

Walidacja metod analitycznych

- **Opracowanie statystyczne wyników**
- **Wzorce i materiały odniesienia**
- **Kalibracja**

Walidacja

Walidacja metod analitycznych to proces ustalania parametrów charakteryzujących sprawność działania i ograniczeń metody oraz sprawdzenie jej przydatności do określonych celów.

Metoda analityczna - wszystkie czynności związane z wykonaniem badań (analiz), od przygotowania próbki do pomiaru wielkości mierzonej, będącej podstawą oznaczenia i opracowania wyników.

Walidacja dotyczy stosowanej **aparatury pomiarowej, programowania** nią sterującego oraz procedury **opracowywania danych pomiarowych**.

Walidacja metod analitycznych obejmuje:

- proces ustalania *parametrów charakteryzujących sprawność działania i ograniczeń metody;*
- procedurę sprawdzającą czy *metoda analityczna jest wolna od błędów systematycznych i przypadkowych;*
- walidację dla *specjalistycznych instrumentów pomiarowych.*

Walidację wykonuje się:

- bezwzględnie dla wszystkich nowych metod, również prowadzona dla procedur modyfikowanych,
- przy próbach rozszerzenia zakresu stosowalności znanej metody analitycznej,
- gdy dana metoda analityczna ma być wykorzystywana w innym laboratorium, z zastosowaniem innej aparatury, przeprowadzana przez innego analityka,
- jeśli zmieniła się jakość odczynników chemicznych.

- Walidacja **pełna** - przeprowadzana, gdy metoda jest opracowywana lub wdrażana po raz pierwszy oraz w przypadku rozszerzenia istniejącej metody oznaczania.
- Walidacja **częściowa** - przeprowadzana, gdy w opracowanej i zwalidowanej metodzie wprowadzane są zmiany, np. przeniesienie metody między laboratoriami, zmiana metodologii analitycznej (np. zmiana rodzaju detekcji, zmiana sposobu przygotowania próbki do analizy), zakresu stężeń, aparatów pomiarowych i ich oprogramowania, zmiana selektywności ze względu na obecność w próbce nowych substancji lub metabolitów.

Wymagania dotyczące walidacji metod analitycznych regulują wytyczne:

- **ICH** (ang. *The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use*): ICH Topic Q2(R1) „Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”
- **USP** (ang. *The United States Pharmacopeia*)
- systemy zapewnienia jakości - normy ISO serii 9000, serii 17025, Dobra Praktyka Laboratoryjna (**GOOD LABORATORY PRACTICE – GLP**).

Parametry metody analitycznej podlegające procesowi walidacji:

Parametry	ICH	USP
Precyzja - powtarzalność	+	+
- precyzja pośrednia	+	
- odtwarzalność	+	
Dokładność	+	+
Granica wykrywalności	+	+
Granica oznaczalności	+	+
Specyficzność/selektywność	+	+
Liniowość	+	+
Zakres pomiarowy	+	+
Odporność		+
Elastyczność		+

Przed przystąpieniem do procesu walidacji należy zoptymalizować i określić podstawowe cechy charakterystyczne metody analitycznej:

- rodzaj oznaczanego składnika,
- zakres stężeń analitu,
- rodzaj matrycy,
- obecność substancji przeszkadzających (interferentów),
- rodzaj oczekiwanej informacji – ilościowa czy jakościowa,
- wymagana granica wykrywalności i oznaczalności;
- oczekiwana i wymagana precyzja i dokładność metody,
- wymagana wrażliwość (odporność) metody,
- wymagana aparatura – czy oznaczenia mają być wykonane na ściśle zdefiniowanym instrumencie, czy też mogą być prowadzone w oparciu o aparaturę tego samego typu,
- możliwość zastosowania walidowanej metody w innym niż dane laboratorium.

Proces walidacji metody analitycznej obejmuje:

- określenie selektywności w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych,
- wyznaczenie liniowości, wartości granic wykrywalności i oznaczalności, zakresu pomiarowego,
- określenie powtarzalności (krótkookresowa precyzja),
- wyznaczenie precyzji pośredniej,
- wyznaczenie dokładności/poprawności,
- określenie tolerancyjności metody.

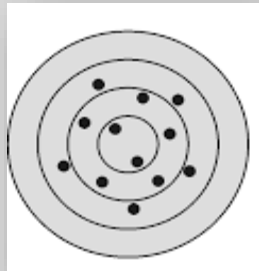
Proces walidacji metody analitycznej wymaga zastosowania:

- ślepych próbek,
- roztworów wzorcowych (kalibracyjnych, próbek testowych),
- próbek ze znaną ilością dodanego analitu (wzbogaconych w analit),
- (certyfikowanych) materiałów odniesienia,
- powtórzeń,
- obróbki statystycznej zbioru wyników.

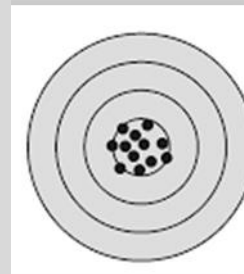
Precyzja

- *Powtarzalność*
- *Precyzja pośrednia*
- *Odtwarzalność*

Precyzja metody jest to **stopień zgodności** między wynikami uzyskanymi **tą samą metodą** i z **użyciem tej samej próbki** przy **wielokrotnym powtarzaniu** oznaczenia.



mała precyzja



duża precyzja

Precyzja odzwierciedla **błąd przypadkowy** w pomiarach.

- **Powtarzalność**

Precyzja oznaczeń, wyznaczana na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego serii pomiarów przeprowadzonych w *danym laboratorium*, przez *danego analityka* z wykorzystaniem *danego urządzenia pomiarowego w krótkim okresie czasu*.

- **Precyzja pośrednia**

Precyzja oznaczeń określana przez rozrzut wyników do wyznaczenia którego wykorzystuje się odchylenie standardowe serii pomiarów, uzyskanych tą *samą metodą, w jednym laboratorium lecz w dłuższym okresie czasu*.

Mają na nią wpływ *czynniki osobowe* i *aparaturowe*.

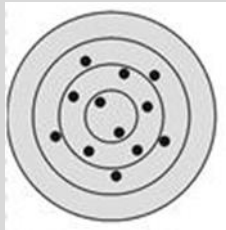
- **Odtwarzalność**

Wyznaczana na podstawie wartości odchylenia standardowego wyników uzyskanych *przez różne laboratoria* (wyniki *badania międzylaboratoryjnych*).

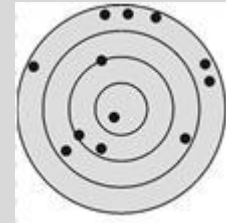
Dokładność i poprawność

Dokładność jest miarą zgodności między uzyskanym wynikiem pojedynczego pomiaru a wartością rzeczywistą (oczekiwaną).

Poprawność to stopień zgodności wyniku oznaczenia (jako wartości średniej obliczonej z serii pomiarów) z wartością oczekiwaną.



duża dokładność



mała dokładność

Miarami **dokładności** są:

- **Błąd bezwzględny, d_x**

$$d_{xi} = x_i - \mu_x$$

x_i – wartość zmierzona

μ_x – wartość prawdziwa lub przyjęta za prawdziwą mierzonej wielkości.

- **Błąd względny, ε_{xi}**

$$\varepsilon_{xi} = \frac{x_i - \mu_x}{\mu_x} \cdot 100\%$$

Dokładność

Dokładność może być wyrażana jako *procent odzysku*:

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

x – pierwotna (oznaczana) ilość analitu

s – dodana (znana) ilość analitu

Odzysk powinien wynosić 95-105% w przypadku składnika głównego i 80-120% dla składników śladowych.

Wyznaczanie dokładności metody:

- Analiza próbki o znanym stężeniu, np. CRM, i porównanie wyników uzyskanych walidowaną metodą z wartością prawdziwą.
- Porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi metodą referencyjną.
- Dodanie znanej ilości badanego analitu do próbki badanej i oznaczenie go sprawdzoną metodą. Odzysk analitu.

Granica wykrywalności i oznaczalności

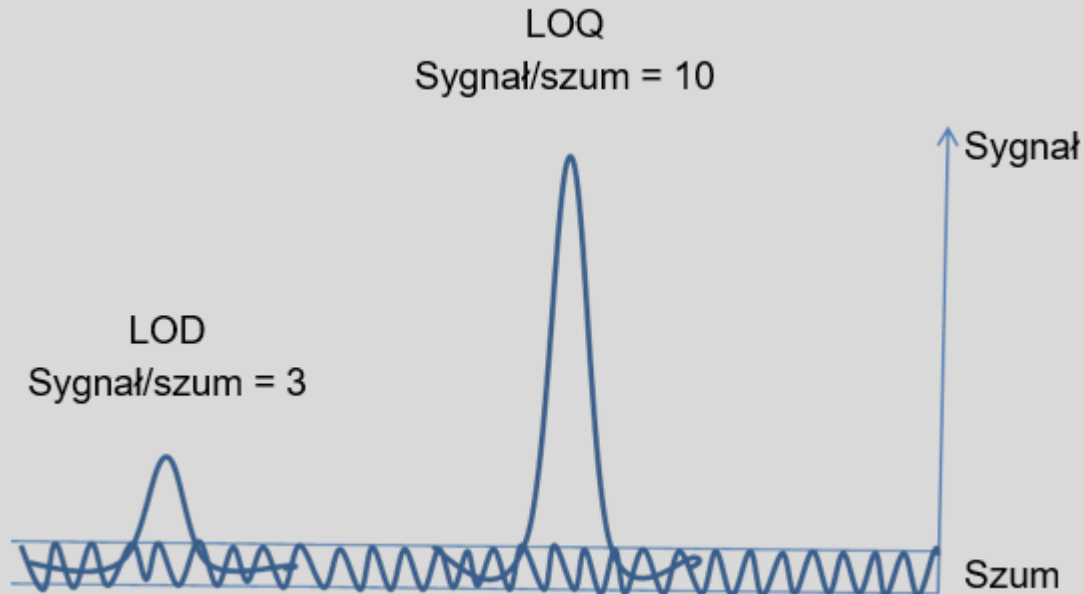
Granica wykrywalności (*limit of detection - LOD*)

- To najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji (pierwiastka, jonu, związku) możliwe do wykrycia za pomocą danej procedury analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.
- Dotyczy stosowanego instrumentu pomiarowego oraz metody analitycznej.

Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności

- Oszacowanie **wzrokowe**
- Obliczanie na podstawie stosunku **S/N**

Stosunek sygnału do szumu (signal to noise ratio – S/N) - wielkość bezwymiarowa, która stanowi stosunek sygnału analitycznego do średniego poziomu szumów w próbce.



Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności

- Obliczanie na podstawie wyników oznaczeń dla próbek ślepych, 10 niezależnych pomiarów dla 10 niezależnie przygotowanych ślepych próbek.

$$LOD = x_{\acute{s}r} + 3s$$

- Metoda **graficzna**, wykonanie oznaczenia dla 3 poziomów stężeń analitu (bliskich spodziewanej wartości granicy wykrywalności w próbkach) po co najmniej 6 równoległych oznaczeń.

$$s = f(c)$$

$$LOD = 3s_0$$

Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności

- Wyznaczana na podstawie odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej:

$$LOD = \frac{3,3s}{b}$$

b – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

s – odchylenie standardowe, wyznaczone:

- jako s wyników uzyskanych dla serii próbek ślepych,
- resztkowe odchylenie standardowe s_{xy} krzywej kalibracyjnej,
- jako s_a wyrazu wolnego uzyskanej krzywej kalibracyjnej.

Granica oznaczalności (*limit of quantification - LOQ*)

Najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji (pierwiastka, jonu, związku) możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją. Wyznaczona z:

- wartości granicy wykrywalności

$$LOQ = 3LOD$$

Znane są definicje, w których krotność wynosi 2 lub 6.

- parametrów regresji krzywej kalibracyjnej

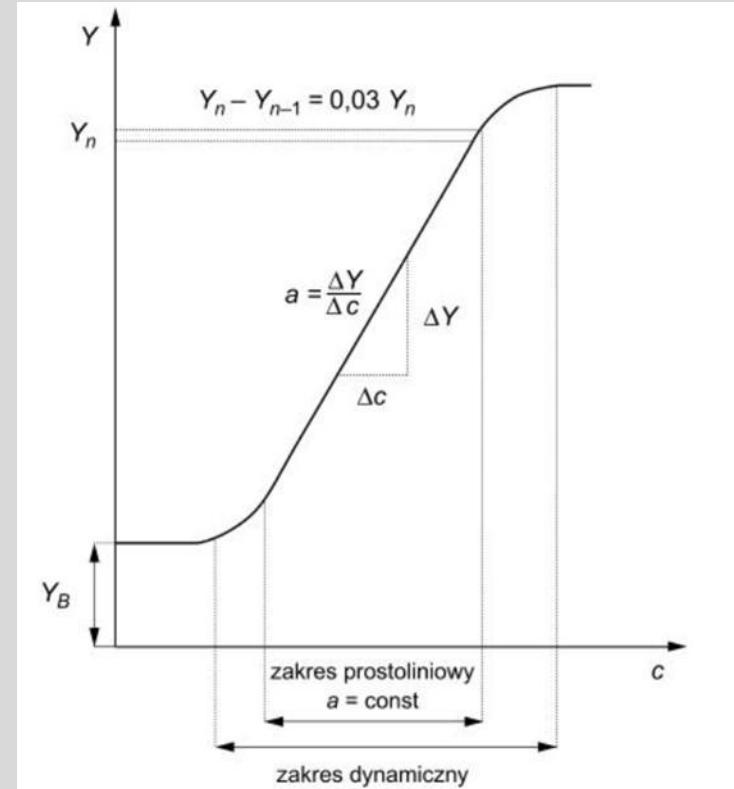
$$LOQ = \frac{10s_a}{b}$$

s_a - odchylenie standardowe wyrazu wolnego

b – współczynnik kierunkowy prostej

Liniowość, czułość, zakres pomiarowy

- **Liniowość** obejmuje przedział zawartości analitu, dla którego sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego jest proporcjonalny do tej zawartości.
- **Czułością metody analitycznej** nazywamy nachylenie krzywej kalibracyjnej, $y = ax + b$.
- **Zakres pomiarowy** - przedział między najniższym a najwyższym stężeniem, wraz z tymi stężeniami, jakie mogą zostać oznaczone za pomocą danej metody pomiarowej z założoną precyzją, dokładnością i liniowością.



Selektywność/Specyficzność

Według ICH:

Selektywność odnosi się do metod, które zapewniają wynik dla kilku substancji, ale jednocześnie możliwe jest rozróżnienie poszczególnych sygnałów.

Specyficzność odnosi się do metod, które można stosować tylko do pojedynczego analitu; metoda jest idealnie selektywna dla oznaczanej substancji.

Odporność metody analitycznej (niewrażliwość)

- Wyrażana jako stabilność uzyskiwanych wyników podczas występowania niewielkich zmian warunków eksperymentalnych opisanych w procedurze analitycznej.
- Walidację odporności metody analitycznej można przeprowadzić poprzez badania międzylaboratoryjne prowadzone przez dostatecznie dużą liczbę laboratoriów (≥ 8) stosujących tę samą procedurę analityczną.
- Można też ją przeprowadzić w jednym laboratorium wykonując planowaną ilość eksperymentów, zmieniając niektóre parametry i obserwując ich wpływ na wynik.

Elastyczność metody (tolerancyjność)

- Jest miarą stopnia, w jakim warunki doświadczalne (np. pH, temperatura, czystość odczynników, instrument, operator) mogą się zmienić bez znaczącego wpływu na uzyskiwane wyniki.

Stabilność

- Analizy powinna być przeprowadzona na świeżo przygotowanych odczynnikach. Jeżeli czas realizacji uległ wydłużeniu należy określić stabilność materiałów.
- Kryterium stabilności – trwałość przez przynajmniej 48 godzin. Roztwory trwałe - sygnał po 48 godz. zmienia się $\leq 2\%$ w porównaniu do sygnału próbki przygotowanej ze świeżych odczynników.

Raport końcowy przeprowadzonej walidacji metody analitycznej

- oznaczana metoda analityczna, rodzaj analitu, skład matrycy, spis wszystkich stosowanych odczynników, roztworów wzorcowych, materiałów odniesienia, wraz z ich specyfikacją, szczegółowy opis warunków przeprowadzenia metody analitycznej,
- spis używanego sprzętu laboratoryjnego oraz aparatury, wraz z ich cechami dotyczącymi wymiarów, klasy dokładności itd.,
- parametry procedury, założenia walidacyjne zgodne z ICH, opis postępowania statystycznego, wykonane testy, ich wyniki, kryteria rewalidacji,
- odpowiednie rysunki, wykresy, np. chromatogramy, krzywe kalibracyjne, itp.
- podsumowanie i wnioski, spis wykorzystywanej literatury,
- wymagane zasady BHP,
- imię i nazwisko osoby, która przeprowadziła proces walidacji,
- potwierdzenie i podpis osoby odpowiedzialnej za sprawdzenie i zatwierdzenie procesu walidacji.

Populacja generalna i próbka statystyczna

Populacja generalna, jest zbiorem, często nieskończonym, wszystkich pomiarów danego obiektu.

Próbka statystyczna jest niewielkim podzbiorem pomiarów wyodrębnionych z populacji, powinna reprezentować populację.

Średnia populacji μ

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

N – całkowita liczba pomiarów populacji

Średnia próbki \bar{x}

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

x_i – kolejne wartości x , które tworzą serię N , liczbę pomiarów w próbce

Odchylenie standardowe populacji (σ)

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$

$(x_i - \mu)$ określa odchylenie wyniku x_i od wartości średniej populacji μ

N – liczba wyników tworzących populację

Odchylenie standardowe próbki (s)

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

$(x_i - \bar{x})$ określa odchylenie d_i wartości x_i od wartości średniej próbki \bar{x} .

Odchylenie standardowe średniej (błąd standardowy), s_m $s_m = \frac{s}{\sqrt{N}}$

Wariancja próbki, s^2 $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1} = \frac{\sum_{i=1}^N d_i^2}{N-1}$

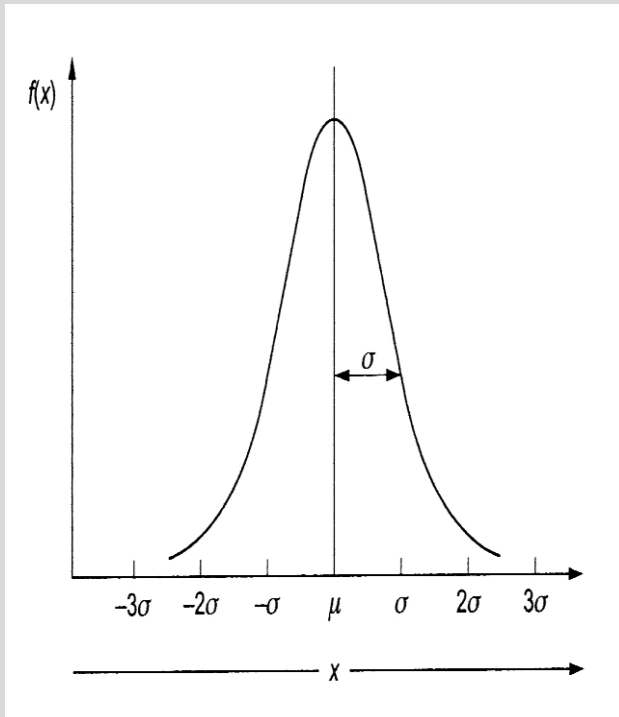
Względne odchylenie standardowe próbki (RSD, s_r) $RSD = s_r = \frac{s}{\bar{x}}$

Współczynnik zmienności (CV) $CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\%$

Przedział ufności to przedział, w którym znajduje się wartość prawdziwa. Jego wartości skrajne nazywane są **granicami przedziału ufności**.

Prawdopodobieństwo założone (w %), że wartość rzeczywista znajduje się w przedziale ufności określa się mianem **poziomu ufności**. W obliczeniach przyjmuje się wartość poziomu ufności **0,95** i **0,99**.

Rozkład normalny



Krzywa Gaussa przedstawiająca rozkład normalny błędów pomiarowych opisany równaniem:

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left[-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right]$$

x – wielkość mierzona, y – częstość (prawdopodobieństwo) jej wystąpienia
Dla rozkładu normalnego o średniej μ i odchyleniu standardowym σ :

- ok. 68% populacji generalnej leży w odległości $\pm 1\sigma$ od średniej;
- ok. 95% populacji generalnej leży w odległości $\pm 2\sigma$ od średniej;
- ok. 99,7% populacji generalnej leży w odległości $\pm 3\sigma$ od średniej.

Testy statystyczne

Test chi-kwadrat (χ^2) jest stosowany w celu sprawdzenia istotności różnicy między wartością odchylenia standardowego lub wariancji dla danego zbioru wyników a wartością zadaną. Warunkiem stosowania testu jest rozkład normalny wyników w badanym zbiorze.

$$\chi^2 = \frac{ns^2}{s_0^2}$$

s – odchylenie standardowe dla zbioru wyników

s_0 – zadane odchylenie standardowe

n – liczba wyników w danym zbiorze

Testy statystyczne

Test F-Snedecora jest stosowany w celu porównania wartości odchyłeń standardowych (wariancji) dla dwóch zbiorów wyników. Warunkiem stosowania testu jest rozkład normalny wyników w badanym zbiorze.

$$F = \frac{\frac{n_1}{n_1 - 1} s_1^2}{\frac{n_2}{n_2 - 1} s_2^2}$$

s_1, s_2 – obliczone wartości odchylenia standardowego dla dwóch zbiorów wyników

n_1, n_2 – liczba wyników dla dwóch zbiorów

Testy statystyczne

Test *t*-Studenta jest stosowany w celu *porównania istotności różnic dwóch wartości średnich* oraz *istotności różnic wartości średniej z założoną wartością*.

Testy statystyczne

W przypadku porównania **istotności różnic dwóch wartości średnich**:

- obliczamy wartości średnie i wartości odchylenia standardowego dla serii wyników,
- obliczamy wartości parametru testu *t*-Studenta zgodnie z zależnością:

$$t = \frac{(x_{1\acute{s}r} - x_{2\acute{s}r})}{\sqrt{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}} \sqrt{\frac{n_1 n_2 (n_1 + n_2 - 2)}{n_1 + n_2}}$$

$x_{1\acute{s}r}$, $x_{2\acute{s}r}$ – wartości średnie obliczone dla dwóch porównywanych zbiorów wyników.

Gdy licznosci serii są jednakowe:

$$t = \frac{|x_{1\acute{s}r} - x_{2\acute{s}r}|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}} \sqrt{n}$$

Testy statystyczne

W przypadku zastosowania testu t-Studenta do porównania ***istotności różnic między wartością średnią a wartością zadaną***:

- obliczyć wartość parametru t, korzystając z zależności:

$$t = \frac{|x_{\text{śr}} - \mu|}{s} \sqrt{n}$$

$x_{\text{śr}}$ – wartość średnia, μ - wartość odniesienia (np. certyfikowana), s – odchylenie standardowe zbioru wyników, na podstawie których obliczono średnią, n – liczba wyników

Inne testy statystyczne:

- stosowane w celu porównania wartości odchylenia standardowego (wariancji) dla wielu zbiorów wyników – test Hartleya, test Bartletta;
- stosowane w celu porównania wartości odchylenia standardowego (wariancji) dla dwóch zbiorów wyników zależnych, skorelowanych – test Morgana;
- stosowane w celu porównania wartości średnich dla tych zbiorów wyników, dla których wartości odchyłeń standardowych (wariancji) różnią się w sposób statystycznie istotny – test Cochran-Coxa, test Aspin-Welcha;
- służący do weryfikacji hipotezy, że dwie populacje (zbiory wyników) charakteryzują się jednakowym rozkładem – test Kołmogorowa-Smirnowa;
- test zmienności wewnątrzlaboratoryjnej – test Cochran;
- stosowane w celu wykrycia wyników wątpliwych – test Hampela, test Dixona i test Grubbsa.

Wzorce i materiały odniesienia

Materiał odniesienia **(*Reference Material* – RM)**

Wg VIM „materiał lub substancja, których jedna lub więcej wartości ich właściwości są dostatecznie jednorodne i na tyle dobrze określone, aby mogły być stosowane do wzorcowania przyrządu, do oceny metody pomiarowej lub do przypisania wartości właściwościom materiałów”.

Certyfikowany materiał odniesienia **(*Certified Reference Material* – CRM)**

Wg VIM „materiał opatrzony certyfikatem, charakteryzujący się wartością lub wartościami danej właściwości, które certyfikowano zgodnie z procedurą zapewniającą odniesienie do dokładnej realizacji jednostki miary, w której wyrażane są wartości danej właściwości; każdej wartości certyfikowanej powinna być przy tym przypisana niepewność odpowiadająca określonemu poziomowi ufności”.

Rodzaje chemicznych materiałów odniesienia

- **Czyste substancje, odczynniki czyste do analizy (cz.d.a.),** wymagania określone przez Komitet do Spraw Odczynników Amerykańskiego Towarzystwa Chemicznego (ACS – *American Chemical Society*). Powszechnie wykorzystywane w laboratorium analitycznym. W specyfikacji maksymalne dopuszczalne poziomy zanieczyszczeń lub rzeczywiste zanieczyszczenia w danym produkcie.
- **Roztwory wzorcowe i mieszaniny gazowe,** sporządzone zazwyczaj grawimetrycznie z czystych substancji.
- **Matrycowe materiały odniesienia,** naturalne bądź syntetyczne.

Materiały odniesienia

Podział pod względem hierarchii metrologicznej:

- **pierwotne materiały odniesienia** – o najwyższej jakości metrologicznej, poddane kontroli w badaniach międzylaboratoryjnych, wytwarzane są przez narodowe instytuty metrologiczne;
- **certyfikowane materiały odniesienia** - wytwarzane przez akredytowane laboratoria wzorcujące lub producentów posiadających odpowiednie uprawnienia;
- **laboratoryjne materiały odniesienia i materiały do kontroli jakości** - również wytwarzane przez akredytowane laboratoria.

Niecertyfikowane materiały odniesienia (laboratoryjne i do kontroli jakości; tańsze, łatwiej dostępne) i ***certyfikowane materiały odniesienia*** (pierwotne materiały odniesienia i certyfikowane materiały odniesienia; drogie, trudno dostępne) różnią się głównie *dokładnością, precyzją oraz wartością niepewności wyznaczenia określonych parametrów.*

Materiały odniesienia

- **bezmatrixowe** będące czystymi substancjami i roztworami wzorcowymi,
- **matrixowe** będące mieszaninami różnych substancji, stosowane w pomiarach gdzie konieczne jest podobieństwo składu materiału odniesienia do składu próbki.

Rola chemicznych materiałów odniesienia

- **Kalibracja aparatury pomiarowej** - czyste substancje, roztwory wzorcowe, mieszaniny gazowe.
- **Walidacja procedur analitycznych** – matrixowe materiały odniesienia.
- **Potwierdzenie kompetencji** laboratoriów i pojedynczych analityków.

Wzorzec pomiarowy

Wzorzec pomiarowy pierwotny (*primary standard*) – wzorzec, który jest wyznaczony lub powszechnie uznawany jako posiadający najwyższą metrologiczną jakość i którego wartość jest przyjęta bez odniesienia do innych wzorców tej samej wielkości.

Wzorzec pomiarowy wtórny (*secondary standard*) – wzorzec, którego wartość jest wyznaczona poprzez porównanie z wzorcem pierwotnym tej samej wielkości.

Produkcja CRM

- **Państwowy Instytut Wzorców i Technologii (NIST) w USA.**
- **W Europie niemiecki Federalny Instytut Badania Materiałów i Testowania – BAM oraz Federalny Instytut Metrologii – PTB, na Słowacji Laboratorium Materiałów Odniesienia Zakładu Chemii – SMU.**
- **W Polsce: Laboratorium Gęstości, Lepkości i Analizy Spektralnej oraz Laboratorium Elektrochemii Głównego Urzędu Miar w Warszawie; Pracownia Wzorców Chemicznych (PWCh) Wydziału Chemii Analitycznej i Fizykochemii Okręgowego Urzędu Miar(OUM) w Łodzi.**

Kalibracja

Proces, podczas którego wyznaczana jest zależność funkcyjna pomiędzy mierzonym w danej metodzie sygnałem a wielkością określającą ilość oznaczanego składnika na podstawie danych obarczonych błędami przypadkowymi.

Według *IUPAC* wyróżnia się dwa rodzaje kalibracji:

- **kalibrację jakościową** – stosowaną w przypadku używania detektorów uniwersalnych, do określenia, który sygnał odpowiada określonemu analitowi;
- **kalibrację ilościową** (kalibracja liniowa i kalibracja nieliniowa) – stosowaną do określenia, jaka zawartość oznaczanego składnika jest odpowiedzialna za dany sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego.

Kalibracja instrumentu (cechowanie, wzorcowanie), proces, w którym przenoszona jest nominalna (certyfikowana) wartość przypisana do wzorca (próbki wzorcowej) na rzeczywiste wartości sygnału otrzymywane przy pomiarze danym instrumentem.

Kalibracja analityczna, pod tym pojęciem należy rozumieć proces polegający na odwzorowaniu rzeczywistej (prawdziwej, teoretycznej) zależności sygnału analitycznego od stężenia analitu – ***zależność kalibracyjna*** do postaci empirycznej – ***wykresu kalibracyjnego*** a następnie na wykorzystaniu tego wykresu do wyznaczenia stężenia tego analitu w badanej próbce – uzyskanie ***wyniku analitycznego***.

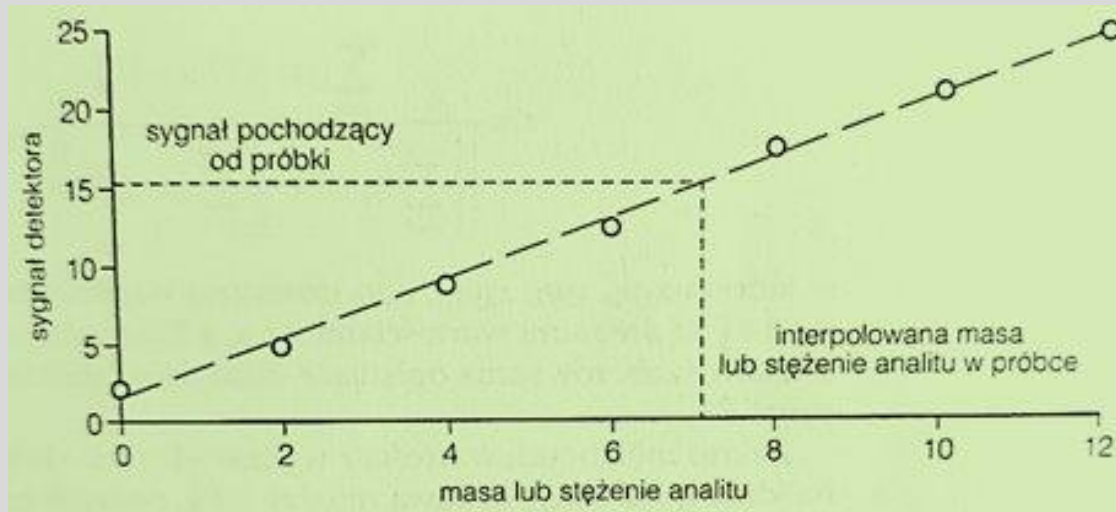
Kalibracja analityczna

Etapy kalibracji analitycznej:

- **laboratoryjny** – przygotowanie roztworów wzorcowych,
- **pomiarowy** – tworzenie wykresu kalibracyjnego,
- **matematyczny** – obliczenie wartości wyniku analitycznego.

Funkcja kalibracyjna

Sporządzenie krzywej kalibracyjnej służy ustaleniu **funkcji kalibracyjnej**:
 $Y=f(c)$, $Y=a \cdot c$



Y – wielkość mierzona;

c – stężenie analitu;

a – współczynnik proporcjonalności, który został wyznaczony w procesie kalibracji.

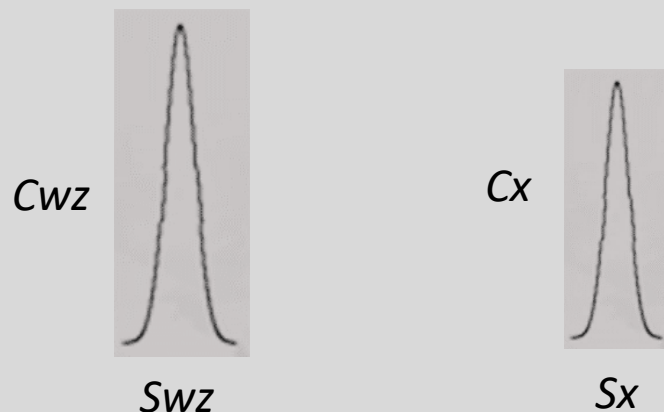
Równanie krzywej kalibracyjnej można wyznaczyć **metodą najmniejszych kwadratów (regresji liniowej)**. Zgodność zależności sygnału od stężenia charakteryzuje współczynnik korelacji (r).

Wyznaczanie funkcji kalibracyjnej:

- Należy stosować wiarygodne **materiały odniesienia** (najlepiej **CMR**).
- Wykonanie szeregu pomiarów w roztworach standardowych o różnym stężeniu substancji oznaczanej.
- Zwykle stosuje się 7-10 roztworów o różnych stężeniach.
- Pomiar w każdym roztworze standardowym powtarzany jest zwykle 3-razy, następnie jest uśredniany.
- Matryca próbki i roztworów standardowych powinna być identyczna.
- Stężenie roztworu standardowego oraz zmierzony sygnał - dane kalibracyjne.
- Dopasowania funkcji do danych kalibracyjnych.

Metody kalibracji

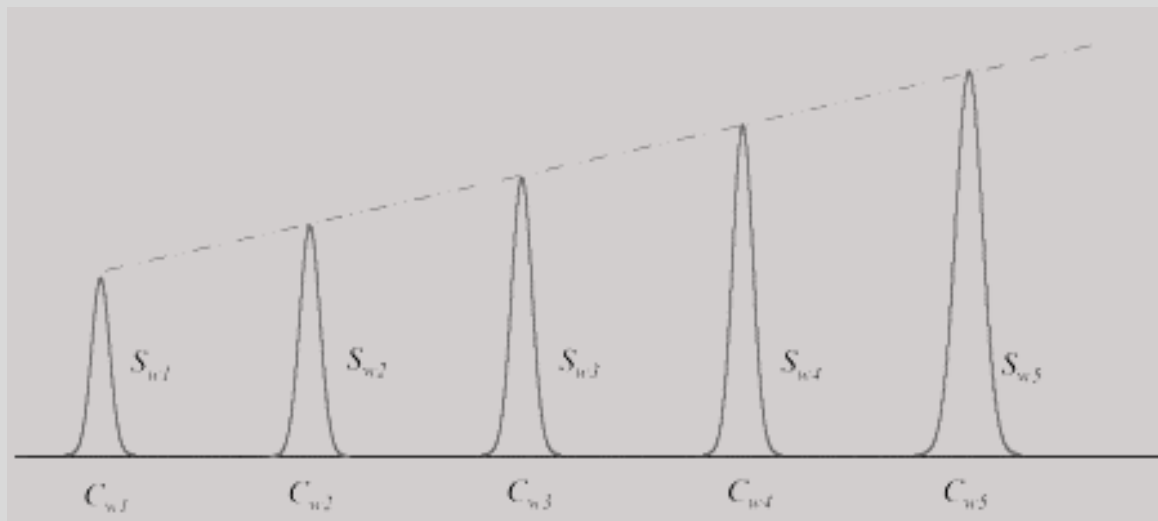
***Kalibracja na podstawie jednego punktu pomiarowego
(kalibracja jednopunktowa, metoda jednego wzorca, metoda porównania ze wzorcem)***



$$c_x = c_{wz} \frac{S_x}{S_{wz}}$$

c_x – zawartość analitu w próbce; c_{wz} – zawartość analitu w próbce wzorca;
 S_x – sygnał urządzenia pomiarowego dla próbki, S_{wz} – sygnał urządzenia pomiarowego dla próbki wzorca.

Kalibracja na podstawie krzywej wzorcowej (kalibracja wielopunktowa) – metoda wzorca zewnętrznego

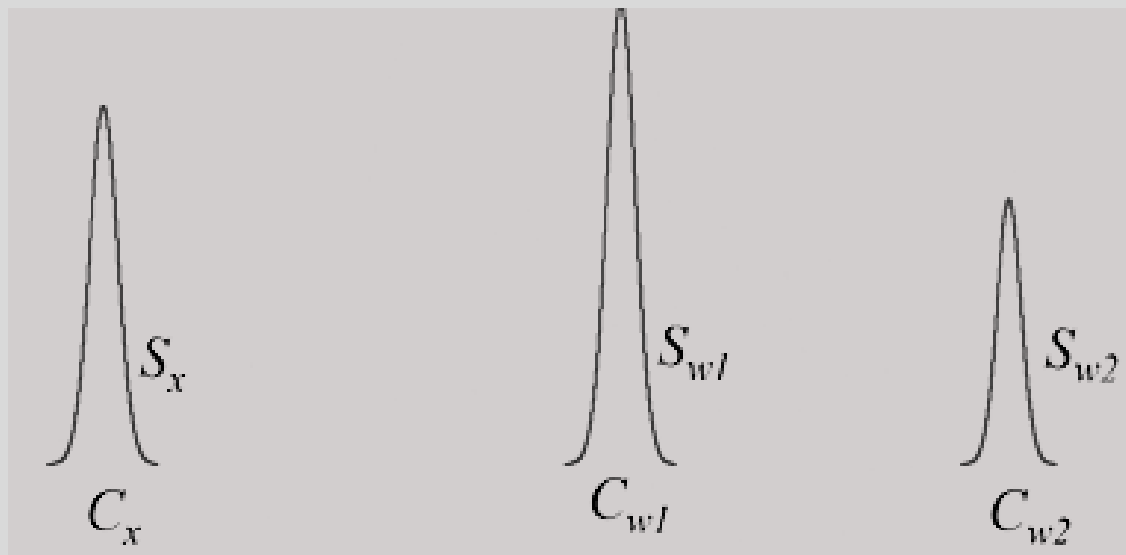


Wyznacza się zależność $S = f(c)$ prostą o postaci $S = a + bc$, po uzyskaniu sygnału dla analitu obecnego w próbce oblicza się wynik oznaczenia ze wzoru:

$$c_x = \frac{S_x - a}{b}$$

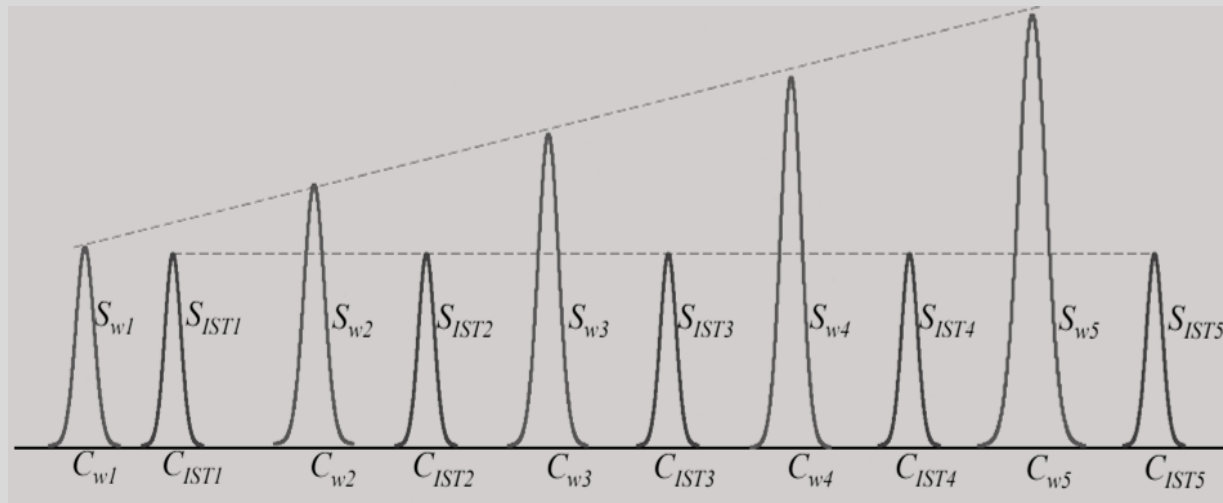
Kalibracja z wykorzystaniem techniki wzorców ograniczających

Wykonuje się trzy pomiary: jeden dla próbki rzeczywistej i dwa dla próbek roztworów wzorcowych, w których zawartość analitu jest większa i mniejsza od jego zawartości w próbce rzeczywistej. Im różnica stężeń analitu w próbkach wzorcowych jest mniejsza uzyskany wynik jest dokładniejszy.



Metoda wzorca wewnętrznego - do roztworu zawierającego analit i roztwory wzorcowe dodaje się dodatkowo określoną ilość *wzorca wewnętrznego*.

Worzec wewnętrzny - substancja odniesienia o właściwościach chemicznych i fizycznych *podobnych* do właściwości analitu, *nie powinien oddziaływać* z analitem, a uzyskany dla niego sygnał analityczny powinien być dobrze oddzielony od sygnału analitu.



Bibliografia:

- pod red. P. Konieczko, J. Namieśnik: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych, Wydawnictwo WNT Warszawa 2017
- J. Miller, J. Miller: Statystyka i chemometria w chemii analitycznej, PWN Warszawa 2016
- D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch: Podstawy Chemii Analitycznej, PWN Warszawa 2006