشائعة الانتشار لقيم معامل الارتباط نجد القيم التالية:

• $r > 0.999$ علاقة خطية عالية

• $0.95 < r < 0.99$ علاقة خطية جيدة

• $0.9 < r < 0.95$ علاقة خطية ضعيفة

٥) يمكن أحيانا استخدام قيمة معامل الارتباط r كطريقة إحصائية إضافية للحكم على المصادقية من خلال المقارنة بين نتائج طريقة قياسية مرجعية وبين نتائج طريقة مطورة جديدة فإذا كانت قيمة معامل الارتباط مثلا أعلى من 0.99 فهذا يدل على جودة وقبول نتائج الطريقة التحليلية المطورة.

• مثال:

• تم تقدير عنصر النحاس في مياه الصرف الصناعي بإحدى طرق التحليل الكهربائي والتي أعطت النتائج التالية:

• تركيز النحاس (ppm): 2 4 6 8 10

• شدة التيار (i nA): 5 9 12.6 17.3 21

• إحسبي معامل الارتباط r لهذه القراءات.

● الحل:

● نستخدم العلاقة السابقة:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - n \bar{X} \bar{Y}}{\sqrt{(\sum X_i^2 - n \bar{X}^2) (\sum Y_i^2 - n \bar{Y}^2)}}$$

X_i	X_i^2	Y_i	Y_i^2	$X_i Y_i$
2	4	5	25	10
4	16	9	81	36
6	36	12.6	158.8	75.6
8	64	17.3	299.3	138.4
10	100	21	441	210
—	—	—	—	—
30	220	64.9	1005.1	470

$$r = \frac{470 - 5 (6) (12.98)}{\sqrt{(220 - 5 \times 6^2) (1005 - 5 \times 12.98^2)}}$$

$$r = 0.999$$

● واجب (٨):

- لقياس تركيز أحد المبيدات الحشرية في المنتجات الزراعية وباستخدام أحد الطرق الطيفية تم قياس تراكيز متزايدة من المبيد لرسم المنحنى القياسي من النتائج التالية:

10.0	7.5	5.0	2.5	1.0	التركيز (ppm)
1.08	0.880	0.567	0.281	0.116	الامتصاص

أحسبي معامل الارتباط لهذه القيم.

طريقة الإضافات القياسية Standard Additions Method

- طريقة منحى التعبير السابقة الذكر بالرغم من فائدتها في إيجاد وتحليل التراكيز المجهولة إلا أنها تحتوي على شرط يصعب أحيانا تحقيقه بشكل سليم وهو أن تكون سلسلة المحاليل القياسية المحضرة متشابهة إلى حد ما مع العينة وهذا يشكل تحديا ومشكلة في بعض الحالات حيث لا يحصل تطابق أو تماثل جيد بين المحاليل القياسية ومحلول العينة المحللة.
- فمثلا عند استخدام طريقة طيفية لتقدير الكولسترول في الدم نستخدم محاليل قياسية نقية pure للمادة المحللة ونقيس امتصاصها. أما العينة الفعلية (عينة الدم) فنقيس امتصاصها وهي ليست نقية حيث تحتوي على العشرات من المركبات الكيميائية والعضوية الأخرى مما يسبب تداخلات حادة interferences . وهذا الأمر يمكن ملاحظته مع عينات معقدة مثل قياس كمية عنصر الكبريت في النفط الخام أو عنصر الفضة في محاليل أفلام التصوير.

● هنا تظهر مشكلة ما يسمى تأثير نسيج أو مكونات العينة sample matrix effect حيث لا يوجد تطابق وتوافق matching بين المحاليل القياسية النقية وبين العينة المحللة المعقدة complicated ولهذا قد يكون من الخطأ استخدام طريقة المنحنى القياسي التقليدية لأننا لا نأخذ في عين الاعتبار مشاكل المتداخلات في العينة التي في الغالب تضعف وتقلل الإشارة التحليلية المقاسة.

● فكرة الطريقة:

- للتغلب على مشكلة عدم التوافق أو التطابق matching بين المحاليل القياسية النقية وبين العينة المعقدة نستخدم طريقة الإضافات القياسية والتي تتم كالتالي:
- يقاس الامتصاص أولاً لمحلول العينة (وربما لا نحتاج لتنفيذ هذه الخطوة) ثم تضاف كميات معلومة التركيز من المادة القياسية للمادة المراد تحليلها وعند كل إضافة يعاد قياس الإشارة التحليلية مرة أخرى وبعد ذلك نرسم منحنى التعبير لهذه القراءات كالسابق إما بواسطة التخمين أو بواسطة طريقة الانحدار الخطي.

- وهنا نضمن أن العينة المحللة والمحاليل القياسية تم قياسها عند نفس الظروف وبالتالي يتم تأمين عملية التطابق والتماثل ونقل تأثير مكونات العينة والامتداخلات. ويرسم أفضل خط يمر بهذه النقاط المتحصل عليها وبتمديد الخط بعد القاطع على محور Y ليصل إلى المحور X نحصل على التركيز المجهول للعينة بطريقة الاستطراد الخلفي extrapolated عندما تكون قيمة $Y = 0$

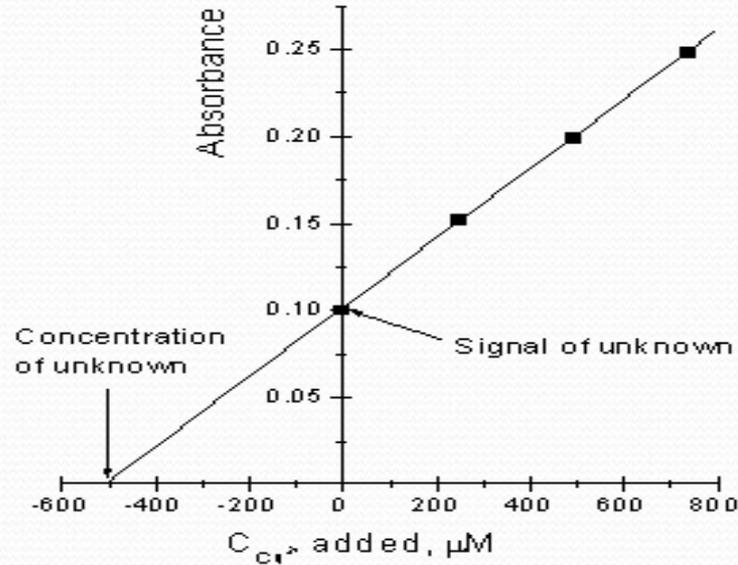


Fig.1. Determination of Cu^{2+} by the method of standard additions

● ملاحظة:

- في طريقة منحني التعيير القياسي standard calibration curve يتم إجراء تجربتين منفصلتين: تجارب أولية لقياس الإشارة التحليلية للمحاليل القياسية لرسم المنحني القياسي ثم تجربة أخرى قد تكون منفصلة لقياس العينة المحللة بينما في المقابل في طريقة الإضافات القياسية تجرى تجربة واحدة في نفس الوقت وفي نفس الظروف لقياس محلول العينة أولاً (وربما أحيانا لا نحتاج أن نقيس محلول العينة اصلاً) ثم قياسات متتالية لمحلول العينة بعد اضافة سلسلة من التراكييز.

● تنبيه:

- الطريقة الأكثر دقة والأكثر سهولة هي أن نستخدم حدود وقيم معادلة الانحدار الخطي وهي قيم الميل m وقيم القاطع b (في معادلة الانحدار الخطي) لحساب التركيز وفق المعادلة التالية:
 - تركيز المادة المحللة = قيمة القاطع / قيمة الميل

$$C = b/m \quad \bullet$$

● مثال:

● تركيز عنصر الرصاص في عينة دهانات تم تقديرها بطريقة الامتصاص الطيفي الذري وذلك بتوظيف طريقة الإضافات القياسية حيث تم إضافة المحاليل القياسية التالية للعينة المحللة:

● العينة + المحاليل القياسية (ppm) 4 8 12 16 20

● شدة الامتصاص 0.36 0.47 0.55 0.62 0.70

● إحسبي تركيز الرصاص في العينة.

● الحل:

● يتم أولاً حساب الميل والقاطع باستخدام طريقة الانحدار الخطي والتي تعطي النتائج التالية:

$$m = 0.0215 \quad b = 0.28$$

● ومن ثم نحسب تركيز الرصاص في العينة:

$$C = b/m = 0.28/0.0215 = 13 \text{ ppm} \quad \bullet$$

• واجب (٩):

- تم استخدام طريقة التحليل الكهربائية الامبيرومترية لتحليل محتوى عينة لمحلول أفلام التصوير من عنصر الفضة. عند استخدام طريقة الإضافات القياسية لتحليل هذه العينة تم الحصول على النتائج التالية:

• تركيز عنصر الفضة (ppm)	0	83	214	342
• شدة التيار (nA)	71	139	242	382

إحسبي تركيز عنصر الفضة في العينة المحللة.

المقياس الداخلي Internal Standard

- سبق وأن بينا أن طريقة منحني التعبير القياسي قد تواجه مشاكل وبالذات مع الطرق الطيفية وطرق الفصل فيما يتعلق بعدم التطابق والتماثل بين المحاليل القياسية النقية ومحلول العينة المعقد. وكان من الحلول استخدام طريقة الإضافات القياسية لكن وجد أنه في بعض الحالات الخاصة قد يتعذر أو لا ينصح باستخدام هذه الطريقة ولا بد من طريقة بديلة أو طريقة أكثر دقة.
- من ذلك مثلا نجد أنه في طريقة الانبعاث الطيفي emission أن جزء من الأشعة المنبعثة يمكن أن يمتص بالعينة المحللة نفسها فيما يعرف بظاهرة الامتصاص الذاتي self-absorption مما يؤدي إلي ضعف وتناقص شدة الانبعاث ومن ثم انخفاض حساسية التقنية التحليلية. وهنا لا يصح استخدام طريقة الإضافات القياسية لأنها تزيد تركيز المادة المحللة وبالتالي تواجه التسبب في تفاقم المشاكل المذكورة سابقا.
- **الطريقة البديلة**
- هو استخدام طريقة المقياس الداخلي والتي سميت كذلك تميزا لها عن الطريقة الأخرى التي تسمى المقياس الخارجي external standard (وهي في الواقع طريقة منحني التعبير calibration graph) والتي استخدمنا فيها محاليل قياسية كانت مفصولة عن محلول العينة وبالتالي القراءات كانت خارجية.

● المقياس الداخلي

● قبل عملية التحليل للعينة المطلوبة يتم إضافة كمية معلومة التركيز لمادة أو عنصر كيميائي غير المادة المحللة لكن بشرط أن تكون شبيهة بالمادة المحللة وتضاف هذ المادة والتي تعرف الآن بالمقياس الداخلي IS إلى العينة المراد تحليلها. بعد ذلك يتم قراءة اشارة المحلول قبل وبعد إضافة المقياس الداخلي وبحكم أن المادة المضافة سوف تتأثر بنفس الطريقة التي تتأثر بها المادة المحللة من المتداخلات أو ظروف إجراء التجربة فإن النسبة بين الاشارتين تبقى ثابتة مما يمكن من حساب تركيز المادة المحللة المجهولة كما سوف يتضح لاحقا.

● تنبيه:

- (١) هذه الطريقة جيدة مع الطرق الطيفية وطرق الفصل الكروماتوجرافي لأنها لا تعاني من اختلاف الاشارة بسبب اختلاف سريان الطور المتحرك أو اختلاف كمية الوقود كما يحدث في الطرق الطيفية اللهبية.
- (٢) ينبغي أن يكون السلوك التحليلي للمقياس الداخلي متقارب مع سلوك المادة المحللة في زمن الاستبقاء retention time في طرق الفصل أو جهد الاختزال في الطرق الكهربائية.

● مثال تطبيقي:

- في تجربة بسيطة لتقدير الصوديوم في بلازما الدم بطريقة الانبعاث الذري اللهب سوف يتأثر التقدير بتذبذب حرارة اللهب لاختلاف معدل جريان الوقود أو كمية نفث العينة إلى اللهب لهذا نستخدم مقياس داخلي من عنصر قريب من الصوديوم في الخواص الكيميائية وفي سلوكه الطيفي مثل عنصر الليثيوم فهنا مثلا طول الموجة لا يختلف كثيرا.

● أمثلة إضافية للمقاييس الداخلية:

حمض أميني Arginine

حمض أميني Alanine

فيتامين B₁₂

فيتامين B₂

دواء باراسيتامول

دواء الأسبرين

• الاستخدام الفعلي للمقياس الداخلي:

• ذكرنا أنه سوف توجد نسبة ثابتة بين إشارة المادة المحللة وإشارة المقياس الداخلي كالتالي:

$$S_A / S_{IS} \propto C_A / C_{IS} \quad \bullet$$

$$S_A / S_{IS} = k \times C_A / C_{IS} \quad \bullet$$

• حيث أن k هي نسبة ثابتة تدعى معامل الاستجابة response factor ويمكن حسابه كالتالي بعد إعادة ترتيب المعادلة السابقة:

$$k = (S_A / S_{IS} \times C_{IS} / C_A)_{\text{standard}} \quad \bullet$$

• هنا نستخدم محاليل قياسية معلومة التركيز (بمعنى C_A معلوم التركيز) لحساب قيمة k في خطوات أولية بعد ذلك يمكن حساب تركيز المحلول المجهول من المعادلة التالية:

$$C_A = (C_{IS} / k \times S_A / S_{IS})_{\text{sample}} \quad \bullet$$

● مثال:

● عند تقدير عنصر الصوديوم في الدم استخدم عنصر الليثيوم كمقياس داخلي كالتالي:

● وجد أن محلول قياسي يحتوي على 2.4 ppm من الصوديوم و 5.2 ppm من الليثيوم يعطي نسبة الإشارة

● $S_{Na}/S_{Li} = 2.45$ ، وبعد ذلك تم إضافة نفس تركيز الليثيوم السابق (5.2 ppm) إلى عينة من الدم ووجد

● أنها تعطي نسبة الإشارة التالية (1.80). إحسبي تركيز الصوديوم في عينة الدم.

● الحل:

● كما ذكرنا سابقا لدينا خطوتين متتاليتين: أولا عن طريق المحاليل القياسية نحسب معامل الاستجابة ثم في

الخطوة التالية نحسب تركيز المادة المحللة:

● معامل الاستجابة response factor

$$k = (S_A / S_{IS} \times C_{IS} / C_A)_{\text{standard}} \quad \bullet$$

$$k = (S_{Na} / S_{Li} \times C_{Li} / C_{Na})_{\text{standard}} = 2.45 \times (5.2/2.4) = 5.31 \quad \bullet$$

• حساب تركيز الصوديوم المجهول

$$C_A = (C_{IS} / k \times S_A/S_{IS})_{\text{sample}} \bullet$$

$$C_{Na} = (C_{Li} / k \times S_{Na}/S_{Li})_{\text{sample}} \bullet$$

$$= (5.2/5.3) \times 1.80 = 1.77 \text{ ppm} \bullet$$

• واجب (١٠):

• عند تحليل كمية الحمض الأميني Lysine في عينة بلازما الدم بتقنية HPLC الكروماتوجرافية تم إضافة

أحد المركبات العضوية كمقياس داخلي ووجد أن عينة الدم التي تحتوي على تركيز 13.4 mg/L من

الحمض الأميني وتركيز 29.1 mg/L من المركب العضوي تعطي نسبة إشارة (زمن استبقاء):

• $S_A/S_{IS} = 12.7$. إذا وجد أن عينة الدم المجهولة التركيز من الحمض الأميني عند إضافة كمية 29.1

mg/L لها من المركب العضوي (المقياس الداخلي) فإن نسبة الإشارة تصبح قيمتها : $S_A/S_{IS} = 9.4$. مما

سبق احسبي تركيز الحمض الأميني في عينة الدم.