Projekt "Operacja - Integracja 3.0!" - III etap wdrażania Zintegrowanego Programu Uczelni jest współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, umowa nr FERS.01.05-IP.08-0226/23-00

Materiały dydaktyczne (SKRYPT)

dla studentów II roku

kierunku ANALITYKA MEDYCZNA

do przedmiotu **Chemia analityczna i instrumentalna**

Materiały uzupełniające

Analiza instrumentalna

AUTORZY: Elżbieta Brzezińska, Grażyna Żydek, Karolina Wanat, Arleta Borowiak, Jarosław Pyzowski, Anna Sobańska

Łódź, 2026

Niniejszy materiał dydaktyczny (skrypt) powstał w ramach realizacji przez Uniwersytet Medyczny w Łodzi projektu pt.: "Operacja - Integracja 3.0!" - III etap wdrażania Zintegrowanego Programu Uczelni, który jest współfinansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027 współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, umowa nr FERS.01.05-IP.08-0226/23-00

CHEMIA ANALITYCZNA i INSTRUMENTALNA
MATERIAŁY DODATKOWE
ANALIZA INSTRUMENTALNA

Spis treści

I. Przebieg i organizacja przedmiotu „Chemia analityczna i instrumentalna” (str. 1 – 7)
II. Analityka – wprowadzenie i podział metod analitycznych (str. 8 – 46)
III. Zasady tworzenia krzywej kalibracji (str. 47 – 53)
IV. Rodzaje i podział elektrod (str. 54 – 64)
V. Walidacja metod analitycznych (str. 65 – 88)
VI. Błędy w analizie chemicznej (str. 89 – 96)
VII. Kryteria wyboru w planowaniu i realizacji analizy chemicznej (str. 97 – 109)

UWAGA!

Źródła i zakres treści obowiązujących do przygotowania na zajęcia praktyczne, wskazane są w treści „instrukcji do ćwiczeń” – „materiały dydaktyczne”, na stronie Zakładu Chemii Analitycznej. Przewodnik laboratoryjny i inne materiały dotyczące analizy klasycznej zawarte są w SKRYPCIE dla I roku kierunku FARMACJA (II-VIII rozdziału), zamieszczonego w Państwa zakładce „materiały dydaktyczne” na stronie Zakładu Chemii Analitycznej.

Podręczniki obowiązujące:

Chemia Analityczna – pod redakcją Ryszarda Kocjana; PZWL, 2023

D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch *Podstawy Chemii Analitycznej* PWN, 2006

Materiały przygotowane przez Zakład Chemii Analitycznej dostępne na stronie internetowej

I. Przebieg i organizacja przedmiotu „Chemia analityczna i instrumentalna”

W Zakładzie Chemii Analitycznej prowadzimy przedmiot „Chemia analityczna i instrumentalna” przeznaczony dla studentów kierunku analityka medyczna. Jego szczegółowy przebieg zawarty jest w „karcie przedmiotu”, czyli przewodniku dydaktycznym, zamieszczonym w systemie Wirtualnej Uczelni (WU) oraz na stronie dydaktycznej Zakładu Chemii Analitycznej.

W semestrze zimowym II roku studiów odbywają się ćwiczenia, w liczbie dziesięciu sześciogodzinnych spotkań, w grupach laboratoryjnych, dwa ćwiczenia pięciogodzinne, w grupach dziekańskich oraz dziesięć dwugodzinnych wykładów, online. Ćwiczenia podzielone są merytorycznie i organizacyjnie na trzy części.

Część pierwszą stanowi praktyczne nauczanie ANALIZY KLASYCZNEJ – 4 ćwiczenia w grupach laboratoryjnych – 24 godziny. Ćwiczenia związane są ze zdobyciem wiedzy i umiejętności z zakresu poprawnej pracy laboratoryjnej oraz wykonywania oznaczeń metodami wolumetrycznymi. Przygotowanie teoretyczne do zajęć i dokładność wykonania ćwiczeń są oceniane każdorazowo. W tym czasie zdobywają Państwo również umiejętność rozwiązywania zadań rachunkowych. Przykłady zadań rachunkowych, wraz z opisem metodyki ich rozwiązywania, dostępne są wśród „materiałów dydaktycznych”, na stronie Zakładu. Na ćwiczeniach odbywają się sprawdziany z rozwiązywania wskazanych działów zadań rachunkowych, które są oceniane. Średnia ocen z tych sprawdzianów wliczana jest do ogólnej oceny zajęć praktycznych. Po zakończeniu ćwiczeń ANALIZY KLASYCZNEJ, organizowane jest kolokwium sprawdzające. Kolokwium obejmuje część teoretyczną analizy klasycznej, zasad poprawnej pracy laboratoryjnej oraz umiejętności rozwiązywania zadań rachunkowych w analizie klasycznej. Ponieważ przedmiot jest kontynuowany, materiał zaliczony tym sprawdzianem, jest automatycznie zaliczony na egzaminie końcowym (dotyczy zaliczonych działów sprawdzianu). Kolokwium ma charakter nieobowiązkowy i nie przewiduje terminów poprawkowych.

Część druga obejmuje 6 sześciogodzinnych ćwiczeń, w grupach laboratoryjnych z zakresu ANALIZY INSTRUMENTALNEJ. Prowadzimy 36 godzin zajęć praktycznych z zastosowaniem różnej aparatury analitycznej. Przygotowanie teoretyczne do zajęć i wykonanie ćwiczeń są oceniane na każdych zajęciach.

Część trzecia, to dwa ćwiczenia, prowadzone w grupach dziekańskich – 2 ćwiczenia pięciogodzinne – 10 godzin. Obejmują one zdobywanie umiejętności kolorymetrycznego wyznaczania widm barwników oraz interpretowania widm IR, NMR i MS. Ćwiczenie drugie może być prowadzone stacjonarnie lub online.

Egzamin końcowy dotyczy niezaliczonej części efektów uczenia się z ANALIZY KLASYCZNEJ, CZYNNOŚCI LABORATORYJNYCH, ZADAŃ RACHUNKOWYCH oraz całości materiału ANALIZY INSTRUMENTALNEJ, WALIDACJI METOD, KRYTERIÓW DOBORU METODY ANALITYCZNEJ i BŁĘDÓW W ANALIZIE CHEMICZNEJ. **Egzamin ma charakter pisemny**. Ocena z części pisemnej stanowi część wyniku końcowego zaliczenia przedmiotu. Wynik końcowy zaliczenia przedmiotu obliczany jest po uzyskaniu zaliczenia **każdego efektu uczenia się**, wymienionego w „karcie przedmiotu", zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 26 lipca 2019 r. w sprawie standardów kształcenia przygotowującego do wykonywania zawodu lekarza, lekarza dentysty, farmaceuty, pielęgniarki, położnej, diagnosty laboratoryjnego, fizjoterapeuty i ratownika medycznego. Oznaczenia są zgodne z treścią Rozporządzenia:

Ogólne

Wiedza – student zna i rozumie:

O.W4. podstawy teoretyczne i metodyczne zastosowania instrumentalnych metod analitycznych w diagnostyce laboratoryjnej +++;

O.W5. zasady wykonywania badań laboratoryjnych przy użyciu metod manualnych i technik zautomatyzowanych oraz autoryzacji wyników +++;

Umiejętności – student potrafi:

O.U3. wykonywać badania laboratoryjne oraz uzyskiwać wiarygodne wyniki +++;

O.U9. wyszukiwać i selekcjonować informacje z różnych źródeł, dokonywać ich krytycznej oceny oraz formułować opinie +;

O.U13. komunikować się ze współpracownikami w zespole i dzielić się wiedzą ++;

Kompetencje – student jest gotów do:

O.K2 pracy w zespole, przyjmując w nim różne role, ustalając priorytety, dbając o bezpieczeństwo własne, współpracowników i otoczenia ++;

O.K7. formułowania wniosków z własnych pomiarów lub obserwacji ++;

Szczegółowe

Wiedza – student zna i rozumie:

B.W05. analityczne metody jakościowej i ilościowej oceny związków nieorganicznych i organicznych oraz celowość stosowania tych metod w analizie medycznej +++;

B.W10. klasyczne metody analizy ilościowej – analizę wagową, analizę objętościową i analizę gazową ++;

B.W11. klasyfikację instrumentalnych technik analitycznych oraz podstawy teoretyczne i metodyczne technik spektroskopowych, elektroanalitycznych, chromatograficznych i spektrometrii mas oraz ich zastosowanie w medycznej diagnostyce laboratoryjnej +++;

B.W12. zasady funkcjonowania aparatów stosowanych w spektrofotometrii w zakresie nadfioletu i promieniowania widzialnego, podczerwieni, spektrofluorymetrii, absorpcyjnej i emisyjnej spektrometrii atomowej, potencjometrii, konduktometrii, chromatografii gazowej, wysokosprawnej chromatografii cieczowej, chromatografii cienkowarstwowej i spektrometrii mas +++;

B.W13. kryteria wyboru metody analitycznej oraz statystyczne podstawy jej walidacji +++.

Umiejętności – student potrafi:

B**.U1.** stosować podstawowe techniki laboratoryjne, w tym chemiczną analizę jakościową ++;

B.U2. dokonywać doboru metody analitycznej oraz oceniać jej przydatność w kontekście celu analizy, kalibracji metody, precyzji wykonania i obliczania +++;

B.U3. wykonywać obliczenia chemiczne +++;

B.U8. dobierać metodę analityczną służącą do rozwiązania konkretnego zadania analitycznego oraz przeprowadzać jej walidację +++;

B.U10. wykonywać wszystkie czynności laboratoryjne z dbałością pozwalającą na zachowanie pełnego bezpieczeństwa swojego i osób współpracujących +++;

B.U15. posługiwać się programami komputerowymi w zakresie edycji tekstu, grafiki, analizy statystycznej, przygotowania prezentacji oraz gromadzenia i wyszukiwania potrzebnych informacji, pozwalających na konstruktywne rozwiązywanie problemów +.

Każdy efekt uczenia się oceniany jest odrębnie, z użyciem średniej punktacji, bez zaokrąglenia w górę (np. pkt 1–1,99 – ocena dostateczna), uzyskanej dla danego efektu: 1 pkt – ocena dostateczna; 2 pkt – ocena dość dobra; 3 pkt – ocena dobra; 4 pkt – ocena ponad dobra; 5 pkt – ocena bardzo dobra; 0 pkt – ocena niedostateczna. Efekt uczenia się może być zaliczony po uzyskaniu średniej (co najmniej) 1 pkt.

Przygotowanie do zajęć praktycznych (kartkówki z zadań i teoria w zakresie tematu ćwiczenia) są punktowane i wpływają na ocenę, ale ich zaliczenie nie zwalnia z rozliczenia na egzaminie lub kolokwium. Ocena końcowa obliczana jest po uzyskaniu co najmniej 1 punktu (średnio) z każdego efektu uczenia się, według wzoru:

$$(\overline{W}) \times 50\% + (\overline{U}) \times 40\% + (\overline{K}) \times 10\% = 1 - 5 \text{ punktów}$$

Wartości punktów i odpowiadające im oceny:

1 – 1,99 pkt – ocena dostateczna

2 – 2,99 pkt – dość dobry

3 – 3,99 pkt – dobry

4 – 4,84 pkt – ponad dobry

4,85 – 5 pkt – bardzo dobry

Forma i warunki zaliczenia/egzaminu w terminach poprawkowych II/III: Egzamin pisemny

Prosimy o szczegółowe zapoznanie się z „kartą przedmiotu" CHEMIA ANALITYCZNA I INSTRUMENTALNA w Wirtualnej Uczelni lub na stronie Zakładu Chemii Analitycznej.

Wszystkie zajęcia praktyczne przedmiotu realizowane są w laboratorium chemicznym. Na początkowych zajęciach prowadzimy więc naukę właściwego postępowania laboratoryjnego i wykonywania czynności laboratoryjnych, zapewniające wiarygodność wyników analitycznych. Te ćwiczenia pozwolą Państwu na swobodną i skuteczną pracę analityczną, unikanie popularnych błędów i unikania niebezpieczeństw pracy w laboratorium chemicznym. Niezbędne materiały teoretyczne, dotyczące poprawnego wykonywania czynności laboratoryjnych i tematyki ANALIZY KLASYCZNEJ znajdą Państwo w skrypcie zatytułowanym: „**Materiały dydaktyczne (SKRYPT) dla studentów I roku kierunku Farmacja do przedmiotu Chemia analityczna, Przewodnik laboratoryjny Analiza klasyczna**". Przedstawia on i systematyzuje teoretyczne zasady postępowania. Zamieszczony w nim tekst pozwoli Państwu zauważyć, że nawet najprostsza czynność (np. mycie szkła laboratoryjnego), w chemii analitycznej traktowana jest bardzo poważnie i według wielu ustalonych zasad, które zapewniają dobrą jakość pracy analityka.

Z przyczyn technicznych, ten skrypt jest dedykowany studentom Farmacji, ale przeznaczony również dla Państwa. Jego treść obowiązuje Państwa na kolokwium i egzaminie. Z tych samych przyczyn aktualny skrypt i jego treści, dedykowany studentom Analityki Medycznej, obowiązuje studentów Farmacji. Przebieg ćwiczeń, związanych z podstawowymi

czynnościami laboratoryjnymi, są dostępne w „materiałach dydaktycznych”, w zakładce „instrukcje do ćwiczeń”, „analiza klasyczna”.

Znajomość materiału teoretycznego obowiązuje na ćwiczeniach i egzaminie. Wykonanie ćwiczeń oceniane jest w ich przebiegu.

II. Analityka – wprowadzenie i podział metod analitycznych

Analityka – chemia analityczna – jest dyscypliną naukową stosowaną do badania składu próbki, struktury analitu, struktury połączeń pomiędzy składnikami, oznaczeń ilościowych i zachowania materii, również pod wpływem działających czynników środowiska. Jej celem jest zbieranie i interpretowanie danych analitycznych, które są przydatne w celu identyfikacji i oznaczania składników materii. Analiza chemiczna obejmuje zastosowanie wielu technik i metod w celu uzyskania i oszacowania jakościowych, ilościowych i strukturalnych informacji o istocie materii.

Zakres wykorzystania informacji analitycznej:

1. Medycyna – diagnostyka laboratoryjna, farmacja, toksykologia, monitorowanie farmakoterapii, badanie produkcji i działania leków.
2. Badania naukowe i rozwojowe w różnych dziedzinach;
3. Badania żywności – składu, jakości, trwałości;
4. Ochrona środowiska – monitoring, badanie jakości powietrza, badanie jakość i skażenia wody, badanie ścieków;
5. Rolnictwo – badanie jakości plonów, badanie jakości i składu gleby, wpływ stosowanych środków ochrony roślin na otoczenie;
6. Przemysł – kontrola procesu technologicznego, kontrola emisji i ścieków, kontrola produktu;
7. Sztuka – badanie wieku, autentyczności i składu różnych obiektów (analiza nieniszcząca);
8. Archeologia i geologia – badania wieku wykopalisk i składu minerałów;
9. Kryminalistyka – badanie materiału dowodowego, wykrywanie narkotyków.

Chemia analityczna jako dyscyplina naukowa, której celem jest opracowanie metod określenia skład chemicznego próbek substancji i ich mieszanin, daje nam w tych wszystkich przypadkach zastosowań odpowiedź na liczne pytania. Dotyczą one nie tylko ilości i identyfikacji analitu, ale również jego właściwości oraz potencjalnych oddziaływań ze środowiskiem, w którym się znajduje. Dzięki wiedzy, jakiej dostarczają analityczne oznaczenia substancji znanych, przewidywać można nawet właściwości substancji o strukturach teoretycznych. Chemia analityczna proponuje więc: ANALIZĘ ILOŚCIOWĄ, ANALIZĘ JAKOŚCIOWĄ, ANALIZĘ STRUKTURALNĄ. Z tych podstawowych grup analiz, biorąc pod uwagę szerokie możliwości i zastosowania wiedzy z zakresu chemii analitycznej, wynikają

inne, bardziej zaawansowane analizy, służące rozwiązaniu złożonych problemów różnych dziedzin.

Analityka, w praktyce, oparta jest na kilku podstawowych zasadach:

1. Źródłem informacji analitycznej jest próbka i zawarte w niej składniki;
2. Informację uzyskuje się przez wywołanie i zinterpretowanie sygnału analitycznego (mierzonej wielkości fizycznej lub fizykochemicznej);
3. Prawie każda właściwość chemiczna, fizyczna i fizykochemiczna, charakteryzująca analit lub ich mieszaninę, może stać się podstawą oznaczenia;
4. Analityka bada nie próbkę, lecz obiekt badany (*obiekt globalny*). Ilość informacji o badanym obiekcie ogranicza się więc do informacji zawartej w analizowanej próbce;
5. Próbka reprezentatywna musi zawierać wszystkie cechy obiektu globalnego. Źle pobrana próbka nie reprezentuje obiektu badanego;
6. Jakość wyników każdej metody analitycznej ograniczona jest umiejętnościami analityka.

Stosowane podziały analitycznych technik i metod analitycznych opierają się na

- źródłach informacji analitycznej, jako podstawy pomiaru;
- sposobu realizacji metody i jej wymagań technicznych;
- zastosowania analizy.

Poniżej przedstawiono przykłady technik i metod analitycznych opartych na tym podziale.

Źródło informacji analitycznej jako podstawa pomiaru.

Właściwości chemiczne

1. **Obserwacja przebiegu reakcji analitycznych**
   a. ***Grawimetria*** – reakcja analityczna – wymiana jonów;
   b. ***Wolumetria*** – wymiana protonów (***alkacymetria***); wymiana elektronów (***redoksymetria***); wymiana ligandów (***kompleksometria***).

Właściwości fizyczne

1. **Masa**

   a. ***Grawimetria*** – masa produktów reakcji strącania analitu. *Mierzona wielkość* – masa czystego analitu lub związku o znanej stechiometrii. Pomiar na podstawie reakcji chemicznych. *Główne zastosowania* – oznaczanie składników głównych i pobocznych

   b. ***Elektrograwimetria*** – *Mierzona wielkością* jest masa substancji wydzielonej na elektrodzie. Najczęściej produktem ważonym jest metal. Jest to elektrochemiczna metoda analizy ilościowej. Polega ona na ilościowym wydzieleniu oznaczanego składnika na elektrodzie w procesie elektrolizy, a następnie oznaczeniu jego masy poprzez dokładne zważenie elektrody przed i po procesie. *Główne zastosowanie* – oznaczanie metali, najczęściej miedzi i cynku w roztworach.

   c. ***Termograwimetria (TG, TGA)*** to technika analizy termicznej. Polega na precyzyjnym rejestrowaniu zmian masy próbki, najczęściej ubytku, ale również przyrostu, podczas jej ogrzewania, chłodzenia lub w stałej temperaturze w określonym czasie. Umożliwia wyznaczanie temperatur rozkładu i innych przemian składu materiałów. *Mierzoną wielkością* jest – ubytek masy analitu, jako efekt cieplny ze zmianą masy. Główne zastosowanie – określanie składu (np. zawartość wypełniaczy, sadzy) oraz stabilności termicznej polimerów i tworzyw sztucznych. W farmacji oznaczanie wilgoci, badanie czystości i stabilności leku. Ponadto badanie procesów utleniania, korozji, rozkładu związków nieorganicznych (węglanów, siarczanów). Temperatura próbki zwykle wzrasta w czasie pomiaru z ustalona szybkością lub zmienia się w inny, uprzednio zaprogramowany, sposób. Wynik pomiaru, zwany termogramem, zawiera wykres zależności masy próbki od temperatury (sygnał TG) oraz jej pierwszej pochodnej (DTG). Termograwimetria może stosowana do analizy próbek wykazujących zmiany masy podczas ogrzewania, zachodzące podczas reakcji chemicznej (rozkładu, utleniania albo redukcji) czy też przemiany fizycznej (parowania, sublimacji lub desorpcji). Przyrząd do pomiarów TG, czyli termograwimetr, składa się z wagi o wysokiej czułości, pieca umożliwiającego ogrzewanie próbki do temperatury 1500-1800°C oraz układu dozowania gazów omywających próbkę. Pomiary TG zwykle prowadzi się w atmosferze utleniającej (O_2 lub powietrze) lub w atmosferze gazu obojętnego (N_2 lub Ar). Niektóre przyrządy umożliwiają zmianę gazu w trakcie pomiaru. W nowoczesnych termograwimetrach można jednocześnie z pomiarem TG wykonywać pomiary metodą różnicowej analizy termicznej (DTA).

2. Objętość

a. ***Miareczkowanie*** to metoda analizy ilościowej w chemii, polegająca na powolnym (miareczkami) dodawaniu roztworu o znanym stężeniu (titranta – roztworu mianowanego) do roztworu o stężeniu nieznanym (analitu), aż do całkowitego przereagowania obu substancji– objętość titranta. *Mierzona wielkość* – objętość zużytego titranta. Podstawowe rodzaje miareczkowania zależne są od rodzaju reakcji chemicznej, zachodzącej pomiędzy titrantem i analitem. Są to: reakcja zobojętniania, kwasowo-zasadowa – alkacymetria; reakcja utleniania i redukcji – redoksymetria; tworzenia trwałych związków kompleksowych – kompleksometria; powstawania trudno rozpuszczalnych osadów – precypitometria, miareczkowanie strąceniowe. *Główne zastosowanie* – badania laboratoryjne krwi (oznaczanie poziomu glukozy, mocznika, elektrolitów); kontrola jakości leku (zawartość substancji czynnej, kontrola pH preparatów); badanie ścieków; badanie czystości wody; badanie czystości powietrza (obecność dwutlenku siarki); badanie jakości produktów spożywczych (kwasowość mleka, soków, wina); analiza gleby i nawozów.

b. ***Gazometria*** to badanie krwi, które mierzy poziom tlenu, dwutlenku węgla oraz pH. *Mierzona wielkość* – ciśnienie parcjalne tlenu, dwutlenku węgla, wodorowęglanów oraz wartość pH. Ocenia wydolność oddechową i równowagę kwasowo-zasadową organizmu. Pomaga wykryć niewydolność oddechową, kwasicę lub zasadowicę. Krew pobiera się najczęściej z tętnicy lub z płatka ucha, z palca. *Główne zastosowanie* to badania w medycynie ratunkowej, intensywnej terapii (wyniki służą do wyznaczenia parametrów pracy respiratora), pulmonologii (leczenie POChP, astmy, zapalenia płuc, kwalifikacji do tlenoterapii), zaburzeniach metabolicznych (wykrywanie kwasicy cukrzycowej, kwasicy mleczanowej we wstrząsie, zasadowicy w przewlekłych wymiotach). W niewydolności oddechowej odróżnia problemy z pobieraniem tlenu i eliminacją dwutlenku węgla.

3. Ładunek

a. ***Kulometria*** – grupa metod elektrochemicznych, w których ilość substancji poddawanej elektrolizie oblicza się na podstawie prawa Faradaya. *Mierzoną wielkością* jest całkowity ładunek elektryczny (Q) zużyty do pełnego utlenienia lub redukcji analitu (elektroliza). ***Kulometria potencjostatyczna*** – stały potencjał elektrody i pomiar prądu w czasie. ***Kulometria amperostatyczna*** – w warunkach stałego prądu. Głównym zastosowaniem jest: oznaczanie małych ilości wody w lekach, żywności,

rozpuszczalnikach; oznaczanie jonów w płynach ustrojowych; badanie czystości substancji czynnej w lekach; analiza środowiskowa; przemysł petrochemiczny.

4. Absorpcja promieniowania

a. ***Spektrofotometria absorpcyjna cząsteczkowa*** – metoda wykorzystująca pomiar absorpcji światła do ilościowego oznaczania związków nieorganicznych i organicznych najbardziej rozpowszechnione techniki to: kolorymetria (VIS), spektrofotometria w nadfiolecie (UV), spektroskopia w średniej podczerwieni (IR), spektroskopia w bliskiej podczerwieni (NIR). Jest to określenie stosowane dla metod spektroskopowych, w których mierzona jest absorpcja promieniowania elektromagnetycznego w funkcji długości fali, następująca w wyniku interakcji z próbką lub badanym obiektem. *Mierzona wielkość* – długość fali i natężenie promieniowania elektromagnetycznego rozpraszanego, emitowanego lub absorbowanego przez analit. Pomiar na podstawie oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z analitem. ***(UV-Vis)*** – metoda analityczna wykorzystuje absorpcję promieniowania elektromagnetycznego w zakresie ultrafioletu i światła widzialnego (o długości fali 100-800 nm), wynikającą ze wzbudzenia elektronów walencyjnych w cząsteczkach naświetlanych substancji. Spektroskopię UV-Vis wykorzystuje się do oznaczania zawartości substancji absorbujących, zwłaszcza związków organicznych zawierające wiązania wielokrotne oraz związki metali przejściowych. Może być też ona stosowana do identyfikacji substancji. W skład spektrofotometru UV-Vis wchodzi źródło promieniowania (zwykle lampa deuterowa lub halogenowo-wolframowa), siatka dyfrakcyjna rozszczepiająca wiązkę światła, kwarcowa komora pomiarowa oraz detektor (najczęściej fotopowielacz lub detektor fotoprzewodzący). Niekiedy stosowane są wielokanałowe matrycowe detektory fotodiodowe (diode-aray detector), zawierające kilkaset elementów światłoczułych, umożliwiające szybki pomiar widma w całym zakresie UV-Vis. ***(IR)*** – metoda analityczna wykorzystująca absorpcję lub emisję promieniowania ze środkowego zakresu podczerwieni (o długości fali 2.5-50 μm), związaną ze wzbudzeniem drgań cząsteczek wchodzących w skład próbki. Wszystkie cząsteczki wykazują pewne drgania charakterystyczne (tzw. drgania normalne), które można przypisać do określonych wiązań lub grup funkcyjnych. Spektroskopia IR jest wykorzystywana do identyfikacji substancji (zwłaszcza związków organicznych), jak i do oznaczania ich zawartości. Nowoczesne fourierowskie spektrometry podczerwieni umożliwiają wyznaczenie widma próbki poprzez analizę jej oddziaływania z tzw. interferogramem. Sygnał, reprezentujący interferogram próbki, jest przetwarzany w jej

widmo (czyli zależność absorbancji od długości fali) na drodze komputerowych obliczeń, z zastosowaniem tzw. transformaty Fouriera. Jako źródła promieniowania wykorzystuje się lampy wolframowe lub żarniki emitujące ciągłe promieniowanie o rozkładzie zbliżonym do widma promieniowania ciała doskonale czarnego. Spektroskopia w podczerwieni umożliwia dostosowanie techniki pomiarowej do stanu skupienia i rodzaju próbki. Najbardziej rozpowszechniona jest technika transmisyjna, ponadto wykorzystuje się techniki ***tłumionego wewnętrznego odbicia (ATR)***, odbicia rozproszonego (DR) oraz odbicia zwierciadlanego (SR/RA). *Główne zastosowania* – analiza jakościowa, ilościowa i strukturalna analitów, od głównego składnika do śladów

b. ***Absorpcyjna spektrometria atomowa (ASA)*** - metoda oznaczania stężenia poszczególnych pierwiastków metalicznych, w której światło przechodzi przez odparowaną lub atomizowaną próbkę, a następnie analizowane są zmiany w jego widmie. (ASA), Zasada pomiaru opiera się na zjawisku absorpcji promieniowania o specyficznej (analitycznej) długości fali przez *wolne atomy* metali. Wywołanie efektu absorpcji atomowej wymaga atomizacji próbki, czyli jej odparowania i dysocjacji cząsteczek na atomy. Atomowa spektroskopia absorpcyjna jest bardzo czułą metodą analityczną umożliwiającą specyficzne oznaczanie zawartości różnych pierwiastków, zwłaszcza metali. W skład spektrofotometru AAS wchodzi źródło promieniowania charakterystycznego, atomizer umożliwiający wytworzenie gazu atomowego, monochromator (np. siatka dyfrakcyjna) oraz detektor (fotopowielacz). Jako źródła promieniowania stosuje się specjalne lampy zawierające pobudzane do emisji promieniowania atomy oznaczanego pierwiastka. Próbka jest poddawana atomizacji w specjalnym palniku acetylenowym lub piecu grafitowym, elektrycznie ogrzewanym do bardzo wysokiej temperatury.

c. ***Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR, MRJ)*** – technika spektroskopowa obserwacji lokalnych pól magnetycznych wokół jąder atomowych. Badana substancja, umieszczona jest w polu i wzbudzana za pomocą fal radiowych, co wytwarza sygnał NMR, który jest wykrywany przy użyciu czułych odbiorników radiowych i komputerowo przekształcany w widmo lub obraz. Wewnątrzcząsteczkowe pole magnetyczne wokół atomu w cząsteczce zmienia częstotliwość rezonansową, dając w ten sposób informację o szczegółach struktury elektronowej cząsteczki i jej poszczególnych elementów struktury chemicznej (grup funkcyjnych). Oprócz identyfikacji analitu, spektroskopia NMR dostarcza szczegółowych informacji o strukturze, dynamice, stanie reakcji i środowisku chemicznym cząsteczek. *Główne*

zastosowania – chemiczne (ustalenie budowy i składu chemicznego badanej substancji; medyczne (nieinwazyjna metoda obrazowania narządów wewnętrznych i tkanek, bez użycia promieniowania jonizującego.

d. ***Absorpcja promieniowania rentgenowskiego*** - technika analityczna należąca do absorpcyjnych metod spektroskopii atomowej. Pozwala na rejestrowanie i analizę efektów oddziaływania promieniowania rentgenowskiego z materią. Możliwa jest zarówno ilościowa, jak i jakościowa analiza badanej substancji. Fotony promieniowania rentgenowskiego przekazują całą swoją energię elektronowi z głębokich powłok atomu, wybijając go. W miejsce tych elektronów przeskakują elektrony z wyższej powłoki, emitując promieniowanie charakterystyczne. Innym mechanizmem jest zderzenie fotonów z elektronem swobodnym lub słabo związanym. W wyniku tego zderzenia traci część energii i zmienia kierunek (rozproszenie). Widoczne są również możliwości obrazowania różnic w gęstości materiałów (np. tkanek – kości zawierają znaczne ilości wapnia o dużej liczbie atomowej, więc absorbują promieniowanie silniej niż tkanki miękkie). Główne zastosowania – badania diagnostyczne (zdjęcia RTG, tomografia komputerowa TK, mammografia, fluoroskopia); chemia (badanie struktury geometrycznej, badanie struktury elektronowej).

e. ***Elektronowy rezonans paramagnetyczny (EPR)***, zwany też elektronowym rezonansem spinowym ***(ESR)***, to spektroskopowa metoda analityczna służąca do wykrywania i analizowania cząsteczek posiadających niesparowane elektrony, które znajdują się w wolnych rodnikach. Występuje tu zjawisko absorpcji promieniowania mikrofalowego przez próbkę umieszczoną w zewnętrznym polu magnetycznym. Technika wykorzystuje fakt, że niesparowany elektron posiada swój własny moment pędu (spin) i moment magnetyczny. W silnym polu magnetycznym następuje rozszczepienie poziomów energetycznych elektronu. Promieniowanie mikrofalowe o odpowiedniej częstotliwości powodują, że elektrony przechodzą między tymi poziomami energetycznymi. Metoda ta jest bardzo czuła na zmiany w mikrootoczeniu elektronów niesparowanych. *Głównym zastosowaniem* są: badania chemiczne i fizyczne (identyfikacja rodników i badanie mechanizmów reakcji chemicznych); biologia i medycyna (wykrywanie stresu oksydacyjnego oraz badanie centrów aktywnych w enzymach); geologia i archeologia (datowanie minerałów i kości); inne (analiza defektów sieci krystalicznej, półprzewodników czy materiałów wykorzystywanych w fotowoltaice).

5. Rozproszenie i absorpcja promieniowania

a. ***Turbidymetria*** – metoda spektrofotometryczna i metoda optyczna służąca do pomiaru mętności roztworów. *Mierzona wielkość* – jest ona oparta na osłabieniu wiązki światła przechodzącego przez badaną próbkę z zawiesiną, poprzez pomiar absorbancji pozornej lub transmitancji pozornej. Głównymi elementami tej techniki są pomiar natężenia światła, wykorzystanie prawa Lamberta-Beera oraz użycie zwykłego spektrofotometru – kolorymetru. Badane jest światło przechodzące przez kuwetę wprost do detektora. Metoda stosowana głównie do zawiesin i koloidów o rozmiarach cząstek powyżej 100 nm. *Głównym zastosowaniem* jest – oznaczanie stężeń (wykrywanie jonów w postaci osadów); biologia i medycyna (pomiar ilości biomasy mikroorganizmów lub stężenia białek); ocena czystości wody i produktów chemicznych

6. Rozproszenie promieniowania

a. ***Nefelometria*** - to instrumentalna metoda analityczna służąca do oznaczania stężenia roztworów koloidalnych. *Mierzoną wielkością* jest natężenie światła rozproszonego przez cząstki koloidów fazowych lub cząsteczki koloidów wielkocząsteczkowych. Zasada działania opiera się na zjawisku fizycznym (efekcie Tyndalla), rozproszenia promieniowania wiązki światła przechodzącego przez badaną próbkę. Drobiny (dyspersja) zawieszone w roztworze rozpraszają światło, a detektor ustawiony zazwyczaj pod kątem 90° mierzy jego natężenie. Ponieważ ilość rozproszonego światła jest wprost proporcjonalna do ilości drobin (ich stężenia), pozwala to na bardzo precyzyjne i ilościowe określenie składu próbki. Najczęściej wykorzystuje się ją w medycynie do oznaczania stężenia specyficznych białek w płynach ustrojowych, takich jak surowica krwi. *Głównym zastosowaniem* jest ilościowe oznaczanie stężenia specyficznych białek w laboratoriach medycznych. Dzięki wysokiej czułości metoda ta pozwala na wczesne wykrywanie stanów zapalnych, chorób zakaźnych oraz zaburzeń układu odpornościowego. W diagnostyce laboratoryjnej nefelometrię wykorzystuje się do analizy krwi, płynu mózgowo-rdzeniowego oraz moczu (oznaczania białek ostrej fazy – do monitorowania stanów zapalnych i infekcji np. białko C-reaktywne CRP; immunoglobulin (przeciwciał) - ocena odporności organizmu poprzez pomiar stężeń immunoglobulin IgG, IgM oraz IgA; składników dopełniacza – w diagnostyce chorób autoimmunologicznych; innych specyficznych białek – transferryny, ferrytyny, związanych z gospodarką żelazem; oznaczanie albuminy w moczu – we wczesnym wykrywaniu uszkodzenia nerek). Nefelometria

znalazła tez zastosowanie w obszarach, gdzie kluczowa jest kontrola czystości roztworów lub analiza cząstek zawieszonych: pomiar stopnia zanieczyszczenia i zmętnienia wód naturalnych oraz ścieków; kontrola czystości mikrobiologicznej leków oraz monitorowanie stabilności preparatów białkowych; ocena klarowności napojów, soków oraz piwa w procesie produkcyjnym.

b. ***Dyfrakcja promieni rentgenowskich (XRD)*** to nieniszcząca technika badawcza polegająca na ugięciu promieni rentgenowskich na atomach sieci krystalicznej. Służy do poznawania struktury atomowej, identyfikacji faz krystalicznych, wyznaczania odległości między płaszczyznami atomowymi oraz pomiaru naprężenia w materiałach. Promieniowanie rentgenowskie pada tu na kryształ, a jego fale uginają się na regularnie rozmieszczonych atomach. Powstaje wzór interferencyjny. Kąty odbicia opisuje prawo Bragga. *Główne zastosowania* – krystalografia **(o**kreślanie budowy cząsteczek i sieci); analiza fazowa **-** wykrywanie minerałów i związków chemicznych w proszkach.; inżynieria materiałowa – badanie cienkich warstw, stopów i wad strukturalnych).

7. Odbicie światła

a. ***Reflektometria*** – jest działem fotometrii. Reflektometria to technika pomiarowa używana głównie do badania kabli, światłowodów i innych materiałów za pomocą analizy fal. *Mierzona wielkość* – czas, w jakim wysłany impuls dociera do przeszkody lub końca ośrodka i wraca jako echo, co pozwala dokładnie zlokalizować uszkodzenia, przerwy w przewodach oraz ocenić ich jakość. Główne zastosowania - akustyczna (wykorzystuje fale dźwiękowe w medycynie do nieinwazyjnej diagnostyki ucha środkowego); rentgenowska (do analizy powierzchni ciał stałych, powłok oraz badania kryształów); częstotliwościowa (używana w rolnictwie i budownictwie do określania wilgotności gleby lub materiałów); diagnostyka laboratoryjna (reflektometria laboratoryjna używana jest do ilościowego oznaczania składników w roztworach za pomocą specjalnych ***testów paskowych***. Urządzenie mierzy intensywność barwy światła odbitego od paska testowego, co pozwala precyzyjnie określić np. stężenie określonych jonów, pozostałości nadtlenków czy zanieczyszczeń w procesie walidacji czyszczenia linii produkcyjnych); farmacja apteczna i diagnostyka (analiza światła odbitego zasila popularne ***glukometry paskowe*** oraz automatyczne ***analizatory moczu***, które pacjenci i farmaceuci wykorzystują do szybkich testów diagnostycznych).

8. Załamanie światła

a. ***Refraktometria*** – to metoda polegająca na pomiarze współczynnika załamania światła przechodzącego przez substancję. Służy do oznaczania stężenia roztworów, identyfikacji związków chemicznych oraz – w medycynie – do komputerowego badania wad wzroku (autorefraktometria oka). Zasadą działania: światło zmienia kierunek i prędkość, gdy przechodzi pomiędzy ośrodkami o różnej gęstości; kąt załamania zależy od gęstości optycznej i stężenia roztworu. Do pomiarów używa się urządzenia o nazwie ***refraktometr***. Główne zastosowania: w farmacji jest podstawową metodą opisana w Farmakopei (wynik pozwala sprawdzić czystość substancji; do kontroli czystości surowców, potwierdzenia tożsamość i czystość substancji płynnych; służy do precyzyjnego pomiaru zawartości substancji czynnych (API) oraz substancji pomocniczych, np. cukru w syropach medycznych czy stężenia glukozy w płynach infuzyjnych; monitorowanie procesów krystalizacji, syntez chemicznych oraz rozpuszczania, aby kontrolować poprawność przebiegu produkcji), w diagnostyce (szybkie, komputerowe badanie ostrości widzenia oraz wykrywanie krótkowzroczności, dalekowzroczności lub astygmatyzmu)

b. ***Interferometria*** – technika wykorzystująca zjawisko interferencji fal elektromagnetycznych światła lub fal radiowych. Najczęściej służy do precyzyjnych pomiarów i kontroli jakości elementów i układów optycznych. W diagnostyce medycznej jest podstawą działania urządzenia do skanowania siatkówki oka.

9. Skręcanie płaszczyzny polaryzacji światła spolaryzowanego

a. ***Polarymetria*** – technika analityczna polegająca na pomiarze stężenia substancji optycznie czynnej na podstawie wielkości kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji światła. Urządzenie, przy pomocy którego dokonuje się pomiaru nazywane jest polarymetrem. Jest to możliwe dzięki temu, że ***wielkość kąta skręcenia dla danej substancji jest proporcjonalna do stężenia tej substancji w roztworze***. Przez polarymetrię rozumie się też często oznaczanie kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji czystych związków chemicznych. Oprócz oznaczania stężeń związków czynnych optycznie, technika ta umożliwia także pomiar czystości optycznej enancjomerów.

10. Emisja promieniowania

a. ***Fotometria płomieniowa*** – *Mierzona wielkość* – promieniowanie emitowane przez odpowiednio wzbudzoną próbkę. Jako źródło wzbudzenia stosuje się płomień palnika, do którego wprowadza się badaną substancję, w postaci rozpylonego, przy użyciu sprężonego powietrza, roztworu. Wzbudzone w płomieniu atomy spalają się emitując

określoną długość fali i powstaje charakterystyczne widmo. Światło płomienia przechodzi przez układ optyczny z filtrem przepuszczającym jedynie widmo badanego pierwiastka i trafia na fotoogniwo, gdzie powstały prąd elektryczny pozwala wyznaczyć ilość badanej substancji. *Metoda stosowana jest głównie* do pomiaru stężenia metali alkalicznych i metali ziem alkalicznych (sód, potas, wapń, magnez, stront). W diagnostyce medycznej – badanie moczu, badanie surowicy krwi i tkanek.

b. ***Spektrografia i spektrometria emisyjna*** – to technika analityczna służąca do badania składu chemicznego substancji. Działa na zasadzie analizy promieniowania światła emitowanego przez analit, po wcześniejszym dostarczeniu energii, np. poprzez podgrzanie lub wyładowanie elektryczne. Atomy lub cząsteczki próbki przechodzą w stan wzbudzony. Następnie wracają do stanu podstawowego, oddając nadmiar energii w postaci promieniowania elektromagnetycznego i ciepła. Każdy pierwiastek emituje światło o charakterystycznych dla siebie długościach fal, co tworzy jego unikalny "odcisk palca" – widmo emisyjne. Analiza widma pozwala określić, jakie pierwiastki znajdują się w próbce (analiza jakościowa) oraz jaka jest ich ilość (analiza ilościowa). W diagnostyce medycznej stosowana jest do oznaczania zawartości pierwiastków śladowych w tkankach.

c. ***Atomowa spektroskopia emisyjna z wzbudzaniem plazmowym (ICP-AES)*** – atomy wykazują zdolność do emisji promieniowania charakterystycznego dla poszczególnych pierwiastków. Wywołanie efektu emisji atomowej wymaga dostarczenia energii koniecznej do odparowania próbki, dysocjacji zawartych w niej cząsteczek i wzbudzenia powstałych atomów do wyższych stanów energetycznych. Wykorzystuje się w tym celu plazmę generowaną indukcyjnie za pomocą zmiennego pola elektromagnetycznego. Plazmowa emisyjna spektroskopia atomowa jest czułą metodą analityczną umożliwiającą jednoczesne oznaczanie zawartości wielu pierwiastków. Jest to podstawowa metoda wykorzystywana do analiz elementarnych. W skład ***spektrofotometru ICP-EAS*** wchodzi specjalny „palnik" plazmowy, monochromator lub polichromator oraz detektor (fotopowielacz). Przez palnik przepływa argon, którego atomy (po jonizacji do jonów Ar^+) są przyspieszane w polu elektromagnetycznym. Do indukowanej w ten sposób plazmy wprowadzana jest próbka, zwykle jako aerozol roztworu wodnego w strumieniu argonu.

d. ***Fluorescencja rentgenowska (XRF)*** - to szybka i nieniszcząca technika analityczna służąca do badania składu pierwiastkowego materiałów stałych, proszków i cieczy. Polega na naświetlaniu próbki promieniami X, co wywołuje emisję

charakterystycznego promieniowania wtórnego unikalnego dla każdego pierwiastka. Początkowo następuje wzbudzenie – promieniowanie pierwotne wybija elektron z wewnętrznej powłoki atomu. Elektron z wyższej powłoki wskakuje na wolne miejsce i emituje promieniowanie. Powstaje kwant promieniowania X o energii charakterystycznej dla danego pierwiastka. *Odpowiedni detektor mierzy* energię i ilość fotonów. *Główne zastosowania* – przemysł, geologia, ochrona środowiska, archeologia i sztuka (nieniszczące datowanie i badanie składu).

e. ***Fluorescencja atomowa*** – to zjawisko fizyczne, w którym atomy pochłaniają energię (np. światło z lampy lub lasera) i natychmiast emitują ją w postaci własnego promieniowania. Światło to ma inną długość fali niż światło wzbudzające. Proces ten trwa tylko tak długo, jak długo działa źródło światła. Atomy w próbce są oświetlane światłem o konkretnej długości fali. Pochłaniają tę energię i przeskakują na wyższy poziom energetyczny – następuje wzbudzenie. Wzbudzony atom jest niestabilny i szybko wraca do stanu podstawowego. Nadmiar energii oddaje w postaci uwolnionego fotonu – następuje emisja. *Detektor mierzy* jasność i barwę wyemitowanego światła. Metoda stosowana jest do wykrywania nawet śladowych ilości: rtęci, arsenu, selenu, ołowiu, cynku. Pomiary są bardzo szybkie, a technika wymaga niewielkiej ilości badanej substancji. *Główne zastosowania:* w ochronie środowiska (do wykrywania toksycznych metali ciężkich w wodzie, glebie czy powietrzu); w przemyśle spożywczym (do sprawdzania czystości żywności i pasz); w diagnostyce medycznej (do analizy składu próbek materiału biologicznego).

f. ***Spektrofluorymetria*** - rodzaj spektroskopii promieniowania elektromagnetycznego, w której analizuje się fluorescencję próbki wywołaną zazwyczaj światłem ultrafioletowym (UV) lub promieniowaniem rentgenowskim. W spektrofluorymetrii wykorzystuje się zjawisko ***luminescencji***, które dzieli się na: fluorescencję – polegającej na przejściu ze wzbudzonego stanu S_1, na stan podstawowy S_0 oraz fosforescencji – polegającej na przejściu ze stanu trypletowego T_1, na stan singletowy S_0. Emitowane fotony mają mniejszą energię niż fotony promieniowania wzbudzającego, więc widmo fluorescencji jest przesunięte w kierunku dłuższych fal w stosunku do widma absorpcji. Widmo fosforescencji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych, zarówno względem widma absorpcji, jak i widma fluorescencji. *Główne zastosowania* – tę czułą metodę można wykorzystywać do analizy ilościowej i jakościowej. Do opisu ilościowego stosuje się zazwyczaj metodę krzywej wzorcowej i zależność intensywności fluorescencji do stężenia próbki. W medycynie – do analizy:

witamin, hormonów, leków. A także związków nieorganicznych, głównie kationów, które tworzą związki kompleksowe z organicznymi ligandami umożliwiającymi fluorescencję. Związki nieorganiczne można oznaczać przy bardzo niskich stężeniach, do 0,5 ng/cm³.

11. Strumień cząsteczek naładowanych i jonów w polu magnetycznym o różnym stosunku m/z (masa/ładunek)

a. ***Spektrometria mas (MS)*** – to narzędzie analityczne wykorzystywane do określania mas różnych związków w próbce. Technika ta jest przydatna do identyfikacji i ilościowego oznaczania związków w mieszaninie, co może obejmować wykrywanie zanieczyszczeń w próbce lub określanie mieszaniny białek w próbce komórkowej. Działa poprzez pomiar stosunku m/z (masy do ładunku) jonów. Wynikiem badania jest widmo masowe, które pokazuje skład i strukturę chemiczną badanej substancji. Podstawą metody jest przeprowadzenie cząsteczek próbki, poprzez zastosowanie różnych metod jonizacji w jony, po uprzednim ogrzaniu do uzyskania stanu gazowego. Pole magnetyczne lub elektryczne rozdziela jony według ich masy i ładunku (m/z) analizując skład. Aparat zlicza jony i tworzy wykres widma masowego. *Główne zastosowania* – w diagnostyce medycznej (badania przesiewowe noworodków – pozwalają na wykrycie kilkudziesięciu rzadkich wrodzonych wad metabolizmu z zaledwie jednej kropli krwi pobranej na bibułę; rutynowe badania mikrobiologiczne – identyfikacja bakterii i grzybów bezpośrednio z hodowli w ciągu kilku minut (zamiast dni), co pozwala na natychmiastowe dobranie właściwego antybiotyku; toksykologia i monitorowanie leków **–** oznaczanie dokładnego stężenie leków oraz wykrywanie substancji toksycznych lub narkotyków; endokrynologia – pomiary poziomu hormonów steroidowych i tarczycy, eliminując błędy typowe dla tradycyjnych testów immunoenzymatycznych (ELISA). W farmacji: poszukiwanie nowych leków - skanowanie w celu znalezienia potencjalnych substancji leczniczych i określenia ich dokładnej struktury; badania metabolizmu (ADME); wykrywanie zanieczyszczeń **–** identyfikacja nawet śladowych ilości substancji szkodliwych lub rakotwórczych; rozwój zastosowania biofarmaceutyków – badanie struktury dużych cząsteczek biologicznych, takich jak przeciwciała monoklonalne czy białka terapeutyczne.

12. Strumień elektronów lub jonów o różnej energii

a. ***Spektroskopia elektronowa*** - jedna z podgrup spektroskopii, wykorzystująca zjawiska na poziomie oddziaływań elektron-próbka. Służy głównie do poznawania i badania struktury elektronowej, wiązań chemicznych oraz składu chemicznego materiałów.

b. ***Spektroskopia jonowa – spektrometria ruchliwości jonów (IMS)*** – technika analityczna, zaliczana do metod spektroskopowych, której podstawą jest pomiar ruchliwości zjonizowanych cząsteczek, w gazie buforowym, pod wpływem pola elektrycznego. Główne zastosowania – wykorzystywana jest m.in. do wykrywania narkotyków i materiałów wybuchowych. Technika ta ma także wiele zastosowań analitycznych. Może być stosowana w połączeniu ze spektrometrią mas (IMS-MS), chromatografią gazową (GC-IMS) oraz wysokosprawną chromatografią cieczową (LC-IMS)

13. Efekty cieplne bez zmiany masy

a. ***Termiczna analiza różnicowa (DTA)*** – to instrumentalna metoda oparta na rejestracji różnicy temperatur (ΔT) między substancją badaną i substancją odniesienia względem czasu lub temperatury, jako dwóch próbek znajdujących się w identycznych warunkach w środowisku ogrzewanym lub chłodzonym w sposób kontrolowany. Pomiaru różnicy temperatur (ΔT) dokonuje się przy pomocy układu różnicowego termopar. W urządzeniach DTA detektorami temperatury są zwykle termoelementy z metali szlachetnych, chemoodpornych.

b. ***Różnicowa Kalorymetria Skaningowa (DSC)*** - to niezwykle czuła technika analizy termicznej API, która pozwala na badanie zmian fizykochemicznych w cząsteczkach (np. białkach, DNA czy lekach) pod wpływem temperatury. *Mierzona wielkość* – moc cieplna – zmiany różnicy strumienia cieplnego powstającego między próbką badaną i referencyjną w trakcie przemian termicznych W przemyśle farmaceutycznym DSC jest standardowym narzędziem na każdym etapie – od projektowania nowej cząsteczki po kontrolę jakości gotowej formy leku. *Główne zastosowania* – badanie polimorfizmu substancji czynnej leku, testy zgodności substancji czynnej z substancjami pomocniczymi (DSC wykrywa przesunięcia lub zanikanie pików termicznych, co świadczy o interakcji składników); badanie stabilności i czystości substancji (bez użycia skomplikowanych metod chemicznych oraz ocenę stabilności termicznej leku). W diagnostyce najczęściej wykorzystuje się odmianę zwaną ***mikrokalorymetrią (nano-DSC)***. Służy ona do analizowania naturalnych makrocząsteczek w płynach ustrojowych pacjenta – profilowanie osocza (tzw.

termogramy krwi – w stanach chorobowych struktura tych białek, co zniekształca wykres termiczny); badania stabilności biomolekuł (białek, przeciwciał i kwasów nukleinowych); interakcje lek-receptor (efekty energetyczne towarzyszące wiązaniu się leków z białkami docelowymi).

14. Promieniowanie wtórne wywołane napromieniowaniem (nieelastyczne rozpraszanie fotonów)

a. ***Spektrometria Ramanowska (RAMAN*** lub ***RS)*** -technika spektroskopowa polegająca na pomiarze promieniowania rozproszenia Ramana (nieelastycznego rozpraszania fotonów). Symetria cząsteczki decyduje, które drgania są aktywne w widmie rozproszenia Ramana co wyraża się poprzez reguły wyboru określające prawdopodobieństwo zaobserwowania (intensywność) danego pasma. W widmie Ramana pojawią się tylko te drgania, w których zmienia się polaryzowalność w taki sposób, że nie ma ona ekstremum w położeniu równowagi. Spektroskopia ramanowska wzajemnie uzupełnia się ze spektroskopią w podczerwieni. Próbka oświetlana jest światłem lasera. Analizowane jest światło, które odbija się od próbki. Badać można próbki we wszystkich stanach skupienia. Jest analizą nieniszczącą, bardzo szybką i czułą, pozwala tez na badanie zawartości nienaruszonych opakowań. Główne zastosowania – farmacja (do szybkiej weryfikacji składu leków i identyfikacji podróbek); chemia i materiałoznawstwo (analiza polimerów, tworzyw sztucznych i minerałów); medycyna (badanie tkanek np. wykrywanie zmian nowotworowych, badanie płynów ustrojowych); analiza śladów w kryminalistyce; wykrywanie narkotyków i materiałów wybuchowych na miejscu przestępstwa (przenośne, lekkie aparaty); analiza dzieł sztuki.

Właściwości i zjawiska fizykochemiczne

1. Wydzielanie elektrolityczne

a. ***Elektrograwimetria*** – elektroanalityczna metoda ilościowa, która polega na elektrolitycznym wydzieleniu wybranego składnika (zazwyczaj metalu) na elektrodzie. Oznaczenie wykonuje się przez dokładne zważenie elektrody przed procesem oraz po nim, a wynik oblicza się z ***przyrostu jej masy***. Roztwór próbki znajduje się w naczynku elektrolitycznym. Przez roztwór przepuszcza się prąd stały

o odpowiednim natężeniu i napięciu. Kationy metali redukują się i osadzają w czystej postaci na katodzie lub jako tlenki na anodzie. Po zakończeniu elektrolizy elektrodę myje się, suszy i waży ponownie. Metoda opiera się na ***prawach Faradaya***, które wiążą ilość wydzielonej substancji z ładunkiem elektrycznym przepływającym przez układ. Elektrograwimetria nie znajduje bezpośredniego zastosowania w medycznej diagnostyce pacjentów**.** Jest to klasyczna metoda laboratoryjna służąca do precyzyjnego oznaczania większych ilości metali, więc wymaga zbyt dużych objętości próbek i ma zbyt niską czułość (granicę wykrywalności), aby badać płyny ustrojowe człowieka (np. krew czy mocz)

b. ***Miareczkowanie kulometryczne*** - metoda analizy chemicznej, w której odczynnik chemiczny nie jest dodawany z biurety, lecz wytwarzany bezpośrednio w naczyniu pomiarowym za pomocą prądu elektrycznego. Ilość oznaczanej substancji oblicza się precyzyjnie na podstawie ładunku elektrycznego, zgodnie z prawami Faradaya. Metoda jest precyzyjna i czuła – umożliwia oznaczanie śladowych ilości substancji. Nie wymaga standaryzacji, ponieważ odczynnikiem jest tylko prąd elektryczny. Jest metodą szybką i zautomatyzowaną. Główne zastosowania: kulometryczne oznaczanie śladowych ilości wody w próbkach (olejach, gazach, lekach czy rozpuszczalnikach). Jest bardzo czułe – pozwala wykryć wodę na poziomie od 1 ppm do 5%.

2. Przepływ prądu pomiędzy elektrodami

a. ***Polarografia*** – część woltamperometrii, elektrochemiczna metoda analityczna polegająca na przyłożeniu liniowo wzrastającego potencjału elektrycznego do kroplowej elektrody rtęciowej będącej elektrodą pracującą z cyklicznie odnawiającą się w trakcie pomiaru powierzchnią i rejestracji natężenia prądu płynącego przez nią. Wartość natężenia prądu jest proporcjonalna do stężenia obecnej w roztworze substancji ulegającej reakcji red-oks (utlenieniu lub redukcji). Metoda pozwala na stworzenie wykresu zależności natężenia prądu od potencjału – ***krzywej polarograficznej***. Polarografia jest metodą jakościową i ilościową. Sama polarografia jest jednak starsza niż woltamperometria, gdyż praktycznie była zastosowana już na początku XX wieku. Obie metody stosować mogą tę samą elektrodę pracującą. Elektrodą pracującą jest tu ***kroplowa elektroda rtęciowa (KRE)*** z odnawiającą się powierzchnią. Jest to niezwykle czuła technika elektrochemiczna, wykorzystywana przede wszystkim do oznaczania śladowych ilości substancji (rzędu 10^{-5} do 10^{-6} mol/l, a w nowoczesnych odmianach impulsowych nawet znacznie

mniej). Główne zastosowania: farmaceutyczna kontrola jakości i czystości produktów (precyzyjne mierzenie zawartości kwasu askorbinowego, oznaczania substancji czynnych, identyfikacji zanieczyszczeń jonami metali ciężkich w gotowych lekach); diagnostyka medyczna – analiza płynów ustrojowych (wykrywanie śladowych ilości toksykologicznych substancji, leków oraz tlenu w próbkach biologicznych). W ochronie środowiska badania obejmują obecność: metali ciężkich, ilość rozpuszczonego tlenu w zbiornikach wodnych, dla oceny środowiska życia biologicznego. Metodę wykorzystuje się również do identyfikacji składu chemicznego historycznych złotych folii pozłotniczych oraz pigmentów, co pomaga w datowaniu i konserwacji obiektów zabytkowych.

b. ***Woltamperometria*** – technika analityczna, której podstawą jest pomiar zależności potencjału elektrycznego od natężenia prądu w układzie elektrody pracującej i elektrody odniesienia zanurzonych w roztworze badanym zawierającym oznaczaną substancję i podstawowy. Elektrodą porównawczą (odniesienia) jest często niepolaryzowana elektroda kalomelowa, natomiast elektroda pracująca jest polaryzowaną obojętną: kroplowa elektroda rtęciowa (KER), inna elektroda rtęciowa lub mikroelektroda stała. Ponadto metoda używa dodatkowo trzeciej elektrody – elektroda pomocnicza, która zamyka obwód elektryczny i przepuszcza prąd. *Główne zastosowania* – oznaczanie metali ciężkich w wodzie i żywności, analiza leków i związków organicznych, badanie antyoksydantów, badania kinetyki reakcji elektrodowych.

c. ***Amperometria*** – technika analityczna, bazująca na pomiarze zależności natężenia prądu od stężenia substancji elektroaktywnej przy stałym potencjale. Stosuje się układ elektrody pracującej i elektrody odniesienia zanurzonych w badanym roztworze składającym się z elektrolitu i badanej substancji. *Mierzona wielkość* – natężenie prądu płynącego między elektrodami podczas elektrolizy. Wielkość tego prądu jest bezpośrednio proporcjonalna do ilości lub stężenia badanej substancji. Do elektrody wskaźnikowej przykłada się dokładnie określone, stałe napięcie. Napięcie to wywołuje utlenianie lub redukcję tylko wybranego analitu (substancji) na powierzchni elektrody. Powstający prąd dyfuzyjny jest rejestrowany. Im wyższe stężenie substancji w próbce, tym wyższy płynie prąd. Amperometria jest metodą bardzo czułą, szybką i dokładną. Daje możliwość oznaczania bardzo małych ilości substancji. *Główne zastosowania* – bioczujniki (glukometry używane przez cukrzyków do oznaczania poziomu glukozy we krwi); analiza środowiskowa (do

wykrywania zanieczyszczeń, tlenu lub metali ciężkich w wodzie); badania biologiczne (śledzenie zmian stężenia substancji aktywnych).

d. ***Miareczkowanie amperometryczne*** – wykorzystywane do wyznaczania punktu końcowego miareczkowania, gdy inne metody zawodzą.

3. Zmiana potencjału elektrody wskaźnikowej

a. ***Potencjometria*** – jest grupą pomiarowych metod elektrochemicznych, polegających na wyznaczaniu wartości ***potencjału elektrody wskaźnikowej*** (jej potencjał zależy od stężenia badanych jonów w roztworze) względem ***elektrody porównawczej*** (ze stałym potencjałem, stanowiącym punkt odniesienia) w funkcji logarytmu stężenia jonów elektroaktywnych. *Mierzona wielkość* – ***siła elektromotoryczna ogniwa (SEM)***. Pomiary są wykonywane ***w warunkach bezprądowych*** (pomiar odbywa się w stanie równowagi termodynamicznej, bez przepływu prądu przez ogniwo), dzięki czemu może być stosowane równanie Nernsta. Główną metodą jest potencjometria bezpośrednia, polegająca na jednokrotnym pomiarze potencjału i bezpośrednim odczycie stężenia np. w pomiarze pH roztworu, przy pomocy ***pehametru***. *Główne zastosowania* – oznaczanie pH środowiska roztworów, wykrywanie i oznaczanie jonów z użyciem elektrod jonoselektywnych. Diagnostyka medyczna – oznaczanie elektrolitów we krwi, moczu bardzo szybkimi analizatorami biochemicznymi (z elektrodami jonoselektywnymi). Farmacja – badanie czystości surowców i produktów leczniczych; badanie pH środowisk wodnych i niewodnych; badanie substancji czynnych preparatów. Stosowana jest również w przemyśle spożywczym, chemicznym, kosmetycznym i ochronie środowiska. Potencjometria znajduje szerokie zastosowanie w laboratoriach przemysłowych, medycznych i środowiskowych ze względu na swoją wysoką precyzję, niski koszt oraz możliwość analizy próbek mętnych i barwnych. Inną zaletą jest również możliwość ponownego użycia próbki w innych badaniach (metoda nieniszcząca).

b. ***Miareczkowanie potencjometryczne*** – polega na śledzeniu zmian potencjału elektrody w trakcie dodawania odczynnika miareczkującego (titranta). Pozwala precyzyjnie wyznaczyć końcowy punkt miareczkowania z krzywej miareczkowania. Analizę można wykonać w próbkach wodnych i niewodnych, barwnych lub mętnych, bez konieczności użycia wskaźników barwnych.

4. Przewodnictwo elektryczne roztworów

a. ***Konduktometria*** – metoda elektroanalityczna. *Mierzona wielkość* – pomiar ***przewodności elektrolitów***, zmieniającej się wraz ze zmianą stężenia jonów. Pomiary

przewodności roztworu dokonuje się za pomocą aparatu nazywanego konduktometrem. Na podstawie tych wyników określa się stężenie badanego roztworu w odniesieniu do danych wzorcowych. Inną możliwością zastosowania tej metody jest miareczkowanie konduktometryczne, gdzie na podstawie zmiany przewodności ustala się punkt końcowy miareczkowania. *Główne zastosowania* – konduktometria znajduje szerokie zastosowanie w przemyśle, ochronie środowiska oraz laboratoriach badawczych, ponieważ pozwala na ***szybki i bezdotykowy pomiar*** zawartości jonów. W diagnostyce medycznej konduktometria jest wykorzystywana przede wszystkim do ***szybkiej oceny parametrów płynów ustrojowych***. Ponieważ przewodnictwo elektryczne zależy od stężenia jonów, metoda ta pozwala na błyskawiczne wykrycie anomalii w składzie chemicznym badanych próbek bez konieczności przeprowadzania skomplikowanych i długotrwałych analiz chemicznych – szacowanie hematokrytu (szybka, pośrednia ocena objętości krwinek czerwonych w stosunku do całej objętości krwi); analiza moczu (ustala całkowite stężenie rozpuszczonych jonów (elektrolitów), co ułatwia ocenę zdolności nerek do zagęszczania i rozcieńczania moczu); badanie potu (diagnostyka mukowiscydozy – badania przesiewowe stężenia jonów sodowych i chlorkowych u dzieci); kontrola płynów dializacyjnych (konduktometry wbudowane są w aparaty do hemodializy (sztuczne nerki); badanie czystości wody laboratoryjnej (wody zdemineralizowanej i destylowanej, używanej w laboratoriach klinicznych do przygotowywania odczynników). W farmacji konduktometria jest niezastąpionym narzędziem kontroli jakości surowców, gotowych produktów i środowiska produkcyjnego. Największą zaletą tej metody w farmacji jest możliwość prowadzenia analiz w roztworach mętnych i silnie zabarwionych (np. syropach czy zawiesinach) – kontrola czystości wody do receptury i iniekcji (stały pomiar przewodnictwa jest wymagany przez Farmakopeę przy produkcji wody oczyszczonej (*Aqua purificata*) oraz wody do wstrzyknięć (*Aqua pro injectione*)); badanie profili uwalniania substancji czynnych (badanie jak szybko i w jakiej ilości uwalniają się jony substancji leczniczych z tabletek lub kapsułek); identyfikacja i kontrola czystości surowców (szybkie odróżnienie substancji i wykrycie śladowych zanieczyszczeń elektrolitami w surowcach niejonowych); Monitorowanie czystości linii produkcyjnych (badanie popłuczyn po myciu reaktorów farmaceutycznych daje pewność, że z systemu zostały całkowicie usunięte resztki detergentów o charakterze jonowym).

b. ***Miareczkowanie konduktometryczne*** – inne zastosowanie metody konduktometrycznej, gdzie na podstawie zmiany przewodności ustala się punkt końcowy miareczkowania. W miareczkowaniu wykorzystuje się ***prąd zmienny***, zabezpieczający elektrody przed polaryzacją i roztwór przed elektrolizą. W farmacji stosowane do miareczkowanie trudnych substancji (np. antybiotyków). Miareczkowanie konduktometryczne pozwala na dokładne oznaczanie ilościowe kwasów organicznych, zasad oraz niektórych antybiotyków w gotowych preparatach bez ryzyka błędu wizualnego.

c. ***Oscylometria*** – w zakresie medycznym, największe zastosowanie ma odmiana metody – ***oscylometria impulsowa***. Jest to nieinwazyjne badanie czynnościowe układu oddechowego. Polega na ocenie oporu i elastyczności dróg oddechowych podczas spokojnego oddychania przez ustnik, bez konieczności wykonywania forsownych i głębokich wydechów. Jest wygodną metodą zastępującą spirometrię. W czasie badania pacjent oddycha przez około 20–30 sekund. Urządzenie generuje w tym czasie ciche, niewidoczne impulsy ciśnienia (fale mechaniczne), które nakładają się na tor oddechowy. Aparat bada falę powracającą, co pozwala zmierzyć impedancję, rezystancję (opór) oraz reaktancję (sprężystość) układu oddechowego.

d. ***Miareczkowanie oscylometryczne*** – (często określane jako miareczkowanie wysokiej częstotliwości) to elektrochemiczna metoda analizy ilościowej. Służy do oznaczania stężenia substancji w roztworze. W odróżnieniu od klasycznego miareczkowania, nie wymaga stosowania wskaźników chemicznych ani zanurzania elektrod bezpośrednio w próbce. Pomiar ma charakter bezkontaktowy. Naczynie z badanym roztworem umieszcza się w cewce lub między okładkami kondensatora. Do układu doprowadzany jest prąd zmienny o bardzo wysokiej częstotliwości. Podczas dodawania titranta zmieniają się właściwości dielektryczne roztworu (przewodność i przenikalność). Oscylometr rejestruje te zmiany i wskazuje moment zakończenia reakcji na wykresie. *Główne zastosowania* – miareczkowanie roztworów silnie barwnych, mętnych lub lepkich, oznaczanie substancji w cieczach nielotnych i środowiskach niewodnych, miareczkowanie precypitometryczne, analiza związków słabo zdysocjowanych (np. niektórych kwasów organicznych).

5. Oddziaływania pomiędzy analitem i środowiskiem – rozdział chromatograficzny

Termin chromatografia oznacza efekt rozdziału (separacji) mieszaniny substancji na jej składniki, obserwowany podczas przepływu fazy ruchomej wzdłuż powierzchni fazy nieruchomej. Cząsteczki składników mieszaniny, które słabo oddziałują z fazą nieruchomą,

są szybciej przenoszone przez płynącą fazę ruchomą, zaś cząsteczki 0 większym powinowactwie poruszają się wolniej. Fazą ruchomą może być gaz lub ciecz, zaś fazą nieruchomą - ciecz, żel lub porowate ciało stałe. Zastosowanie chromatografii w analityce chemicznej polega na separacji mieszaniny substancji, identyfikacji i pomiarze ich ilości.

a. ***Chromatografia gazowa (GC)*** - wykorzystuje efekt rozdziału chromatograficznego z użyciem gazu (np. He) jako fazy ruchomej, oraz porowatego ciała stałego lub filmu polimeru organicznego jako fazy nieruchomej. Stosowana jest do analiz składu mieszanin związków chemicznych, zwłaszcza związków organicznych i nieorganicznych. Najważniejsze elementy chromatografu gazowego to dozownik, służący do wprowadzenia próbki do strumienia gazu nośnego, kolumna analityczna zawierająca fazę stacjonarną oraz detektor. Kolumna chromatograficzna (kapilarna) ma postać długiej i cienkiej rurki, w postaci zwoju. Faza stacjonarna tworzy cienką warstwę na wewnętrznej powierzchni ścianek. Kolumna jest umieszczona w termostatowanym piecu, wyposażonym w programator temperatury. Detektory przewodnictwa cieplnego (TCD, HWD), detektory płomieniowo-jonizacyjne (FID), detektory wychwytu elektronów (ECD) oraz detektory masowe (MSD).

b. ***Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)*** - jest uniwersalną metodą analityczną, stosowaną głównie do analiz próbek, również zawierających nielotne, wielkocząsteczkowe związki chemiczne, w szczególności substancje biologicznie czynne. Metoda HPLC wykorzystuje efekt rozdziału chromatograficznego z użyciem cieczy jako fazy ruchomej. Skład fazy ciekłej i rodzaj fazy stacjonarnej jest uzależniony od składu badanych próbek oraz typu oddziaływań wykorzystywanych do osiągnięcia separacji ich składników. Typowy zestaw do HPLC składa się ze zbiornika fazy ciekłej (eluentu), pompy, dozownika, kolumny analitycznej, detektora i zbiornika na zużyty eluent. Stosowane mechaniczne pompy tłokowe umożliwiają osiąganie wysokich ciśnień i stabilnych szybkości przepływu. Kolumny analityczne to rurki stalowe wypełnione cząstkami fazy stacjonarnej. Detektory absorpcji promieniowania UV-VIS, detektory fluorescencyjne, detektory refraktometryczne oraz detektory elektrochemiczne.

c. ***Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)*** – metoda analityczna, wykorzystująca jako fazę stacjonarną cienką warstwę porowatego sorbentu, oraz ciecz jako fazę ruchomą (eluent). Rozdział zachodzi w wyniku przepływu eluentu przez warstwę sorbentu, wciąganego przez sorbent na skutek działania sił kapilarnych. Metoda TLC, szeroko stosowana jako podstawowa metoda rozdziału i identyfikacji związków

organicznych, jest ceniona ze względu na prostotę i szybkość oraz niskie koszty. W chromatografii cienkowarstwowej stosowane są na ogół te same sorbenty, co w kolumnowej chromatografii cieczowej (najczęściej modyfikowany żel krzemionkowy). Rozdział chromatograficzny prowadzi się w specjalnej, zamkniętej komorze, zawierającej eluent i atmosferę nasycona jego parami. Do wizualizacji efektów rozdziału wykorzystywane są specjalne reagenty, tworzące ze związkami organicznymi barwne związki. Można też posłużyć się światłem ultrafioletowym, wywołującym fluorescencję sorbentu, maskowaną przez rozdzielone składniki próbki.

d. ***Chromatografia fluidalna, Chromatografia płynem nadkrytycznym (SFC)*** - łączy cechy chromatografii gazowej i cieczowej. Jako fazę ruchomą wykorzystuje gaz w warunkach nadkrytycznych (np. dwutlenek węgla w temp. powyżej 31°C i 73 atm), w których zanikają różnice pomiędzy fazą ciekłą i gazową. Chromatografia fluidalna jest stosowana m.in. do rozdziału substancji trudno rozpuszczalnych, gdyż fazy nadkrytyczne wykazują zdolność do rozpuszczania substancji złożonych z dużych, niepolarnych cząsteczek. Aparatura SFC przypomina układ do HPLC i zawiera pompę dozującą eluent, zawór służący do wprowadzania próbek, kolumnę (pakowaną lub kapilarną), regulator ciśnienia oraz detektor płomieniowo-jonizacyjny.

e. ***Elektroforeza kapilarna (CE)*** – różnicowanie szybkości migracji cząstek naładowanych w roztworze, wywołanej przez zewnętrzne pole elektryczne. Jest stosowana do rozdziału biopolimerów (np. białek, kwasów nukleinowych) i innych związków, także związków jonowych. Elektroforeza kapilarna to metoda, wykorzystująca efekt elektroforezy do separacji jonów oraz naładowanych makrocząsteczek i agregatów cząsteczek, zachodzący w cienkiej kapilarze kwarcowej. Pomimo odmiennego mechanizmu rozdziału, wykazuje ona wiele podobieństw do metod chromatograficznych.

6. Promieniowanie

a. ***Metody radiometryczne*** – wykorzystujące do celów analitycznych promieniowanie jądrowe. Wyróżnia się następujące grupy metod radiometrycznych: ***metody wskaźnikowe***, w których wykorzystuje się promieniowanie jądrowe emitowane przez izotopy promieniotwórcze (wskaźniki) wprowadzone do badanych układów (próbki); ***metody aktywacyjne*** – oparte na pomiarze promieniowania jądrowego emitowanego przez promieniotwórcze izotopy, produkty reakcji jądrowych,

zachodzących w próbce w wyniku napromieniowania jej: neutronami (aktywacja neutronowa), fotonami (fotoaktywacja) lub cząstkami naładowanymi; ***metody fluorescencji rentgenowskiej*** z wykorzystaniem źródeł izotopowych – opierające się na pomiarze promieniowania rentgenowskiego wzbudzonego za pomocą promieniowania jądrowego ze źródeł izotopowych (opisane powyżej); metody, w których wykorzystuje się ***naturalną promieniotwórczość*** – pozwalające oznaczyć pierwiastki, których izotopy promieniotwórcze występują w przyrodzie; ***metody niespecyficzne*** – w których wykorzystuje się zjawisko rozpraszania lub absorpcji promieniowania jądrowego przez próbkę (opisane powyżej).

b. ***Aktywacja neutronowa*** – proces, w którym promieniowanie neutronowe indukuje radioaktywność w materiałach. Ma ono miejsce, gdy jądra atomowe przechwytują swobodne neutrony, stając się cięższymi i wzbudzonymi. Pochłonięcie neutronu wiąże się z natychmiastową emisją wysokoenergetycznego promieniowania gamma. Jądro powstałe w wyniku wychwytu neutronów często jest radioaktywne i ulega rozpadowi emitując cząstki takie, jak elektrony, neutrony, protony lub cząstki alfa. Aktywacja neutronowa jest wykorzystywana do wytwarzania izotopów promieniotwórczych, jest także ważnym narzędziem analitycznym pozwalającym oznaczać ***skład pierwiastkowy materiałów*** z dużą dokładnością.

Podział technik i metod analitycznych – wymagania techniczne

I. Metody oparte na chemicznych reakcjach analitycznych, których podstawą są zjawiska chemiczne (reakcje analityczne):

Rodzaj metody		**wymagana cecha analitu**	**ograniczenia w metodzie**	**Przykłady**
Metoda wagowa (grawimetra)		Ściśle określony skład chemiczny analitu i znany Ir w rozpuszczalniku,	efekt solny, wpływ jonów wodorowych przy wytrącaniu wodorotlenków i soli słabych kwasów, hydroliza osadu, Wpływ temp	Ba SO_4 $MgNH_4PO_4$ $Fe(OH)_3$
Metody objętościowe	Alkacymetria	Zachodzenie reakcji kwas-zasada (w znaczeniu teorii Brönsteda)	Dobór wskaźnika, pH i titranta	HCl titrant-NaOH wskaźnik oranż metylowy
	Argentometria	Znany Ir w rozpuszczalniku	1. Dobór wskaźnika w zależności od Ir powstających substancji, 2. Roztwór nie może zawierać inne nieoznaczane aniony mogące stanowić	W metodzie Mohra: chlorki, bromki, srebro w środowisku obojętnym. W metodzie Volharda: chlorki, bromki w środowisku kwaśnym

			konkurencyjne trudno rozpuszczalne osady ze wskaźnikiem w zależności od pH	
	Redoksymetria	Równocześnie zachodzące reakcje utleniania i redukcji	1. Dobór pH zależny od reakcji zachodzących w roztworze 2. W jodometrii wykorzystuje się związek addycyjny z jodem jako wskaźnik	1.Nadmanganianometria- oznaczanie reduktorów. 2.Jodometria do oznaczania utleniaczy np. Fe(III), Cu(II), aceton, aldehydy, hydrochinon i reduktorów np.: As_2O_3, $S_2O_3^{2-}$, H_2SO_3
	Kompleksometria	Utworzenie trwałego i rozpuszczalnego związku kompleksowego	Dobór pH i wskaźnika tak aby trwałość kompleksu metal-EDTA była dużo większa niż kompleksu metal-wskaźnik	Do oznaczania metali na różnym stopniu utlenienia metodami: bezpośrednią, odwrotną, podstawieniową. Do oznaczania anionów metoda pośrednia np. siarczany.

II. Metody oparte na właściwościach fizyczne, głównie na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z próbką:

Rodzaj metody		Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Metody optyczne	Nefelometria	Rozproszenie promieniowania, współczynniki załamania światła ośrodka i fazy rozproszonej muszą być różne	Kąt pomiaru promieniowania rozproszonego wynosi 90° aby oddzielić promieniowanie wiązki pierwotnej od promieniowania rozproszonego. Warunki pomiaru próbek badanych winny być możliwie identyczne	Oznaczanie ilościowe np.: anionów Cl^-, Br^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-} rozcieńczonych roztworów białek
	Turbidymetria	Rozproszenie i absorpcja promieniowania, pomiar absorpcji pozornej	Warunki pomiaru próbek badanych winny być możliwie identyczne	Oznaczanie ilościowe np.: anionów Cl^-, Br^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-} w stężeniu 10^{-6}–10^{-9}mol/l, rozcieńczonych roztworów białek
	Refraktometria	Załamanie światła wynikające ze zmiany prędkości światła przy przechodzeniu przez ośrodki o różnej gęstości	Pomiar współczynnika załamania nie jest selektywny, dlatego skład jakościowy substancji musi być znany, do badania stosowane jest światło monochromatyczne	Pomiary form enancjomerycznych, refrakcji molowych RM
	Polarymetria	Zdolność substancji optycznie czynnej do skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego	Istotna jest długość fali i temperatura pomiarów	Identyfikacja i oznaczanie środków leczniczych, badanie równowag i mechanizmów reakcji Oprócz oznaczania stężeń

				związków czynnych optycznie, technika ta umożliwia także pomiar tzw. czystości optycznej enancjomerów. Zastosowanie w przemyśle cukrowniczym.
sorpcja promieniowania	Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa VIS (kolorymetria)	Selektywna absorpcja (związana ze stanami elektronowymi cząsteczki,) promieniowania widzialnego. Zabarwienie obserwowane jest dopełnieniem barwy promieniowania absorbowanego.	Wymagana jest barwa własna jonu oznaczanego pierwiastka lub związku, w który w wyniku reakcji został przeprowadzony oznaczany pierwiastek lub obecność sprzężonych wiązań wielokrotnych albo chromoforu	Oznaczanie ilościowe Fe(III) za pomocą KSCN, należy zachować odpowiednie pH i stężenia reagentów z uwagi na możliwość powstawania barwnych kompleksów przeszkadzających
	Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa UV/VIS	Promieniowanie ultrafioletowe powoduje przejścia elektronów wiązań typu π (wiązania wielokrotne) ze stanów podstawowych na wyższe poziomy energetyczne – *stany wzbudzone*.	Spełnione prawa absorpcji L-B i addytywności	Oznaczenia ilościowe i jakościowe, wyznaczanie pK aldehydu p-hydroksy-benzoesowego, wyznaczanie składu kompleksu np. Fe(II) w $[NH_4Fe(SO_4)\cdot 12H_2O]$ z kwasem 5-sulfo-salicylowym
	Spektrometria absorpcyjna cząsteczkowa IR	Absorpcja zakresie podczerwieni (0,2-30 □m np. wiąże się ze stanami oscylacyjnymi (spektrometria oscylacyjna), w zakresie mikrofalowym z rotacyjnymi (spektrometria rotacyjna).	Przygotowanie właściwe próbek do rejestrowania widma substancji w fazie gazowej, ciekłej i stałej.	Analiza strukturalna chloramfenikolu, oznaczenia ilościowe nifuroksazydu w zakresie NIR.
	Magnetyczny rezonans jądrowy (NMR)	Absorpcja promieniowania w zakresie fal radiowych 1-3000m przez jadra atomów cząsteczki w polu magnetycznym o dużym natężeniu	Odpowiednie przygotowanie próbek dostosowanie do rodzaju badanych cząsteczek właściwego natężenia pola magnetycznego	Badanie struktur cząsteczek np.: p-chloronitrobenzen
Emisja promieniowania	Emisja atomowa np. fotometria płomieniowa	Emisja promieniowania przez atomy próbki wzbudzonej strumieniu anergii	Pierwiastki oznaczane muszą mieć niskie potencjały wzbudzenia (1,4-3,0 V), emitują promieniowanie w zakresie widzialnym. Istotne jest otrzymanie linii rezonansowej	Oznaczane są raczej litowce i berylowce stężenia do 10^{-8} g
	Emisja cząsteczkowa np. fluorymetria	Zdolność emisji promieniowania UV i VIS cząsteczek wzbudzonych (co warunkuje obecność w budowie związku układu sprzężonych wiązań podwójnych	Próbka w formie ciekłej. Odpowiedni dobór monochromatora i detektora	Można oznaczać zarówno substancje organiczne, jak i nieorganiczne o stężeniach 0,01 ppm; np.: oznaczanie chlorowodorku chininy

III. Metody oparte na właściwościach fizykochemicznych, głównie na procesach elektrochemicznych nazywane są metodami elektrochemicznymi lub elektroanalitycznymi:

Rodzaj metody	Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Potencjometria i miareczkowanie potencjometryczne	Zmiana potencjału elektrody wskaźnikowej (zjawisko-przez ogniwo nie płynie prąd stały), (wielkość mierzona-potencjał elektrody) Związek spełnia równanie Nernsta. a) z użyciem elektrody szklanej kombinowanej b) z użyciem elektrody jonoselektywnej	Wymagają stężeń substancji oznaczanych co najmniej rzędu 10^{-2}–10^{-3} mol/l, oraz ograniczenia zakresu pH zależnie od stosowanej elektrody szklanej kombinowanej, w przypadku wyznaczania kilku st. dysocjacji, różnice powinny być co najmniej o ok. 1,5 jednostek pH pomiędzy tymi stałymi. Dobór odpowiedniej elektrody do określonego rodzaju jonów	Oznaczanie zawartości CH_3COOH, oraz mieszaniny Na_2CO_3 i $NaHCO_3$, wyznaczanie graficznie pK słabych kwasów
Konduktometria i miareczkowanie konduktometryczne	Związek jest elektrolitem, istotny jest dobór titranta	Przewodnictwo mocnych elektrolitów może przebiegać wyłącznie w roztworach bardzo rozcieńczonych	Oznaczanie ilościowe wodnych roztworów HCl, p-toluidyny i NH_4CL

IV. Metody rozdzielcze

Rodzaj metody	Wymagana cecha analitu	Ograniczenia w metodzie	Przykłady
Chromatografia	Metoda fizykochemiczna, rozdzielane składniki mieszaniny ulegają podziałowi ilościowemu pomiędzy dwie fazy z szybkościami określonymi przez ich powinowactwo do każdej fazy	Właściwy dobór faz w zależności od rodzaju oznaczanych składników mieszaniny oraz detektora w danej technice chromatograficznej	Analiza ilościowa aminokwasów metodą TL, oznaczanie ilościowe kofeiny metodą HPLC
Elektroforeza	Zróżnicowana szybkość migracji jonów w polu elektrycznym. Ruchliwość elektroforetyczna w danym roztworze jest wielkością charakterystyczną dla danego jonu przy zachowaniu określonych warunków doświadczalnych	Szczególnie w przypadku elektroforezy kapilarnej istotny jest dobór pH, lepkości i siły jonowej oraz składu roztworu, w którym jest badany jon.	Zastosowanie w oznaczeniach aminokwasów, peptydów, białek, nukleotydów, DNA, węglowodanów, amin i witamin w próbkach biologicznych i płynach ustrojowych w analizie biochemicznej i biomedycznej, w analizie czystości leków i do rozdzielania izomerów optycznych oraz w badaniach farmakokinetycznych. W ochronie środowiska metoda jest najczęściej stosowana do oznaczeń fenoli, pestycydów i herbicydów.

Podział metod w zależności od zastosowania

1. ***Analiza elementarna substancji nieorganicznych***
   - **a.** Atomowa spektroskopia emisyjna z wzbudzaniem plazmowym (ICP-AES)
   - **b.** Spektrometria masowa ze wzbudzeniem plazmowym (ICP-MS)
   - **c.** Fluorescencyjna spektroskopia rentgenowska (XRF)
   - **d.** Atomowa spektroskopia absorpcyjna (AAS) (analiza śladowa)
   - **e.** Analiza ciał stałych
2. ***Termograwimetria (TG)***
   - **a.** Różnicowa analiza termiczna (DTA)
   - **b.** Różnicowa kalorymetria skaningowa (DSC)
   - **c.** Dyfrakcja rentgenowska (XRD) (badanie składu fazowego)
   - **d.** Spektrografia (jakościowa analiza metali i stopów)
3. ***Analiza mieszanin gazów***
   - **a.** Spektroskopia w podczerwieni (IR)
   - **b.** Chromatografia gazowa (GC)
   - **c.** Spektrometria masowa (MS)
4. ***Analiza mieszanin związków organicznych***
   - **a.** Spektroskopia w podczerwieni (IR)
   - **b.** Spektroskopia Ramana
   - **c.** Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
   - **d.** Chromatografia gazowa (GC)
5. ***Identyfikacja związków organicznych***
   - **a.** Spektroskopia w podczerwieni (IR)
   - **b.** Spektroskopia Ramana
   - **c.** Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)
   - **d.** Spektrometria masowa (MS)
6. ***Oznaczanie zawartości metali***
   - **a.** Atomowa spektroskopia absorpcyjna (AAS) (analiza śladowa)
   - **b.** Polarografia
   - **c.** Potencjometria
   - **d.** Spektrofluorymetria
   - **e.** Spektroskopia UV-Vis
   - **f.** Woltamperometria (analiza śladowa)

7. ***Oznaczanie zawartości anionów nieorganicznych***
    a. Spektroskopia UV-Vis
8. ***Oznaczanie zawartości gazów w roztworach wodnych***
    a. Potencjometria
9. ***Oznaczanie zawartości niektórych związków organicznych***
    a. Spektroskopia UV-Vis
    b. Spektrofluorymetria (substancje wykazujące luminescencję)
    c. Woltamperometria
    d. Chromatografia gazowa (GC) (substancje lotne)
10. ***Oznaczanie zawartości związków biologicznie czynnych***
    a. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC)
    b. Elektroforeza kapilarna (CE)
11. ***Oznaczanie zawartości niemetali tworzących wodorki***
    a. Atomowa spektroskopia absorpcyjna (AAS)
12. ***Oznaczanie zawartości wody***
    a. Spektroskopia w podczerwieni (IR)
    b. Pomiary pH
    c. Potencjometria

Ponadto, w analizie chemicznej wyróżniamy:

- ***analizę klasyczną*** (niewymagającą aparatury);
- ***analizę instrumentalną*** (z użyciem aparatury analitycznej różnego rodzaju);
- ***metody „mokre”*** (analiza substancji w roztworze);
- ***metody „suche”*** (niewymagające przeprowadzenie próbki do roztworu);
- ***metody makro*** – decygramowe: 10^{0}–10^{-1}g, 10^{1}–10^{0} ml (w zależności od zawartości analitu w próbce);
- ***metody półmikro*** – centygramowe: 10^{-2}g; 10^{0}ml;
- ***metody mikro*** – miligramowe: 10^{-3}g; 10^{-1} – 10^{-2}ml;
- ***metody ultramikro*** – mikrogramowe: 10^{-4} – 10^{-6}g; 10^{-3} – 10^{-5}ml;
- ***metody ultraultramikro*** – nanogramowe: 10^{-7} – 10^{-9}g; 10^{-6} – 10^{-8}ml;
- ***metody submikro*** – pikogramowe: 10^{-10} – 10^{-12}g; 10^{-9}ml;
- ***metody bezwzględne*** – ***absolutne*** – nie wymagają wzorcowania i z reguły oparte są na reakcjach chemicznych przebiegających całkowicie i zgodnie ze znaną stechiometrią.

Należą do nich: grawimetria, miareczkowanie, gazometria, kulometria, elektrograwimetria, termograwimetria, techniki potencjometryczne (elektrody jonoselektywne), immunoanaliza;

- ***metody porównawcze*** – ***względne*** – wymagają kalibracji względem znanych wzorców. Sygnał pomiarowy jest proporcjonalny do ilości lub rodzaju analitu (Y = f (c));
- ***metody znormalizowane*** **–** stosowane do oceny surowców i produktów o ściśle ustalonych umownych warunkach wykonania. Ustalony jest sposób, czas, temperatura itp. Metody ujęte w normach: w Polsce –Polski Komitet Normalizacji (obecnie Polski Komitet Miar i Wag). Również Międzynarodowa Organizacja Normalizacji (Int. Standards Organisation), w USA NIST (National Institue of Standards and Technologies dawniej National Bureau of Standard NBO)

Bioanalityka

Tą nazwą określana jest nowoczesna dziedzina nauki o szerokim zastosowaniu. Jej wyniki służą analizie próbek materiału biologicznego, w celu uzyskania informacji o stanie organizmu żywego (***diagnostyka medyczna***) lub środowiska bytowania organizmu (*środowisko abiotyczne*). Zastosowanie znajduje również w badaniu żywności, ekologii, badaniach sanitarnych, przemyśle kosmetycznym i chemicznym oraz w kryminalistyce.

Złożone problemy, które rozwiązuje, wymagają zastosowania wiedzy z zakresu analityki, chemii i biologii, co jest możliwe dzięki zastosowaniu zaawansowanego sprzętu laboratoryjnego. Są wśród nich urządzenia o niewinnie brzmiących nazwach jak ***elektroniczny nos*** (E-nos) czy ***elektroniczny język*** (E-język) i bardzo skomplikowanej konstrukcji. Elektroniczny nos imituje działanie nabłonka węchowego. Podstawą jego działania jest matryca czujników, o działaniu niespecyficznym, które wykrywają lotne związki organiczne. Każdy zapach, złożony z wielu związków lotnych, daje sygnał o charakterystycznym profilu dla danego zapachu.

Elektroniczny język jest to narzędzie służące do analizy płynów. rozpoznaje podstawowe smaki: słodki, słony, kwaśny, gorzki oraz umami. Do tego celu wykorzystuje czujniki elektrochemiczne zanurzane w cieczy. Mierzą one zmiany potencjału lub prądu wywołane przez obecność konkretnych jonów lub cząsteczek. Poniżej opisano szerzej zastosowania bioanalityki, szczególnie w zastosowaniu diagnostycznym i farmaceutycznym.

Przyszłość BIOANALITYKI jest wyraźnie widoczna w DIAGNOSTYCE MEDYCZNEJ. Wiele doniesień naukowych wskazuje na intensywne prace nad:

- poszukiwaniem nowych markerów – wyróżników chorób, na przykład chorób układu oddechowego;
- konstruowaniem nowych przyrządów do diagnostyki medycznej, w tym do badań przesiewowych;
- opracowaniem nowych procedur analizy ludzkiego materiału analitycznego.

1. Zastosowanie powstałych urządzeń ***elektronicznego nosa*** do rozróżniania mieszanin wzorcowych, zawierających składniki wydychanego powietrza oraz potencjalne wyróżniki chorób, pozwoliły między innymi na:
   - ***Wykrywanie nowotworów*** – możliwa jest identyfikacja raka płuc, piersi, jelita grubego oraz prostaty na podstawie mikroskopijnych zmian w składzie chemicznym oddechu;
   - ***Diagnostykę infekcji płucnych*** – istnieje tu możliwość rozróżnienie bakteryjnych i wirusowych zakażenia dróg oddechowych, co pozwala na szybkie dobranie odpowiedniego leku;
   - ***Monitorowanie cukrzycy*** – wykrywanie podwyższonego stężenie acetonu w oddechu, co sygnalizuje niebezpieczną dla życia kwasicę ketonową;
   - ***Wykrywanie chorób neurodegeneracyjnych*** – wkrótce możliwe będzie wykrywanie wczesnych markerów chorób Alzheimera i Parkinsona w powietrzu wydychanym.
2. ***Elektroniczny język*** analizuje skład płynów ustrojowych: krwi, moczu, śliny i łez, wykrywając składniki ważne diagnostycznie. Znana jest:
   - ***Szybka analiza moczu*** – w tym badaniu wykrywane są infekcje układu moczowego, zaburzenia pracy nerek oraz nawet śladowe ilości glukozy u pacjentów z cukrzycą;
   - ***Badanie śliny i łez*** – to możliwość bezbolesnego badania poziomu hormonów, markerów stresu oraz markerów stanów zapalnych bez konieczności pobierania krwi. Umożliwia to przygotowania próbki do badania przez pacjenta w domu, szczególnie gdy należy pobrać materiał o niewygodnej porze (np. badanie poziomu kortyzolu z pobranej śliny);
   - ***Kontrola czystości leków*** – możliwość sprawdzania tożsamość i czystość substancji czynnych lekach oraz maskowanie przykrego (np. gorzkiego) smaku projektowanego leku;
   - ***Wykrywanie biomarkerów nowotworowych*** – mogą być identyfikowane specyficzne białka i jony obecne w osoczu krwi osób, we wczesnych stadiach rozwoju nowotworu.

Obecnie badania medyczne z użyciem elektronicznego nosa i elektronicznego języka nie są jeszcze powszechnie dostępne i nie można ich wykonać rutynowo w przychodniach czy laboratoriach komercyjnych. Zdecydowana większość tych technologii znajduje się na etapie

zaawansowanych badań klinicznych, eksperymentów medycznych oraz programów pilotażowych.

3. ***Wykorzystanie materiału biologicznego*** jako elementu urządzenia kontrolno-pomiarowego: ***biofiltry, biosorbenty, biokolumny, bioczujniki*** (do badania poziomu glukozy we krwi), ***przeciwciała*** (stosowane w ***immunoanalizie***).
4. ***Wykorzystanie organizmów żywych*** do uzyskania informacji o stanie środowiska ich bytowania (*środowisko abiotyczne*)***: biowskaźnik***, ***biomonitor.***

Na kolejnych stronach przedstawiono przykładową aparaturę analityczną, pracującą w Zakładzie Chemii Analitycznej oraz w CBMM PAN. Pod fotografiami instrumentów analitycznych, przedstawiono również niektóre przykładowe widma analitów.

Analiza instrumentalna – aparatura Zakładu Chemii Analitycznej

Wysokosprawna chromatografia kolumnowa (HPLC):
- zestaw do HPLC firmy Jasco



Chromatografia cienkowarstwowa (TLC):
- aplikator AS 30 firmy Desaga





- densytometr CD 60 i komora wizualizacyjna CABUVis firmy Desaga





Spektroskopia UV-Vis:
- spektrofotometry: Lambda 25 firmy Perkin-Elmer i Spectroquant Prove 300 firmy Merck





- spektrofotometr SP-830 Plus – kolorymetr firmy Metertech



Spektroskopia IR oraz NIR:
- spektrofotometr FT-IR Spectrum BX i FT-NIR Spectrum 100 N firmy Perkin-Elmer




Fotometria płomieniowa i fluorymetria:
- fotometr płomieniowy firmy Biobase i fluorymetr 6285 firmy Jenway

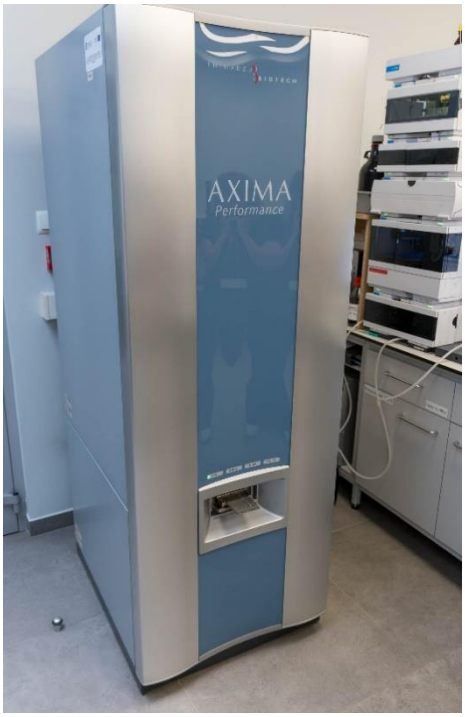




Spektroskopia mas – aparatura CBMM PAN:
- zestaw LC-MS firmy Waters (chromatograf UPLC oraz hybrydowy spektrometr mas wysokiej rozdzielczości typu Q-TOF z technologią mobilności jonów (HDMS) (jonizacja ESI)) oraz spektrometr mas SQ Detector 2 firmy Waters (jonizacja ESI, APCI, ESCi)




- spektrometr mas AXIMA Performance firmy Shimadzu-Biotech (jonizacja techniką MALDI -wzbudzenie laserem matrycy zawierającej badaną próbkę)





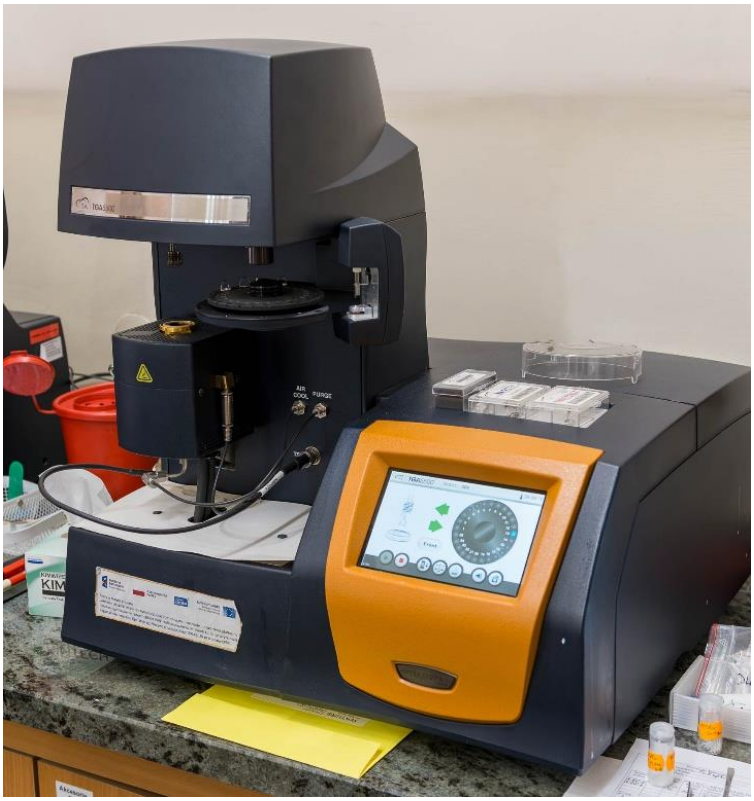
Spektroskopia NMR:
- spektrometr NMR Ascend 400 wraz z autosamplerem firmy Bruker



Różnicowa kalorymetria skaningowa:
- różnicowy kalorymetr skaningowy Discovery DSC 2500 firmy TA Instruments



Termograwimetria:
- termograwimetr Discovery TGA 5500 firmy TA Instruments



Absorpcyjna Spektrometria Atomowa (AAS) – określenie ilości składników w próbce.



Chromatograf gazowy (GC-MS) – identyfikacja pierwiastków i związków chemicznych



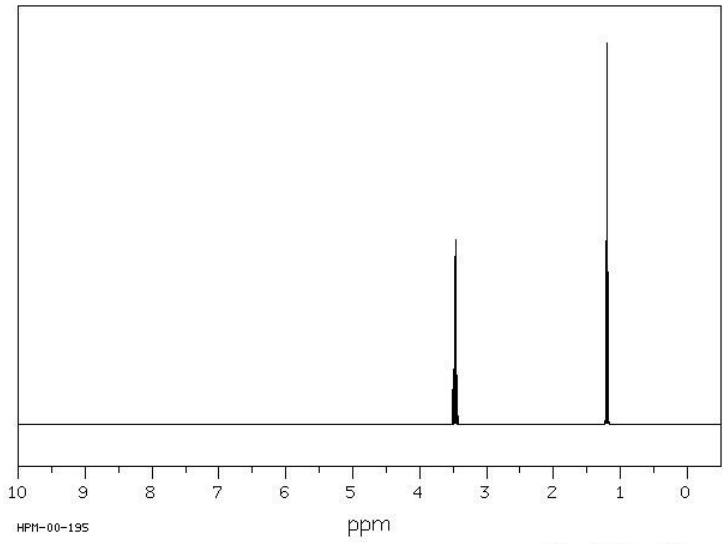
Przykładowe widma spektroskopowe eteru dietylowego, wykonane metodami ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, IR, MS

^{1}H-NMR:

SDBS-^{1}H NMR SDBS No.:2150 Spectral code:HPM-00-195

$C_4H_{10}O$ **300 MHz**

diethyl ether **0.04 ml : 0.5 ml $CDCl_3$**



HPM-00-195

(B) (A)

CH_3—CH_2—O—CH_2—CH_3

Parameter	ppm	Hz
D(A)	3.472	
D(B)	1.206	
J(A,B)	7.00	

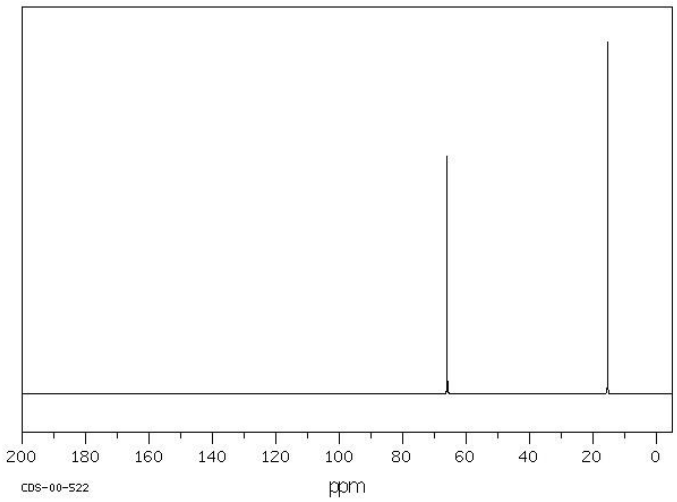
Hz	ppm	Int.
1052.16	3.507	161
1045.16	3.484	490
1038.17	3.461	501
1031.17	3.437	171
368.77	1.229	509
361.78	1.206	1000
354.78	1.183	487

^{13}C-NMR:

SDBS-^{13}C NMR SDBS No.:2150 Spectral code:CDS-00-522

$C_4H_{10}O$ **25.16 MHz**

diethyl ether **0.5 ml : 1.5 ml $CDCl_3$**

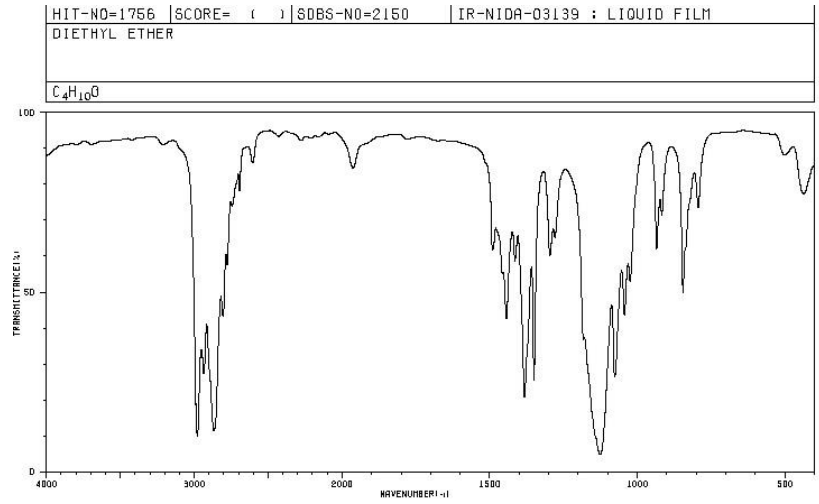


CDS-00-522

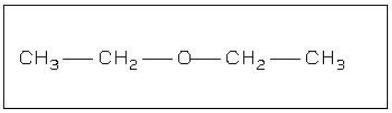
2——1——0——1——2

ppm	Int.	Assign.
65.97	675	1
15.35	1000	2

IR:



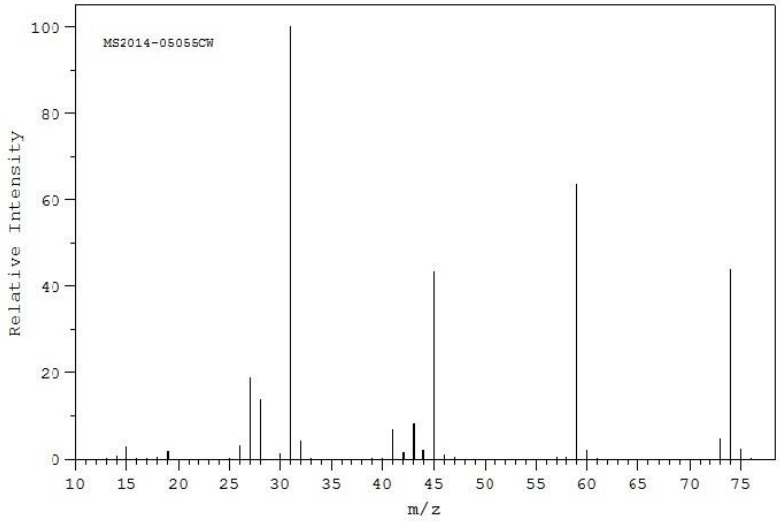
2989	17	2693	74	1383	20	1024	60
2979	9	2604	81	1351	24	935	58
2935	26	1962	81	1297	56	917	68
2868	10	1490	68	1279	62	846	47
2804	41	1457	53	1126	4	794	70
2777	55	1444	41	1077	25	501	84
2743	70	1416	57	1043	42	438	74



MS:

SDBS-Mass

MS2014-05055CW SDBS No. 2150
diethyl ether
$C_4H_{10}O$ (Mass of molecular ion: 74)

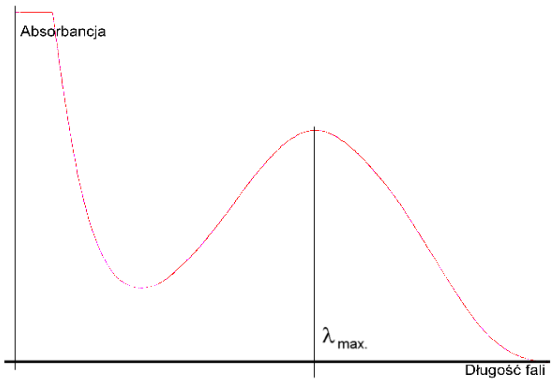


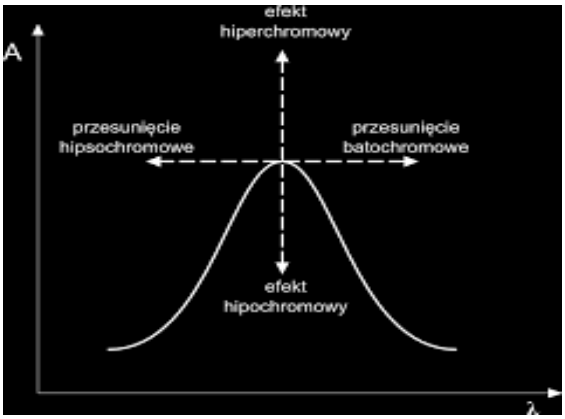
MS2014-05055CW SDBS No. 2150
diethyl ether
$C_4H_{10}O$ (Mass of molecular ion: 74)

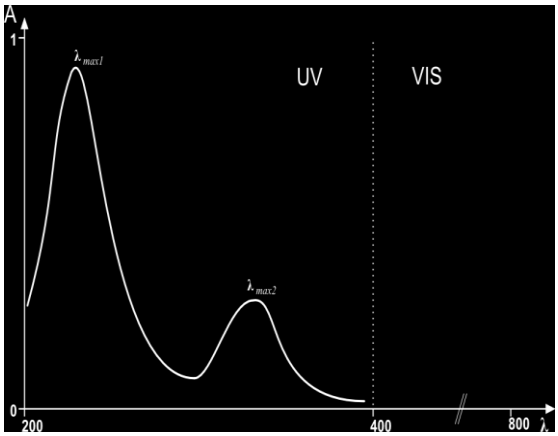
15.0	2.9
19.0	1.8
26.0	3.1
27.0	18.7
28.0	13.7
29.0	41.3
30.0	1.3
31.0	100.0
32.0	4.1
41.0	6.9
42.0	1.5
43.0	8.2
44.0	2.0
45.0	43.4
46.0	1.0
59.0	63.4
60.0	2.1
73.0	4.7
74.0	43.7
75.0	2.3

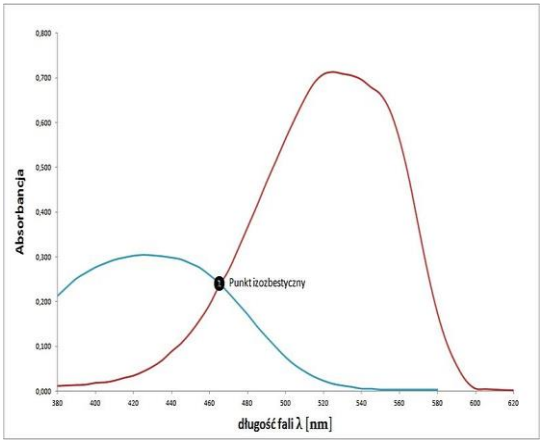
Source Temperature: 250 °C
Sample Temperature: 250 °C
Reservoir, 70 eV

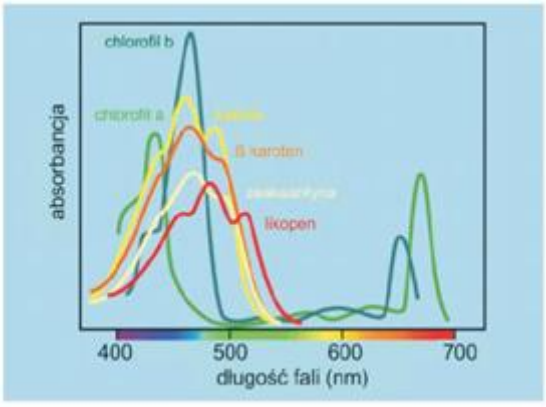
Przykładowe widma wykonane metodą spektrofotometryczną UV-Vis











Widmo absorpcyjne dwóch typów chlorofilu (chlorofil typu a i b) oraz kilku karotenoidów

III. Zasady opracowania krzywej kalibracji

Krzywa kalibracyjna

Krzywa kalibracyjna (krzywa wzorcowania) jest to ***graficzne – w formie wykresu***, bądź ***matematyczne – w formie równania***, przedstawienie zależności między sygnałem analitycznym a stężeniem lub ilością badanej substancji. Stanowi podstawowe narzędzie stosowane w analizach ilościowych. Najczęściej wykorzystywana jest krzywa kalibracyjna opracowywana metodą wzorca zewnętrznego (ang. *external standard*), która ma zazwyczaj charakter liniowy, choć może reprezentować również inne zależności.

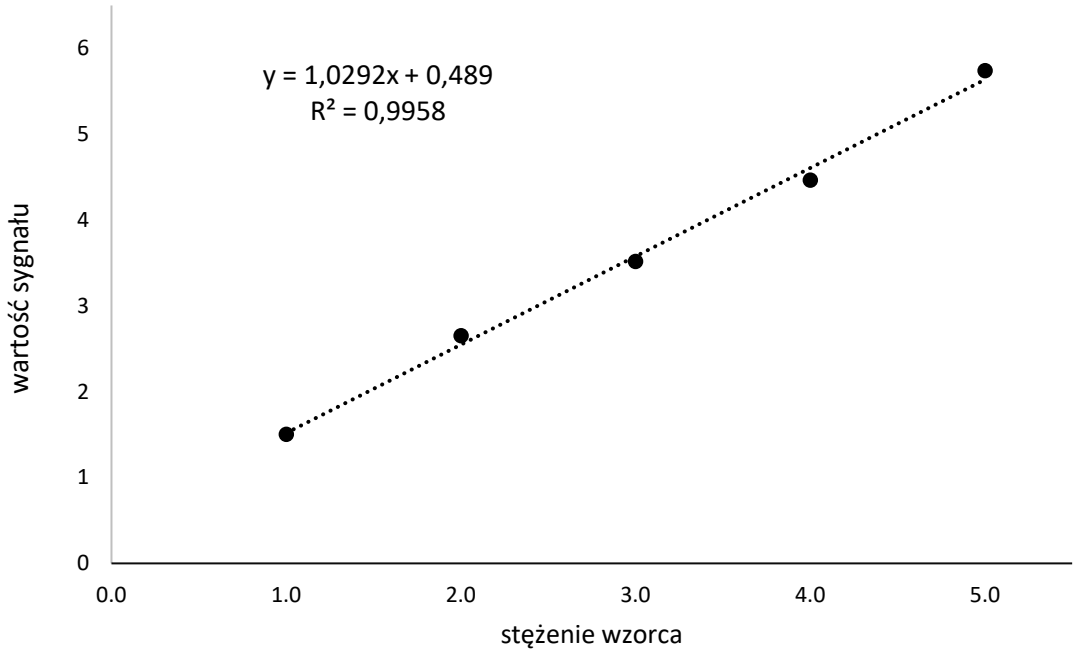
Wyznaczanie krzywej kalibracyjnej

Pierwszym etapem jest zebranie danych eksperymentalnych. W tym celu przygotowuje się serię roztworów wzorcowych o rosnących, dokładnie znanych stężeniach analitu. Warto w tym celu wykorzystać certyfikowane materiały odniesienia (ang. certified reference materials; CRMs), w których prawdziwa zawartość analitu jest dokładnie znana. Minimum stanowią trzy roztwory, jednak dobrą praktyką jest stosowanie 5-6 próbek różniących się stężeniem ok. 30% względem siebie. Zastosowany zakres wzorców powinien pokrywać się z szacowanymi stężeniami badanych próbek, które będą oznaczane ilościowo. Następnie dokonuje się pomiaru sygnału z każdej próbki wzorcowej. Pomiar dla każdego stężenia powinien być powtórzony minimum 3 razy, w praktyce laboratoryjnej zazwyczaj stosuje się 3-5 powtórzeń dla każdego punktu pomiarowego, z których uzyskuje się wartość średnią.

Drugim etapem jest wykreślenie krzywej. Na oś odciętych (x) nanosi się stężenia wzorców, na oś rzędnych (y) odpowiadające im średnie wartości zmierzonych sygnałów. Do narysowanych w ten sposób punktów dopasowuje się prostą, która jest zazwyczaj wyznaczana metodą regresji liniowej (Rys.1). Ustala się również ***równanie matematyczne***, opisujące tę prostą (funkcję zależności miary sygnału pomiarowego od stężenia analitu). Dla zależności liniowej ma ono postać $\boldsymbol{y = ax + b}$. W równaniu: $\boldsymbol{y}$ – sygnał pomiarowy; $\boldsymbol{x}$ – stężenie analitu; $\boldsymbol{a}$ to współczynnik kierunkowy opisujący nachylenie prostej i określający czułość metody; natomiast $\boldsymbol{b}$ to wyraz wolny, informujący o przecięciu krzywej z osią y, często oznaczający sygnał tła, czyli pozostałych składników próbki poza analitem.

Trzecim etapem jest ocena jakości sporządzonej krzywej. W tym celu sprawdza się przede wszystkim ***współczynnik determinacji*** $\boldsymbol{R^2}$, który zawiera się w przedziale 0-1. Im bliżej jedności, tym dopasowanie krzywej jest lepsze, a uzyskane wyniki z próbki badanej będą

dokładniejsze. Często oblicza się również ***odchylenie standardowe reszt***, które informuje jak daleko punkty na wykresie odchylają się średnio od dopasowanej krzywej. Informuje ono o ***dokładności dopasowania***. Im mniejsza wartość, tym punkty są ciaśniej skupione wokół wyznaczonej krzywej.



Rys. 1. Przykładowa liniowa krzywa kalibracyjna sporządzona dla serii 5 roztworów wzorcowych wraz z wyznaczonym równaniem krzywej i współczynnikiem determinacji.

„Zero" na wykresie krzywej kalibracyjnej

Krzywa kalibracyjna nie musi przechodzić przez punkt (0,0) na wykresie, bez wyraźnych wskazań jest to nawet błędne. Zazwyczaj, próbka nie zawierająca analitu (stężenie „0", tzw. ***ślepa próba***) wykazuje ***sygnał tła***, pochodzący od pozostałych znajdujących się w niej składników, rozpuszczalnika itd. W takiej sytuacji wymuszenie przechodzenia przez punkt (0,0) spowoduje zmianę nachylenia prostej, czyli współczynnika kierunkowego ***a***, a co za tym idzie uzyskanie błędnych wyników dla badanych próbek.

UWAGA! Jedynymi sytuacjami, w których dopuszcza się przechodzenie krzywej przez punkt zerowy są: potwierdzenie przy pomocy odpowiedniego testu statystycznego, że współczynnik *b* nie różni się istotnie od zera lub gdy wymagają tego wytyczne walidacyjne dla danej metody.

Liniowość i zakres pomiarowy krzywej

Liniowość to przedział stężeń analitu, w którym mierzony sygnał jest wprost proporcjonalny do stężenia.

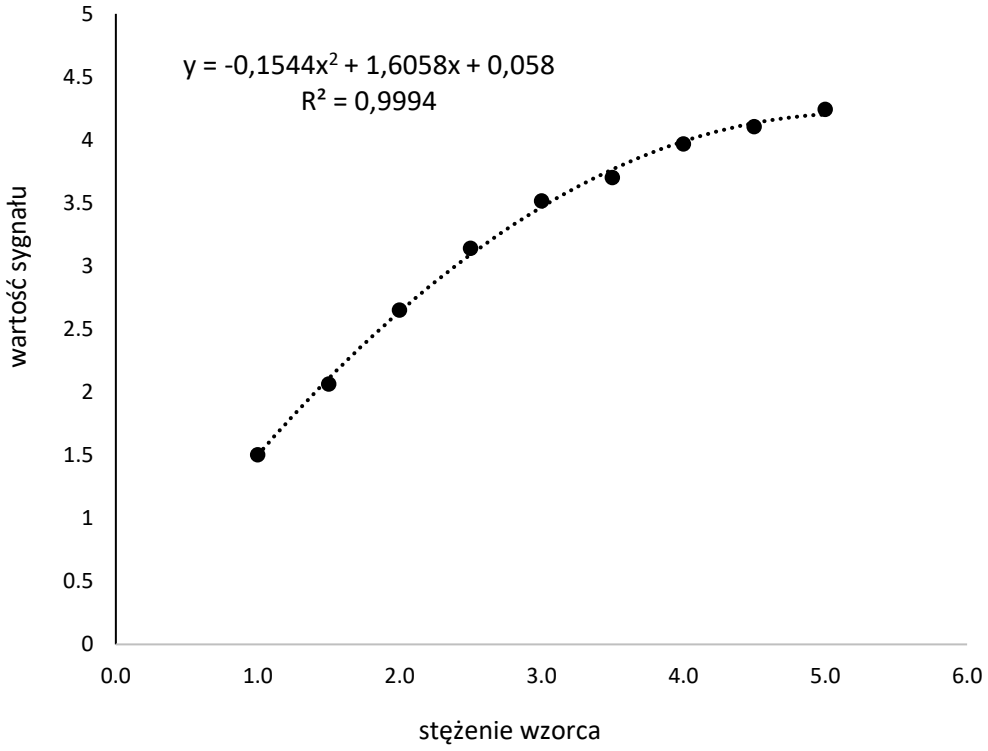
Przy wyznaczaniu standardowej krzywej kalibracyjnej istotne jest, aby znajdowała się ona w zakresie liniowości danej metody. ***Zakres pomiarowy***, inaczej nazywany ***roboczym***, to przedział między najniższym a najwyższym stężeniem analitu, w którym sygnał zachowuje liniowość, dzięki czemu badane próbki można oznaczyć z wymaganą dokładnością.

Przy korzystaniu z krzywej kalibracyjnej, ważne jest również określenie ***granicy wykrywalności*** (***LOD***; ang. limit of detection) i ***granicy oznaczalności*** (***LOQ***, ang. limit of quantification), czyli najmniejszych stężeń analitu w badanej próbce przy których można go wykryć, czyli dokonać analizy jakościowej (LOD) lub też oznaczyć ilościowo (LOQ). Zazwyczaj wyznaczenie parametrów LOD i LOQ opiera się na pomiarach ślepej próby, generującej sygnał tła (szum). ***Wartość trzykrotnie przekraczająca szum określana jest jako LOD, natomiast dziesięciokrotne przekroczenie szumu oznaczane jest jako LOQ***.

Nieliniowe krzywe kalibracyjne

W niektórych przypadkach liniowość wskazań nie jest zachowania w całym lub w części zakresu wykonywania pomiarów. Zdarza się to w wielu technikach analitycznych, np. gdy detektor osiąga stan nasycenia lub gdy wpływ mają dodatkowe zjawiska fizykochemiczne. Aby poprawnie korzystać z nieliniowej krzywej, można zastosować zaawansowane dopasowania regresji wielomianowej, np. ***wielomiany drugiego stopnia (kwadratowe): $y = ax^2 + bx + c$*** (Rys. 2), które pozwalają uwzględnić lekkie zakrzywienia.

Przy większych odchyleniach stosuje się bardziej skomplikowane ***wielomiany trzeciego stopnia (sześcienne): $y = ax^3 + bx^2 + cx + d$,*** w razie potrzeby można również zastosować ***funkcje logarytmiczne*** lub ***wykładnicze***. W przypadkach odbiegania od liniowości zaleca się również wykorzystanie większej ilości roztworów wzorcowych, w celu jak najdokładniejszego odwzorowania przebiegu analizowanej zależności.



Rys. 2. Przykładowa nieliniowa krzywa kalibracyjna sporządzona dla serii 9 roztworów wzorcowych wraz z wyznaczonym równaniem krzywej i współczynnikiem determinacji.

Ocena stabilności krzywej kalibracyjnej

Samo przygotowanie i wstępna ocena krzywej kalibracyjnej nie są wystarczające, aby prawidłowo korzystać z niej przy oznaczeniach ilościowych. Konieczna jest regularna kontrola jej stabilności i poprawności uzyskanej zależności sygnału od stężenia.

UWAGA! W celu zachowania dokładności analiz ilościowych, należy regularnie oceniać parametry statystyczne krzywej i bieżącą odpowiedź układu przed każdą serią pomiarową, nawet jeśli analizy odbywają się codziennie.

Do weryfikacji użyteczności krzywej kalibracyjnej używa się minimum 3 stężeń materiałów odniesienia lub roztworów wzorcowych pokrywających cały zakres roboczy (niskie, średnie i wysokie stężenie analitu). **Błąd odczytu dla tych próbek nie powinien przekraczać założonego błędu metody – często przyjmuje się zakres odchylenia ± 5% do ± 10%.**

Inne metody kalibracji

Poza standardową krzywą kalibracyjną, można zastosować również inne metody, które pozwalają na uzyskanie zależności między sygnałem a zawartością analitu w próbce. Decyzję, którą z nich wybrać opiera się na kilku czynnikach, są m.in.: rodzaj metody analitycznej, rodzaj przyrządu pomiarowego, wymagana dokładność wyniku czy przedział stężeń analitu. Duże znaczenie mają również rodzaj matrycy próbki badanej i wzorców tzw. efekty matrycowe.

a. ***metoda porównania z wzorcem*** – wykonuje się tylko dwa pomiary sygnałów analitycznych: dla roztworu wzorcowego i dla próbki badanej. Wzorzec powinien mieć stężenie zbliżone do stężenia analitu w próbce badanej. Wynik oblicza się wykorzystując prostą zależność matematyczną:

$$c_{p.badanej} = \frac{S_{p.badanej}}{S_{wzorca}} \times c_{wzorca}$$

Jest to najmniej dokładna metoda, zakładająca, że zależność między ***stężeniem*** (***c***) a ***sygnałem*** (***S***) jest wprost proporcjonalna, liniowa i przechodzi przez punkt (0,0) na wykresie, czyli zakłada całkowity brak ***efektów matrycowych***.

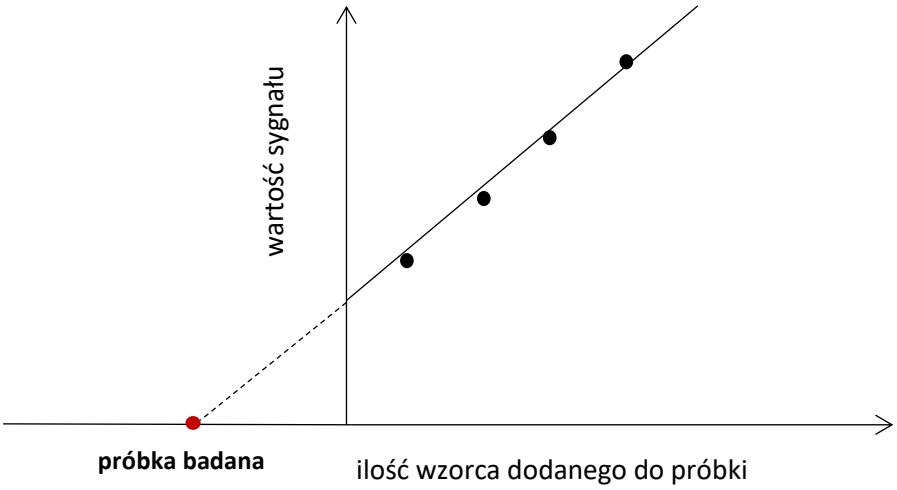
b. ***metoda dodatku wzorca*** (ang. ***standard addition***) – polega na dodaniu do próbki badanej znanych ilości analitu, zwykle od 50 do 150% oczekiwanej zawartości oznaczanej substancji. Można zastosować jednokrotny dodatek wzorca, wtedy tylko do jednej próbki badanej wprowadza się wzorzec, a wynik oblicza się z wykorzystaniem wyniku tej samej próbki zbadanej wcześniej bez dodatku:

$$c_{p.badanej} = \frac{S_{p.badanej} \times c_{wzorca}}{S_{p.bad+wzorca} - S_{p.badanej}}$$

Drugą opcją jest wielokrotny dodatek wzorca, gdzie do kilku badanych próbek, z taką samą ilością oznaczanej substancji dodajemy rosnące ilości wzorca. Na podstawie uzyskanych sygnałów, wykreśla się krzywą kalibracyjną wykazującą zależność sygnału w funkcji ilości analitu dodanej do próbki. Następnie przeprowadza się graficzną

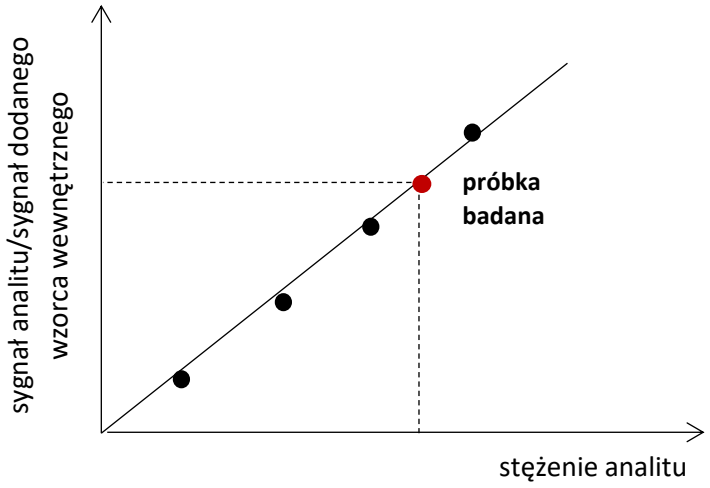
ekstrapolację krzywej kalibracyjnej do punktu przecięcia z osią x i odczytuje się wartość stężenia próbki. (Rys. 3).

Jest to podstawowa metoda wykorzystywana w analityce medycznej ze względu na często występujące, znaczne ***efekty matrycowe*** w próbkach. Jest szybka i dobrze sprawdza się przy próbkach badanych o małej objętości.



Rys. 3. Schematyczny sposób oznaczania zawartości analitu przy pomocy metody wielokrotnego dodatku wzorca.

c. ***metoda wzorca wewnętrznego*** (ang. ***internal standard***) **–** stałą ilość wzorca wewnętrznego (substancja różna od analitu, ale o podobnych właściwościach i dająca dodatkowy sygnał) dodajemy do kilku roztworów zawierających rosnące stężenia analitu. Krzywa kalibracyjna jest wykreślana z zależności: stężenie analitu w funkcji stosunku sygnału analitu i sygnału wzorca wewnętrznego (Rys. 4). Dobrze sprawdza się w przypadku dużej zmienności w składzie kolejnych badanych próbek oraz strat materiału podczas analizy.



Rys. 4. Schematyczny sposób oznaczania zawartości analitu przy pomocy metody wzorca wewnętrznego.

d. metoda roztworów ograniczających – w tej metodzie przeprowadza się dwa pomiary dla roztworów wzorcowych, jeden ma niższe stężenie niż próbka badana, drugi – stężenie wyższe. Wynik z próbki badanej jest obliczany z odpowiedniego wzoru:

$$c_{p.badanej} = c_{\substack{niższe \\ wzorca}} + \left(c_{\substack{wyższe \\ wzorca}} - c_{\substack{niższe \\ wzorca}}\right) \times \frac{S_{p.badanej} - S_{\substack{niższy \\ wzorzec}}}{S_{\substack{wyższy \\ wzorzec}} - S_{\substack{niższy \\ wzorzec}}}$$

Metoda znajduje zastosowanie w przypadkach, gdy wynik musi być precyzyjny w wąskim zakresie stężeń, jednak trzeba mieć wcześniej oszacowany wynik próbki badanej.

IV. Rodzaje i podział elektrod

Elektrodą (półogniwem) nazywamy układ redoks złożony z metalu – przewodnika prądu oraz roztworu określonych jonów w formie zredukowanej lub utlenionej. Wyróżniamy: *elektrody pierwszego rodzaju; elektrody drugiego rodzaju; elektrody trzeciego rodzaju; elektrody redoks; elektrody jonoselektywne*

1. Elektrody pierwszego rodzaju

Elektrody metalowe – zbudowane z metalu zanurzonego w roztworze zawierającym jego kationy. Elektrody metalowe: ***srebrowa, miedziowa, cynkowa i rtęciowa*** – blaszka/pręt z odpowiedniego metalu (rtęć na łyżeczce) w roztworze zawierającym kation tego metalu o określonej aktywności - odwracalna względem kationu $\mathbf{Me^0 = Me^{n+} + \mathit{n}e}$

Elektrody te pełnią ***funkcje wskaźnikowe***.

Elektrody gazowe – gaz zanurzony w roztworze zawierającym jego aniony, odwracalna względem anionu $Cl_2 + 2e = 2Cl^-$

Wyjątkiem jest ***elektroda wodorowa***, która jest odwracalna względem kationu

$H_2 = 2H^+ + 2e$

Wodorowa – blaszka platynowa, w nowoczesnych elektrodach – nanoplatyna lub stop platyny np. z rutenem, zanurzona w płynnym wodorze. W standardowych warunkach (ciśnienie 1013 hPa, temperatura 298 K, aktywność jonów wodorowych wynosi 1), potencjał normalny/standardowy tej elektrody przyjmuje wartość 0 V i stanowi punkt odniesienia do obliczeń potencjałów innych elektrod (elektroda porównawcza). Elektroda wodorowa cechuje się wysoką powtarzalnością, może posłużyć jako elektroda wskaźnikowa (pomiar bezpośredni jonów H^+). Wykorzystywana jest w warunkach silnie kwaśnych, zasadowych czy w roztworach organicznych, chociaż wrażliwa zarówno na substancje redukujące jak i utleniające.

2. Elektrody drugiego rodzaju

Są to elektrody odwracalne względem wspólnego anionu. Połączenie metalu pokrytego jego trudno rozpuszczalną solą zanurzonych w roztworze soli o wspólnym anionie (tworzącym trudno rozpuszczalną sól metalu). Elektrody drugiego rodzaju stosowane są zazwyczaj jako ***elektrody odniesienia***. Nasycony roztwór chlorku potasu (np. w ***elektrodzie kalomelowej***

i ***chlorosrebrowej***) gwarantuje stałe stężenie jonów Cl^- w określonej temperaturze. Dzięki temu ***potencjał rzeczywisty E*** elektrody jest niezmienny.

Elektroda chlorosrebrowa – chlorek srebra pokrywa blaszkę srebrną, zanurzoną w roztworze chlorków o określonej aktywności. Ag, $AgCl_{(s)}/Cl^-$. Potencjał zależny od stężenia chlorków.

Elektroda kalomelowa – najczęściej stosowana ***elektroda porównawcza***. Hg, $Hg_2Cl_{2(s)}$/nasycony KCl. Reakcja elektrodowa dotyczy uwalniania jonów rtęci Hg_2^{2+}, reakcja następna wiązania jonu w chlorek rtęci. Reakcje przebiegają z wydzieleniem elektronów. Potencjał zależny od zmiany aktywności jonów chlorkowych Cl^-. Im aktywność większa tym mniejszy potencjał elektrody. Aktywność jonów chlorkowych zależy od stężenia chlorku potasu (elektrolitu) i temperatury.

3. Elektrody trzeciego rodzaju

Są to elektrody odwracalne względem wspólnego kationu. Układ złożony z metalu, jego trudno rozpuszczalnej soli i drugiej trudno rozpuszczalnej soli o wspólnym anionie. Elektroda zanurzona jest w roztworze dobrze rozpuszczalnej soli kationu tworzącego drugą trudno rozpuszczalną sól. Elektroda jest odwracalna względem tego kationu – potencjał zależy od stężenia tego kationu. Pb, $PbCO_3$, $CaCO_3/Ca^{2+}$.

4. Elektrody redoks

Elektrody wskaźnikowe. Stanowią je metale obojętne chemicznie (np. Pt, Au) zanurzone w roztworze zawierającym jednocześnie postać utlenioną i zredukowaną substancji. Przykładem takiej elektrody jest ***elektroda chinhydronowa***, służąca do pomiaru stężenia jonów wodorowych. Elektroda chinhydronowa jest to blaszka platynowa zanurzona w roztworze chinhydronu. Chinhydron jest równo molowym addycyjnym połączeniem chinonu i hydrochinonu. Potencjał tej elektrody wskaźnikowej zależny od pH roztworu (zakres pomiarowy pH 1-8. Nie można jej stosować w obecności silnych utleniaczy i reduktorów (silniejszych niż obie formy redoks chinhydronu).

5. Elektrody jonoselektywne

Najpopularniejsze i wciąż udoskonalane elektrody pomiarowe, szeroko wykorzystywane w przemyśle, pomiarach laboratoryjnych i środowiskowych. Procesem potencjotwórczym w elektrodach wymienionych we wcześniejszych punktach, jest określona reakcja redoks,

w której następuje wymiana elektronów. Natomiast w ***jonoselektywnych elektrodach membranowych*** potencjał zależy od ***wymiany jonów na granicy faz membrana roztwór badany***. Zasada metody została opracowana ponad 100 lat temu (pierwszą elektrodę szklaną opracowali na początku XX wieku Zygmunt Klemensiewicz i Fritz Haber) i polega na pomiarze ***siły elektromotorycznej ogniwa (SEM***) złożonego z dwóch elektrod: ***elektrody wskaźnikowej*** (jonoselektywnej) i ***elektrody porównawczej*** (inaczej ***referencyjnej***) zanurzonych w roztworze jonów badanych.

Różne typy elektrod jonoselektywnych pracują według innych mechanizmów, wykorzystując różne zjawiska fizykochemiczne i generując potencjał w innych sposób. Różnice te wynikają z różnorodności membran (budowa i modyfikacje składu), obecności elektrolitu lub stałego kontaktu, jak i samego przetwornika sygnału.

Potencjał elektrody jonoselektywnej zależy od stężenia badanych jonów, a ***potencjał elektrody referencyjnej*** jest stały (nie zależy od składu i stężenia badanego jonu).

Aparat (milivoltomierz) do pomiarów cechuje się wysokim oporem, nie pobiera prądu z układu. Pomiar odbywa się w ***warunkach bezprądowych***, dzięki czemu można zmierzyć niewielkie zmiany wartości potencjału.

Metoda jest prosta, szybka i selektywna, choć nie jest wysoce czuła.

Elektrody jonoselektywne umożliwiają pomiar stężenia wybranych jonów w roztworze (a dokładnie ich aktywności), które są nazywane ***jonami głównymi***, w obecności innych jonów (nazywanych ***przeszkadzającymi***). Zależność SEM od stężenia zapisana jest w ***równaniu Nikolskiego-Eisenmana (rozbudowane równanie Nernsta)***, które uwzględnia wpływ jonów przeszkadzających.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \log (a_g + \Sigma K_{gp} a_p)$$

E – potencjał elektrody

E° – potencjał standardowy

R – stała gazowa

T – temperatura w skali Kelwina

F – stała Faradaya

n – liczba elektronów biorących udział w reakcji elektrodowej

a_g – aktywność jonów głównych, oznaczanych (w przypadku roztworów rozcieńczonych można zastąpić aktywność stężeniem)

a_p – aktywność jonów przeszkadzających

K_{gp} – współczynnik selektywności, określający wpływ jonów przeszkadzających na potencjał; zazwyczaj przyjmuje się ten sam ładunek jonu głównego i przeszkadzającego; gdy współczynnik jest mniejszy od 1 przyjmuje się selektywność względem jonu głównego.

Na potencjał elektrody jonoselektywnej składa się ***potencjał międzyfazowy*** na granicy faz membrana - rozwór badany (uwarunkowany wymianą jonową między roztworem a membraną) oraz ***potencjał dyfuzyjny***, wynikający z procesów zachodzących wewnątrz membrany (w warstwie przylegającej do roztworu). Ze wzoru na potencjał wynika, że czułość elektrody zależy od wartość ładunku jonu oraz temperatury (w temperaturze 25˚C dla jonów jednowartościowych wynosi 59,16 mV). Błędy pomiarowe mogą wynikać np. z nieprawidłowej kalibracji elektrody, złego jej kondycjonowania lub wysokim stężeniem jonów głównych lub przeszkadzających. Granica detekcji w przypadku klasycznych elektrod jonoselektywnych (z ciekłym elektrolitem wewnętrznym) to wartość rzędu 10^{-6}. Z uwagi na opisanie różnorodnych zjawisk w obrębie membrany, możliwe było opracowanie nowych elektrod np. ***ze stałym kontaktem*** (bez elektrolitu wewnętrznego), ***z wymuszonym przepływem jonów*** w określonym kierunku w wyniku przyłożonego prądu – polaryzacja galwanostatyczna, ograniczenie dodatku plastyfikatora, co skutkowało obniżeniem granicy wykrywalności nawet do rzędu 10^{-11}. Ponadto opisano wpływ jonów przeszkadzających o różnych wartościach ładunków na wielkość potencjału. Współczynnik selektywności elektrody wyznacza się eksperymentalnie i pozwala określić granicę oznaczalności. Na precyzję i dokładność oznaczeń potencjometrycznych wpływają: wahania temperatury, jony przeszkadzające, poprawna kalibracja, potencjał dyfuzyjny związany z elektrodą odniesienia.

Podział elektrod jonoselektywnych:

*- **z membranami stałymi**: homogeniczne - szklane i krystaliczne: monokrystaliczne i polikrystaliczne i heterogeniczne – krystaliczne w obojętnym nośniku;*

*- **z membranami ciekłymi**: z kationitem, z anionitem, z obojętnymi związkami makrocyklicznymi (np. z walinomycyną)*

*- **uczulane**: enzymatyczne (oznaczany jon, jest produktem reakcji enzymatycznej np. oznaczanie mocznika), gazowe (np. wodorowa).*

5.1. Elektrody wskaźnikowe stałomembranowe.

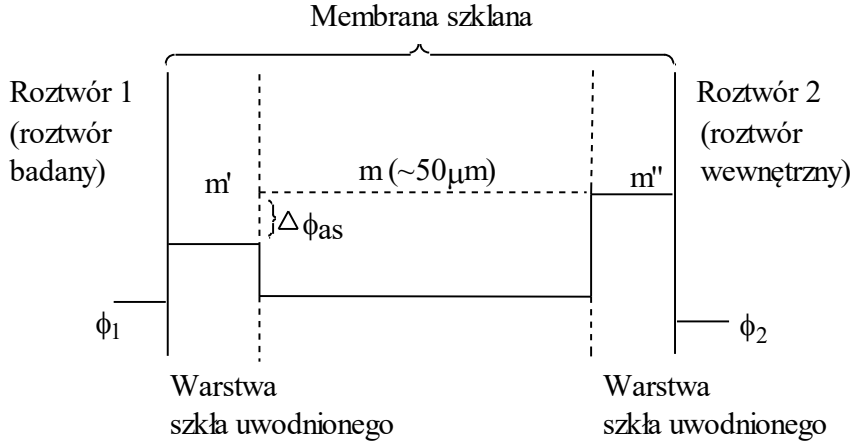
Elektrody te mogą mieć membranę z różnych materiałów: szklaną, krystaliczną (np. membrana w postaci monokryształu np. fluorku lantanu(III) – ***jonoselektywna elektroda fluorkowa***) lub plastyczną (tworzywa sztuczne np. polichlorek winylu – PCW lub gumy silikonowe z zawieszonymi kryształami soli).

Elektrody membranowe krystaliczne dzielimy na ***homogeniczne*** i ***heterogeniczne,*** są rzadko używane ze względu na trudność w ich przygotowaniu. Pierwsze mają membrany zbudowane z kryształów: monokryształów trudno rozpuszczalnej soli lub mieszaniny różnych soli – polikrystaliczne. Przykładem elektrody z ***membraną monokrystaliczną*** jest ww. elektroda ***fluorkowa*** (LaF_3) lub elektroda ***siarczkowa*** Ag_2S. Elektroda z ***membraną polikrystaliczną*** może być zbudowana z mieszaniny soli Ag_2S i AgCl, wykorzystywana do oznaczania jonów: Cl^-, Br^-, I^-, S^{2-} , Ag^+ oraz SCN^-. Selektywność tych membran związana jest z ładunkiem i wielkością jonów, a współczynnik selektywności związany jest z iloczynem rozpuszczalności soli. Przykładem elektrody z membraną heterogeniczną jest np. elektroda do oznaczania jonów wapnia, zbudowana z kryształów szczawianu wapnia rozproszonych w obojętnym nośniku. Obojętnym nośnikiem może być parafina, guma silikonowa, polietylen, polistyren.

Najbardziej popularną elektrodą stałomembranową jest ***elektroda szklana czuła na jony*** H^+ (pierwszą opracowali na początku XX wieku Zygmunt Klemensiewicz i Fritz Haber), charakteryzująca się szerokim liniowym zakresem pomiarowym (pH 2-12). Najczęściej stosowana elektroda do oznaczania jonów wodorowych (również do innych kationów jednowartościowych: Na^+, K^+, Ag^+, Li^+, $NH4^+$).

Elektroda szklana składa się z rurki wykonanej ze szkła wysoko oporowego, zakończonego banieczką cienkościenną ze szkła elektrodowego o grubości 50 - 100 μm. Głównym składnikiem banieczki jest ditlenek krzemu tworzący przestrzenną sieć oraz domieszki tlenków metali jak Li_2O, Na_2O czy K_2O, które odpowiadają za wymianę jonową i przewodnictwo elektryczne. W roztworach wodnych w powstałej strukturze dochodzi do wypierania metali z struktury banieczki (w jej uwodnionej warstwie), w wyniku powstają ugrupowania anionowe $\equiv Si - O^-$ mogące reagować z protonami H^+. Domieszki tlenków Al_2O_3 lub B_2O_3 w składzie szkła elektrodowego, powodują zmiany selektywności membrany, dzięki czemu można oznaczać jony metali np. Na^+ (nie są wrażliwe na jony H^+). Wnętrze elektrody szklanej (pH) wypełnia roztwór o znanym pH (np. 0,1 mol/l HCl), w którym zanurzona jest elektroda wyprowadzająca – najczęściej chlorosrebrowa (Ag, AgCl). Elektroda ta zestawiona jest z elektrodą porównawczą –

kalomelową Hg, Hg_2Cl_2/KCl (nas) lub chlorosrebrową Ag,AgCl/KCl (nas). Elektroda odniesienia/porównawcza oddziałuje z roztworem zewnętrznym/ badanym poprzez połączenie elektrolityczne. Popularnym rozwiązaniem jest zespolenie obu elektrod porównawczej/odniesienia i szklanej w jednej obudowie – tzw. elektroda kombinowana:
e. szklana Ag, AgCl / HCl /membrana / roztwór badany / e. odniesienia Hg, Hg_2Cl_2/KCl (nas)



Potencjał membrany $E_m = (\varphi_2-\varphi_1)$ stanowi sumę różnic potencjałów na wszystkich granicach faz:

$$\mathbf{E_m = (\varphi_2-\varphi_{m''}) + (\varphi_{m''}-\varphi_m) + (\varphi_m-\varphi_{m'}) + (\varphi_{m'}-\varphi_1)}$$

Strukturę szklanej membrany przedstawiono na schemacie. Budowa przestrzenna szkła nie jest identyczna, dlatego każdą elektrodę szklaną wyróżnia inny potencjał asymetrii szkła. Oddziaływania roztworu z membraną zachodzą w bardzo cienkiej warstwie uwodnionego szkła o grubości około 10-100 nm (tzw. zewnętrzna warstwa żelowa). Różnica potencjałów między membraną a roztworem powstaje w wyniku reakcji wymiany jednowartościowych kationów metali alkalicznych ze szkła takich jak Na^+ lub Li^+ na jony wodorowe z roztworu (teoria jonowymienna schemat):

$$\mathbf{H^+ + Na^+A^-_{(szkło)} \leftrightarrow Na^+ + H^+A^-_{(szkło)}}$$

Podstawą mechanizmu powstawania różnicy potencjałów w półogniwach jest wymiana elektronów, natomiast potencjału membranowego wymiana jonów sodowych szkła na wodorowe roztworu. Należy podkreślić, że reakcja zachodzi po obu stronach membrany szklanej (w kontakcie z roztworem wewnętrznym i roztworem zewnętrznym) aż do ustalenia się równowagi termodynamicznej.

Potencjał elektrody szklanej składa się zatem z dwóch potencjałów: ***potencjału roztworu napełniającego elektrodę względem roztworu zewnętrznego i potencjał elektrody***

wyprowadzającej/chlorosrebrowej względem roztworu wewnętrznego. Potencjał elektrody chlorosrebrowej względem roztworu wewnętrznego ma wartość stałą, tak więc potencjał elektrody szklanej zależy od różnicy pH obu roztworów.

$$\mathbf{E = E^{\circ} + 2{,}303\,\frac{RT}{F}\,\log a_{H^+\,(r\text{-}r\ zew)}}$$

Z uwagi, że potencjał zależy od temperatury równanie dla temperatury 25^{o} przyjmuje następującą postać:

$$\mathbf{E = E^{\circ}_{(sz)} - 0{,}0592pH}$$

Pomiary pH z użyciem elektrody szklanej mają charakter porównawczy, co oznacza, że mierzy się SEM ogniwa w roztworze standardowym/buforowym, o ściśle określonej wartości pH (np. wzorzec buforu o pH 7,0; wz), a następnie w roztworze badanym (x).

$$\mathbf{pH_x = pH_{standard} + (E_x - E_{standard})/0{,}0592}$$

Elektrody szklane różnych typów wykazują różnice w wartościach potencjału standardowego E^{o}, wynika to z niejednorodnej budowy szkła. Każda elektroda będzie wykazywać nieco inny potencjał w tym samym, określonym pH (potencjały nie są ściśle odtwarzalne). Elektroda szklana musi być skalibrowana przed pomiarem, każda elektroda szklana jest inna, wykazuje inny potencjał asymetrii i E$^{\circ}$, dlatego każda krzywa kalibracyjna ma inny kształt. Nachylenie krzywej kalibracyjnej nazywamy charakterystyką elektrody. We wzorze przyjmuje on postać współczynnika k i informuje nas o czułości metody.

$$\mathbf{E = E^{\circ} - k\,pH}$$

Każda elektroda szklana ulega zużyciu, dlatego kalibracja przede wszystkim ma na celu określenie nachylenia krzywej i sprawdzenie sprawność elektrody. To tłumaczy, dlaczego pomiar pH z wykorzystaniem elektrody szklanej może być wykonany tylko metodą porównawczą - na podstawie zmiany potencjału elektrody. Zmiana ta następuje, gdy roztwór buforowy (wzorcowy; wz) jest zastąpiony przez roztwór badany. Wzory na potencjał elektrody w roztworze badanym (x) i w roztworze buforowym (wz) są następujące:

$$\mathbf{E_x = E^{\circ} - k\,pH_x}$$

$$\mathbf{E_{wz} = E^{\circ} - k\,pH_{wz}}$$

Po dodaniu stronami**:**

$$\mathbf{E_x - E_{wz} = - k\,(pH_x - pH_{wz})}$$

$$\mathbf{pH_x - pH_{wz}} = -\frac{E_x - E_{wz}}{k}$$

$$\mathbf{pH_x = pH_{wz}} - \frac{E_x - E_{wz}}{k}$$

Jest to podstawowe równanie pehametrii. Nie występuje w nim E^o. Pomiarowi podlega zmiana potencjału elektrody ($\mathbf{E_{wz} - E_x}$) spowodowana przeniesieniem elektrody szklanej wraz z elektrodą kalomelową z roztworu wzorcowego do roztworu badanego. Zmiana potencjału elektrody jest proporcjonalna do różnicy pH roztworów. Stąd pehametr jest przyrządem do pomiarów różnic pH dwóch roztworów.

Elektroda szklana jest powszechnie wykorzystywana ze względu na szeroki zakres pH w jakim można dokonywać pomiarów (w zależności od składu szkła około pH 2-12). Jednak zależność prostoliniowa potencjału w funkcji pH nie ma zastosowania poza opisanym zakresem pH. W roztworach mocno kwasowych poniżej pH 2 obserwuje się ***błąd kwasowy***, natomiast powyżej pH 12 – ***błąd zasadowy***. Błąd kwasowym spowodowany jest wysyceniem membrany jonami H^+ jest ich zbyt wiele, by wszystkie mogły związać się z membraną. Wskazania pehametru są więc zawyżone w porównaniu z wartością rzeczywistą. Natomiast błąd zasadowy dotyczy roztworów silnie zasadowych, o dużej zawartości jonów sodowych. W tych warunkach potencjał elektrody szklanej jest zależny od aktywności jonów sodowych, zgodnie z równaniem Nikolskiego membrana jest wrażliwa/selektywna na jony Na^+, jednocześnie spada selektywność na jony H^+. Zmierzona wartość pH jest niższa w porównaniu z wartością rzeczywistą, spowodowane jest to zmianą selektywności membrany (zbyt dużo jonów Na^+). Selektywność membrany, a przez to zakres pomiarowy można zmieniać np. poprzez modyfikację składu membrany.

5.2. Elektrody ciekłomembranowe

W skład membrany tych elektrod wchodzą: ***plastyfikator*** (zapewnia elastyczność, umożliwia ruchliwość jonów), polichlorek winylu (PCW) oraz ***wymieniacz jonowy*** i ***jonofor*** (składniki elektroaktywne wiążące oznaczane jony). Membrany mają grubość 100-200 μm i są nazywane klasycznymi do dziś używanymi do oznaczeń K^+, Na^+, Ag^+, NH_4^+, Ca^{2+}, Pb^{2+}.

Plastyfikatorem jest rozpuszczalnik organiczny niemieszający się z wodą. Wymieniacz jonowy to sól składająca się z dużego, niemobilnego jonu organicznego oraz z mobilnego, prostego

przeciwjonu hydrofilowego (np. K^+, Na^+, Cl^-). Jon organiczny ma właściwości silnie lipofilowe, dzięki czemu nie przechodzi do roztworu próbki ani roztworu wewnętrznego elektrody, zapewnia elektroobojętność membrany, obniża jej opór jednocześnie zwiększając przewodnictwo jonowe. Elektrody czułe na kationy zawierają wymieniacz kationowy, który składa się z organicznego anionu i wymiennego kationu np. lipofilowe tetrafenyloborany. Natomiast elektrody czułe na aniony zawierają membrany z wymieniaczem anionowym, składającym się z organicznego kationu i mobilnego anionu np. lipofilowe czwartorzędowe sole amoniowe. Selektywność membrany zapewnia jonofor (organiczny ligand zazwyczaj obojętny), który wiąże kationy lub aniony z roztworu (selektywne kompleksowanie jonów), przez co uwalniane są do niego mobilne jony wymieniacza jonowego. Przykładami jonoforów są naturalne antybiotyki: walinomycyna, która wiąże specyficznie jony potasowe oraz nonaktyna i monenzyna - selektywne odpowiednio na jony NH_4^+ i Na^+. Jonoforem mogą być też syntetyczne związki makrocykliczne, obojętne etery koronowe koordynujące jony o określonych wymiarach/przestrzennej budowie, tworząc kompleks „tzw. koronat".

Obecność wymieniacza jonowego ma na celu stabilizację kompleksu: badany jon-jonofor w przypadku, gdy jonofory nie są obdarzone ładunkiem elektrycznym lub samego jonoforu, gdy posiada ładunek.

Wyróżniamy ***elektrody z kationitem*** – np. ***elektroda wapniowa***, gdzie substancją elektrodowo czynną jest kationit o ładunku ujemnym – sól diestru didecylowego kwasu fosforowego(V) oraz ***elektrody z anionitem*** – zawierające np. czwartorzędowe sole amoniowe (***elektroda chlorkowa)*** i sole kompleksowe ($Me(fenantrolina)_3X_2$ Me^{2+}= Ni^{2+} i Fe^{2+}). Symbol X to anion, a elektroda służy do oznaczania jonów jednowartościowych: NO_3^-, ClO_4^-, Br^-, I^-. W tych elektrodach kompleksy lub czwartorzędowe sole amoniowe pełnią rolę jonoforów, które wybiórczo wiążą oznaczane jony z roztworu. Najpopularniejszą jest ***elektroda azotanowa***.

5.3. Elektrody jonoselektywne uczulane

Ostatnia grupa elektrod jonoselektywnych to ***elektrody enzymatyczne***. Reagują one na jony powstałe w wyniku rozkładu oznaczanego związku przez specjalne enzymy (np. ***elektroda do oznaczania mocznika*** z enzymem ureazą). Enzym (ureaza) może być unieruchomiony w żelu poliakrylamidowym, który pokrywa szklaną elektrodę, wiąże mocznik z roztworu i przekształca w jony NH_4. Powstające jony amonowe NH_4, określające potencjał tej elektrody jonoselektywnej, są miarą stężenia mocznika. Schemat hydrolizy mocznika pod wpływem ureazy: $(NH_2)_2CO + 2H_2O + H^+ \rightarrow^{ureaza}\rightarrow HCO_3^- + 2NH_4^+$

Innym sposobem jest związanie enzymu przy pomocy aldehydu glutarowego. Aldehyd ten reaguje zarówno z enzymem, jak i nośnikiem np. albuminą surowicy wołowej BSA (białko to pełni funkcje stabilizujące enzym), w wyniku czego powstaje usieciowana struktura z silnymi wiązaniami kowalencyjnymi (enzym nie ulega wymyciu).

Zalety elektrody enzymatycznej wynikają z selektywności/specyficzności oddziaływań substratu z enzymem. Membranę elektrody można pokryć również warstwą żywych komórek bakteryjnych wytwarzających odpowiedni enzym – są to tzw. elektrody bakteryjne.

Elektrody gazowe łączą charakter elektrody szklanej i enzymatycznej. Gazy najczęściej oznacza się pH-metrycznie elektrodą szklaną, ponieważ pozostają one w równowadze z jonami wodorowymi i wodorotlenowymi. Zmiana pH roztworu wewnętrznego przekłada się na zmianę potencjału elektrody szklanej. Membrany przepuszczające gazowy substrat reakcji np. NH_3 czy CO_2 mogą być wykonane z gumy silikonowej, teflonu lub polimerów: polipropylenu lub polietylenu. Przykładem elektrody do pomiaru CO_2 jest elektroda Severinghausa. Roztworem wewnętrznym tej elektrody jest $NaHCO_3$, który reaguje z CO_2, w wyniku czego zmienia się stężenie H^+ w roztworze, a tym samym jego pH. Czujniki te wykorzystywane są do pomiarów ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla w krwi.

Podsumowanie:

Każda elektroda wskaźnikowa musi mieć dobraną odpowiednią elektrodę odniesienia. Elektrody porównawcze czasami mają możliwość wymiany elektrolitu odpowiedniego dla wybranej elektrody pomiarowej.

Wadą konwencjonalnych elektrod jest obecność roztworu wewnętrznego, co wiąże się z pewnymi ograniczeniami przy ich stosowaniu np. pionowe ustawienie, uzupełnianie roztworu czy wpływ temperatury, brak możliwości miniaturyzacji.

Pod koniec ubiegłego wieku nastąpił rozwój elektrod bez roztworu wewnętrznego - elektrodę tą nazwano elektrodą ze stałym kontaktem (ang. *all solid- state; ASS* lub *Solid-Contact Ion-Selective Electrodes; SCISEs*). Szukano substancji/rozwiązań/struktur, które połączyłyby funkcje membrany i metalu. Na granicy styku tych faz zaproponowano polimer przewodzący np. polipirol, który zarówno może wymieniać jony z membraną i elektrony z przewodnikiem. Rozwiązanie to pozwoliło na obniżenie granicy wykrywalności, porównywalnych do metod spektroskopowych.

Zaletą elektrod typu *all-solid-state* jest możliwość ich przechowywania przez długi czas (zwiększenie trwałości/żywotności elektrody) oraz możliwość miniaturyzacji, co przekłada

się na objętość badanej próbki (do kilku µl). Ponadto mogą zastępować metody wymagające drogiej aparatury takie jak atomowa spektrometria absorpcyjna ASA czy chromatografia cieczowa HPLC. Rozwój ten przyczynił się do obniżenia granicy wykrywalności jonów oraz poprawy stabilności pomiarów potencjału. Z drugiej strony rozwój nowoczesnych sond wieloparametrowych i automatyzacja pomiarów, pozwala na ciągły monitoring wielu jonów/parametrów np. w oczyszczalniach ścieków.

Inną modyfikacją zwiększającą dokładność i precyzję było buforowanie jonów w roztworze wewnętrznym, co prowadzi do zatrzymania samorzutnego przepływu jonów z roztworu wewnętrznego do zewnętrznego i zawyżania wyników. Zastosowanie poliakrylanów ułatwiło dobieranie właściwości membrany.

Kolejnym rozwiązaniem było zastosowanie w składzie membran nanostruktur do unieruchomienia jonoforów np. nanocząsteczek złota, platyny czy nanorurek węglowych.

Bibliografia

„Chemia analityczna: podręcznik dla studentów. T. 2, Analiza instrumentalna” (red. Ryszard Kocjan).

„Sensory chemiczne i biosensory” (red. Zbigniew Brzózka, Elżbieta Malinowska i Wojciech Wróblewski; Wydawnictwo Naukowe PWN).

Artykuł przeglądowy: Elektrody jonoselektywne – klasyka i nowe koncepcje - Krzysztof Maksymiuk, Agata Michalska; CHEMIK 2015, 69, 7, 373–382.

Trendy w rozwoju i zastosowanie czujników potencjometrycznych Trends in design and ways of application of the potentiometric sensors Nikola Lenar, Beata Paczosa-Bator 2018; Analit 6 (2018) 53–59; Strona czasopisma: http://analit.agh.edu.pl/

V. Walidacja metod analitycznych

Walidacja jest jednym z ważniejszych zadań laboratorium. Może być ona wymogiem narzuconym przez prawo, np. w przemyśle farmaceutycznym albo działaniem wymuszonym jako element systemu zarządzania (ISO 9001) bądź też potwierdzeniem zgodności funkcjonowania z obowiązującymi zasadami dobrej praktyki (GHP, GMP, GLP).

W różnych dokumentach stosowane są różne pojęcia związane z walidacją. I tak np. w *normie ISO/IEC 17025* stosowane jest pojęcie „***walidacja metody***"; w *słowniku VIM* (Międzynarodowy Słownik Metrologii, ang. *International Vocabulary of Metrology*) „***walidacja procedury pomiarowej***"; a w *systemie GLP* (Dobra Praktyka Laboratoryjna, ang. *Good Laboratory Practice*) „***walidacja standardowej procedury analitycznej***".

Według normy EN ISO/IEC 17025:2005, która stanowi zbiór wymagań (technicznych i systemowych), jakie musi spełnić laboratorium, aby mogło uzyskać certyfikat akredytacji Polskiego Centrum Akredytacji: „Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących":

„**Walidacja jest potwierdzeniem przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione wymagania dotyczące konkretnie zamierzonego zastosowania**" (pkt 5.4.5.1 Normy).

Celem walidacji nie jest ocena analityka lub laboratorium wykonującego oznaczenie, lecz określenie parametrów analitycznych danej metody pomiarowej.

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

Walidacja jest procesem sprawdzającym spełnienie wymagań stawianych danej *metodzie analitycznej*.

Pod pojęciem ***metody analitycznej*** należy rozumieć wszystkie czynności związane z wykonaniem badań (analiz), począwszy od przygotowania próbki a skończywszy na pomiarze wielkości mierzonej, będącej podstawą oznaczenia i opracowania wyników. Każda metoda analityczna składa się z kilku etapów, każdy z nich musi być poddany walidacji.

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

Walidacja metod analitycznych obejmuje:

1. **Proces ustalania parametrów** charakteryzujących sprawność działania i ograniczeń metody oraz ***sprawdzenia jej przydatności do określonych celów****;*

2. **Procedurę sprawdzającą** czy metoda analityczna jest wolna od błędów systematycznych i przypadkowych, *nie tylko w ramach **kalibracji**, ale przede wszystkim wynikających z **interferencji** przy **analizie próbek rzeczywistych**;*
3. **Walidację** dla specjalistycznych instrumentów pomiarowych, *składającą się z **testów wykonywanych** przez odpowiednie służby zgodnie z odpowiednimi normami.* Dzięki walidacji można nie tylko określić parametry metody, scharakteryzować jej możliwości analityczne oraz poznać jej ograniczenia, ale także zidentyfikować czynniki, które mogą wpływać na jakość uzyskiwanych wyników badania.

Walidację wykonuje się:

1. Bezwzględnie dla wszystkich nowych metod, których przydatność należy ocenić, jest również prowadzona dla procedur modyfikowanych;
2. Gdy prowadzone są próby rozszerzenia zakresu stosowalności znanej metody analitycznej, np. oznaczanie analitu ale w innej matrycy, w innym zakresie stężeń;
3. Gdy dana metoda analityczna ma być wykorzystywana w innym laboratorium bądź z zastosowaniem innej aparatury, oznaczenia mogą być wykonywane przez innego analityka;
4. Jeśli zmieniono dostawców odczynników, tym samym, zmieniła się ich jakość.

W zależności od zakresu przeprowadzonych doświadczeń wyróżnia się walidację ***pełną*** lub ***częściową***.

Walidacja pełna jest wymagana, gdy metoda jest opracowywana lub wdrażana po raz pierwszy oraz w przypadku rozszerzenia istniejącej metody oznaczania. Przed przystąpieniem do analizy próbek badanych, należy określić wszystkie wymienione wcześniej parametry walidacyjne.

Walidacja częściowa jest przeprowadzana, gdy w opracowanej i zwalidowanej metodzie wprowadzane są zmiany. Zaliczamy do nich np.: przeniesienie metody między laboratoriami, zmianę metodologii analitycznej (np. zmiana rodzaju detekcji, zmianę sposobu przygotowania próbki do analizy), zakresu stężeń, aparatów pomiarowych i ich oprogramowania, zmianę selektywności ze względu na obecność w próbce nowych substancji lub metabolitów. Walidację częściową należy również przeprowadzić, gdy metoda nie była stosowana przez dłuższy czas, np. przez pół roku. W ramach walidacji częściowej określa się przede wszystkim precyzję, dokładność, liniowość.

Szczegółowe wymagania dotyczące walidacji metod analitycznych regulują wytyczne:

- Organizacji **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" **Międzynarodowej Rady Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych stosowanych u Ludzi**,
- **Farmakopei Stanów Zjednoczonych** (**USP**, ang. The United States Pharmacopea)
- oraz systemy zapewnienia jakości: **normy ISO serii 9000, serii 17025, Dobra Praktyka Laboratoryjna** (**GLP, *GOOD LABORATORY PRACTICE***).

W farmacji, obowiązek walidacji metod analitycznych narzuca na producentów substancji aktywnych i/lub produktów leczniczych Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania.

Walidacja jest także wymagana przez urzędy państwowe w ramach rejestracji leków.

- **normy ISO serii 9000** (zawierają terminologie, wymagania i wytyczne dotyczące wprowadzania, doskonalenia i kontrolowania systemu zarządzania jakością);
- **norma ISO serii 17025** (norma systemu zarządzania jakością w celu ujednolicenia wymagań technicznych i wymagań z zakresu zarządzania jakością, przeznaczonych dla laboratoriów badawczych i testujących w celu potwierdzenia ich kompetencji w zakresie przeprowadzanych badań, pomiarów i wzorcowania);
- **Dobra Praktyka Laboratoryjna** (**GLP)** (system zapewnienia jakości obejmujący działania organizacyjne oraz warunki, w których badania laboratoryjne np. badania środowiskowe, zdrowotne są planowane, dokonywane, monitorowane, rejestrowane, archiwizowane i prezentowane. Celem zasad dobrej praktyki laboratoryjnej jest promowanie jakości i wiarygodności uzyskiwanych wyników badań, od momentu ich planowania aż po właściwe przechowywanie danych źródłowych i sprawozdań, tak by możliwe było prześledzenie toku badania lub jego całkowite odtworzenie).

Tabela 1. Parametry metody analitycznej podlegające procesowi walidacji zalecane przez *International Conference of Harmonisation* (*ICH*) i *The United States Pharmacopea* (*USP*):

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 określić podstawowe cechy charakterystyczne metody analitycznej:

1. rodzaj oznaczanego składnika (analitu),
2. poziom stężenia i zakres stężeń analitu,
3. rodzaj matrycy,
4. obecność substancji przeszkadzających (interferentów),
5. rodzaj oczekiwanej informacji – ilościowa czy jakościowa,
6. wymagana granica wykrywalności i oznaczalności;
7. oczekiwana i wymagana precyzja i dokładność metody;
8. wymagana wrażliwość (odporność) metody;
9. wymagana aparatura – czy oznaczenia mają być wykonane na ściśle zdefiniowanym instrumencie, czy też mogą być prowadzane w oparciu o aparaturę tego samego typu;
10. możliwość zastosowania walidowanej metody w innym niż dane laboratorium.

Proces walidacji metody analitycznej może być przeprowadzany w różnej kolejności, jednak najbardziej racjonalne jest postępowanie zgodne z poniższym schematem:

1. ***Określenie selektywności*** w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych (optymalizacja warunków rozdzielenia i oznaczania dla analitów obecnych w próbkach roztworów wzorcowych),
2. ***Wyznaczenie liniowości***, wartości ***granic wykrywalności*** i ***granic oznaczalności***, ***zakresu pomiarowego***;
3. ***Określenie powtarzalności*** (krótkookresowa precyzja),
4. ***Wyznaczenie precyzji pośredniej***,
5. ***Określenie selektywności*** na podstawie wyników uzyskanych w trakcie analiz próbek rzeczywistych,
6. ***Wyznaczenie dokładności***/poprawności na podstawie analizy próbek materiałów odniesienia zawierających analit na różnych poziomach stężeń,
7. ***Określenie tolerancyjności metody***, np. na podstawie wyników porównań międzylaboratoryjnych.

Przeprowadzenie procesu walidacji wymaga zastosowania:

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

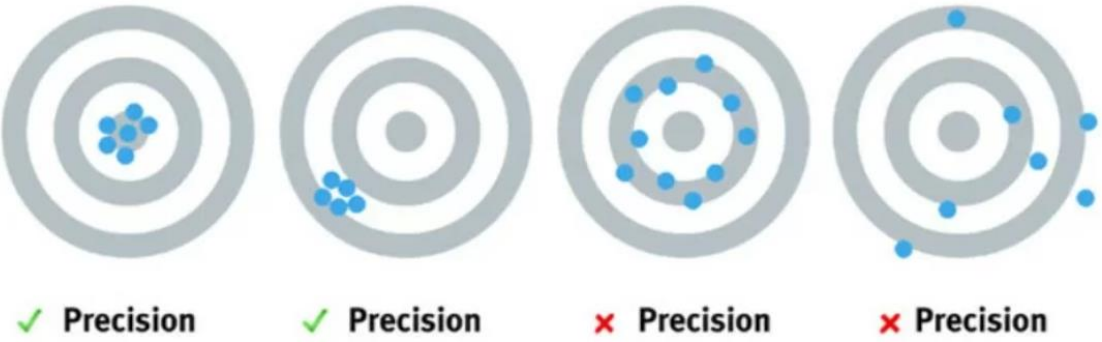
Precyzja

Precyzję dzieli się na 3 rodzaje:

- ***powtarzalność***
- ***precyzję pośrednią***
- ***odtwarzalność***

Określane są one w oparciu o wyznaczoną wartość odchylenia standardowego.

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



Precyzja odzwierciedla błąd przypadkowy w pomiarach.

2. **Powtarzalność**

   Wyznaczana jest na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego serii pomiarów przeprowadzonych w *danym laboratorium*, przez *danego analityka* z wykorzystaniem *danego urządzenia pomiarowego w krótkim czasie*.

3. **Precyzja pośrednia**

   Jest to 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*.

   Precyzja pośrednia jest pojęciem szerszym od powtarzalności, gdyż mają na nią wpływ czynniki osobowe i aparaturowe:

   a. ***czynniki osobowe*** – oznaczania przeprowadzają różni analitycy, praca danego analityka nie jest stabilna w ciągu całego czasu jej wykonywania;

   b. ***czynniki aparaturowe*** – pomiary mogą być przeprowadzone z wykorzystaniem różnych urządzeń z danego laboratorium; roztworów wzorcowych i odczynników pochodzących od różnych producentów; różnych akcesoriów, np. różnych kolumn chromatograficznych, o tej samej charakterystyce, lecz pochodzących od różnych producentów.

4. **Odtwarzalność** jest wyznaczana na podstawie wartości odchylenia standardowego wyników uzyskanych przez *różne laboratoria* (wyniki badań międzylaboratoryjnych).

   Aby wyznaczyć precyzję pośrednią, powtarzalność i odtwarzalność należy obliczyć wartości odchylenia standardowego.

   Według zaleceń ICH wartość odchylenia standardowego może być obliczona poprzez:

a. przeprowadzenie co najmniej ***9 niezależnych oznaczeń w całym zakresie*** pomiarowym, np. 3 niezależne oznaczenia na 3 poziomach stężeń;

b. przeprowadzenie ***6 niezależnych oznaczeń analitu w próbkach wzorcowych*** na poziomie stężenia odpowiadającego stężeniu w próbce rzeczywistej;

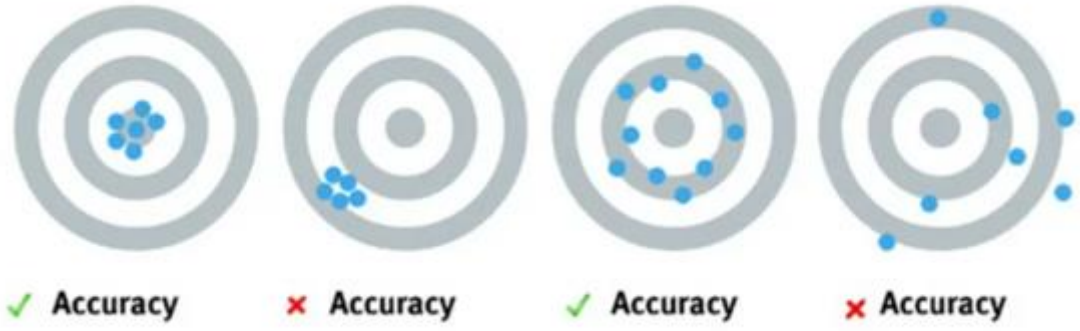
c. na podstawie wyników ***6 niezależnych oznaczeń dla analitów*** występujących w 3 różnych matrycach i na 2 lub 3 poziomach stężeń.

Z kolei, **wg zaleceń EURACHEM** „*A Laboratory Guide to Method Validation and Topics*", zaleca się przeprowadzić ***10 niezależnych oznaczeń*** i na tej podstawie obliczyć odchylenie standardowe.

Dokładność i poprawność

Dokładność jest miarą zgodności między uzyskanym wynikiem pojedynczego pomiaru a wartością rzeczywistą (oczekiwaną). Wskazuje jak blisko wartości prawdziwej (oczekiwanej) znajduje się uzyskany wynik pomiaru. Ilościowo wyraża ją błąd pomiaru. Trudno wyznaczyć dokładność, gdyż wartość prawdziwa zwykle nie jest znana. Wykorzystuje się wtedy pewną wartość przyjętą za prawdziwą.

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



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 może być wyrażana jako procent odzysku, który oblicza się wg wzoru: $\boldsymbol{R}\% = \frac{\boldsymbol{x_i}}{\boldsymbol{\mu}} \cdot \mathbf{100}\%$, gdzie $\boldsymbol{x}_\mathbf{i}$ – oznaczona ilość analitu w badanej próbce**,** $\boldsymbol{\mu}$ - znana ilość analitu w badanej próbce.

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.

Granica wykrywalności i powtarzalności

Należą do bardzo istotnych parametrów walidacji metody analitycznej. Wyznaczenie ich wartości bardzo często bywa problematyczne, głównie z powodu mnogości definicji opisujących oba pojęcia oraz trudności w wyznaczeniu wielkości poziomu szumów danego urządzenia pomiarowego.

1. **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. Jej wartość liczbowa zależy również od obecności innych składników występujących w analizowanej próbce oraz jest ściśle związana z poziomem szumów stosowanego urządzenia pomiarowego. Dotyczy stosowanego instrumentu pomiarowego oraz metody analitycznej.

Pojęcia związane z granicą wykrywalności:

a. **Stosunek sygnału do szumu (signal to nosie ratio – S/N)** to wielkość bezwymiarowa, która stanowi stosunek sygnału analitycznego do średniego poziomu szumów w próbce. Parametr ten służy do określenia wpływu poziomu szumu na względny błąd pomiaru. Najczęściej przedstawiany jako stosunek średniej arytmetycznej serii pomiarów dla próbek ślepych (bądź zawierających analit na bardzo niskim poziomie) do wartości odchylenia standardowego dla tej serii pomiarów.

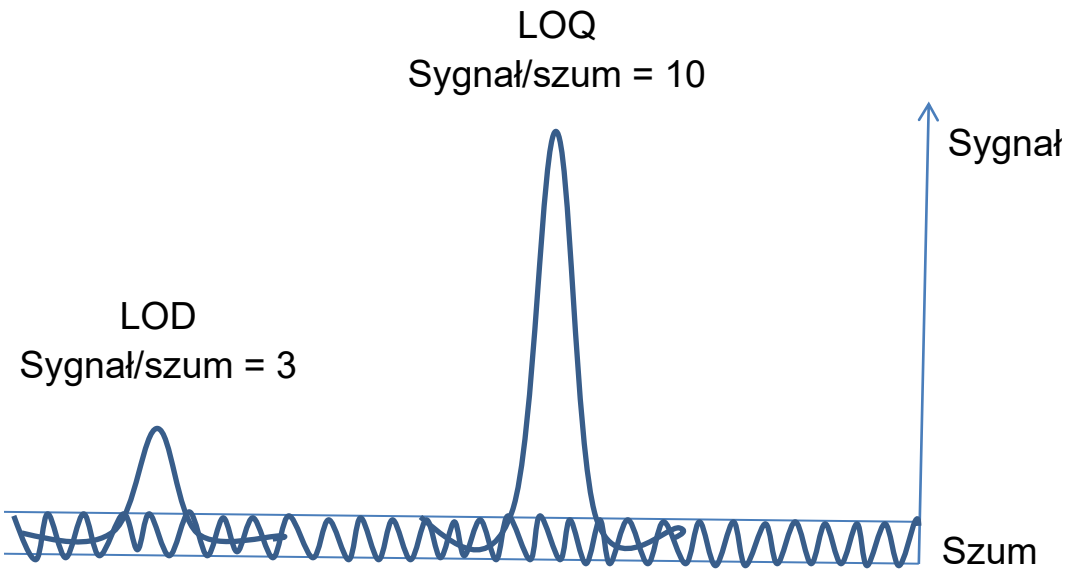
b. **Granica wykrywalności stosowanego instrumentu pomiarowego, detektora (instrumental detection limit - IDL)** - najmniejsza zawartość oznaczanego analitu,

jaka może zostać wykryta (bez ilościowego jej oznaczenia) za pomocą danego urządzenia pomiarowego.

c. **Granica wykrywalności metody analitycznej (metod detection limit - MDL)** - najmniejsza zawartość analitu, jaka może zostać wykryta przy zastosowaniu danej metody analitycznej.

Sposoby wyznaczania granicy wykrywalności:

- ***Oszacowanie wzrokowe***, stosowane głównie w analizach nieinstrumentalnych, kiedy nie jest możliwe wyznaczenie poziomu szumów;
- ***Obliczanie na podstawie stosunku S/N***, stosowane, gdy istnieje możliwość uzyskania linii bazowej szumów, kiedy oznaczeniu końcowemu poddawana jest próbka ślepa. Wyznacza się wartość stosunku sygnału do szumu dla próbki ślepej lub dla próbki o bardzo niskiej zawartości analitu a następnie stosuje się zasadę, że granica wykrywalności to trzykrotny poziom szumów dla stosowanej metody analitycznej.



- ***Obliczanie na podstawie wyników oznaczeń dla próbek ślepych***. Polega na przeprowadzeniu 10 niezależnych pomiarów dla 10 niezależnie przygotowanych ślepych próbek. Dla tak uzyskanych 10-ciu wyników oblicza się wartość średnią oraz wartość odchylenia standardowego:

$$\boldsymbol{LOD = x_{śr} + 3s}$$

Wartość granicy wykrywalności jest w tym przypadku równa wartości średniej powiększonej o trzykrotną wartość odchylenia standardowego.

- ***Metoda graficzna***, polega na wykonaniu oznaczeń dla 3 poziomów stężeń analitu (bliskich spodziewanej wartości granicy wykrywalności w próbkach) po co najmniej 6 równoległych oznaczeń. Do każdej serii pomiarów obliczyć wartość odchylenia standardowego i wyznaczyć zależność liniową **s = f(c).** Wyznaczyć wyraz wolny s_0 i obliczyć:

$$\boldsymbol{LOD = 3s_0}$$

- Metoda wyznaczana ***na podstawie odchylenia standardowego zbioru sygnałów i kąta nachylenia krzywej kalibracyjnej***:

  Wykorzystuje się zależność:

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

b – współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej

s – odchylenie standardowe, wyznaczane:

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

2. **Granica oznaczalności (limit of quantification - LOQ)** to najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji (pierwiastka, jonu, związku) możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją. Przyjmuje się, że:

$$\boldsymbol{LOQ = 3LOD}$$

Znane są definicje, w których LOQ = 2LOD czy też LOQ = 6LOD.

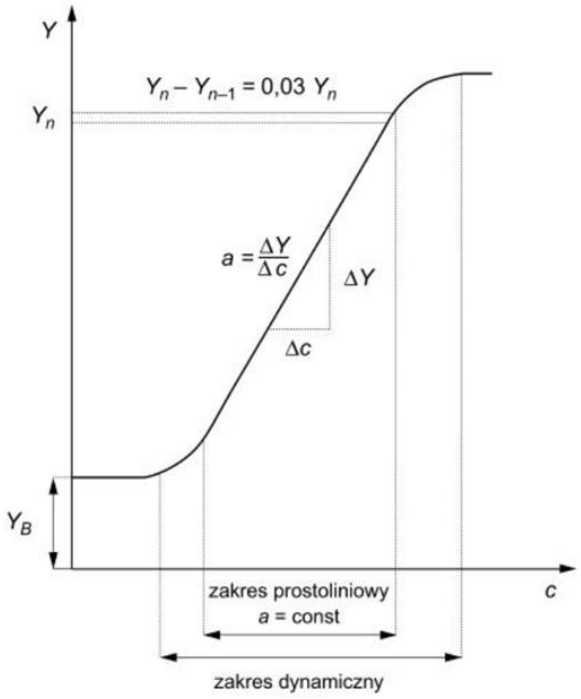
3. **Liniowość, zakres pomiarowy, czułość**

a. **Liniowość metody pomiarowej**

Liniowość określa przedział zawartości analitu, w którym sygnał wyjściowy urządzenia pomiarowego jest bezpośrednio proporcjonalny do jego stężenia. Najczęściej wyznacza się ją na podstawie wykresu kalibracyjnego, stosując poniższą procedurę:

- ***Liczba punktów pomiarowych***: Pomiary wykonuje się dla roztworów wzorcowych na co najmniej 6 poziomach stężeń.
- ***Powtórzenia:*** Dla każdego poziomu stężenia należy przeprowadzić 3 równoległe pomiary (w celu zapewnienia wiarygodności statystycznej).

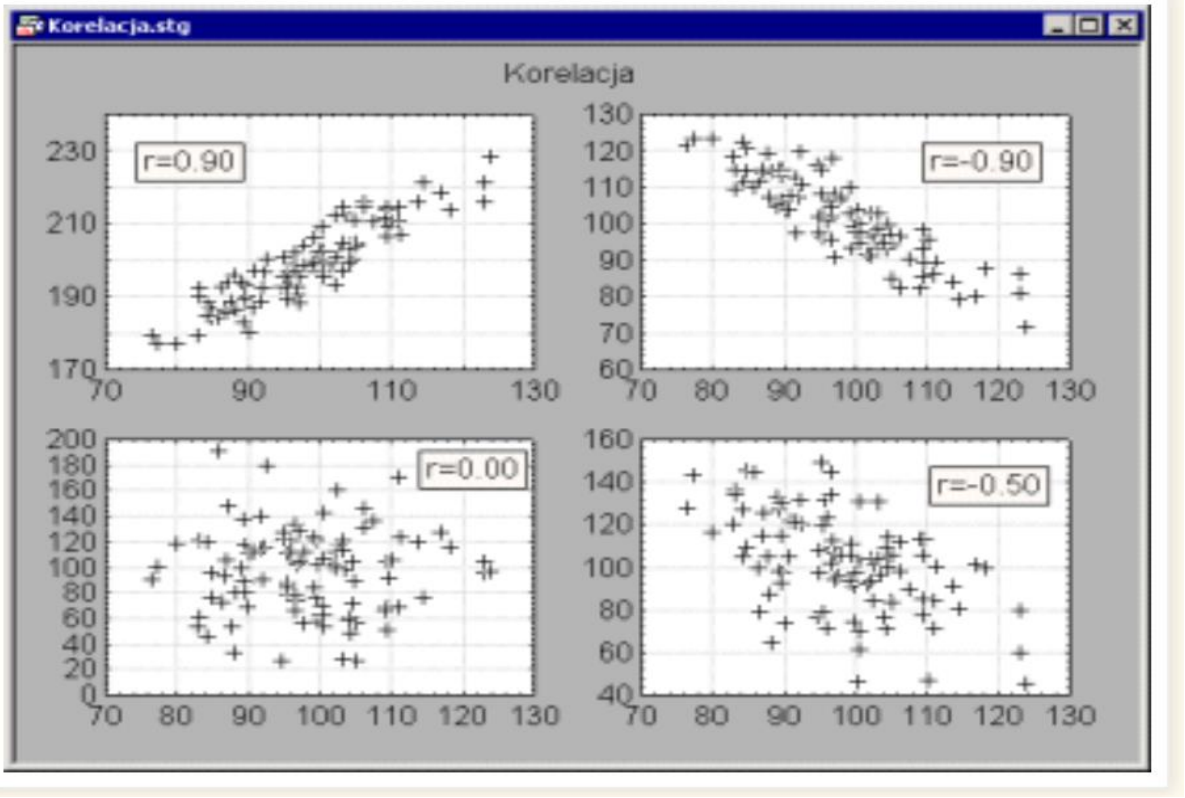
- ***Dobór zakresu stężeń***: Zakres stężeń wzorców musi obejmować oczekiwaną zawartość analitu w badanej próbce. Zazwyczaj przyjmuje się przedział od 50% do 150% wartości oczekiwanej.



Liniowość ocenia się wizualnie oraz przez wyznaczenie parametrów regresyjnych równania:

$$y = ax + b$$

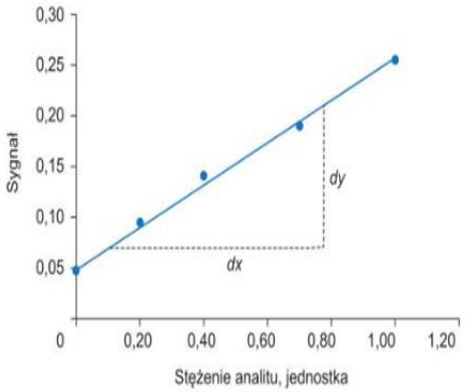
Miarą zależności między dwiema zmiennymi x i y jest współczynnik korelacji liniowej r. Stosując współczynnik korelacji do oceny liniowości zakresu metody lub krzywej wzorcowej, zwykle przyjmuje się założenie granicznej wartości współczynnika korelacji, np. r = 0,999. Gdy r = 1, zachodzi ścisła zależność liniowa, a wzrost x powoduje wzrost y. Gdy r = –1, wtedy również zachodzi zależność liniowa, ale wzrost x powoduje zmniejszenie wartości y. W przypadku, gdy r = 0 wielkości x i y są nieskorelowane. W przypadku oznaczania substancji głównej współczynnik *r* powinien być większy od **0,995**, w przypadku oznaczania śladów powinien być większy od **0,98**.



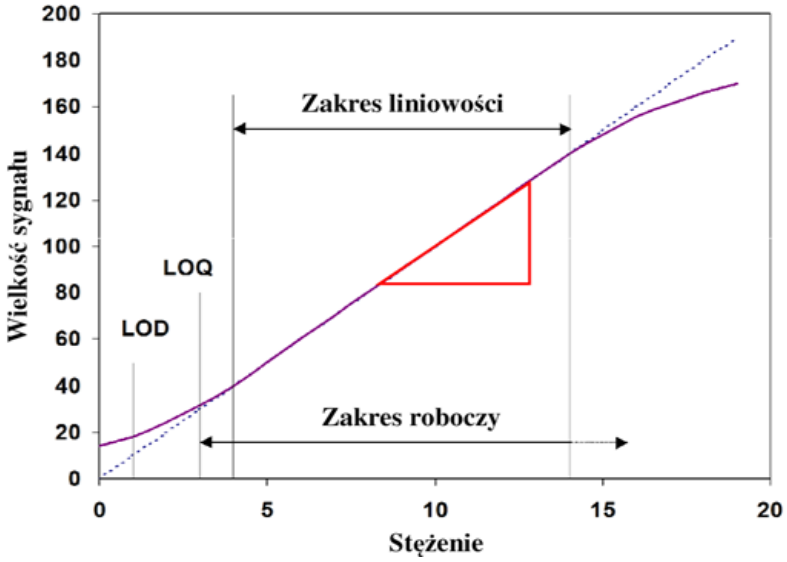
4. **Czułość metody analitycznej** to najmniejsza różnica zawartości analitu, jaka może być stwierdzona za pomocą tej metody (współczynnik kierunkowy wykresu kalibracyjnego, y = ax + b).

   Czułością metody analitycznej nazywamy nachylenie krzywej kalibracyjnej. Czułość określa 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 współczynnikiem kierunkowym (***a***) wykresu kalibracji ***y = ax + b; a = dy/dx***

   Określa ona ***najmniejszą ilość substancji lub jej stężenie, jakie można realnie zmierzyć daną metodą.***



5. **Zakres pomiarowy** to 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.



6. **Selektywność i specyficzność**

   Selektywność to ***zdolność do rozróżnienia i oznaczenia składników (lub grupy składników) bez zakłóceń ze strony innych składników***.

   Specyficzność oznacza, że ***metoda jest idealnie selektywna dla oznaczanej substancji***. Według **ICH** termin specyficzność odnosi się do metod, które można stosować tylko do pojedynczego analitu, a selektywność odnosi się do metod, które zapewniają wynik dla kilku substancji, ale jednocześnie możliwe jest rozróżnienie poszczególnych sygnałów.

7. **Odporność** określa ***wpływ niewielkich wahań warunków***, w których prowadzi się pomiary na wartość wyniku końcowego oznaczenia. Jest to parametr odnoszący się do zmian warunków wewnątrz laboratorium.

8. **Odporność metody analitycznej (niewrażliwość)** jest 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.

9. **Elastyczność** to parametr określający ***przydatność danej metody analitycznej w przypadku różnych warunków***. **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. Jeżeli pomiar jest wrażliwy na zmianę warunków analitycznych, warunki te powinny być dokładnie kontrolowane i opisane w procedurze. Należy ustalić, które czynniki muszą być kontrolowane szczególnie starannie, a których kontrola jest mniej znacząca.
10. **Stabilność** to parametr, który nie został ujęty w tabeli ICH i USP. Próbki analityczne ulegają przemianom w czasie przechowywania. Dotyczy to również wzorców i odczynników przygotowanych do analizy. Dlatego 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 ≤ 2% w porównaniu z sygnałem próbki świeżo przygotowanej.

Raport końcowy przeprowadzonej walidacji metody analitycznej

Powinien on zawierać następujące informacje:

- ***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.

Pojęcia statystyczne

Populacja generalna to zbiór wszystkich elementów (np. nieskończenie wiele wyników pomiarów), które nas interesują w badaniu.

Próbka statystyczna to część populacji generalnej (np. ograniczona liczba wyników pomiarów) wzięta do badań.

Populację generalną i próbkę statystyczną można opisać za pomocą parametrów: **średnia populacji**, **średnia próbki**, o**dchylenie standardowe populacji, odchylenie standardowe próbki, odchylenie standardowe średniej, wariancja**, **współczynnik zmienności**.

Średnia populacji μ

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

N – całkowita liczba pomiarów populacji

Średnia próbki $\bar{x}$

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

N – liczba pomiarów w próbce statystycznej

Średnia próbki $\bar{x}$ jest to wartość średniej arytmetycznej określonej próbki statystycznej, należącej do pewnej populacji. Definiowana jest ona jako stosunek sumy wartości pomiarowych i liczby pomiarów. W tym równaniu N – oznacza liczbę pomiarów w próbce statystycznej. W przypadku równania definiującego średnią populacji, N oznacza całkowitą liczbę pomiarów populacji. Jeżeli N jest niewielkie, wartość $\bar{x}$ różni się od wartości μ, ponieważ niewielka próbka danych może być niewystarczająco reprezentatywna dla całej populacji. W większości przypadków μ jest nieznana i musi być szacowana na wartości $\bar{x}$. Wraz ze wzrostem rozmiaru próbki (liczby pomiarów) różnica między $\bar{x}$ a μ maleje. Różnica ta staje się zaniedbywalna dla N w granicach od 20 do 30.

Odchylenie standardowe populacji (σ)

Odchylenie standardowe populacji σ jest miarą precyzji wyników populacji:

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

N – liczna wyników tworzących populację

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

Odchylenie standardowe próbki (s)

Używane do opisu niewielkich serii wyników pomiarowych. Można je wyrazić wzorem:

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

s = 0, wszystkie wyniki są identyczne

s > 0, im większe rozproszenie wyników tym wartość s większa

Odchylenie standardowe średniej (błąd standardowy), s_m

Określa odchylenie standardowe serii wyników podzielone przez pierwiastek kwadratowy z liczby wyników w serii:

$$\mathbf{s_m} = \frac{\mathbf{s}}{\sqrt{\mathbf{N}}}$$

Wariancja próbki, s^2, jest równa kwadratowi odchylenia standardowego próbki.

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

Względne odchylenie standardowe próbki (RSD, s_r)

Otrzymujemy je dzieląc odchylenie standardowe przez wartość średnią serii wyników:

$$\mathbf{RSD} = \mathbf{s_r} = \frac{\mathbf{s}}{\bar{\mathbf{x}}}$$

Może ono być wyrażony w częściach na tysiąc (ppt) lub procentach.

Współczynnik zmienności (CV) to względne odchylenie standardowe pomnożone przez 100%:

$$\mathbf{CV} = \frac{\mathbf{s}}{\bar{\mathbf{x}}} \cdot \mathbf{100\%}$$

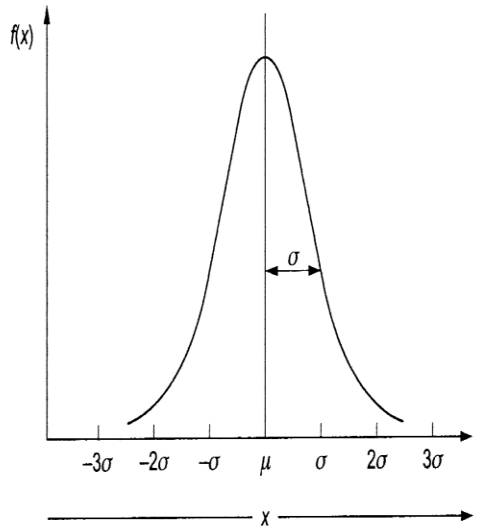
Przedział ufności

To przedział, w którym znajduje się wartość prawdziwa. Jego wartości skrajne nazywane są **granicami przedziału ufności**. W obliczeniach przyjmuje się wartość poziomu ufności **0,95** i **0,99**, co oznacza, że na 100 wyników 95 i 99 znajduje się w przedziale ufności.

Rozkład normalny

Rozkład normalny, zwany również rozkładem Gaussa lub krzywą Gaussa, jest najważniejszym rozkładem statystycznym. Ogólny kształt krzywej Gaussa we wszystkich przypadkach jest podobny i przypomina kształt dzwonu. Rozkład normalny jest też bardzo intuicyjny: większość obserwacji jest skupiona wokół średniej, obserwacje leżące dalej od średniej występują rzadziej.

Niezależnie od szerokości krzywej Gaussa, 68,3% pola powierzchni pod krzywą mieści się w granicach ±1σ względem średniej μ, co oznacza, że 68,3% wyników należących do populacji leży w tym obszarze. W granicach ±2σ mieści się 95,4% wszystkich wyników, a w granicach ±3σ mieści się ich 99,7%.



Testy statystyczne

1. **Test Q-Dixona**
   Test ten stosowany jest w celu sprawdzenia, czy w analizowanym zbiorze danych nie występuje wynik obarczony błędem grubym. Warunkiem jego zastosowania jest liczność próby mieszcząca się w przedziale od 3 do 10 obserwacji. Test Q-Dixona umożliwia odrzucenie tylko jednej wartości z badanego zbioru. Eliminacji podlega ta wartość pomiarowa, dla której obliczony parametr Q przekracza wartość krytyczną Q_{kr}, odczytywaną z odpowiednich tablic.
2. **Test chi-kwadrat (χ^2)**
   Test chi-kwadrat (χ^2) stosowany jest w celu oceny istotności różnicy między wartością odchylenia standardowego (lub wariancji) wyznaczoną dla badanego zbioru wyników a wartością zadaną. Opiera się on na porównaniu wartości empirycznych (uzyskanych w doświadczeniu) z wartościami teoretycznymi, obliczonymi przy założeniu braku zależności między zmiennymi. Istotne różnice między tymi wartościami mogą

świadczyć o istnieniu zależności. Warunkiem poprawnego zastosowania testu jest założenie normalnego rozkładu wyników w analizowanym zbiorze.

Sposób postępowania:

a. ***Oblicza się wartość odchylenia standardowego*** dla analizowanej serii wyników.

b. Następnie ***wyznacza się wartość statystyki testowej*** $\boldsymbol{\chi^2}$ zgodnie ze wzorem:

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

gdzie:

s– odchylenie standardowe obliczone dla badanego zbioru,

s_0– zadana wartość odchylenia standardowego,

n– liczba wyników w zbiorze.

c. Z tablic rozkładu chi-kwadrat odczytuje się wartość krytyczną χ^2_{kr}, uwzględniając przyjęty poziom istotności (najczęściej $\alpha = 0{,}05$) oraz liczbę stopni swobody $f = n - 1$.

d. Porównuje się wartość obliczoną z wartością krytyczną:

1. gdy $\chi^2 \leq \chi^2_{kr}$, przyjmuje się, że odchylenie standardowe nie różni się istotnie statystycznie od wartości zadanej,
2. gdy $\chi^2 > \chi^2_{kr}$, uznaje się, że różnica jest statystycznie istotna.

3. Test F-Snedecora

Test F-Snedecora służy do porównywania wartości odchyleń standardowych w dwóch różnych zbiorach wyników. Warunkiem jego poprawnego zastosowania jest założenie, że analizowane dane pochodzą z populacji o rozkładzie normalnym. Procedura testu polega na obliczeniu wartości statystyki F, którą następnie porównuje się z wartością krytyczną F_{kr}, odczytaną z odpowiednich tablic statystycznych z uwzględnieniem przyjętego poziomu istotności oraz liczby stopni swobody.

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

$\boldsymbol{s_1}$, $\boldsymbol{s_2}$ – obliczone wartości odchylenia standardowego dla dwóch zbiorów wyników

$\boldsymbol{n_1}$, $\boldsymbol{n_2}$ – liczba wyników dla dwóch zbiorów

Jeżeli otrzymana wartość F jest mniejsza lub równa F_{kr}, oznacza to, że różnice między odchyleniami standardowymi analizowanych zbiorów nie są statystycznie istotne. W przeciwnym przypadku uznaje się, że różnice te są istotne, a następnie wskazuje się

metodę mniej precyzyjną, czyli tę, dla której wartość odchylenia standardowego jest większa.

4. **Test t-Studenta**

Test t-Studenta stosowany jest w celu oceny istotności różnic między dwiema wartościami średnimi, a także do porównania wartości średniej z określoną wartością odniesienia. W przypadku porównywania dwóch średnich warunkiem jego zastosowania jest wcześniejsza ocena jednorodności wariancji, przeprowadzona za pomocą testu F-Snedecora. Procedura testu polega na obliczeniu wartości statystyki t,

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

gdzie $x_{1śr}$, $x_{2śr}$ – wartości średnie obliczone dla dwóch porównywanych zbiorów wyników n_1 i n_2

którą następnie porównuje się z wartością krytyczną t_{kr}, odczytaną z odpowiednich tablic statystycznych. Na tej podstawie dokonuje się oceny czy różnice między analizowanymi wielkościami są statystycznie istotne.

Analogiczne postępowanie stosuje się w przypadku porównywania wartości średniej z przyjętą wartością teoretyczną. Wartość statystyki *t* oblicza się wg wzoru:

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

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

Test t-Studenta znajduje również zastosowanie w analizie regresji — umożliwia ocenę istotności współczynników równania regresji liniowej poprzez porównanie ich z wartościami zadanymi.

5. **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 odchyleń standardowych (wariancji) różnią się w sposób statystycznie istotny – ***test Cochrana-Coxa, test Aspina-Welcha***,

- służący do weryfikacji hipotezy, że dwie populacje (zbiory wyników) charakteryzują się jednakowym rozkładem – ***test Kołmogorowa-Smirnowa***,
- test zmienności wewnątrzlaboratoryjnej – ***test Cochrana***,
- stosowane w celu wykrycia wyników wątpliwych – ***test Hampela, test Grubbsa***.

Wzorce i materiały odniesienia

...materiały odniesienia powinny odgrywać
w chemii analitycznej taką samą rolę,
jak metr w pomiarach długości i kilogram
w pomiarach masy
Międzynarodowy Kongres Chemików,
Chicago, 1888 r.

Według definicji podanej w słowniku terminów metrologicznych (VIM) **materiał odniesienia (RM,** *ang. Reference Material***)** to „***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***". **Materiał odniesienia** może być substancją czystą bądź mieszaniną, gazem, cieczą, ciałem stałym.

Z kolei, **certyfikowany materiał odniesienia (CRM,** *ang. Certified Reference Material***)** to „***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:**

1. 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.
2. Roztwory wzorcowe i mieszaniny gazowe, sporządzone zazwyczaj grawimetrycznie z czystych substancji.
3. Matrycowe materiały odniesienia, naturalne bądź syntetyczne.

Podział **materiałów odniesienia** pod względem **hierarchii metrologicznej**:

1. **pierwotne materiały odniesienia** – o najwyższej metrologicznej jakości, sporządzone przez narodowy instytut metrologiczny, uznawane przez instytucje krajowe, spójne z jednostkami układu SI;
2. **certyfikowane materiały odniesienia** – sporządzane przez krajowe laboratoria i instytucje, posiadają certyfikat;
3. **laboratoryjne materiały odniesienia i do kontroli jakości** – wytwarzane przez akredytowane laboratoria, posiadają ustanowione wartości odniesienia, nie poddane procesowi certyfikacji.

Materiały odniesienia są przygotowywane tak, aby były jednorodne, trwałe i miały stałą charakterystykę w odpowiednio długim czasie. Muszą wykazywać podobieństwo do próbek rzeczywistych pod względem składu matrycy, poziomu zawartości analitów, sposobu związania analitów z matrycą, rodzaju i stężenia substancji przeszkadzających oraz fizycznego stanu materiału.

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. Z tego też względu certyfikowane materiały odniesienia zajmują wyższe miejsce w hierarchii metrologicznej. Wymagania na etapie ich produkcji, wg zaleceń ISO, są bardziej rygorystyczne, co ma odzwierciedlenie zarówno w ich cenie, jak i dostępności.

Materiały odniesienia mogą być:

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

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.

Certyfikacja materiału odniesienia – procedura, która ustala wartość jednej lub więcej własności materiału albo substancji przez proces zapewniający zachowanie spójności pomiarowej do dokładnej realizacji jednostek miary, w których wartości własności są wyrażone, zakończona wydaniem świadectwa.

Certyfikat materiału odniesienia – dokument towarzyszący certyfikowanemu materiałowi odniesienia określający jedną lub więcej wartości własności i ich niepewności oraz potwierdzający, że została wykonana niezbędna procedura w celu zachowania terminu ważności CRM oraz spójności pomiarowej.

Rola chemicznych materiałów odniesienia

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

Materiał odniesienia powinien spełniać określone kryteria zapewniające jego przydatność i wiarygodność w zastosowaniach analitycznych.

- Przede wszystkim musi charakteryzować się stabilnością wartości właściwości, którą odtwarza, w akceptowalnym okresie oraz w możliwych do zapewnienia warunkach przechowywania, transportu i użytkowania.
- Istotna jest również jego jednorodność, tak aby wartość właściwości oznaczona w jednej części partii mogła być odnoszona do każdej innej części tej partii w granicach dopuszczalnej niepewności.
- Ponadto wartość właściwości materiału odniesienia powinna być ustalona z odpowiednią precyzją i dokładnością, adekwatną do jego zamierzonego zastosowania.
- Niezbędnym elementem jest także przejrzysta i kompletna dokumentacja opisująca materiał odniesienia oraz przypisaną mu wartość właściwości, sporządzona zgodnie z wytycznymi zawartymi w Przewodniku ISO nr 31.

Materiały odniesienia służą m.in. do wyznaczania parametrów walidacyjnych, np. dokładności oraz sprawdzania etapów analizy chemicznej, np. pobierania i przygotowywania próbek, natomiast roztwory wzorcowe służą głównie do kalibracji układu pomiarowego. Dlatego stawia się im wymagania:

- stężenia wszystkich składników, w tym matrycy, powinny być zbliżone do stężeń odpowiednich składników w badanej próbce,
- dokładność znajomości stężeń składników powinna umożliwić wykrywanie błędów systematycznych,

- powinna być znana niska wartość niepewności. Niepewność pomiaru występuje zawsze i jest składową niepewności wszystkich pojedynczych etapów postępowania analitycznego.

Roztwory wzorcowe – wymagania:

- nie powinien zawierać zanieczyszczeń wpływający na wynik kalibracji,
- powinien umożliwiać przeprowadzenie kalibracji w całym wymaganym zakresie stężeń,
- dokładność znajomości stężeń składników powinna być porównywalna z oczekiwaną dokładnością wyników pomiaru.

Wytwarzaniem CRM na skale ogólnoświatową zajmują się wyspecjalizowane do tego celu laboratoria. Certyfikowanie materiałów odniesienia odbywa się w nich na podstawie wiarygodnych metod referencyjnych.

Producenci 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.
- Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgia (Placówka Komisji Europejskiej) (BCR)
- Laboratory of Government Chemist, Teddington, Wielka Brytania (LGC)
- International Atomic Energy Agency, Wiedeń, Austria (IAEA)
- National Institute of Environmental Studies, Tsukuba Ibaraki, Japonia (NIES)
- National Research Counsil of Canada, Ottawa, Kanada (NRCC)
- 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.

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, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2016

- W. Hyk, Z. Stojek: Analiza statystyczna w laboratorium, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2016
- M. Dobecki: Zapewnienie jakości analiz chemicznych, Instytut Medycyny Pracy im. prof. J. Nofera w Łodzi 2004
- D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch: Podstawy Chemii Analitycznej, PWN Warszawa 2006

VI. Błędy w analizie chemicznej

Podczas wykonywania analiz chemicznych najistotniejszym zadaniem jest dostarczenie wiarygodnego wyniku. Analizowanie różnych obiektów materialnych ma na celu ustalenie ilości składników lub określonego składnika. Ilość ta zwykle ma duże znaczenie dla oceny próbki i obiektu badanego. Ważne dla tej oceny są dokładność i precyzja uzyskanych wyników, które stanowią podstawowe kryterium jakości pomiaru analizy chemicznej.

POMIAR stanowi ogół czynności, które wykonujemy w celu ustalenia wartości danej wielkości mierzonej, będącej cechą obiektu materialnego, procesu, zjawiska itp.

DOKŁADNOŚĆ pozwala ocenić zbieżność wyniku postępowania analitycznego i prawdziwej wielkości mierzonej. Prawdziwa wielkość mierzona jest zwykle nieznana, więc nazywamy ją WARTOŚCIĄ UMOWNIE PRAWDZIWĄ lub PRZYJĘTĄ WARTOŚCIĄ ODNIESIENIA. Wielkość mierzona nazywana jest MEZURANDEM, jest to np. masa, stężenie lub inna badana cecha analitu.

Dokładność charakteryzujemy ilościowo określając błąd pomiaru, nazywanym BŁĘDEM BEZWZGLĘDNYM, błędem analitycznym lub błędem absolutnym. Jest on definiowany jako różnica między zmierzoną wartością **x** a wartością rzeczywistą. Może być dodatni lub ujemny i podawany jest zwykle *w postaci wartości bezwzględnej*. Dla wartości średniej z pomiarów jest to różnica tej wartości i wartości rzeczywistej (**μ**).

$$\mathbf{E_{abs} = x - \mu}$$

Błąd pomiaru wyrażony jest w takich jednostkach jak wartość mierzona.

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%. Błąd względny pomiaru jest wielkością niemianowaną lub podawaną w procentach.

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

Wszystkie metody analityczne obarczone są błędami przypadkowymi i systematycznymi, charakterystycznymi dla danej metody.

Błędy pomiaru i ich rodzaje

Każdemu procesowi pomiarowemu towarzyszą BŁĘDY POMIARU, których całkowite wyeliminowanie nie jest możliwe. Zadaniem analityka jest rozpoznanie ich źródła, natury,

ocena wielkość i uwzględnianie na każdym dalszym etapie obróbki danych. Ta przyjęta wartość odniesienia jest przyczyną NIEPEWNOŚCI POMIAROWEJ, opisana ustalonymi błędami pomiaru określana jest RACHUNKIEM NIEPEWNOŚCI.

Błędy pomiaru wynikać mogą z różnych źródeł i dzielą się na dwie zasadnicze grupy: BŁĘDY WSKAZANIA i BŁĘDY ODCZYTANIA. Poniżej przedstawiono ich składowe mogące wpływać na ogólny błąd pomiaru:

Błąd wskazania

1. Niedokładność narzędzia pomiarowego zależne od rodzaju i specyfiki tego narzędzia;
2. Błędy charakterystyczne dla metody pomiaru i źle dopasowane do wartości mierzonej;
3. Niedoskonałość obiektu podlegającego badaniu – próbka niejednorodna lub niestabilna;
4. Niedoskonałość narzędzia pomiarowego – zanieczyszczenia, niewłaściwy zakres pomiaru (np. niewłaściwie dobrana analityczna długość fali promieniowania), aparat niewłaściwie kalibrowany, aparatura zużyta;
5. Czynniki zewnętrzne wpływające na pracę narzędzia pomiarowego – temperatura otoczenia w przebiegu pomiaru, wstrząsy, wpływ pola magnetycznego, podmuchy, niestabilność napięcia prądu zasilającego aparaturę pomiarową.

Błędy odczytania

1. Niedoskonałość zmysłów analityka lub brak umiejętności oraz wprawy;
2. Niewłaściwe oświetlenie;
3. Trudność w odczytaniu wyniku wynikająca z niedoskonałości narzędzia – nieczytelna skala, niestabilność odczytywanej wartości.

Błędy pomiaru rozpatrywane są na podstawie pochodzenia, możliwości ich niwelowania i unikania ich wpływu na wynik końcowy. Związany jest z tym podział podstawowy rodzajów błędów występujących w analizie chemicznej i sposobu postępowania w przypadku ich wykrycia.

Błędy przypadkowe

Podstawową grupą błędów, pojawiającą się podczas pomiarów są BŁĘDY PRZYPADKOWE. Te błędy są właściwie nieodłącznym efektem każdego pomiaru, więc nie

można ich wyeliminować. Zwykle **są niewielkie** i dzięki temu **nie wpływają na wynik końcowy**. Ich całkowity brak w serii pomiarów może świadczyć o podświadomym dążeniu analityka do uzyskania jednakowych wyników. Dzieje się tak w przypadku, gdy sugestia może wpływać na widoczne efekty pomiaru (zmiana barwy, odczytanie wyniku na skali narzędzia pomiarowego itp.). Uniknięcie błędów przypadkowych w taki sposób pozbawia analityka możliwości uśrednienia wyników i oceny precyzji pomiaru. **Przyczyny błędów przypadkowych nie są dokładnie znane**. Nie można też przewidzieć ich wielkości. Na ich powstawanie mają wpływ zakłócenia różnego pochodzenia. Zakłócenia te wpływają na sygnał mierzony, próbkę lub działanie analityka. Błędy przypadkowe **powodują niewielki rozrzut wokół pewnej wartości średniej**. Pomiary mogą być większe lub mniejsze od średniej. Wyniki w serii wielokrotnie powtarzanego pomiaru uwidaczniają je różniąc się między sobą. Nie można zapobiegać powstawaniu błędów przypadkowych.

Błąd przypadkowy kwalifikowany jest jako zdarzenie losowe i **podlega rozkładowi statystycznemu, zazwyczaj rozkładowi normalnemu (Gaussa)**. Statystycznie więc ze wzrostem wartości tego błędu maleje prawdopodobieństwo jego wystąpienia. Najbardziej prawdopodobne jest uzyskanie wyniku bliskiego średniej arytmetycznej będącej w tym przypadku najlepszym oszacowaniem. Jakość średniej wzrasta ze wzrostem liczby pomiarów w powtarzalnych warunkach. Jak widać błędy przypadkowe zazwyczaj dotyczą zmian, które nie są skutkiem celowych działań i zachodzą w kilku kolejnych pomiarach wykonywanych przez tego samego analityka z najwyższą starannością, przy niemal identycznych parametrach eksperymentalnych.

Podczas każdego pomiaru może pojawić się BŁĄD SKRAJNY (zwany też GRUBYM lub NADMIERNYM). Są to błędy przypadkowe o bardzo dużych wartościach i bardzo małym prawdopodobieństwie wystąpienia. Ponieważ **mogą wpłynąć w sposób istotny na wartość średnią wyniku**, powinny być odrzucane przy pomocy odpowiednich testów statystycznych. Przyczyną takiego błędu mogą być pojedyncze, większe zakłócenia. Najczęściej jest to błąd operatora: nieprawidłowe wykonanie pomiaru, błędny odczyt, błędny zapis wyniku, złe pobranie próbki, złe wykonanie procedury oznaczeń, błąd w obliczeniach, złe ustawienie pokręteł, nie przepłukanie biurety, pipety roztworem odmierzanym. Niekiedy błędy te wynikają z nagłej awarii aparatury lub nagłej zmiany warunków fizycznych środowiska doświadczenia. Błędy grube powinny być zauważone i eliminowane jak najwcześniej, aby uniknąć wprowadzenia ich do obliczeń wyników badań. Istnieje ścisły sposób kwalifikowania błędów jako nadmierne, zwany **metodą 3σ** (sigma). Rozkład normalny wyników pomiaru pozwala na obliczenie średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego. W przedziale utworzonym

przez ±3 odchylenia standardowe wokół średniej znajduje się ok 99,7% wyników. Pozostałe wyniki uznajemy za błędy grube i eliminujemy. Istnieje wiele innych sposób na wykrycie błędów grubych, które mogą być przydatne w pracy laboratoryjnej, są to m.in. test Grubbsa, Q-Dixona czy Kryterium Chauveneta.

Błędy systematyczne

Inną grupą błędów w analizie laboratoryjnej są BŁĘDY SYSTEMATYCZNE (nazywane też OBCIĄŻENIEM). Mogą być małe lub duże, ale mają charakter stały. Błędem takim nazywa się **odchylenie otrzymanego wyniku** (średniej z wyników), które występuje zawsze lub okresowo 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 o tę samą wartość). Jednoczesne występowanie błędów przypadkowych może utrudnić zauważenie tego trendu, jeżeli błędy będą tego samego rzędu. **Przyczyny błędu są ściśle określone**. Mogą być ustalone i usunięte poprzez korektę postępowania. Jeżeli przyczyna nie może być usunięta, wprowadzona jest odpowiednia **poprawka** lub **standaryzacja**. Do przyczyn błędów systematycznych należą: metoda pomiaru (niedociągnięcia i uproszczenia metody); błąd przyrządu (ograniczona dokładność aparatury); zanieczyszczenie odczynników; praca analityka. Główne przyczyny powstawania błędów systematycznych są podstawą podziału i charakterystyki. Poniżej przedstawiono ich definicje.

BŁĘDY METODYCZNE wynikają z *istoty metody pomiarowej i* ***nie mogą być usunięte***. Błąd metodyczny powinien być mały, tak by był możliwy do pominięcia. Wynika on np. z konieczności dodania nadmiaru odczynnika dla uzyskania dostrzegalnego efektu, zbyt wolno przebiegającej reakcji i innych. Związany jest z potrzebami metody analitycznej. Tego typu błędy dotyczą **niekompletności reakcji**, np. rozpuszczalność osadów, rozkład, ulatnianie substancji badanej, różnica między uzyskanym punktem końcowym a teoretycznym punktem końcowym oznaczenia. Istnieje bardzo wiele możliwych przyczyn błędów systematycznych. Są nimi **niedociągnięcia i uproszczenia metody.** Podczas strącania trudno rozpuszczalnego osadu, w ramach analizy wagowej, występuje zjawisko współstrącania innych składników próbki prowadzące do zawyżania wyniku, w pomiarach masy pomijamy zmiany przyspieszenia ziemskiego wywołane szerokością geograficzną, wpływem Księżyca oraz Słońca. Przejawem niedociągnięcia procedury jest też **odchylenie warunków** prowadzenia pomiaru względem warunków, w jakich system był wzorcowany. Zmiana temperatury powoduje m.in. zmiany wymiarów badanego obiektu oraz samego systemu pomiarowego, zmiany rezystancji, wibracje

mogą zakłócać pomiar masy. Procedura powinna przewidywać i takie sytuacje i zwracać na nieuwagę.

BŁĘDY APARATUROWE związane są z *niedokładnością urządzenia pomiarowego lub jego niestabilną pracą*. Błędy związane ze stosowanymi przyrządami lub odczynnikami są wynikiem używania nieskalibrowanych lub wadliwych urządzeń pomiarowych. Mogą również wynikać z użycia niewłaściwych lub zanieczyszczonych odczynników. W tym zakresie występują też **błędy addytywne**, które są wynikiem obecności zanieczyszczeń w substancjach wzorcowych i substancji oznaczonej.

Wszystkie przyrządy są źródłem potencjalnych błędów systematycznych. Najczęściej występują tu: **błąd wskazania** przyrządu pomiarowego opisany w świadectwie wzorcowania; **wahania napięcia** źródła prądu; **zabrudzenie lub korozja** styków; **zużycie źródła** promieniowania.

Błędy te ***mogą być usuwane*** *przez staranne i częste kalibrowanie przyrządów pracujących w tych samych warunkach*.

Inne przyczyny błędów aparaturowych to ograniczona **dokładność przyrządu.** Każdy przyrząd ma ograniczoną **rozdzielczość**, która umożliwia odczyt z określoną i skończoną dokładnością. Istnieją reguły postępowania w przypadku odczytu z miernika analogowego, gdy bierze się pod uwagę grubość wskazówki oraz długość działki elementarnej, a także taśm mierniczych, kątomierzy, termometrów. W tych przypadkach za błąd maksymalny uznaje się na ogół połowę działki. Inne zasady obowiązują podczas odczytu z mierników cyfrowych, które generują niepewność równą co najmniej ostatniej cyfrze znaczącej, gdy wskazania są stabilne lub połowę zakresu zmian plus jedna cyfra znacząca, gdy wskazania wahają się w pewnym zakresie.

BŁĘDY INDYWIDUALNE (OPERATORA) to błędy ludzkie i operacyjne związane są z **nieprzestrzeganiem przyjętego toku postępowania** procedury analitycznej, np. nadmierne przemywanie osadu, utrzymywanie nieprawidłowych temperatur, narażanie substancji higroskopijnych na działanie wilgoci. Do tej grupy błędów zalicza się również błędy związane z **niemożnością uzyskania przez analityka dokładnych wyników**, np. niektóre osoby nie są w stanie zaobserwować ostrych zmian koloru w analizie miareczkowej, co powoduje dodanie większej ilości odczynnika miareczkującego niż jest wymagana. Przyczyną jest też **brak doświadczenia lub umiejętności analityka**: przenoszenie osadu na sączek, ważenie ciepłych naczyń wagowych, nieprawidłowa lokalizacja menisku w biurecie, nie przemycie pipety roztworem odmierzanym.

Błędy systematyczne mają określoną wartość wraz z uzasadnioną, dającą się przypisać przyczyną oraz są możliwe do uniknięcia Błędy systematyczne można istotnie zmniejszyć, stosując:

1. kalibrację urządzeń, aparatury,
2. wykonywanie równolegle analizy próby kontrolnej,
3. wykonywanie równolegle analizy ślepej próby,
4. krzyżowe sprawdzanie wyników różnymi metodami analizy,
5. metodę dodawania wzorca,
6. metodę standardów wewnętrznych,
7. nabieranie wprawy przez analityka.

Korzystając z wyników niezależnych metod, wiedzy i doświadczenia oraz informacji w poradnikach analitycznych można oszacować wielkość błędu systematycznego i w oparciu o to ustalić **poprawkę**, dla danej metody. Poprawkę należy dodać lub odjąć od ustalonego wyniku obciążonego błędem. W ten sposób z **wyniku surowego** uzyskujemy **wynik skorygowany**. Ustalenie poprawek jest ważnym elementem walidacji i musi znaleźć się w każdym sprawozdaniu.

Dogłębna analiza błędów pozwala na dobre oszacowanie niepewności pomiarowej i jest niezbędnym etapem procesu analitycznego.

Niedokładność pomiaru

Ocenę niedokładności pomiaru można wykonać dwoma sposobami: **tradycyjnym** – **opartym na pojęciu błędu granicznego** lub obecnie zalecanym – **opartym na pojęciu niepewności standardowej**. Zapis wyniku pomiaru wyznacza przedział ufności, wewnątrz którego prawdopodobnie występuje wartość rzeczywista. Prawdopodobieństwo wystąpienia wartości rzeczywistej w tym zakresie jest określone podanym **przedziałem ufności**.

Ważną informację jest tu sposób zapisu wyniku ustalający liczbę cyfr znaczących. Zapis 34,5 (3 cyfry znaczące) oznacza, że błąd bezwzględny wyznaczenia liczby jest mniejszy lub równy 0,05. Zapis 34 oznacza, że błąd jest rzędu 1.

Zgodnie z regułami, liczba 120 ma trzy cyfry znaczące. Jeżeli z wartości błędu wynika, że ostatnie 0 nie jest cyfrą pewną tzn. błąd jest większy od 0,5 to nie wykazujemy jej stosując formę zapisu naukowego $1{,}2 \cdot 10^2$, ponieważ w tym zapisie wszystkie cyfry traktowane są jako cyfry znaczące.

Zapis 20,0 jest poprawny, gdy błąd bezwzględny jest mniejszy lub równy 0,05, mimo, że liczba cyfr znaczących wynosi 1.

Liczbę, po zaokrągleniu zapisano w postaci 67,2. Podane w liczbie 67,2 trzy cyfry znaczące oznaczają, że maksymalny błąd bezwzględny wynosi 0,05.

Zalecenia zapisywania błędu bezwzględnego i niepewności pomiarowej

Błąd bezwzględny powinien być zapisany z podaniem dwóch cyfr znaczących. Zaokrąglając niepewności pomiarowe dokonujemy **zaokrąglenia w górę**. Gdy obliczony błąd bezwzględny wynosi 3,12 po zaokrągleniu do 2 cyfr znaczących zapisujemy go jako 2,2.

Zasady zaokrąglania wyników pomiarów i ich niepewności.

Zasada główna mówi, że najpierw należy zaokrąglić wartość niepewności pomiaru a dopiero potem wartość wyniku pomiaru badanej wielkości fizycznej.

Wartość niepewności zaokrągla się zwykle w górę do dwóch cyfr znaczących otrzymanych wartości lub do jednej cyfry znaczącej, jeżeli nie zmieni to wartości niepewności o więcej niż 10%.

Wynik pomiaru oblicza się o jedno miejsce dalej niż miejsce dziesiętne na którym zaokrąglono niepewność, po czym należy zaokrąglić do tego miejsca dziesiętnego, do którego zaokrąglono niepewność (wg podanych zasad zaokrąglania wyników).

Wyniki końcowe (wartość mierzonej wielkości fizycznej i jej niepewności) należy zapisywać, tak, by niezerowe cyfry wartości niepewności znajdowały się na miejscach dziesiętnych i setnych.

Podsumowanie

Najczęstsze przyczyny błędnych wyników analizy:

1. Błędnie wykonane czynności przygotowawczych;
2. Zanieczyszczenie podczas pobierania i przechowywania próbek;
3. Brak homogenności próbki;
4. Zanieczyszczenia próbek lub roztworów próbek podczas przygotowania do analizy (czystość narzędzi, naczyń, zmiana jakości odczynników, zmiana warunków fizycznych);
5. Adsorpcja lub desorpcja z powierzchni naczyń, aparatury, filtrów itp.;
6. Straty z powodu lotności składników próbki;
7. Zakłócenie przebiegu reakcji chemicznych;
8. Wpływ matrycy (interferencje);

9. Nietrwałość roztworów;

10. Nieodpowiednie substancje, z których wykonano wzorce;

11. Błędy przy przygotowaniu próbek do analizy (straty analitu, zanieczyszczenie, reakcje uboczne);

12. Błędy metodyczne;

13. Błędy pomiaru instrumentalnego;

14. Błędy obliczeniowe (przeliczenia, nieprawidłowe zaokrąglenia, błędne jednostki, błędny wybór liczby cyfr znaczących);

15. Błędy kontroli jakości (brak kontroli, zbyt rzadka kontrola, nieprawidłowa kontrola).

Bibliografia

1. Jarosław Chojnacki i inni, pod red. A. Okuniewski, Skrypt do ćwiczeń, Chemia ogólna i nieorganiczna, ćwiczenia rachunkowe, Rozdział 1. Podstawowe pojęcia chemiczne Stanisław Konieczny, WYDZIAŁ CHEMICZNY Politechniki Gdańskiej, Katedra Chemii Nieorganicznej, Gdańsk 2019

2. E. Bulska, Metrologia chemiczna, Malamut 2008

3. W. Hyk, Z. Stojek, Analiza statystyczna w laboratorium, PWN SA Warszawa 2016

4. J. Miller, J. Miller Statystyka i chemometria w chemii analitycznej, PWN SA Warszawa 2016.

VII. Kryteria wyboru w planowaniu i realizacji analizy chemicznej

Poniżej przedstawiono terminy pochodzące ze słownika chemii analitycznej, opisujące definicje i zasady analityki oraz cechy charakteryzujące metody analityczne.

Technika analityczna – zespół metod analitycznych wykorzystujących to samo zjawisko fizyczne.

Metoda analityczna – sposób identyfikacji (wykrywania) lub oznaczania składnika próbki. Metoda analityczna przedstawia strategiczną koncepcje uzyskiwania optymalnych informacji o obiekcie badań przy założonej zasadzie pomiaru. Ustala główny zarys przebiegu analizy. Metoda analityczna to konkretny sposób oznaczania analitu za pomocą danej techniki, poprzez wykonanie określonego postępowania. Metoda analityczna obejmuje proces od pobrania próbki do otrzymania wyniku i jego opracowania.

Strategia – procedura analityczna – sposób postępowania uwzględniający cały proces od pobrania próbki do oceny wyników. Procedura jest opisana w normach i instrukcjach. Procedura analityczna to cały proces metody analitycznej i uzyskana na podstawie opracowanych wyników informacja analityczna.

Zasada pomiaru – opisuje sposób stosowania określonych zjawisk przyrodniczych w celu uzyskania informacji analitycznych. Opis obejmuje wzajemne oddziaływania, jakim musi być poddana próbka celem uzyskania odpowiedzi analitycznej.

Składniki główne – nazywane również matrycą próbki stanowią od 1 do 100% zawartości próbki

Składniki uboczne – nazywane też domieszkowymi stanowią od 0,01 do 1% składu próbki

Składniki śladowe – ich zawartość w próbce nie przekracza 0,01%. Trudność oznaczenia składników śladowych jest tym większa im mniejsze jest stężenie. Wynika również ze składu próbki.

Wykrywalność/granica wykrywalności/limit detekcji (LOD) – najmniejsze stężenie lub ilość analitu w badanej próbce, które można wykryć daną metodą z określonym prawdopodobieństwem.

Oznaczalność/limit oznaczalności/granica oznaczalności (LOQ) – najmniejsze stężenie lub ilość analitu w badanej próbce, które można oznaczyć daną metodą.

Czułość metody analitycznej – stosunek przyrostu sygnału analitycznego do przyrostu zawartości (lub stężenia) oznaczanego analitu.

Precyzja metody – oznacza stopień zgodności między wynikami uzyskanymi w określonych warunkach, przy wykonaniu wielokrotnych pomiarów tej samej wielkości. Miarą precyzji jest odchylenie standardowe zebranych wyników z serii pomiarów dla tego samego wzorca. Mała wartość odchylenia standardowego oznacza dużą precyzję i powtarzalność wyników.

Dokładność – stopień zgodności wartości rzeczywistej ze średnią arytmetyczną wyników uzyskanych dla oznaczanej wielkości.

Selektywność metody – możliwość zastosowania metody do wykrycia lub oznaczenia tylko pewnej liczby składników.

Specyficzność metody – możliwość zastosowania metody w określonych warunkach do analizy tylko jednego składnika próbki.

Uniwersalność metody – możliwość stosowania jej w dużym zakresie stężeń oznaczanej substancji lub do oznaczania różnych składników.

Niezawodność – uzyskane wyniki zależą w niewielkim stopniu od czynników nie ujętych w opisie metody.

Proces analityczny

Proces analityczny rozpoczyna się od postawienia problemu i kończy się na analizie wyników i przygotowaniu raportu. Wyborem postępowania analitycznego, do rozwiązania konkretnego zadania, kierują różne potrzeby i ograniczenia.

Realizacja procesu analitycznego odbywa się w kilku różnych obszarach:

1. Ogólne określenie problemu
2. Praca koncepcyjna, oparta na wiedzy analityka i źródłach podstawowych informacji – rozpoczyna pracę oraz prowadzi do weryfikacji i ustaleń na wszystkich etapach procesu
3. Określenie analitycznych aspektów problemu
4. Wybór i ustalenie procedury analitycznej – od pobrania próbki do interpretacji wyników. Wybór ten zależy od: właściwości analizowanej próbki; od zakresu postawionego zadania analitycznego; od możliwości realizacji zadania, z zachowaniem jakości wyników.
5. Wybór postępowania analitycznego, jego przygotowanie i realizacja w pełnym zakresie
6. Ocena wiarygodności wyników analizy
7. Wnioskowanie
8. Końcowe sprawozdanie

Analiza chemiczna realizowana jest poprzez zastosowanie wielu technik i metod w celu uzyskania i oceny informacji o istocie materii. Różnorodność i wielość metod analitycznych nie są przypadkowa. Wskazany analit zbadać można wieloma sposobami. Zwykle jednak wybierana jest jedna konkretna metoda, która pozwala na uzyskanie poprawnego wyniku analizy. Wyborem tej metody analitycznej kierują różnie potrzeby i ograniczenia. Wybór zależy zarówno od właściwości analizowanej próbki, jak i od postawionego zadania analitycznego.

Zakres współpracy zleceniodawcy (Z) i analityka (A) w kolejnych etapach realizacji procesu analitycznego:

Ogólne określenie problemu (**Z**)

Określenie analitycznych aspektów problemu (**Z**, **A**)

Wybór procedury analitycznej (**A**, **Z**)

Pobieranie próbek (**Z**+**A**)

Przygotowanie próbki (**A**)

Pomiar (**A**)

Obróbka wyniku (**A**)

Wnioskowanie (**A**)

Sprawozdanie końcowe (**A**, **Z**)

Kryteria wyboru w procesie analitycznym

KRYTERIUM I – wymagania i potrzeby analizy

1. Informacje konieczne do sformułowania problemu (Z):

a. Jakiego zakresu informacji analitycznej dotyczy zadanie?

b. Czy badana będzie pojedyncza próbka, czy seria prób?

c. Jaka jest ilość i dostępność materiału do pobrania próbki reprezentatywnej?

d. Jaki jest stan skupienia materii badanej?

e. Jaki jest dopuszczalny czas realizacji zadania?

f. Jaka jest dopuszczalna niepewność pomiarów?

g. Jaka jest dopuszczalna wysokość kosztów realizacji zadania?

Odpowiedź na te pytania pozwala na racjonalne podejmowanie dalszych wyborów

2. Informacje zawarte w zleceniu (Z):

a. ***Rodzaj oczekiwanej informacji*** – jakościowa, ilościowa, strukturalna, wymagana precyzja i dokładność oznaczeń;

b. ***Wielkość próbki i zawartość analitu w próbce*** – wybieramy metody wystarczająco czułe oraz z użytecznym zakresem oznaczalności;

c. ***Obecność innych składników próbki*** (matryca) – wybieramy metody selektywne lub/i specyficzne, w których sygnał jest generowany tylko przez analit, lub nie występuje interferencja składników towarzyszących;

d. ***Rodzaj, charakter i budowa analitu*** – wybieramy te techniki, które oparte są na obserwacji zjawisk fizycznych lub chemicznych, generowanych przez analit w warunkach dostępnej metody, o oczekiwanych parametrach. Prawie każda właściwość fizyczna lub fizykochemiczna charakteryzująca dany pierwiastek lub związek może być podstawą jego analizy metodami klasycznymi lub instrumentalnymi;

e. ***Możliwość zastosowania analizy*** **niszczącej** lub konieczność oszczędzenia próbki. Jeśli próbka jest potrzebna do innych badań lub z innych przyczyn nie może ulec zniszczeniu, stosujemy jedną z metod nieniszczących - bezpośrednich;

f. ***Oczekiwany termin wykonania*** zadania (zależy od czasu potrzebnego do ewentualnego opracowania nowej metody i pozyskania potrzebnych materiałów);

g. ***Koszt analizy***. Zleceniodawca musi określić swoje możliwości, co pewnie ograniczy możliwy zakres wyboru metod;

h. ***Możliwości techniczne laboratorium***. Analityk najpewniej zechce posłużyć się posiadanym sprzętem i aparaturą do realizacji zadania.

KRYTERIUM II – wybór techniki i metody analitycznej (Z, A)

Technika analityczna **– grupa metod analitycznych wykorzystujących to samo zjawisko fizyczne, fizykochemiczne lub chemiczne, możliwe do obserwacji w danym analicie. Zjawisko to musi odpowiadać potrzebom postawionego zadania.**

Metoda analityczna **– sposób oznaczania analitu za pomocą danej techniki, odpowiadający potrzebom zadania.**

Ogólne zasady wyboru techniki i metody analitycznej

1. ***Cel***

a. rodzaj analizowanego materiału, w tym rodzaj matrycy,

b. dostępna wielkość próbki (skala),

c. poziom zawartości oznaczanego składnika (granica oznaczalności, granica wykrywalności),

d. dopuszczalny czas trwania analizy,

e. wymagana dokładność i precyzja wyniku (czułość),

2. ***Koszty wykonania analizy***

a. aparatura (amortyzacja),

b. robocizna,

c. koszty materiałowe (gazy techniczne, odczynniki, rozpuszczalniki).

3. ***Stan wyposażenia laboratorium***

a. posiadana aparatura,

b. doświadczenia personelu,

c. odczynniki,

d. wzorce analityczne.

Kryteria szczegółowe

1. Wybór techniki analitycznej oparty jest głównie na cechach charakterystycznych materiału przeznaczonego do badania:

a. budowa chemiczna analitu;

b. cechy fizykochemiczne analitu;

c. reaktywność chemiczna analitu.

Pozwalają na wybór techniki na podstawie możliwości oddziaływań analitu ze środowiskiem analizy.

2. Wybór konkretnej metody analitycznej oparty jest na bardziej szczegółowych informacjach o metodzie, próbce oraz analicie.

a. selektywność odczynnika i metody – dla niewielkich ilości analitu w próbce;

b. specyficzność odczynnika i metody – dla badania tylko jednego składnika próbki;

c. uniwersalność metody – dla oznaczania wielu składników.

d. czułość metody – zależna od zawartości składnika próbki, ważna dla wymaganej wykrywalności i oznaczalności analitu;

e. dokładność i precyzja metody

Pozwalają na wybór metody dla osiągnięcia oczekiwanej informacji jakościowej lub ilościowej i wiarygodnego wyniku na oczekiwanym poziomie zmian stężenia.

3. Podział metod wg sposobu oznaczeń końcowych

a. Metody oparte na chemicznych reakcjach analitycznych, których podstawą są zjawiska chemiczne (reakcje analityczne)

b. Metody oparte na właściwościach fizycznych,

c. Metody oparte na pomiarze promieniowania powstającego w wyniku reakcji jądrowych (α, ß, γ).

d. Metody rozdzielcze służące wyizolowaniu substancji, jej identyfikacji i oznaczaniu, dzięki zróżnicowanej odpowiedzi substancji na warunki rozdziału.

e. Metody oparte na innych zjawiskach fizycznych

KRYTERIUM III – wybór procedury analitycznej (A, Z)

Procedura analityczna

1. Procedura analityczna **jest to szczegółowy sposób postepowania od pobrania próbki do interpretacji wyników.** Jej opracowanie wynika z uwzględnienia potrzeb technicznych wybranej metody, charakter badanego obiektu (homogenność, dostępność materiału), inne wymagania zleceniodawcy) i uwzględnia:

a. wielkość i szczegółowe warunki pobierania próbki;

b. potrzebę izolowania analitu i szczegółowe warunki przygotowania próbki;

c. używane stężenia, objętość i czystość odczynników;

d. szczegółowe warunki i sposób wykonania pomiaru;

e. sposób przedstawienia wyników (np. wykresy, tabelaryczne/liczbowe);

Niektóre procedury opisane są w normach i instrukcjach. Jeśli są dostępne, należy ich bezwarunkowo przestrzegać.

KRYTERIUM IV – pobieranie próbek (Z+A)

Zasady ogólne dotyczące materii badanej i próbek

1. Analiza chemiczna jest zwykle prowadzona dla niewielkiej części ***obiektu badanego*** nazywanego ***próbką***;

2. Pobranie próbki jest pierwszym etapem procedury analitycznej, opartym na wynikach formułowania problemu oraz rodzaju obiektu badanego;
3. Niezbędne w procesie analitycznym jest pobranie ***próbki reprezentatywnej***, posiadającej ***właściwości badanego obiektu***;
4. W pobraniu próbki wyborowi podlega ***strategia pobierania***, która jest decydująca dla jakości ostatecznego wyniku analizy;
5. ***Jakość i przydatność informacji analitycznej nie będą lepsza niż jakość pobranej próbki, która zależy od trafności wyboru strategii pobierania***;
6. W przypadku ciągłego pobierania próbek oraz przygotowania próbek biologicznych i mikrobiologicznych stosowane są ***specjalne techniki***;
7. ***Wielkość próbki***, którą należy pobrać, zależy od zakresu oznaczalności metody analitycznej i zawartości oznaczanego składnika w próbce;
8. ***Oszacowanie wpływu różnych parametrów na wielkość próbki reprezentatywnej;***
9. Zależności wielkości (masa, objętość) ***próbek jednostkowych*** od wielkości badanego obiektu materialnego – ***im większy obiekt, tym więcej próbki*** należy pobrać;
10. ***Wpływu niejednorodności*** badanego obiektu na ***wielkość próbek*** jednostkowych. Im większa jest ***niejednorodność materiału, tym większe próbki*** należy pobierać – tak by próbka zawierała wszystkie składniki materiału – ***ograniczenie wielkości to możliwe ograniczenie składu***;
12. Liczby próbek jednostkowych, które powinny być podstawą do utworzenia próbki ogólnej – im ***większa jest niejednorodność materiału, tym więcej próbek jednostkowych*** należy pobierać – tak by próbka zawierała wszystkie składniki materiału – ***ograniczenie liczby próbek to możliwe ograniczenie składu próbki reprezentatywnej;***

Rodzaje próbek

1. ***Próbka reprezentatywna*** – część materiału, która nie różni się od całości materiału badanego pod względem danej cechy;
2. ***Próbka pierwotna*** – część partii materiału *pobrana jednorazowo z jednego miejsca*;
3. ***Próbka jednostkowa*** – część materiału złożona ze *wszystkich próbek pierwotnych* pobranych z określonego miejsca;
4. ***Próbka ogólna*** – część partii materiału złożona ze *wszystkich próbek pierwotnych pobranych z danej partii*;

5. ***Próbka laboratoryjna*** próbka przygotowana z próbki ogólnej, która zdolna jest reprezentować właściwości materiału, *przeznaczona do prowadzenia analiz*;
6. ***Próbka do badań*** próbka przygotowana z próbki laboratoryjnej, z której pobiera się próbkę analityczną;
7. ***Próbka analityczna*** część pobrana z próbki laboratoryjnej, *przeznaczona w całości do jednego oznaczenia*;
8. ***Próbka wzorcowa*** próbka *o dokładnie znanym składzie*. Przeznaczona do kalibracji;
9. ***Próbka rozjemcza*** próbka mająca na celu ustalenie zawartości składników, których oznaczenia wykonane przez różne laboratoria nie są zgodne; *wyniki analizy próbki rozjemczej wykonane w instytucji przyjętej przez zakłady są obowiązujące dla obu stron*;
10. ***Próbka złożona sekwencyjnie*** próbka powstała na skutek pobierania próbek jednostkowych do jednego pojemnika według ustalonego programu.

Zasady pobierania próbek, zależne od obiektu badanego (Z+A)

Pobrana do badań próbka musi odpowiadać obiektowi, z którego pochodzi zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym.
Pobranie próbki jest pierwszym etapem procedury analitycznej, opartym na wynikach formułowania problemu oraz rodzaju obiektu badanego.

Zasadnicze czynniki warunkujące reprezentatywność próbki

1. Pobrana próbka musi być dostatecznie duża;
2. Próbki pierwotne pobrane losowo.
3. Należy zapewnić niezmienność składu pobranej próbki ogólnej na wszystkich dalszych etapach.
4. Należy zapobiegać zmniejszeniu jednorodności próbki ogólnej, czy też przelewaniu roztworów zawierających lotne składniki.
5. ***Właściwości badanego obiektu wpływające na sposób pobrania i postępowania z próbką***:
    a. ***stan skupienia*** (ciało stałe, ciecz, gaz),
    b. ***skład fazowy***,
    c. ***jednorodność***,

d. ***wielkość***,

e. ***twardość***,

f. ***lotność***,

g. ***trwałość***,

h. obiekt przeznaczony ***do analizy ciągłej*** lub ***do pojedynczego pomiaru***.

Ogólny schemat pobrania i postępowania z próbką

1. Z całkowitej ilości materiału (np. hałda, produkcja dobowa, ładunek statku, pociągu) pobiera się (w sposób losowy) partię materiału (szarża produkcyjna, wagon, worek).
2. Z różnych losowych miejsc partii materiału pobieramy tzw. ***próbki jednostkowe***. Ilość i sumaryczna wielkość próbek jednostkowych wynosić powinna 0,01-1% wielkości partii materiału. Zależy to od stopnia jednorodności materiału (im bardziej jednorodny, tym mniejsze próbki pierwotne i jednostkowe).
3. ***Próbka ogólna*** powstaje z połączenia poszczególnych próbek jednostkowych. Próbka ogólna jest dokładnie rozdrabniana i mieszana.
4. Zmniejszenie masy próbki ogólnej odbywa się różnymi metodami i prowadzi do otrzymania ***średniej próbki laboratoryjnej*;**
5. Próbkę tę dzieli się na ***trzy części***, z których jedna przeznaczona jest do analizy, drugą przekazuje się zleceniodawcy analizy, natomiast trzecia trafia do archiwum jako tzw. ***próbka rozjemcza***.
6. Próbka powinna być tym większa im mniej jednorodny jest materiał badany.
   W przypadku ciągłego pobierania próbek oraz przygotowania próbek biologicznych i mikrobiologicznych stosowane są specjalne techniki.

Kolejność pobierania próbek

1. ***Najmniejsza próbka reprezentatywna***, której struktura nie różni się zasadniczo, pod względem badanej cechy od populacji generalnej (dobór procedury postępowania z materiałem niejednorodnym dla uzyskanie próbki reprezentatywnej);
2. ***Próbka laboratoryjna*** przeznaczona do prowadzenia procedury analitycznej;
3. ***Próbka analityczna*** w całości przeznaczona do jednego oznaczenia lub wykorzystywana bezpośrednio do badania.

KRYTERIUM V – przetwarzanie próbki (A)

Cele i zadania poszczególnych etapów przygotowania próbek

1. ***Zapewnienie stabilności*** próbki na etapie transportu i przechowywania - Konserwacja chemiczna, Konserwacja termiczna., Liofilizacja.
2. ***Uzyskanie homogeniczności*** pobranej próbki - Mielenie. Mieszanie. Analiza sitowa
3. ***Usunięcie składników przeszkadzających (interferentów)*** - Odpylanie (*próbki gazowe*). Usuwanie zawiesiny (*próbki ciekłe*). Osuszanie próbek. Odtlenianie próbek. Usuwanie składników reaktywnych
4. ***Chemiczna konwersja analitów (derywatyzacja)*** do postaci łatwej do: izolacji, rozdzielania składników mieszanin, wykrywania i oznaczania ilościowego
5. ***Wymiana matrycy próbki*** na matrycę „przyjazną" w stosunku do stosowanego przyrządu pomiarowego – ekstrakcja analitów z próbki
6. ***Podniesienie stężenia analitu*** w próbce do poziomu umożliwiającego przeprowadzenie analizy ilościowej – wykorzystanie szerokiego spektrum technik wzbogacania analitów (*w wielu przypadkach operacja ta jest połączona z etapem wymiany matrycy*).
7. ***Zmniejszenie ilości zużywanych odczynników*** (w tym także rozpuszczalników) – wykorzystanie tzw. bezrozpuszczalnikowych technik przygotowania próbek. Zmniejszenie skali oznaczeń (*miniaturyzacja procesu analitycznego*)

Wstępna obróbka i kondycjonowanie próbki – przygotowanie próbki

1. ***Próbki muszą zostać przekształcone w postać odpowiednią do zastosowania wybranej techniki i metody.***
   - **a.** Większość metod analitycznych wymaga przeprowadzenia próbki do roztworu (grawimetria, miareczkowanie, spektrofotometria UV-Vis, spektrofluorymetria, fotometria płomieniowa, absorpcyjna spektrometria atomowa, potencjometria, konduktometria, elektrograwimetria, kulometria, polarografia, woltamperometria, metody rozdzielcze, większość metod optycznych).

b. Nieliczne metody pozwalają badać próbki w postaci stałej lub w roztworze (spektrofotometria IR, spektrometria mas, spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej).

2. ***Przygotowanie próbki do przeprowadzenia wybranej metody analitycznej może wymagać różnych czynności: rozpuszczanie; oddzielanie analitu od matrycy; przekształcanie analitu w inną postać chemiczną.***
   a. Przeprowadzenia próbki do roztworu. Jest to jedna z najczęściej wykonywanych procedur. Zależnie od rodzaju analitu i wymagań metody może być prowadzone jako: ***rozpuszczanie*** (w rozpuszczalniku, który nie zakłóci przebiegu analizy i nie zanieczyści analitu); ***roztwarzanie***, gdy analit nie jest rozpuszczalny w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych w wystarczającym stopniu; ***stapianie próbek***, gdy substancja nieorganiczna nie ulega działaniu kwasów lub alkaliów; ***mineralizacja***, w celu oznaczenia składników nieorganicznych w próbkach organicznych, powoduje usunięcie części organicznej.
3. ***Wszystkie procesy poza rozpuszczaniem zachodzą z udziałem przemian chemicznych. Próbka ulega rozkładowi.***
   a. Wydzielanie, rozdzielanie i zatężanie analitu. Obejmuje wiele różnych, nierzadko złożonych czynności jak: ***sączenie, strącanie, wirowanie, ekstrakcja, krystalizacja, chromatografia, destylacja, absorpcja, adsorpcja, filtracja, dializa*** i inne.
   b. Maskowanie czynników zakłócających pomiar
   c. Derywatyzacja analitu

KRYTERIUM VI – pomiar (A)

Po dokonaniu wyboru metody analitycznej, sposób przeprowadzenie pomiaru jest zasadniczo ustalony. Decyzja w zakresie postępowania dotyczy wyboru:

a. stosowanej techniki analitycznej;

b. pomiaru z zastosowaniem techniki sprzężonej

KRYTERIUM VII – opracowanie wyników pomiarowych (A)

1. Opracowanie jakości wyników pomiarowych opiera się na znanych zasadach walidacji metod.

2. Czynności związane z opracowaniem wyniku projektowane są w zakresie potrzeb zadania analitycznego – możliwości wyjaśnienia problemu.

3. Wprowadzane są elementy porównania z wynikami innych analiz.

a. ocena statystyczna wyników;

b. oszacowanie błędów pomiarowych;

c. oszacowanie błędów całego procesu analit

d. analiza chemometryczna.

KRYTERIUM VIII – interpretacja wyników (A)

1. Interpretacja wyników jest etapem procesu analitycznego, bezpośrednio poprzedzającym przygotowanie sprawozdania.
2. Formułowanie wniosków z analizy otrzymanych wyników nie jest konieczne i odbywa się na życzenie zleceniodawcy.
3. Odpowiedniej interpretacji wyników służy pełna dokumentacja każdego etapu procedury analitycznej.

KRYTERIUM IX – przygotowanie raportu końcowego (Z+A)

Wybór elementów składowych i poziomu szczegółowości raportu końcowego zależy od wymagań zleceniodawcy i sformułowania zadania.

KRYTERIUM X – ekonomiczne (Z+A)

1. Skład matrycy wywołujący interferencje spektralne można eliminować na przykład stosując aparaturę o większej zdolności rozdzielczej lub podjęcie pracy nad metodą zmiany na matrycę przyjazną. Oba podejścia zmieniają koszt i czas analizy.

2. Przewidywane koszty inwestycyjne. Planowanie najlepszego wykorzystania aparatury dostępnej (czas pracy), zakupienie nowego urządzenia lub zlecenie badania firmie zewnętrznej (kalkulacja kosztów).
3. Przewidywanie kosztów eksploatacyjnych (odczynniki, energia, koszty techniczne).
4. Przewidywanie kosztów osobowych (czy wybrać proste metody, związane z kosztami osobowymi, czy zautomatyzowane i ponieść koszty aparatury, szkolenia personelu?).
5. Kryterium ochrony środowiska (minimalizacja ścieków i odpadów).
6. Stosowanie metod nieniszczących (analiza kryminalistyczna, analiza sądowa, materiały cenne i zabytkowe)