

1. Opracowanie wyników

Ostatnim etapem procesu analitycznego jest opracowanie wyników. Raport (sprawozdanie) z przeprowadzonej analizy musi zawierać następujące elementy:

- krótki opis zastosowanej metody analitycznej
- nazwę, opis i warunki pracy użytego urządzenia (dla metod instrumentalnych)
- spis zastosowanych odczynników
- listę otrzymanych wyników wyjściowych (danych uzyskanych bezpośrednio w trakcie prowadzonej analizy)
- wyniki końcowe

Wartości mierzonej funkcji (Y), ilości substancji oznaczanej (x) lub oznaczanego stężenia (c) tej substancji przedstawiane są zwykle w postaci:

- tabelarycznej
- wykresów graficznych
- równań funkcji zależności pomiędzy (Y) i (c): $Y = ac$ lub $Y = ac + b$

W celu obliczenia wyniku końcowego, należy opisać:

- wynik końcowy analizy w postaci średniej arytmetycznej z obliczonym przedziałem ufności i określeniem prawdopodobieństwa, z jakim ten przedział ufności został podany
- walidację metody

2. Statystyczna ocena wyników

Parametry statystyczne opisujące wyniki

Rozkład normalny błędów pomiarowych

Wartości mierzone – wyniki analiz – podlegają nieuniknionym odchyleniom przypadkowym. Prawdopodobieństwo występowania wyników mniejszych i większych od wartości rzeczywistej (μ), jest jednakowe i stanowi rozkład odchyłeń opisany *funkcją Gaussa, której obrazem jest krzywa Gaussa (krzywa dzwonowa) przedstawiająca rozkład normalny błędów przypadkowych*. Jej cechą jest to, że:

- największą liczebność mają wyniki, gdy wartość mierzona (x_i) \approx rzeczywistej (μ)
- im bardziej x_i różni się od μ , tym mniejsza jest liczebność wyników
- rozrzut wyników jest symetryczny, tj. występuje jednakowa liczba odchyłeń dodatnich i ujemnych

- krzywa ma maksimum przy $x_i = \mu$, dwa punkty przegięcia przy $x_i = \mu \pm \sigma$ (odchylenie standardowe) i po dwóch stronach zbliża się asymptotycznie do osi odciętych
- trójkąt opisany na krzywej ma podstawę o wierzchołkach w punktach -2σ i $+2\sigma$

Odchylenie standardowe

Odchylenie standardowe (σ) w rozkładzie Gaussa:

- przedstawia błąd bezwzględny dla wyniku x_i , któremu odpowiada punkt przegięcia na krzywej
- jest miarą odtwarzalności
- mała wartość tego parametru wskazuje na dużą precyzję

Miara ta dotyczy oznaczeń, w których liczba powtórzeń jest duża ($n > 30$). Gdy oznaczeń jest mniej niż 30 odchylenie standardowe szacuje się na podstawie parametru s :

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

Przedział ufności

Wartość rzeczywista może być *oszacowana* na podstawie średniej arytmetycznej z pomiarów. W tym celu określa się przedział, w którym znajduje się wartość rzeczywista z założonym z góry prawdopodobieństwem. Przedział ten nazwano przedziałem ufności (L). Prawdopodobieństwo założone (w %), że wartość rzeczywista znajduje się w przedziale ufności określa się mianem poziomu ufności (p). W obliczeniach najczęściej przyjmuje się wartość poziomu ufności 0,95 i 0,99. Oznacza to, że na 100 wyników odpowiednio 95 i 99 znajduje się w przedziale ufności.

Przedział ufności wyznacza się:

- przy dużej liczbie pomiarów ($n > 20$) z rozkładu normalnego według wzorów:

$$L = \bar{x} \pm 1,96\sqrt{n} \quad \text{dla } p = 0,95$$

$$L = \bar{x} \pm 2,58\sqrt{n} \quad \text{dla } p = 0,99$$

- przy małej liczbie pomiarów ($n < 20$) z rozkładu Studenta (dotyczy statystycznej oceny małych grup wyników), według wzoru:

$$L = \bar{x} \pm t s_x^-$$

t – współczynnik z tablicy rozkładu Studenta – zależy od poziomu ufności i liczby

pomiarów; s_x^- - jest odchyleniem standardowym średniej $s_x^- = \frac{s}{\sqrt{n}}$

Prosta regresji

Wyniki pomiarów mogą być przedstawione w postaci równania funkcji zależności liniowej pomiędzy wielkością mierzoną (Y) a stężeniem (c):

$$Y = ac + b$$

Mając współczynnik kierunkowy (a) i przesunięcie prostej regresji (b), można skonstruować krzywą kalibracji. Współczynnik kierunkowy (a) jest miarą czułości metody analitycznej. W przypadku spektrofotometrii UV-VIS przy grubości warstwy absorbującej = 1 cm, współczynnik kierunkowy odpowiada wartości współczynnika absorpcji (ϵ). Wartość (b) jest miarą przesunięcia prostej regresji. Współczynnik korelacji (r) określa zgodność punktów (x_i, Y_i).

3. Błędy w analizie chemicznej

Każda wielkość mierzona w doświadczeniu – wynik analizy obarczona jest błędem. Wyróżniamy: błędy przypadkowe, błędy systematyczne i błędy grube.

Błędy przypadkowe – są niewielkie. Ich przyczyną są różnego pochodzenia zakłócenia oddziałujące na sygnał mierzony w czasie doświadczenia. Ich przyczyna nie jest dokładnie znana. Wyniki w serii pomiarów zwykle różnią się między sobą. Zwykle błędów tych nie można wyeliminować. Błędy te powodują niewielki przypadkowy rozrzut wokół pewnej wartości średniej. Nie wpływają na wynik końcowy. Dla zmniejszenia

efektu błędu przypadkowego należy ściśle realizować założoną procedurę, np. unikać ważenia, gdy ktoś otwiera drzwi w pokoju wagowym itd.

Błędy systematyczne – mają charakter stały. Błędem takim nazywa się odchylenie otrzymanego wyniku (średniej z wyników), które występuje zawsze podczas wykonywania oznaczeń daną metodą lub za pomocą danego przyrządu. Zmiana sygnału wywołana błędem systematycznym zachodzi w tym samym kierunku (stale zawyża lub zaniża odczyt). Przyczyny takiego błędu są ściśle określone, mogą być zwykle ustalone i usunięte poprzez korektę postępowania. Jeżeli przyczyna błędu systematycznego nie może być usunięta, może zostać wprowadzona odpowiednia poprawka lub standaryzacja. Do przyczyn błędów systematycznych należą:

- a). metoda pomiaru
- b). błąd przyrządu
- c). zanieczyszczenie odczynników.

Błędy systematyczne podzielić można na:

Błędy metodyczne - wynikają one z istoty metody pomiarowej i nie mogą być usunięte. Metody opracowywane są w taki sposób, aby błąd metodyczny był możliwy do pominięcia. Może on wynikać np. z konieczności dodania nadmiaru titranta dla uzyskania dostrzegalnej zmiany barwy wskaźnika, zbyt wolno przebiegającej reakcji będącej podstawą metody itd.

Błędy aparaturowe - związane są z niedokładnością urządzenia pomiarowego lub ich niestabilną pracą. Wszystkie przyrządy są źródłem potencjalnych błędów systematycznych (pipety - błąd kalibracji lub odmienna temperatura użycia). W urządzeniach elektrycznych źródłem błędu są wahania napięcia źródła prądu, zabrudzenie lub korozja styków. W przyrządach optycznych – zmniejszenie intensywności promieniowania spowodowane zużyciem źródła. Błędy te usuwane są przez staranne i częste kalibrowanie przyrządów pracujących w tych samych warunkach.

Błędy indywidualne - przyczyną są niedoświadczenie lub brak umiejętności analityka. Niedostateczne przenoszenie osadu na sączek, nadmierne przemywanie osadu, ważenie ciepłych naczyń wagowych, nieprawidłowa lokalizacja menisku w biurecie, daltonizm, wada wzroku. Błędy te usuwa się poprzez nabieranie wprawy przez analityka.

Błędy grube – powstają zawsze z winy wykonawcy analizy, również przez niedopatrzenie. Występują tylko przy niektórych pomiarach. Bywają dodatnie lub ujemne. Są wynikiem jednorazowego wpływu przyczyn działających przejściowo. Wynik pomiaru znacznie odbiega wtedy od pozostałych wyników serii. Najczęściej jest to wynik skrajny. Powodem takich błędów mogą być:

- a). złe pobranie próbki
- b). zły dobór procedury oznaczeń
- c). błąd w obliczeniach
- d). złe ustawienie pokręteł,
- e). nie przepłukana biureta
- f). złe odczytanie lub przepisanie wyniku

Ze względu na sposób podawania wartości błędu wyróżniamy **błędy bezwzględne i względne**.

Błąd bezwzględny - zwany jest również absolutnym. Określany jest jako różnica między zmierzoną wartością x a wartością rzeczywistą. Może mieć wartość dodatnią lub ujemną i podawany jest zwykle w postaci wartości bezwzględnej. Dla wartości średniej z pomiarów jest to różnica tej wartości i wartości rzeczywistej.

Błąd względny - odnosi wartość błędu bezwzględnego do wartości rzeczywistej (μ) i określa tym samym jego znaczenie dla oznaczenia. Błąd względny dla próbek o dużym stężeniu nie powinien przekraczać 0,1%, dla oznaczania ilości śladowych może przekraczać nawet 20%.

$$E_{wzg} = \frac{E_{abs}}{\mu} = \frac{x - \mu}{\mu}$$

$$\% E_{wzg} = \frac{x - \mu}{\mu} \cdot 100$$

Wszystkie metody analityczne obarczone są błędami przypadkowymi i standardowymi, charakterystycznymi dla danej metody. Dla celów porównania różnych metod oznaczania tego samego agalitu stosowane są różne kryteria.

4. Walidacja metod analitycznych

Warunkiem dobrej i akceptowanej pracy laboratorium analitycznego jest poddanie wykonanej metody procesowi walidacji. Celem walidacji metody analitycznej jest stwierdzenie, czy proces analizy według danej metody przebiega w sposób rzetelny i daje wiarygodne wyniki. Walidację wykonuje się bezwzględnie dla wszystkich nowych metod, jest również prowadzona dla metod modyfikowanych.

Walidacja metody analitycznej obejmuje wykonanie zalecanych czynności, które polegają na eksperymentalnym udokumentowaniu stopnia wiarygodności metody analitycznej i wykazaniu, że metoda jest przydatna do rozwiązania danego zadania analitycznego.

Procesowi walidacji podlegają wszystkie etapy analizy:

- wybór krzywej kalibracji
- określenie zakresu prostoliniowości krzywej kalibracji
- wyznaczenie czułości metody
- badanie dokładności i precyzji metody
- wyznaczenie granicy wykrywalności i oznaczalności
- oznaczenie stabilności analitu
- wyznaczenie odzysku analitu
- oszacowanie selektywności metody

Czułość metody

Czułością metody analitycznej nazywamy nachylenie krzywej kalibracyjnej. Czułość określa więc zmianę sygnału analitycznego (Y) na skutek zmiany stężenia (c) analitu lub jego ilości (x). Im większa zmiana sygnału przy małej zmianie stężenia analitu, tym większa czułość metody. Matematycznie parametr ten jest wyrażany współczynnikiem kierunkowym wykresu kalibracji (a).

Czułość metody określa się również *limitem oznaczalności (detekcji)*. Określa ona najmniejszą ilość substancji lub jej stężenie, jakie można realnie zmierzyć daną metodą.

Dokładność metody

Jest to stopień zgodności pomiędzy wynikiem oznaczonym (x) lub średnią wyników z n oznaczeń a prawdziwą zawartością analitu w badanej próbce. Ilościowo dokładność jest miarą wielkości błędu. Oznaczać można:

- *dokładność pojedynczego oznaczenia* - jest możliwa do oznaczenia tylko jako błąd standardowy, ponieważ nie jest znana zawartość rzeczywista w próbce.
- *dokładność metody* - określana jest na podstawie średniej wartości z n pomiarów uzyskanych na tej samej próbce i tą samą metodą. Badaną próbką jest tu wzorzec – certyfikowany materiał odniesienia (certified reference materials CRMs), w której prawdziwa zawartość analitu jest dokładnie znana.

Wyznaczanie dokładności metody:

- przeprowadzenie analizy próbki, w której zawartość analitu jest dokładnie znana - można wykorzystać próbki CRM.
- porównanie wyników uzyskanych opracowaną metodą z wynikami uzyskanymi inną metodą, powszechnie uznaną za dokładną
- badanie odzysku znanej ilości analitu dodanego do matrycy, nie zawierającej substancji oznaczanej
- wyznaczając odzysk znanej ilości analitu dodanego do próbki badanej

Precyzja metody

Precyzja metody jest to stopień zgodności między wynikami uzyskanymi tą samą metodą i na tej samej próbce przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczenia. Można ją też zdefiniować jako rozrzut poszczególnych wyników przy powtarzanych doświadczeniach w stosunku do średniego wyniku z oznaczeń. Im większa precyzja tym mniejszy rozrzut.

Przy powtarzanych doświadczeniach nie uzyskujemy nigdy dwóch identycznych wyników, a prawidłowe wyniki układają się zawsze zgodnie z rozkładem normalnym w kształcie krzywej dzwonowej. Najlepszą miarą precyzji jest odchylenie standardowe σ (lub jego przybliżenie s). Za precyzję oznaczeń odpowiedzialny jest błąd przypadkowy.

Z precyzją wiążemy też terminy:

Powtarzalność oznaczeń, gdy analiza wykonywana jest w tym samym laboratorium, przez tego samego analityka, tą samą metodą, na tych samych urządzeniach, w możliwie krótkim przedziale czasowym. Miara powtarzalności jest *RSD powtarzalności oznaczeń*.

RSD jest to względne odchylenie standardowe (*relative standard deviation*), niezależne od jednostek pomiaru. Jest wyrażone ilorazem wartości odchylenia standardowego i średniej z wartości pomiarów:

$$RSD = \frac{S}{x}$$

RDS jest liczbą mniejszą od jedności i wyrażane jest często w procentach jako współczynnik zmienności (*coefficient of variance*) **CV%**.

Odtwarzalność oznaczeń, gdy wyniki otrzymywane są w sposób niezależny, tą samą metodą i na tej samej próbce, ale w różnych laboratoriach, przez różnych analityków na różnych urządzeniach. Statystyczne opracowanie wyników daje wartość *RDS odtwarzalności*.

Precyzja oznaczeń zależy od stężenia analitu w badanej próbce. Przyjmuje się, że opracowana metoda spełnia wymogi, gdy $CV\% = 2^{(1 - 0,5 \log c)}$ gdzie *c* – stężenie masowe analitu. Sama precyzja nie wystarcza do uzyskania dokładnych wyników.

Krzywa kalibracji

W czasie pomiaru analitycznego odczytujemy sygnał (*Y*) zależny od stężenia lub ilości analitu w badanej próbce. Przyrząd stosowany w analizie musi być kalibrowany. Sporządzenie krzywej kalibracyjnej służy ustaleniu równania zależności pomiędzy miarą generowanego przez przyrząd sygnału i zawartością analitu w próbce:

$$Y = f(c)$$

Y – wielkość mierzona, *c* – stężenie analitu

Najczęściej:

$$Y = ac$$

gdzie

a – współczynnik proporcjonalności, który został wyznaczony w procesie kalibracji

Do sporządzenia krzywej kalibracyjnej należy stosować wiarygodne materiały odniesienia (certyfikowane CMR). Kalibracja przyrządu jest czynnością wstępnej walidacji.

Równanie krzywej kalibracyjnej można wyznaczyć metodą najmniejszych kwadratów (regresji liniowej). Zgodność zależności sygnału od stężenia charakteryzuje współczynnik korelacji (r). Jeżeli krzywa kalibracyjna jest podstawą wielokrotnych analiz, jej stabilność musi być potwierdzana każdorazowo w dniu wykonania analizy.

Liniowość wskazań

Liniowość to przedział zawartości analitu, dla którego sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego jest proporcjonalny do tej zawartości. Zależność Y (c) w badanej próbce jest prostoliniowa tylko w ograniczonym zakresie badanych stężeń analitu. Wyróżnia się tu: dynamiczny zakres wskazań przyrządu, liniowy zakres wskazań (zakres roboczy – zakres pomiarowy). *Zakres pomiarowy to przedział pomiędzy najwyższym i najniższym stężeniem (wraz z nimi), jakie mogą zostać oznaczone za pomocą danej metody pomiarowej z założoną precyzją, dokładnością i liniowością.* Przy niskich stężeniach zakres liniowy ograniczony jest dolną granicą oznaczalności, a zakrzywienie jest wynikiem szumów aparaturowych i efektem matrycowym. Za koniec zakresu prostoliniowego przyjmuje się punkt, w którym odchylenie od prostoliniowości nie przekracza 3%.

$$Y_{teor} - Y_{rzecz} = 0,03Y_{teor}$$

Y_{teor} – sygnał dla roztworu o najwyższym stężeniu, wyznaczony metodą najmniejszych kwadratów (regresji liniowej)

Y_{rzecz} – sygnał rzeczywisty dla roztworu o najwyższym stężeniu, wyznaczony eksperymentalnie.

Innym kryterium liniowości wskazań jest współczynnik korelacji. Przyjmuje się, że dla trzech powtórzeń (3 równoległe pomiary dla każdego poziomu stężenia – przeważnie obejmuje wartości od 50 do 150% wartości oczekiwanej wyników analizy) krzywej kalibracyjnej z sześcioma roztworami wzorcowymi (na 6 poziomach stężeń) współczynnik korelacji dla każdej krzywej powinien mieć wartość $r \geq 0,999$. Dodatkowo wyznacza się istotność wyznaczonych wartości współczynników wykresu kalibracyjnego.

Granica wykrywalności i oznaczalności

Granica wykrywalności i oznaczalności są parametrami, które odgrywają niezwykle istotną rolę w procesie walidacji metody.

Przyczynami trudności w zrozumieniu i wyznaczeniu tych wartości są:

- mnogość definicji opisujących pojęcia
- trudności praktyczne w wyznaczaniu podstawowego parametru determinującego granicę wykrywalności – wielkość poziomu szumów urządzenia pomiarowego.

Stosunek sygnału do szumu (*signal to noise ratio – S/N*) – to wielkość bezwymiarowa, będąca stosunkiem sygnału analitycznego do średniego poziomu szumu dla określonej próbki. Służy do określenia wpływu poziomu szumu na względny błąd pomiarowy.

Granica wykrywalności (*limit of detection – LOD*) – to najmniejsza ilość lub stężenie substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej procedury analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Jest to najmniejsza ilość analitu, przy której istnieje pewność jego obecności w próbce. Wymiar tej wartości to zawartość analitu, np. mg/dm³. Ma ona ściśle powiązanie z poziomem szumu. Przyjmuje się, że jej wartość to trzykrotny poziom szumów.

Granica oznaczalności (*limit of quantification – LOQ*) – to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją. Wartość LOQ jest zawsze wielokrotnością wyznaczonej wartości LOD. Najczęściej LOQ = 3 LOD. Czasem wartość krotności wynosi 2 lub 6.

Stabilność

Próbki analityczne ulegają przemianom fizykochemicznym i biochemicznym w czasie przechowywania. Dotyczy to również standardów i odczynników przygotowanych do analizy. Analiza powinna być przeprowadzona na świeżo przygotowanych materiałach. Jeśli realizacja następuje w przedłużającym się czasie lub przewidujemy wykorzystanie odczynników i wzorców w dłuższym okresie, należy ustalić stabilność materiałów. Kryterium stabilności jest ich trwałość przynajmniej przez 48 godzin. Za trwałe uważa się

te roztwory, których sygnał po 48 godz. zmienia się $\leq 2\%$ w porównaniu z sygnałem próbki świeżo przygotowanej.

Odzysk analitu

W przypadku konieczności oddzielenia analitu od matrycy konieczne jest określenie odzysku analitu. Można to wykonać metodą dodawania analitu. Do jednej z dwóch równych części próbki dodaje się znaną ilość analitu (s). Po przeprowadzeniu analizy z próbki z dodatkiem analitu ($x+s$) i pierwotnej (x), obliczany jest odzysk R według wzoru:

$$R(\%) = \frac{(x + s) - (x)}{s} \cdot 100$$

Obydwie próbki analizowane są tą samą metodą. Można dodawać też analitu do czystej matrycy. Akceptowany średni odzysk zależy od stężenia analitu w próbce – dla stężenia 1% analitu średni odzysk powinien wynosić 97-103%.

Selektywność (specyficzność) metody

Jest to możliwość oznaczenia jednego składnika wobec innych, w złożonej próbce rzeczywistej, bez interferencji składników towarzyszących. Metoda jest selektywna, gdy w złożonej mieszaninie sygnał jest generowany tylko przez analit.

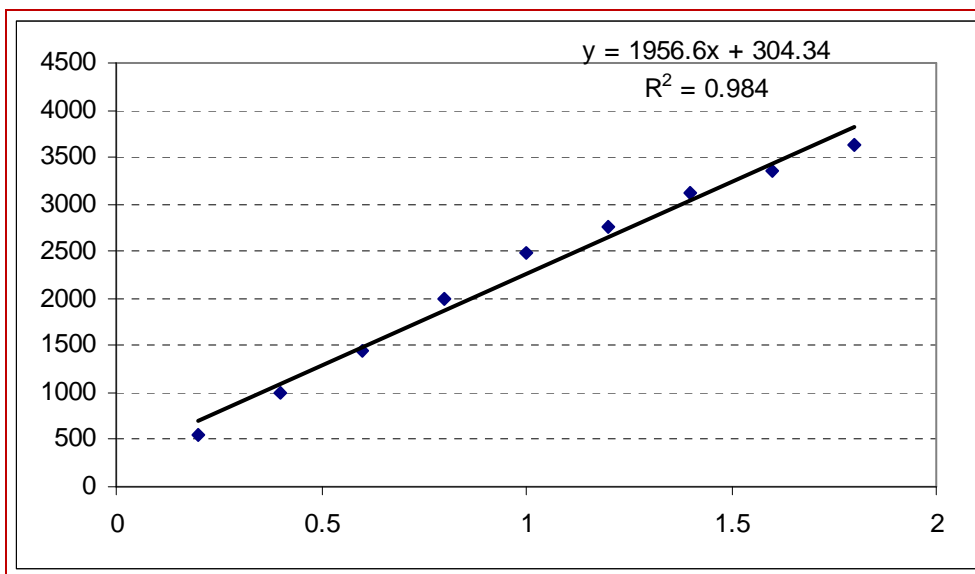
CHROMATOGRAFIA

Przy walidacji metod chromatograficznych należy przede wszystkim zwrócić uwagę na specyficzność i liniowość metody.

1. **Specyficzność** – tutaj, to badanie, czy dany proces chromatograficzny pozwala na jednoznaczną identyfikację i oznaczenie badanego składnika. Inaczej, czy otrzymane piki lub plamki chromatograficzne pochodzą na pewno od badanej substancji oraz czy nie nakładają się z pikami/plamkami innych substancji, obecnych w typowych próbkach (np. substancji pomocniczych, zanieczyszczeń, produktów rozkładu oznaczanego składnika itp.). Na tym etapie należy wyznaczyć czasy retencji t_R lub współczynniki R_f dla innych składników typowego preparatu w danych warunkach rozdziału chromatograficznego i wykazać, że piki/plamki tych substancji nie przeszkadzają w analizie prowadzonej przy pomocy walidowanej metody. Można też posłużyć się dodatkowymi technikami, np. przedstawić widma masowe, IR, UV/VIS lub inne dla wyizolowanego daną metodą badanego składnika i porównać je z widmami wzorca.

2. Liniowość

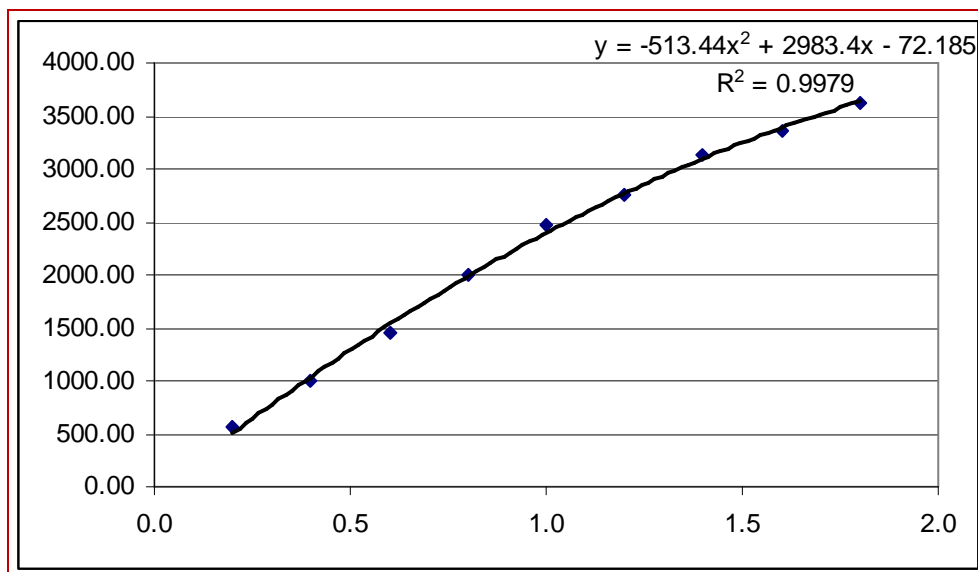
Krzywe kalibracyjne dla metod chromatograficznych wyznacza się w postaci zależności pól powierzchni pod pikami chromatograficznymi otrzymanymi dla minimum 6 stężeń analitu od tych stężeń, w zakresie ok. 50-150% wartości spodziewanej. W przypadku wielu metod analitycznych (np. oznaczeń spektrofotometrycznych, opartych na prawie Lamberta-Beera) krzywe wzorcowe mają w szerokim zakresie stężeń analitu charakter liniowy. Wyznacza się je wówczas posługując się metodą najmniejszych kwadratów. O liniowości krzywej wzorcowej świadczy m.in. wysoki współczynnik regresji liniowej otrzymanej dla min. 6 punktów pomiarowych (wartość powyżej 0.999). Przykład przedstawia rys.1.



Rys. 1. Seria punktów pomiarowych dla pomiaru metodą chromatografii cienkowarstwowej-densytometrii (poła powierzchni pod pikami na densytogramie w zależności od stężenia analitu w $\mu\text{g/plamkę}$), z naniesioną prostą regresji. Współczynnik regresji wynosi $R=0,992$, jest bliski 0,999.

Współczynnik regresji liniowej dla punktów z rys. 1 jest wprawdzie bliski 0,999, ale nie musi to koniecznie świadczyć o liniowości otrzymanej dla tej metody krzywej kalibracyjnej.

W przypadku chromatografii cienkowarstwowej, połączonej ze skanowaniem densytometrycznym otrzymanych plamek, zależność pól powierzchni pod pikami densytogramów od stężenia analitu nie musi podlegać prawu Lamberta-Beera i nie jest idealnie liniowa. Oczywiście istnieje możliwość wybrania wąskiego zakresu stężeń, w którym otrzymana krzywa wzorcowa będzie miała charakter liniowy z wysokim współczynnikiem regresji rzędu ponad 0,999 (zakres „pseudoliniowy”), ale w szerszym zakresie z powodzeniem można zastosować inny rodzaj krzywej kalibracyjnej, np. funkcję kwadratową – rys.2.



Rys. 2. Punkty pomiarowe z rys. 1, z naniesioną krzywą kalibracyjną w postaci równania kwadratowego.

Ponadto oprócz wymienionych powyżej parametrów metody analitycznej, podlegających walidacji, dla każdej metody należy rozważyć czynniki, które mogą spowodować jej niepowodzenie. W przypadku metod chromatograficznych należy w szczególności ustosunkować się do następujących zagadnień:

- Czystość rozpuszczalników, służących do przygotowywania próbek, roztworów wzorcowych oraz ewentualnie (nie dotyczy to oczywiście chromatografii gazowej) fazy ruchomej – czy wystarczą rozpuszczalniki cz.d.a. (czyste do analizy), czy muszą być czystości HPLC?
- Jakość odczynników, używanych np. do reakcji barwnych w procesie wywoływania chromatogramów cienkowarstwowych lub derywatywacji substancji przed wykonaniem oznaczenia za pomocą chromatografii gazowej.
- Jakość płytek chromatograficznych – zwykle czy tzw. wysokosprawne (o mniejszej i bardziej wyrównanej średnicy ziaren fazy stacjonarnej).
- Temperatura, wilgotność i ciśnienie atmosferyczne w laboratorium – mogą wpłynąć na współczynniki retencji.

KOLORYMETRIA

Kolorymetryczna metoda rodankowa oznaczania zawartości Fe(III) służy do określania zawartości żelaza w analizowanym wodnym roztworze w określonym zakresie stężeń. W metodzie tej do wyznaczenia stężenia oznaczanej substancji wykorzystuje się absorbcję barwnego kompleksu utworzonego z kationów Fe(III) i anionów SCN⁻. W zależności od środowiska chemicznego, w którym znajduje się analit, jak również ustalonych warunków pomiarowych, wartość sygnału mierzonego dla danego stężenia analitu może ulegać zmianie, stąd nie może jednoznacznie świadczyć o ilości analitu w próbce. Dlatego konieczne jest przeprowadzenie kalibracji danego oznaczenia. Do najczęściej stosowanych metod kalibracji należy metoda serii wzorców. W metodzie serii wzorców przygotowuje się roztwory wzorcowe, czyli syntetyczne roztwory o znanych, ściśle ustalonych stężeniach analitu. Po poddaniu tych roztworów pomiarom, przedstawia się otrzymane wyniki w układzie współrzędnych sygnał (absorbancja) – stężenie analitu a następnie dopasowuje się do nich określoną funkcję (zazwyczaj linię prostą). Pomiar wykonuje się zwykle przy określonej długości fali, najczęściej odpowiadającej maksimum absorpcji oznaczanej substancji oraz względem roztworu odniesienia (tzw. ślepej próby), czyli roztworu przygotowanego analogicznie jak roztwory wzorcowe i roztwór próbki, lecz niezawierającego analitu. Do przygotowywania roztworów stosowanych w oznaczeniach należy wykorzystywać wyłącznie certyfikowane odczynniki chemiczne oraz homologowaną aparaturę badawczą.

FOTOMETRIA PŁOMINIOWA

Wyznaczanie wartości niepewności związanej z etapem kalibracji stosując metodę fotometrii płomieniowej

Na etapie kalibracji jonów Na^+ wykorzystuje się serię roztworów wzorcowych, w których stężenia wynoszą odpowiednio: 1, 5, 7, 10, 15 i 20 ppm. Próbkę każdego z roztworów wzorcowych analizuje się trzykrotnie otrzymując serię wyników – tabela 1.

Tabela 1.

Wyniki oznaczeń Na^+ w próbkach roztworów wzorcowych wykonanych w celu wyznaczenia krzywej kalibracyjnej

Stężenie c [ppm]	Wartości natężenia emitowanego promieniowania I_{em}			
	y_1	y_2	y_3	$y_{wart. \text{średnia}}$
1				
5				
7				
10				
15				
20				

Na podstawie uzyskanych wyników sporządza się wykres $I_{em} = f(c)$

Dla prostoliniowego odcinka krzywej wyznaczamy parametry krzywej regresji, dla równania regresji liniowej $y = bx + a$, gdzie:

y – zmienna zależna (sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego)

x – zmienna niezależna (zawartość oznaczanego analitu)

a – wyraz wolny

b – współczynnik kierunkowy prostej

Krzywa kalibracyjna przechodzi przez początek układu współrzędnych, zatem wyraz wolny – $a = 0$. Współczynnik kierunkowy prostej – b obliczamy ze wzoru:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n x_i y_i}{\sum_{i=1}^n x_i^2}$$

Wartość stężenia badanej próbki można wyznaczyć zarówno z wykresu krzywej kalibracyjnej, jak też wyliczyć z równania $I_{em} = b c$. Niepewność wyznaczonej krzywej

kalibracyjnej można przedstawić na wykresie jako przedział ufności obliczany na podstawie równania:

$$\Delta y_i = Y \pm s_{xy} t_{(\alpha, f=n-2)} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(x_i - x_{\text{sr}})^2}{Q_{xx}}} \Delta \quad (1)$$

gdzie:

Δy_i - przedział ufności obliczonej wartości Y dla danej wartości x_i

Y - wartości obliczone na podstawie krzywej regresji dla danych wartości x_i

s_{xy} - resztkowe odchylenie standardowe obliczone wg wzoru

$$s_{xy} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{sr}})^2}{n - 1}} \quad (2)$$

$t_{(\alpha, f=n-2)}$ - parametr t-Studenta

n – całkowita liczba próbek wzorcowych (liczba punktów)

x_i – wartość x dla której obliczane jest Δy_i

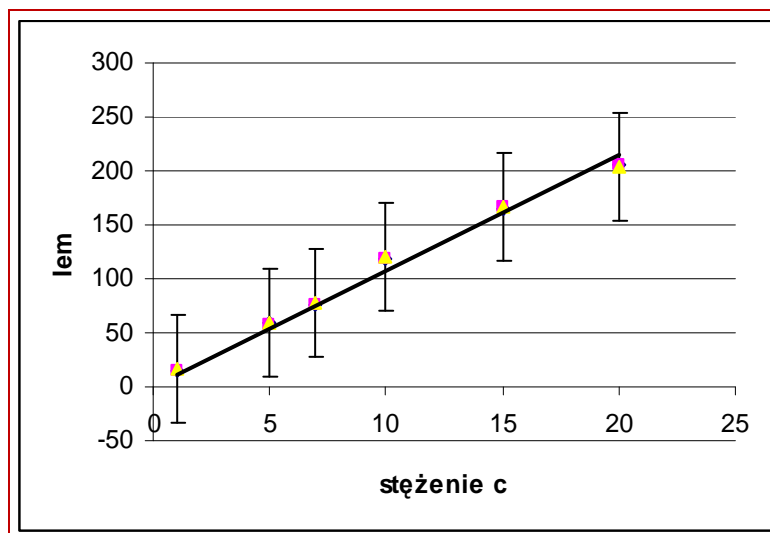
x_{sr} – średnia wartość (najczęściej oznacza stężenie)

Q_{xx} - parametr obliczany wg. wzoru (3)

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - x_{\text{sr}})^2 \quad (3)$$

Przykładowa krzywa kalibracyjna:

Stężenie c [ppm]	Y1	Y2	Y3
1	15	14	16
5	59	58	60
7	76	76	77
10	119	118	120
15	165	166	166
20	206	205	204



PODCZERWIENÍ

W przypadku rejestracji widm w zakresie podczerwieni analitycznej (MIR) i bliskiej podczerwieni (NIR) podstawowymi wielkościami mierzonymi są położenia maksimów pasm w cm^{-1} oraz ich transmitancja T w %. Proces walidacyjny wymaga więc przede wszystkim podania wzorca widma z określeniem położenia jego charakterystycznych pasm. Wzorzec ten, z ustalonymi dopuszczalnymi błędami, musi być odtworzony na testowanym aparacie. Tym wzorcem, według Standard Reference Material, jest widmo folii polistyrenu o grubości około $38 \mu\text{m}$ rejestrowane w zakresie od 540 cm^{-1} do 3125 cm^{-1} (SRM number 1921B). Folia dla potrzeb kalibracyjnych nie może być uszkodzona, zanieczyszczona i nie może być przechowywana w środowisku o dużej wilgotności. Zaleca się, aby była przechowywana w eksykatorze, nie była dotykana palcami a ewentualny kurz był usuwany strumieniem suchego powietrza.

Kalibracja powinna być wykonywana w temperaturze $23 \pm 1^\circ\text{C}$, a z komory pomiarowej powinien być usunięte CO_2 i H_2O . Szczegółowe ustawienia aparatu podane są w pracy:

Gupta, D.; Wang, L.; Hanssen, L.M.; Hsia, J.J.; Datla, R.V.; *Standard Reference Materials: Polystyrene Films for Calibrating the Wavelength Scale of Infrared Spectrophotometers - SRM 1921*; NIST Special Publication 260-122, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1995).

Widmo folii wzorcowej z zaznaczonymi kilkunastoma pasmami kalibracyjnymi wg. SRM przedstawione jest na ryc. 1 a wartości mierzonych parametrów do kalibracji na ryc. 2. Położenia charakterystycznych pasm dla widma z ryc. 1 zebrane są w tabeli 1.

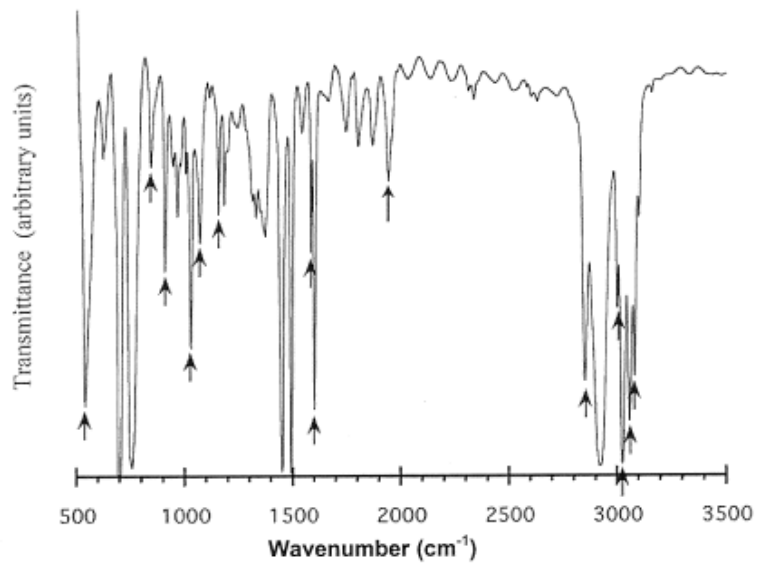


Figure 1. Spectrum of polystyrene film showing locations of certified absorption bands.

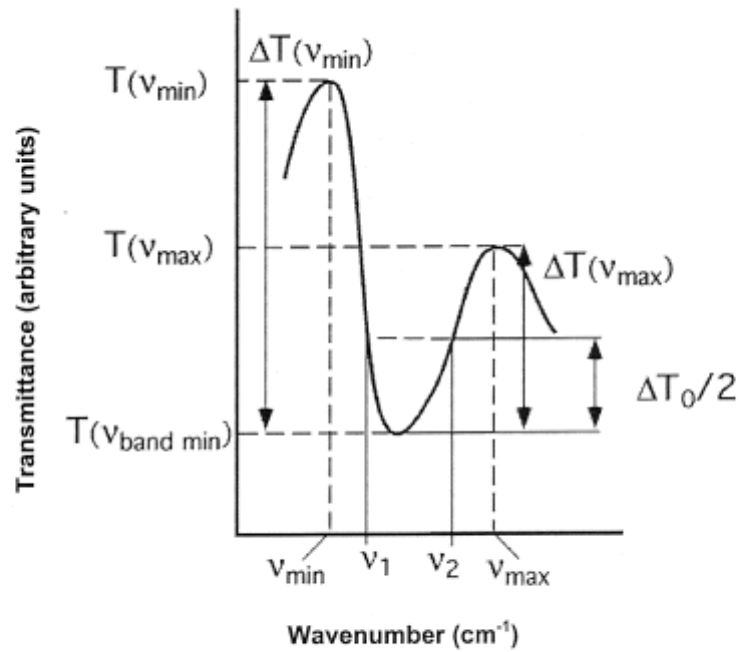


Figure 2. Diagram indicating parameters used in the band wavenumber determination method (see text for details).

Tabela 1. Położenia pasm do certyfikacji spektrofotometru –widmo 1.

Numer pasma	Liczba falowa (cm^{-1})	Dopuszczalne odchylenie standardowe dla 4 pomiarów (cm^{-1})
1	544.92	2.43
2	842.10	1.29
3	906.82	0.10
4	1028.42	0.27
5	1069.27	0.77
6	1154.62	0.09
7	1583.04	0.09
8	1601.38	0.11
10	2850.20	0.12
11	3001.40	0.09
12	3026.44	0.09
13	3060.14	0.09
14	3082.22	0.09

Walidacja metod analitycznych - przykłady zadań

1. Odrzucenie wyników niepewnych. Test Q Dixona

Prawie zawsze przy wykonywaniu pomiarów, niektóre wyniki wyraźnie odbiegają od pozostałych, wpływając na wartość średnią i odchylenie standardowe. Odrzucenie wyników odbiegający można dokonać na podstawie prostego w obliczeniach testu Q Dixona, korzystając z tabeli wartości krytycznych i liczby Q_t (tabela1) Liczbę Q wylicza się ze wzoru:

$$Q_t = (x_2 - x_1) : R \quad \text{lub} \quad (x_n - x_{n-1}) : R$$

gdzie x_1 - lewy skrajny wynik wątpliwy

x_2 - sąsiedni do x_1 (najbliższy do x_1)

x_n - prawy skrajny wynik wątpliwy

x_{n-1} - jego poprzednik

R - rozstęp szeregu ($x_n - x_1$)

Tabela 1. Wartości krytyczne parametru Q_1 , testu Dixona dla określonego poziomu istotności α i stopniach swobody f

$f \backslash \alpha$	0,10	0,05	0,01
3	0,886	0,941	0,988
4	0,679	0,765	0,889
5	0,557	0,642	0,780
6	0,482	0,560	0,698
7	0,434	0,507	0,637
8	0,399	0,468	0,590
9	0,370	0,437	0,555
10	0,349	0,412	0,527

Przykład1

Oznaczano zawartość jonów miedzi (Cu^{2+}) w próbce ścieków, uzyskując następujący zbiór wyników oznaczeń w mg/dm^3 :

0,875 0,863 0,876 0,868 0,771 0,881 0,878 0,869 0,866

Sprawdzić, czy nie występuje w danej serii wynik obarczony błędem grubym.

Żeby sprawdzić, czy w badanym zbiorze wyników nie ma wyniku odbiegającego, zastosowano test Q-Dixona.

Otrzymany zbiór wyników uszeregowano w ciąg rosnący:

0,771 0,863 0,866 0,868 0,869 0,875 0,876 0,878 0,881

Dla tak utworzonego zbioru obliczono wartości:

$$R=0,110$$

$$Q_1=0,836$$

$$Q_n=0,027$$

Z tablic rozkładu Q-Dixona (tabela1) odczytano wartość krytyczną parametru Q_{kr} , dla poziomu istotności $\alpha =0,05$ i liczby stopni swobody $f=n=9$

$$Q_{kr}=0,437$$

Ponieważ obliczona wartość Q_1 jest większa od wartości parametru krytycznego Q_{kr} ($Q_1 > Q_{kr}$), wynik najniższy w serii należy w niej odrzucić jako obarczony błędem grubym.

2. Oznaczanie błędów systematycznych.

a. Typ błędu systematycznego stałego.

Wymagania:

Próbki dwóch wzorców (materiały odniesienia) różniące się zawartością analitu.

Sposób postępowania:

Przeprowadza się serię pomiarów dla próbek dwóch wzorców (materiałów odniesienia) różniących się zawartością analitu, z zastosowaniem badanej metody. Wartość błędu systematycznego stałego a_{sys} oblicza się zgodnie ze wzorem:

$$a_{sys} = (u_{x1} \cdot x_{sr2} - u_{x2} \cdot x_{sr1}) : (u_{x1} - u_{x2})$$

gdzie: u_{x1} , u_{x2} – wartości oczekiwane dla próbek dwóch wzorców

x_{sr1} , x_{sr2} – uzyskane wartości średnie na podstawie analizy odpowiednich wzorców

Przykład 2.

Oznaczano zawartość jonów chlorkowych (Cl^-) w próbce roztworu wzorcowego o stężeniu $3,00 \text{ mg/dm}^3$ oraz w próbce tego roztworu po dwukrotnym rozcieńczeniu. Wykonano 11 równoległych oznaczeń stosując badaną procedurę. Zebrano uzyskane zbiory wyników:

Próbka roztworu wzorcowego 1 dla $u_{sr1} = 3,00 \text{ mg/dm}^3$

3,08 3,07 3,02 2,99 2,88 2,90 3,06 3,06 3,01 3,01 3,05

Próbka roztworu wzorcowego 2 (po dwukrotnym rozcieńczeniu roztworu wzorcowego 1.)

$u_{sr2} = 1,50 \text{ mg/dm}^3$

1,53 1,58 1,47 1,48 1,52 1,59 1,54 1,44 1,56 1,50 1,45

Wyznaczyć wartość błędu systematycznego stałego.

Dla dwóch zbiorów wyników obliczono wartości średnie:

$$x_{sr1} = 3,012 \text{ mg/dm}^3$$

$$x_{sr2} = 1,514 \text{ mg/dm}^3$$

Otrzymane wyniki podstawiono do wzoru i otrzymano wartość błędu systematycznego stałego:

$$a_{sys} = (3 \cdot 1,514 - 1,5 \cdot 3,012) : (3,00 - 1,50) = 0,016 \text{ mg/dm}^3$$

Otrzymana wartość wskazuje, że wyniki uzyskiwane w przypadku stosowania badanej metody są zawyżone w stosunku do wartości oczekiwanej, o czym świadczy dodatnia wartość błędu systematycznego stałego. W celu korekty wyniku należy od niego odjąć wartość obliczonego błędu systematycznego stałego.

b. Typ błędu systematycznego zmiennego.

Wymagania:

Próbka badana oraz próbka badana z dodatkiem wzorca.

Sposób postępowania:

Z zastosowaniem badanej metody przeprowadza się serię pomiarów dla badanej próbki i próbki z dodatkiem wzorca. Wartość mnożnika poprawkowego oblicza się zgodnie ze wzorem:

$$B = c_x : (x_{\text{srcx}} - x_{\text{sr}})$$

gdzie c_x – oczekiwana wartość wzrostu stężenia analitu spowodowana dodatkiem wzorca
 x_{sr} , x_{srcx} – uzyskane wartości średnie odpowiednio dla próbki i próbki z dodatkiem wzorca.

Wartość błędu systematycznego zmiennego wyznacza się zgodnie ze wzorem:

$$b_{\text{sys}} = (1 - B) : B$$

Przykład 3.

Oznaczano zawartość jonów magnezu (Mg^{2+}) w próbce wody deszczowej, a następnie zawartość jonów magnezu w próbce wody po dodaniu wzorca o stężeniu $c_x = 0,50 \text{ mg/dm}^3$.

W każdej z badanych próbek wykonano po 11 równoległych pomiarów:

Dla próbki wody deszczowej:

0,875 0,881 0,876 0,893 0,892 0,874 0,887 0,880 0,875 0,894 0,888

Dla próbki wody deszczowej z dodatkiem wzorca:

1,385 1,372 1,395 1,370 1,398 1,402 1,377 1,385 1,380 1,379 1,368

Wyznaczyć wartość błędu systematycznego zmiennego.

Na podstawie otrzymanych wyników obliczono wartości średnie:

$$x_{\text{sr}} = 0,8831 \text{ mg/dm}^3$$

$$x_{\text{srcx}} = 1,3828 \text{ mg/dm}^3$$

Podstawiając otrzymane wartości do wzoru na wartość mnożnika poprawkowego otrzymano:

$$B = 0,5 : (1,3828 - 0,8831) = 1,0006$$

Otrzymana wartość mnożnika poprawkowego $B > 1$ wskazuje, że wyniki uzyskiwane w przypadku korzystania z badanej (oceniaanej) metody są zaniżone w stosunku do wartości oczekiwanej.

Podstawiając otrzymane wartości do wzoru na wartość błędu systematycznego zmiennego otrzymano:

$$b_{\text{sys}} = (1 - 1,0006) : 1,0006 = - 0,0006$$

Otrzymana wartość błędu systematycznego pozwala na skorygowanie obliczonej zawartości magnezu w badanej próbce wody deszczowej:

$$x_{\text{kor}} = B \cdot x_{\text{sr}} = 1,0006 \cdot 0,8831 = 0,8836 \text{ mg/dm}^3$$

