

# Analytické metody

## Klasické metody

## Instrumentální metody

Klasická analýza	Instrumentální analýza
Vysoká přesnost stanovení až 0,1% rel.	Proměnlivá přesnost stanovení 5 -10 -20 % rel.
Stanovitelnost analytu do cca 0,1 %	Stanovitelnost analytu do $10^{-4}$ - $10^{-10}$ %, ale může být i nižší
Založena na základním chemismu	Založena na fyzikálně-chemických, ale častěji na fyzikálních dějích
Vážková a odměrná analýza	Elektroanalytické, optické, separační instrumentální metody

# Analytické metody

**Kvalitativní stanovení**= zjištění přítomnosti látek (co?)

**Kvantitativní stanovení** = zjištění množství látek (kolik?)

## Validace analytických metod

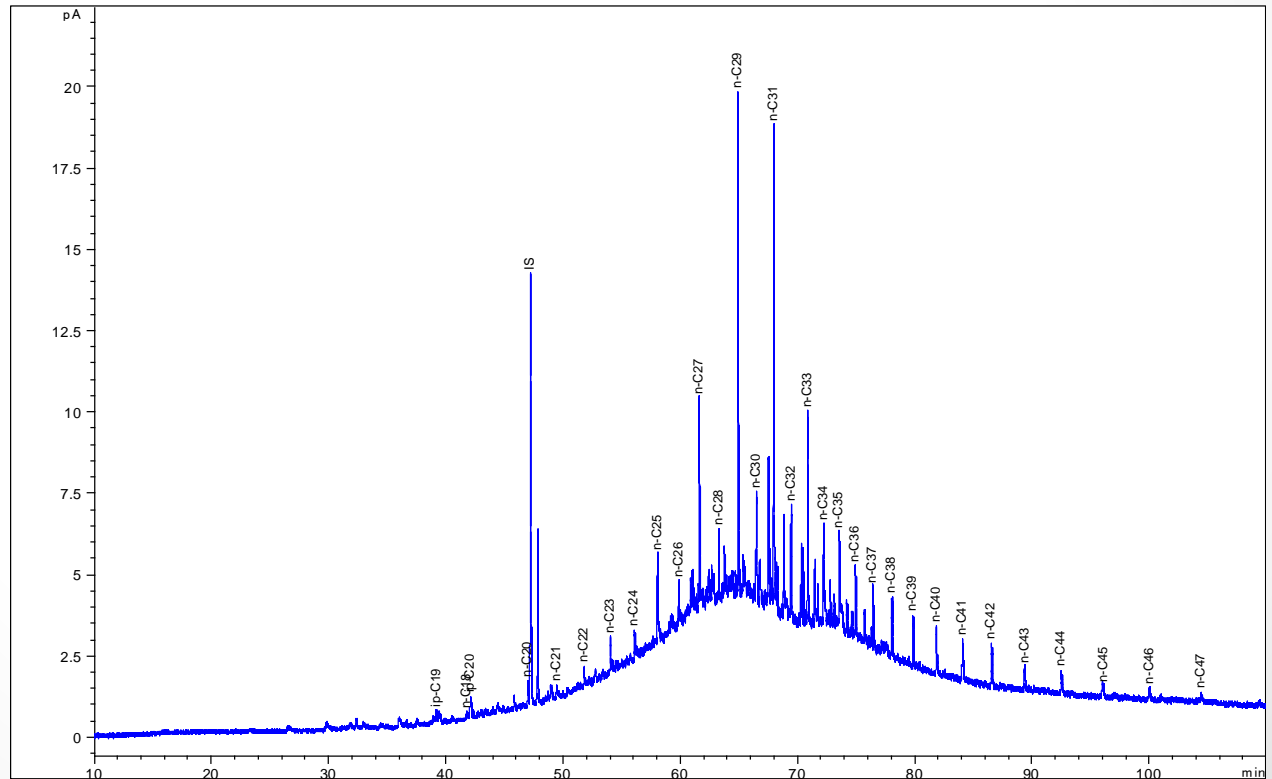
**Validace** - prokázání toho, že použitý postup je vhodný pro zamýšlené použití. Kritický je výběr **validačních parametrů** - základní kritérium jak získat dostatek údajů, aby bylo možno posoudit, zda metoda či systém, jsou vhodné pro zamýšlený účel.

**Kalibrace** – postup, kterým se navazuje měřidlo na státní etalony. Jedná se o určení vztahu mezi výstupní a vstupní veličinou, platného pro měřicí systém.

# Kvantitativní analýza

## Metoda interního standardu (IS)

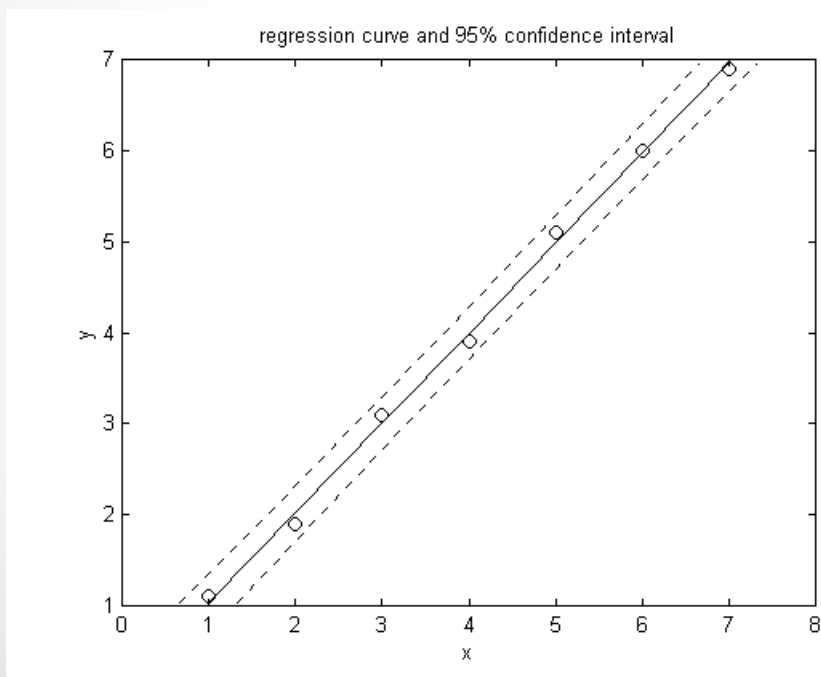
IS = látka, která se ve analyzovaném vzorku nevyskytuje. Znamé množství IS se přidá do vzorku. Podle poměrného zastoupení IS se stanoví obsah požadovaných složek.



# Kvantitativní analýza

## Metoda kalibrační přímky

- připravíme sadu vzorků o známém složení, stanovíme závislost odezvy na koncentraci standardu v předpokládaném rozmezí ve vzorku.



Kalibrační přímka s 95% intervalem spolehlivosti

# Validace

- ✓ potvrzení prostřednictvím skutečných pozorování, měření a zkoušení, že **požadavky na zamýšlené použití nebo aplikaci jsou splněny**
- ✓ zahrnuje sérii experimentů, jejich matematicko-statistické zpracování které prokáže při opakovaném použití reprodukovatelné výsledky
- ✓ je třeba přesně definovat podmínky, za kterých je metoda použitelná

## pravidla validace

- validovat celou metodu
- validovat celý rozsah koncentrací
- validovat v rozsahu všech uvažovaných matric

## Průběh validace

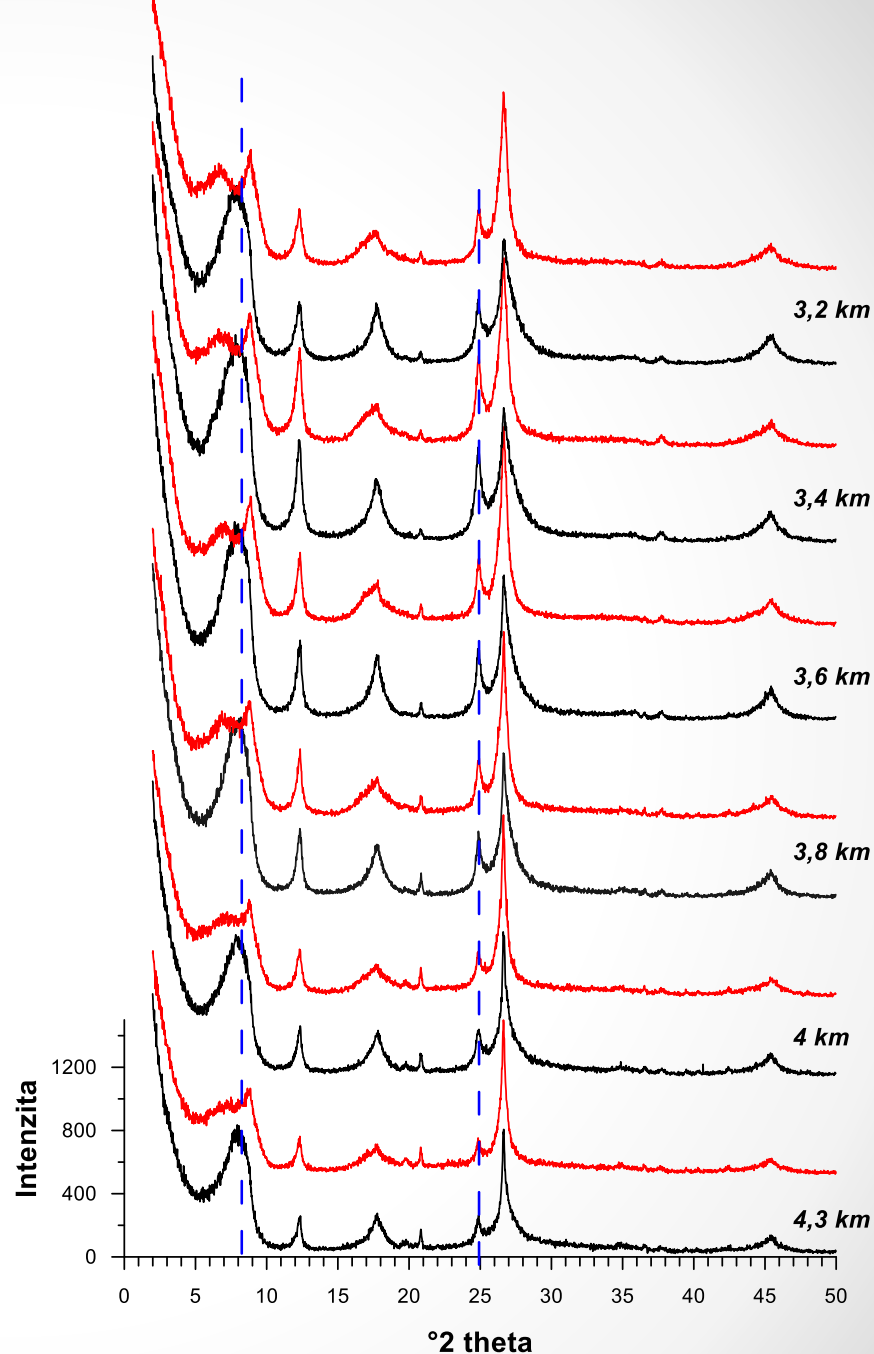
- stanovení pracovních charakteristik dané analytické metody
- stanovení rozsahu a omezení dané analytické metody
- identifikace ovlivňujících parametrů, které mohou měnit pracovní charakteristiky dané analytické metody
- jaký analyt můžeme stanovit, v jaké matici, za přítomnosti jakých interferentů?
- za jakých definovaných podmínek můžeme dosáhnout předem určenou nejistotu?

## Charakteristiky metody

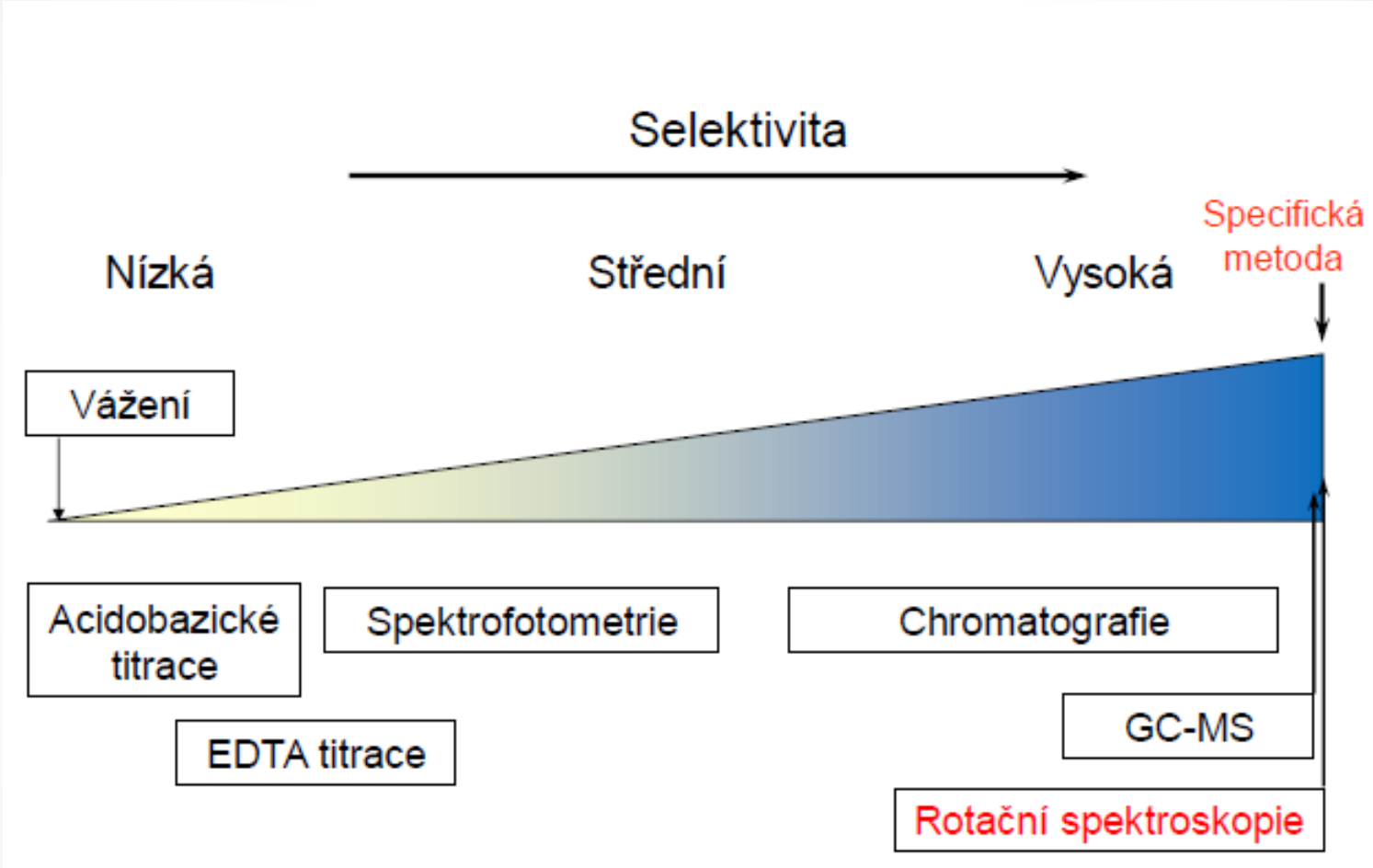
- selektivita, specifičnost
- výtěžnost
- linearita, pracovní rozsah, citlivost
- LOD, LOQ
- Opakovatelnost
- Robustnost
- rozšířená nejistota

## Selektivita (Selectivity)

- udává rozsah, do kterého může být jednotlivý analyt stanoven v komplexní směsi, aniž by došlo k interferenci s ostatními složkami ve směsi. O metodě, která je naprosto selektivní pro analyt nebo skupinu analytů, říkáme, že je specifická.







## Výtěžnost (recovery)

- míra pravdivosti analytické metody
- udává míru schopnosti měřicí metody (postupu) postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku
- je mírou účinnosti metody
- je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku

$$R = \frac{\textit{nalezená \_ hodnota}}{\textit{referenční \_ hodnota}}$$

referenční hodnotu obdržíme z:

- CRM (certifikovaného materiálu)  $R = \frac{C_{\textit{nalezená}}}{C_{\textit{CRM}}}$

- spiku čisté látky  $R = \frac{C_{\textit{nalezená}} - C_{\textit{matrice}}}{C_{\textit{spike}}}$

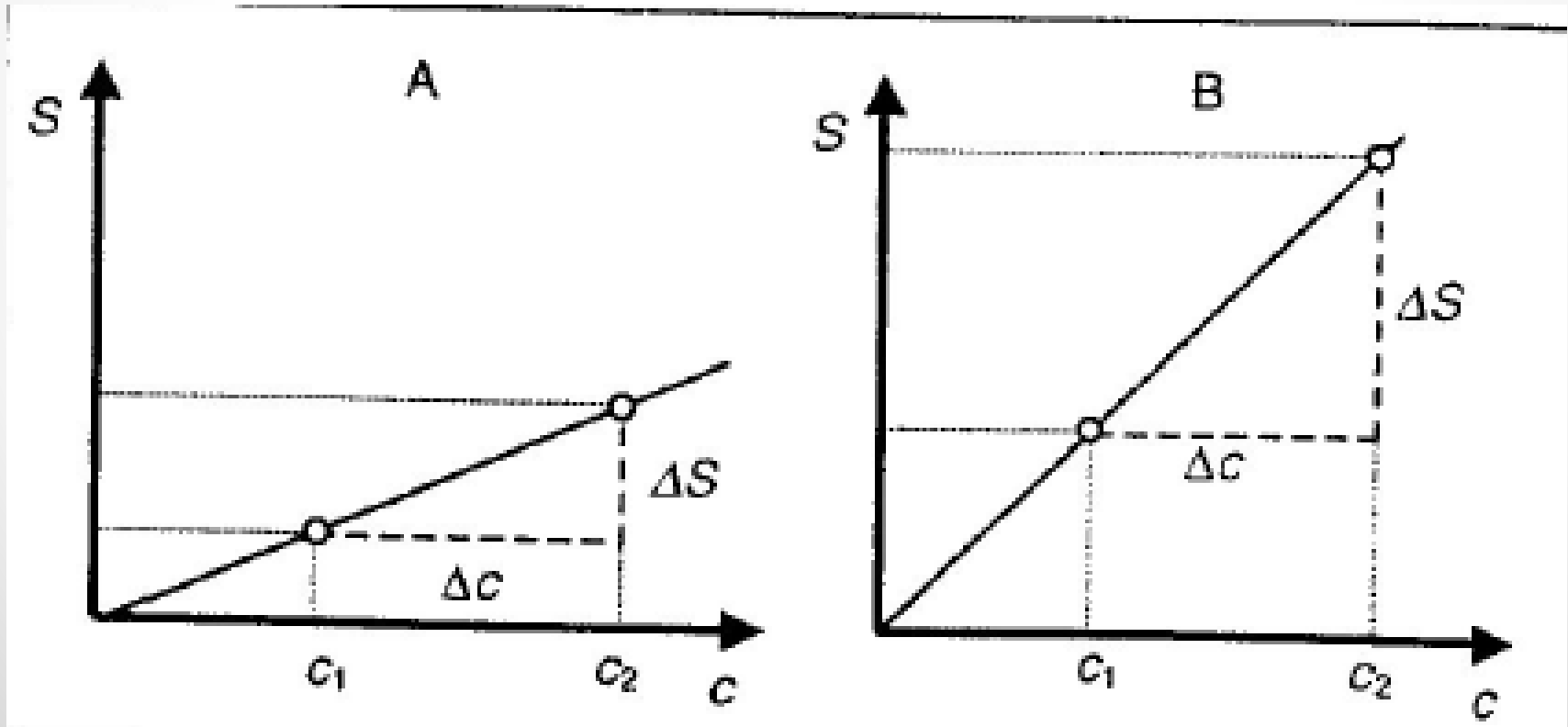
**Čím je R blíže k 1,**  
**tím je menší vychýlení metody a**  
**pravdivost metody je vyšší.**

**Citlivost** = směrnice kalibrační přímky.

- změna odezvy měřicího zařízení dělená odpovídající změnou nezávislé proměnné

Je-li citlivost závislá na matrici, nepostačuje kalibrace na čisté látky.

**Podíl změny odezvy měřicího zařízení a odpovídající změny podnětu.**



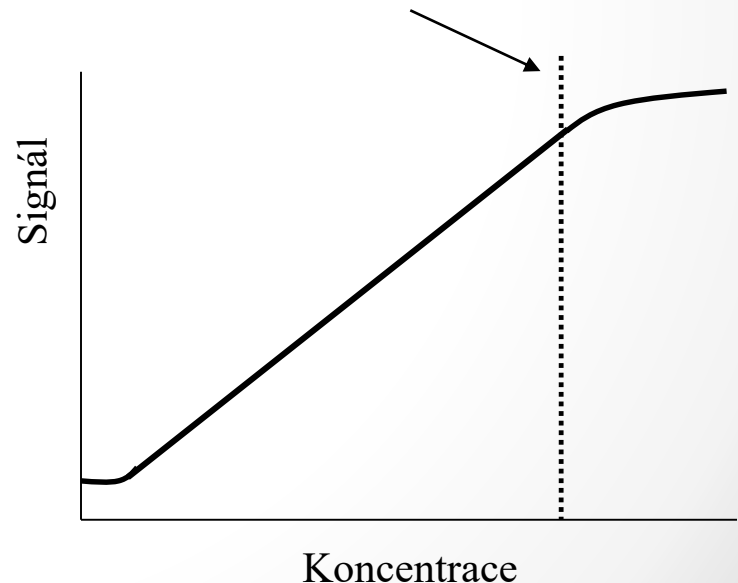
## Linearita (Linearity)

**schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné koncentraci analytu.**

Je zjišťována analýzou vzorků s koncentracemi analytu, které pokrývají deklarovaný rozsah metody.

*Vzorky, použité k určení linearity, mají být analyzovány v sériích 3 - 5 replikátů.*

*Mez linearity, Limit of Linearity (LOL)*



## Rozsah (Range)

### rozsah mezi mezí stanovitelnosti (LOQ) a mezí linearity (LOL)

Oblast v níž metoda poskytuje použitelné výsledky. Metody mají obvykle rozsahy v rozmezí dvou řádů. Některé metody však mají rozsah v hodnotách pěti i šesti řádů.

**Pracovní rozsah** je obecně rozsáhlejší než lineární rozsah. Aby byla metoda účinná, nemusí být vztah mezi odezvou a koncentrací naprosto lineární. Použijí se pak nelineární regresní metody.

## **Mez stanovitelnosti - LOQ (Limit of quantification)**

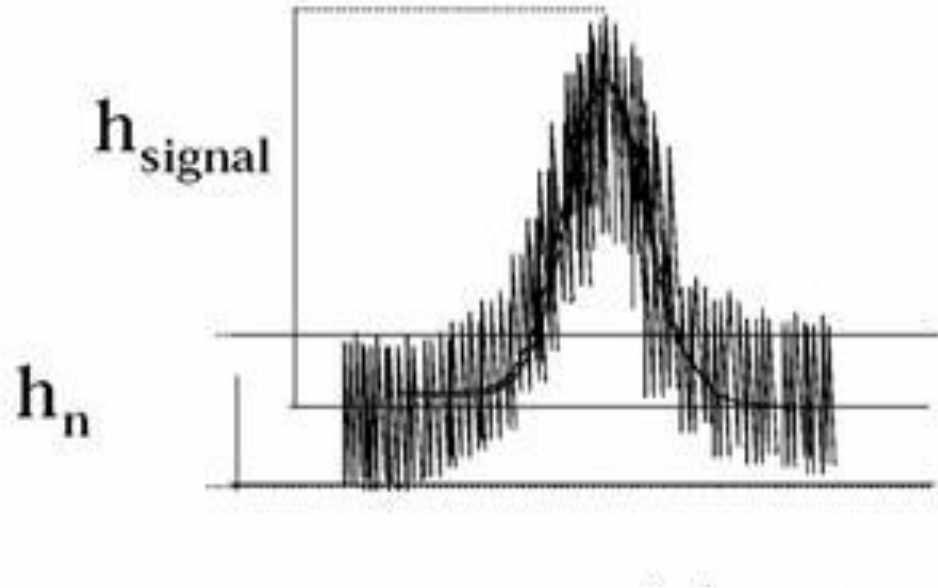
**nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s předem zadanou nejistotou.**

Je to nejnižší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelným stupněm správnosti a přesnosti.

určuje se z hodnot analytického signálu

**Desetinásobek šumu směrodatné odchylky slepého pokus**

## Mez stanovitelnosti - LOQ (Limit of quantification)



$$\text{LOD} = 3 \cdot h_n / m$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot h_n / m$$

$h_n$  = šum na základní linii  
 $m$  je směrnice kalibrační křivky

**Desetinásobek šumu směrodatné  
odchyly slepého pokus**

**Mez detekce = MD, LOD – Limit od detection**

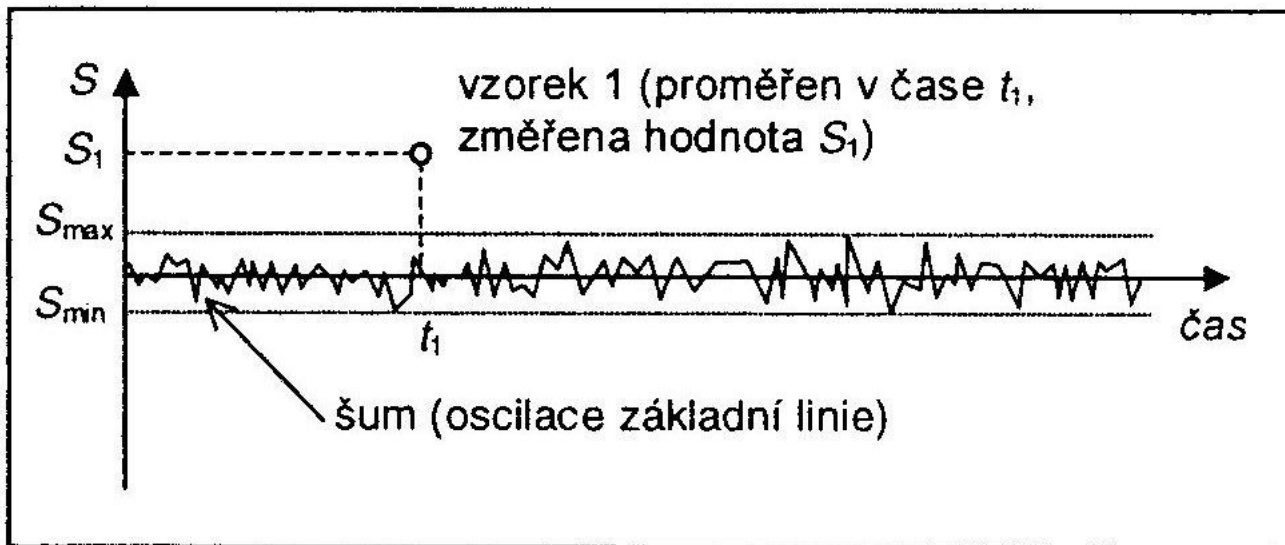
**nejmenší množství složky ve vzorku, které lze stanovit**

signál statisticky významně odlišný od šumu.

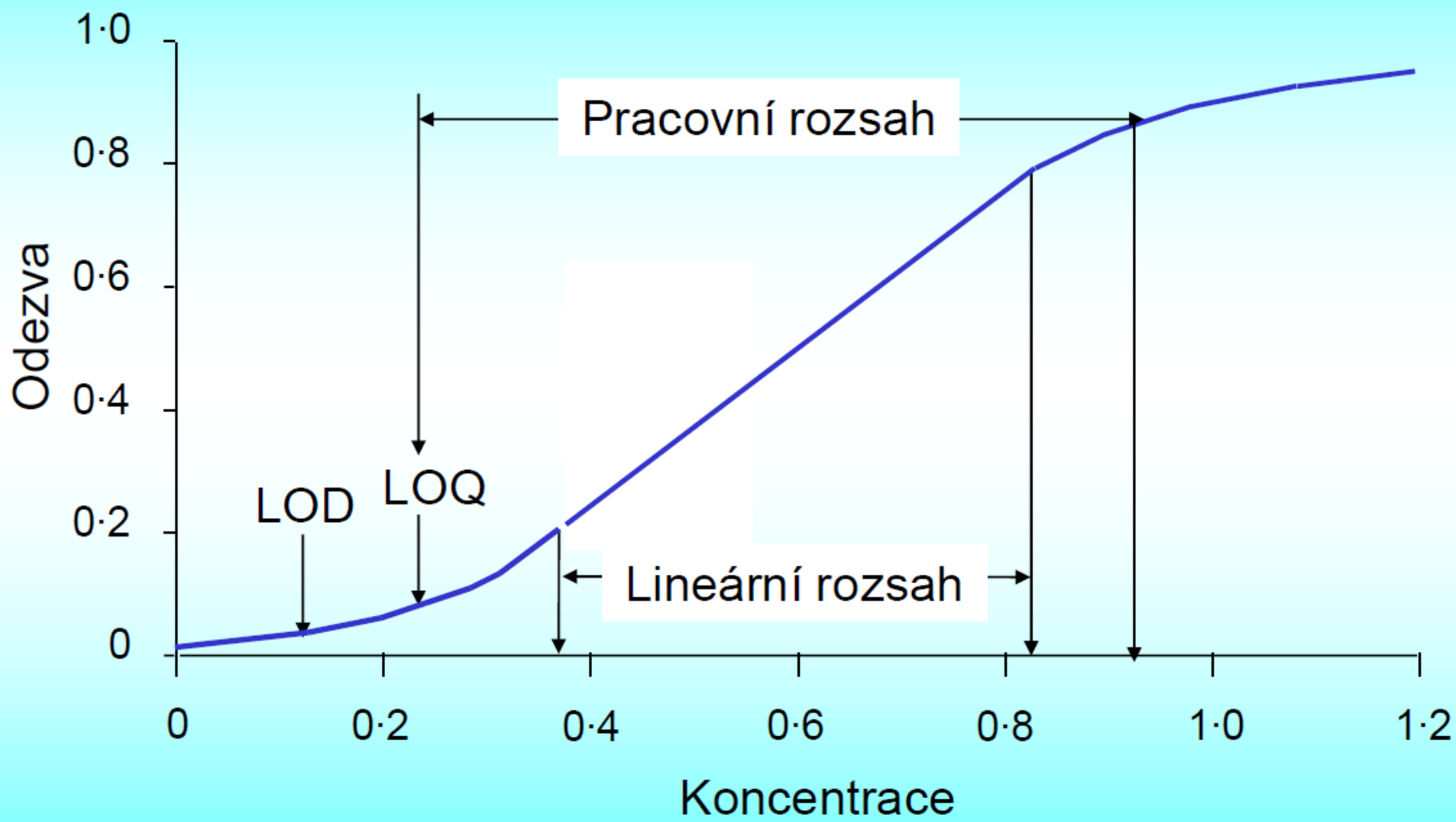
Opakované měření slepého vzorku - hodnoty oscilující kolem nuly = **šum**.

Měření vzorku za stejných podmínek - signál  $S$ , musí dostatečně převyšovat šum.

**trojnásobek šumu směrodatné odchylky slepého pokusu**







## Rozsah (Range)

### rozsah mezi mezí stanovitelnosti (LOQ) a mezí linearity (LOL)

Oblast v níž metoda poskytuje použitelné výsledky. Metody mají obvykle rozsahy v rozmezí dvou řádů. Některé metody však mají rozsah v hodnotách pěti i šesti řádů.

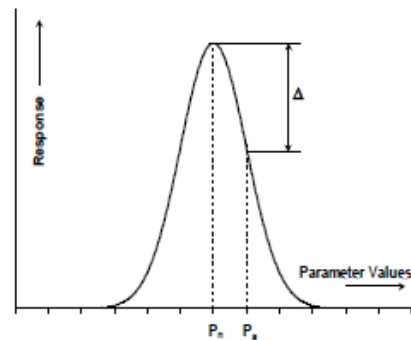
**Pracovní rozsah** je obecně rozsáhlejší než lineární rozsah. Aby byla metoda účinná, nemusí být vztah mezi odezvou a koncentrací naprosto lineární. Použijí se pak nelineární regresní metody.

## Robustnost (Robustness)

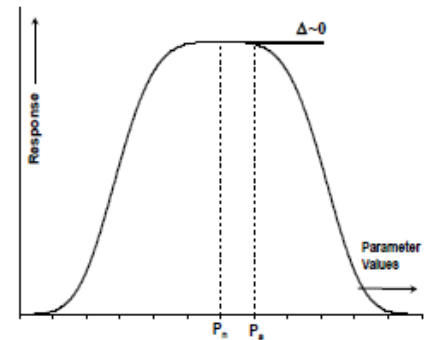
- míra kapacity zůstat netečný vůči malým, ale záměrným změnám parametrů metody a poskytuje indikaci o jeho spolehlivosti během obvyklého používání.

Změna podmínek může nastat pro případ mezilaboratorních zkoušek (jiná laboratoř, analytik, instrument) nebo změnou podmínek v jedné laboratoři (teplota, koncentrace, doba extrakce).

Nerobustní parametr



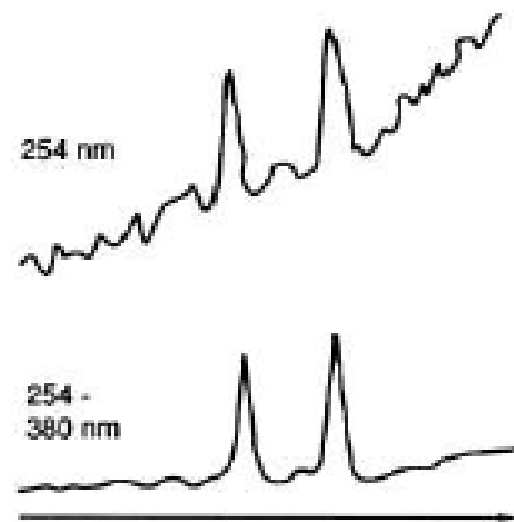
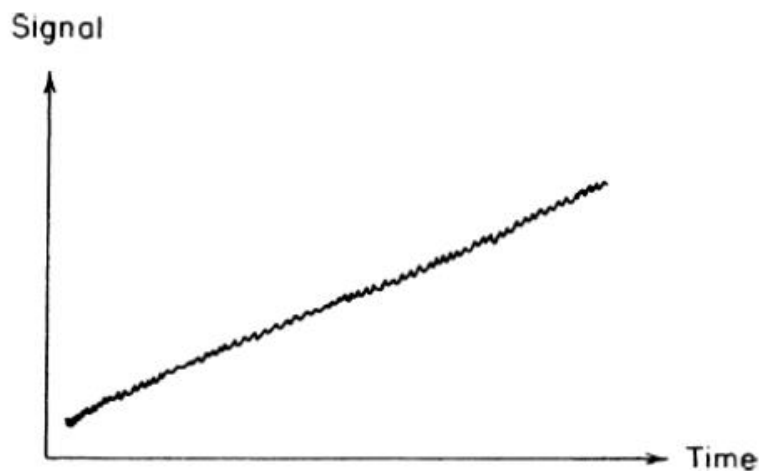
Robustní parametr



# Drift základní linie měřicího přístroje

Spojitá nebo přírůstková změna indikace v čase způsobená změnami metrologických vlastností měřicího přístroje.

- odchylka základní linie v čase, projevuje se nárůstem směrnice



# Nejistota výsledků měření

## *Nejistota měření*

- znamená pochybnost o exaktnosti výsledku měření
- je parametr související s výsledkem měření, který charakterizuje rozptyl hodnot, které by bylo možno důvodně přiřadit měřené veličině
- má podobu rozsahu (intervalu)

**nelze použít ke korekci výsledku**

## *Chyba měření*

- rozdíl mezi individuálním výsledkem a skutečnou hodnotou měřené veličiny
- má diskrétní hodnotu

**lze ji využít ke korekci výsledku**

## Typy nejistot

Typ 1:

- vyhodnocena pomocí statistických metod z naměřených údajů a vyjádřena ve formě směrodatné odchylky

Typ 2:

- vyhodnocena jinak než statistickou analýzou výsledků (předchozí experimenty, údaje z literatury, informace výrobce a expertní odhad)

## **Přesnost (Precision)**

**Těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušky, získanými za předem specifikovaných podmínek.**

Závisí na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah ke skutečné hodnotě. Obvykle se uvádí ve formě směrodatné odchylky.

*Menší přesnost je vyjádřena větší směrodatnou odchylkou.*

## **Opakovatelnost (Repeatability):**

**Přesnost za podmínek opakovatelnosti.** Vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu, provedených stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu.

*Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku.*

**Mez opakovatelnosti (Repeatability limit)** – Hodnota, o níž lze s pravděpodobností 95 % předpokládat, že bude pod ní ležet nebo jí bude rovna absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky zkoušek (měření), které byly získány za podmínek opakovatelnosti.

## **Reprodukovatelnost (Reproducibility):**

**Přesnost za podmínek reprodukovatelnosti.** Vyjadřuje těsnot souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (pracovník, přístroj, místo, podmínky, čas, avšak stejná metoda). Okružák

***Mez reprodukovatelnosti (Reproducibility limit) – Hodnota, o níž lze s pravděpodobností 95 % předpokládat, že pod ní bude ležet nebo jí bude rovna absolutní hodnota rozdílu mezi dvěma výsledky zkoušek (měření), které byly získány za podmínek reprodukovatelnosti.***



**Regulační diagram:** je nástroj statistické regulace procesu (SPC z anglického Statistic Process Control)

graf, který se používá ke znázornění změn procesu resp. jeho klíčové metriky v průběhu času.

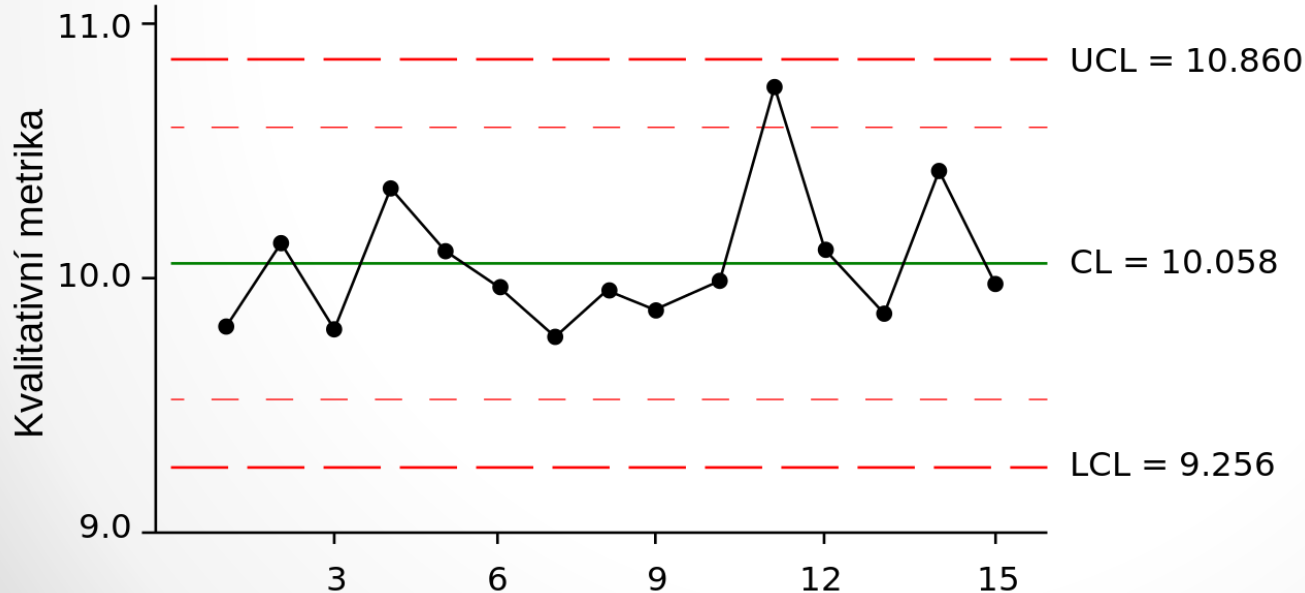
Regulační diagram má vždy označenu střední hodnotu (*CL - Central Line*) a horní a dolní regulační mez (*UCL – Upper Control Line* a *LCL – Lower Control Line*), tzv. akční meze, které jsou určeny buď z historických dat, nebo jsou cílovou hodnotou určenou předpisem. Z časového průběhu diagramu je možné udělat závěr zda je chování procesu či metriky regulované, nebo zda je nepředvídatelné (mimo kontrolu).

IŠIKAWA, Kaoru. *Introduction to Quality Control*. 1. vyd. Tokyo : 3A Corp, 1990. ISBN 9784906224616. OCLC 23372992. S. 98.

Nancy R. Tague. *Seven Basic Quality Tools* [online]. Milwaukee, Wisconsin: American Society for Quality, [cit. 2010-02-05]. (The Quality Toolbox.) S. 15.

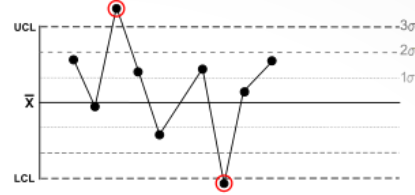
## Regulační diagram:

Regulační diagramy tak mohou být použity například ke kontrole stability procesu, tedy zjistit zda proces funguje jako stabilní systém s náhodnými vlivy působícími v malém rozsahu (systém s inherentní variabilitou) označovaný též jako proces ve „statisticky zvládnutém stavu“, případně zda dochází ke zlepšení či zhoršení tohoto stavu. Regulační diagram poskytuje uživatelům on-line pohled na chování procesu.

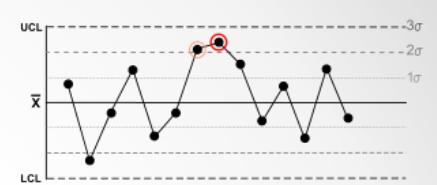


# Regulační diagram:

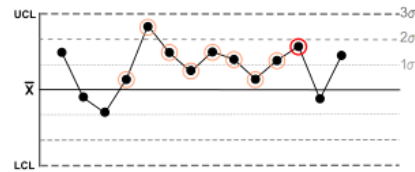
**Rule 1:** One point is more than 3 standard deviations from the mean



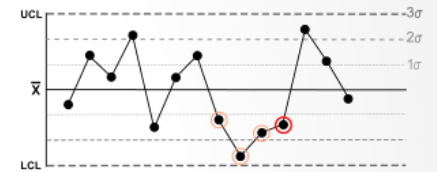
**Rule 5:** Two (or three) out of three points in a row are more than 2 standard deviations from the mean in the same direction



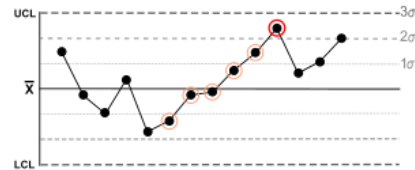
**Rule 2:** Nine (or more) points in a row are on the same side of the mean



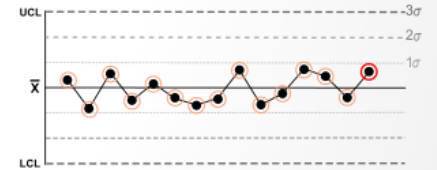
**Rule 6:** Four (or five) out of five points in a row are more than 1 standard deviation from the mean in the same direction



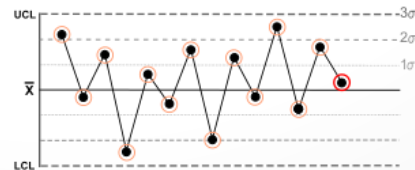
**Rule 3:** Six (or more) points in a row are continually increasing (or decreasing)



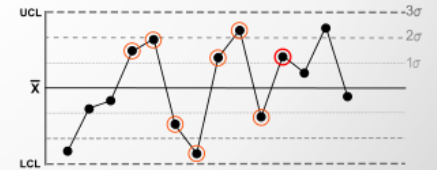
**Rule 7:** Fifteen points in a row are all within 1 standard deviation of the mean on either side of the mean



**Rule 4:** Fourteen (or more) points in a row alternate in direction, increasing then decreasing



**Rule 8:** Eight points in a row exist with none within 1 standard deviation of the mean and the points are in both directions from the mean



[http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Poster\\_-\\_Control\\_Charts\\_for\\_Nelson\\_Rules.svg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Soubor:Poster_-_Control_Charts_for_Nelson_Rules.svg)

## Regulační diagram:

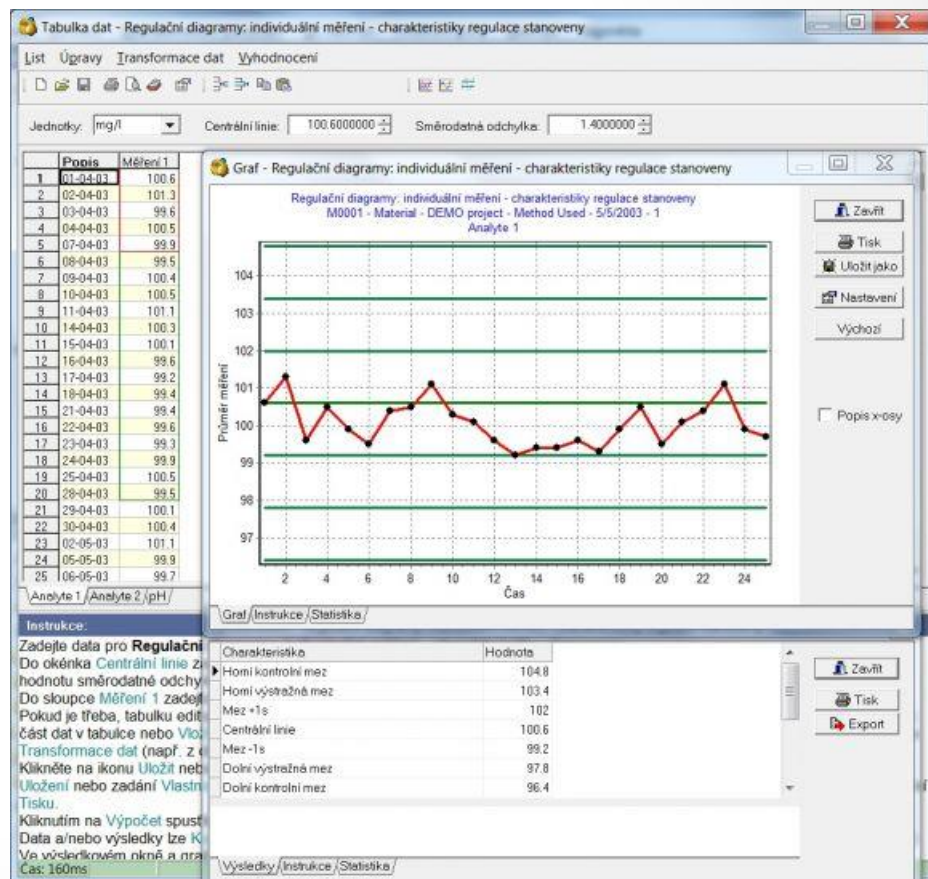
Profesionální sw. pro tvorbu, např.:

Effichem - <http://www.effichem.cz/>

Statistica - <http://www.statsoft.cz/>

Třeštík - <http://www.trestik.cz/statisticke-nastroje-pro-spc>

A mnoho jiných, **ale**  
velmi jednoduše lze připravit v  
jakémkoliv tabulkovém procesoru  
(MS Excel) i manuálně na papíře.



<http://www.effichem.cz>