

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 též ještě 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.

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

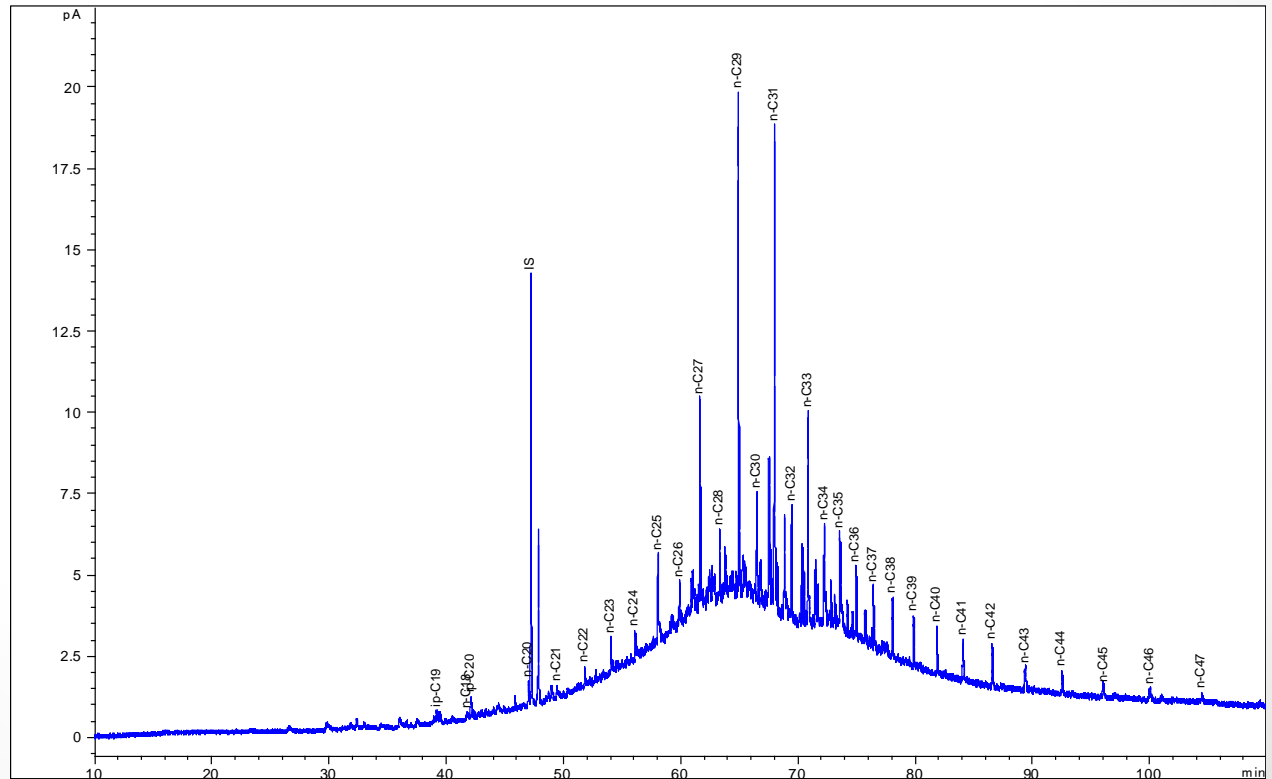
pravidla validace

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

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

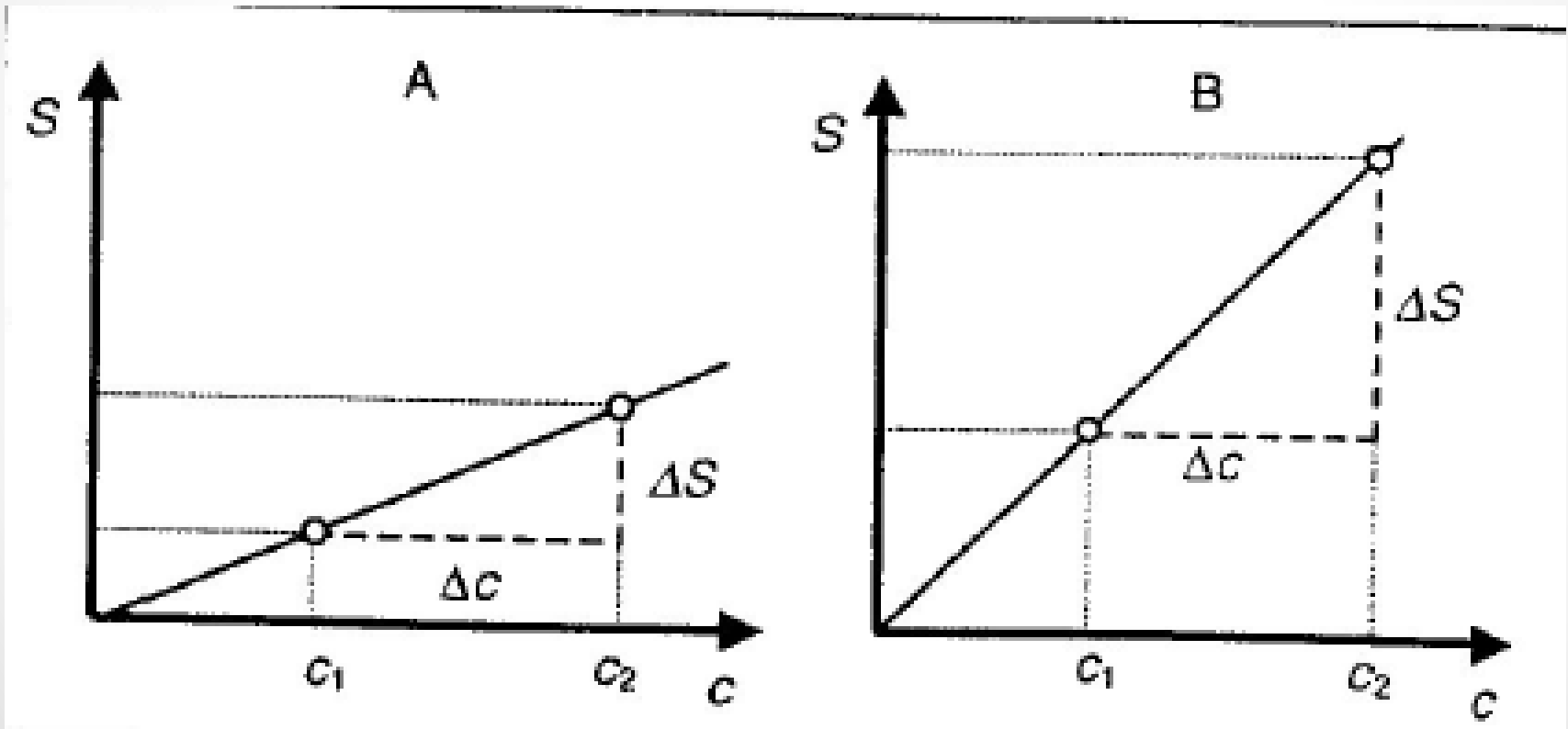
- připravíme sadu vzorků o známém složení, stanovíme závislost odezvy na koncentraci standardu v předpokládaném rozmezí ve vzorku.



Kalibrační přímka s 95% intervalem spolehlivosti

Citlivost = směrnice kalibrační přímky. Je-li citlivost závislá na matici, nepostačuje kalibrace na čisté látky.

Podíl změny odezvy měřicího zařízení a odpovídající změny podnětu.



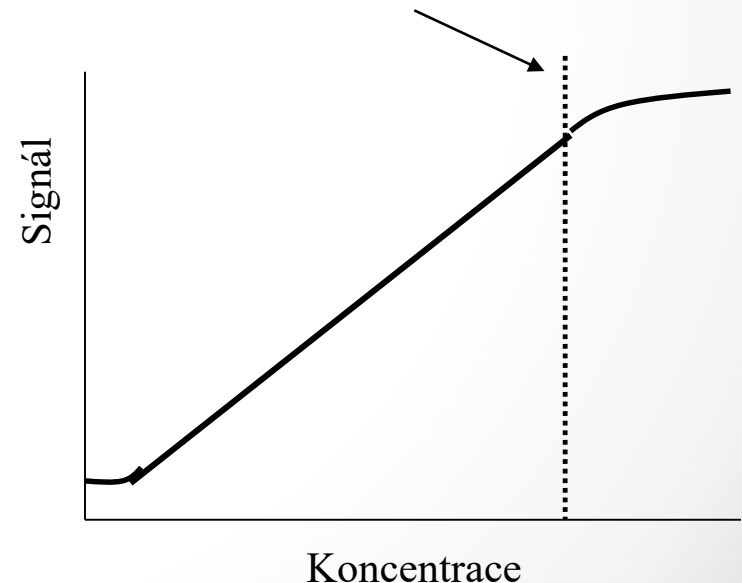
Linearita (Linearity)

schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné koncentraci analytu.

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

Mez linearity, Limit of Linearity (LOL)

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



Mez detekce = MD, LOD – Limit od detection

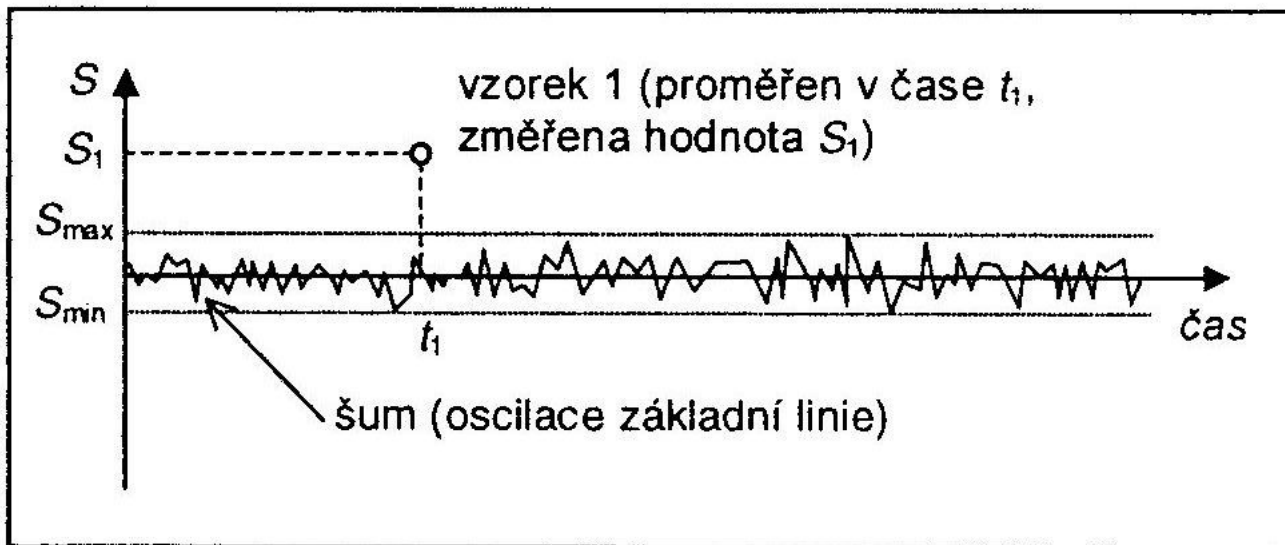
nejmenší množství složky ve vzorku, které lze stanovit

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

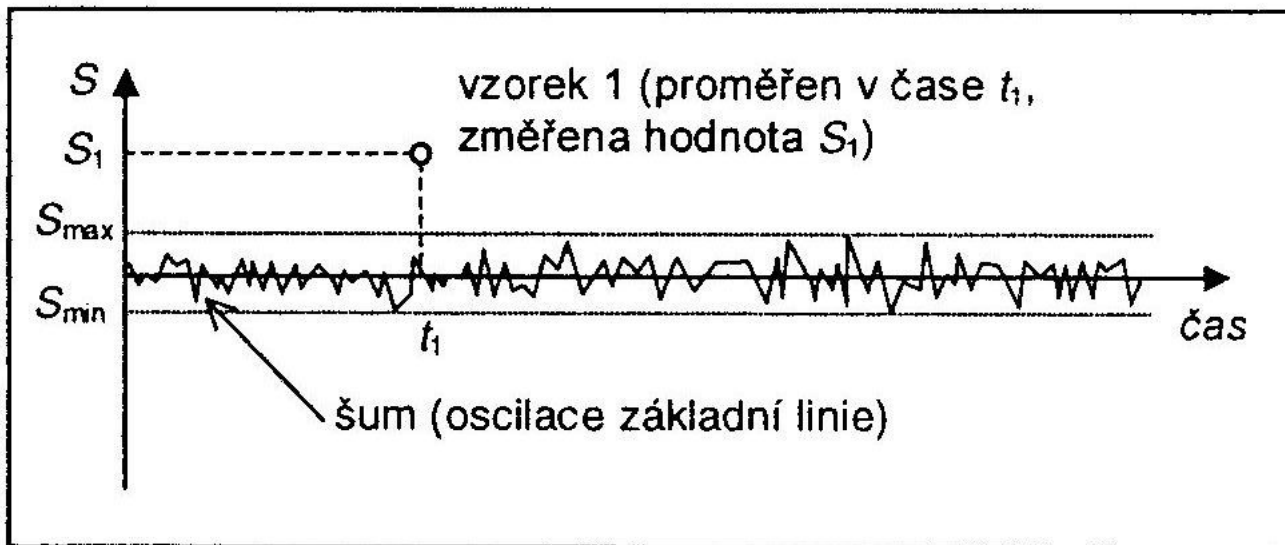


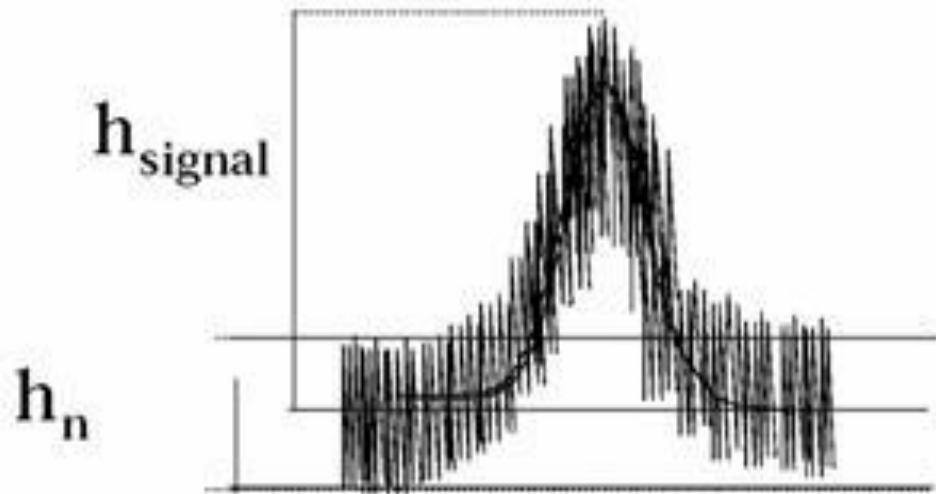
Mez stanovitelnosti - LOQ (Limit of quantification)

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.

Desetinásobek šumu směrodatné odchylky slepého pokus





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

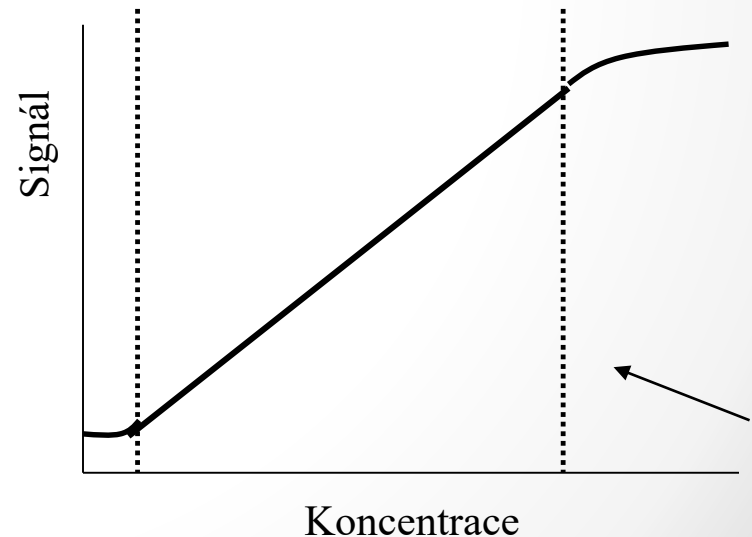
$$\text{LOQ} = 10 \cdot h_n / m$$

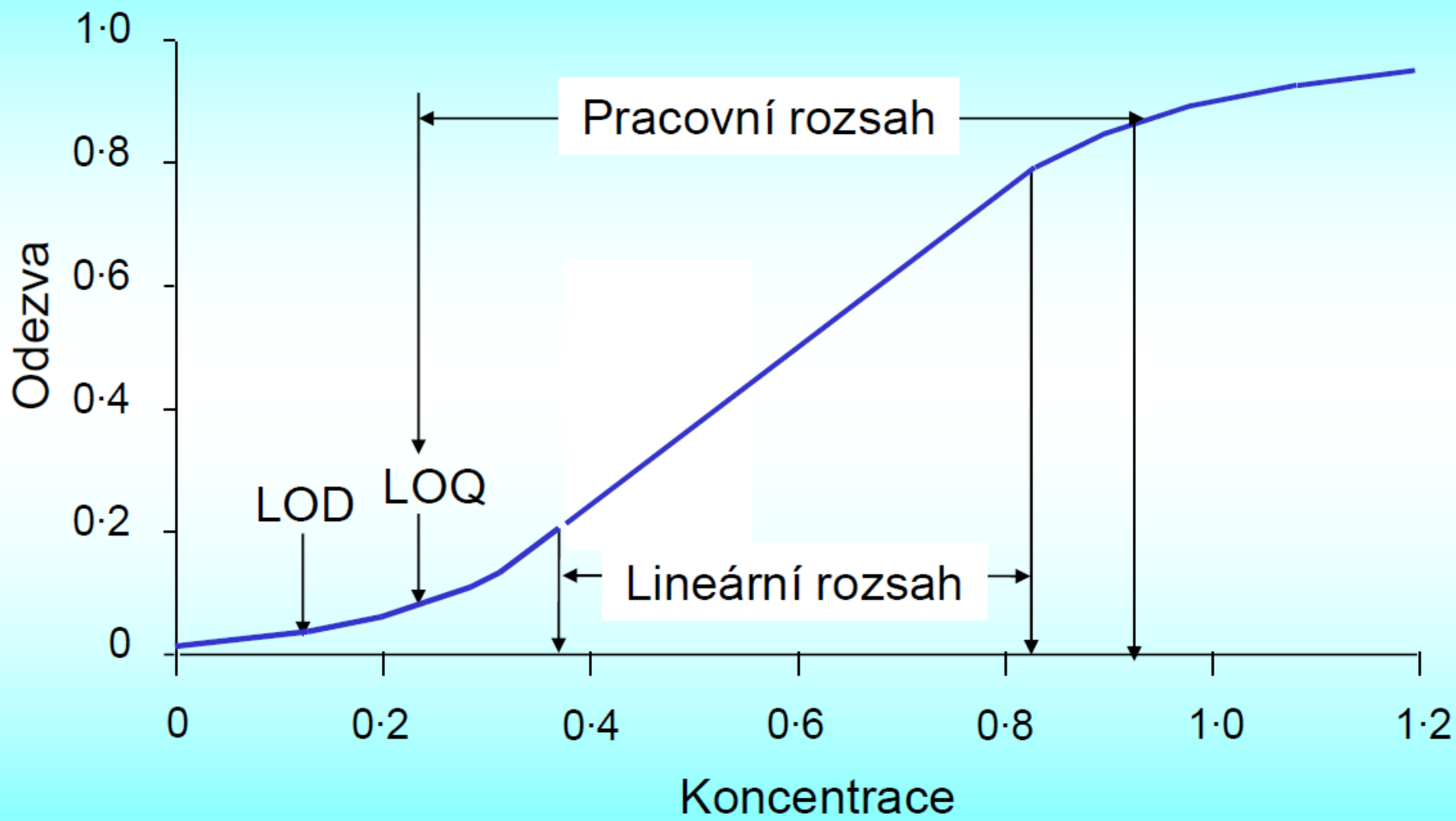
h_n = šum na základní linii
 m je směrnice kalibrační křivky

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.

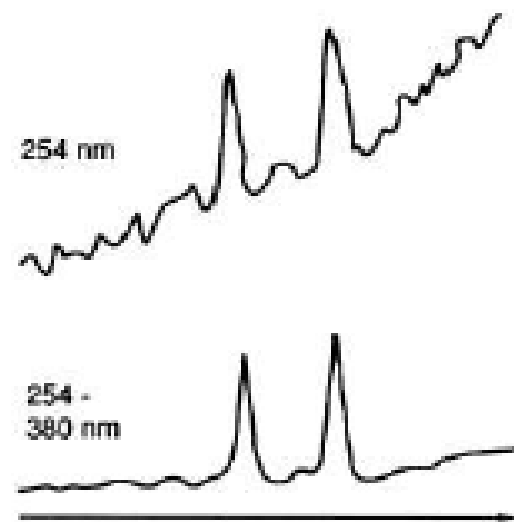
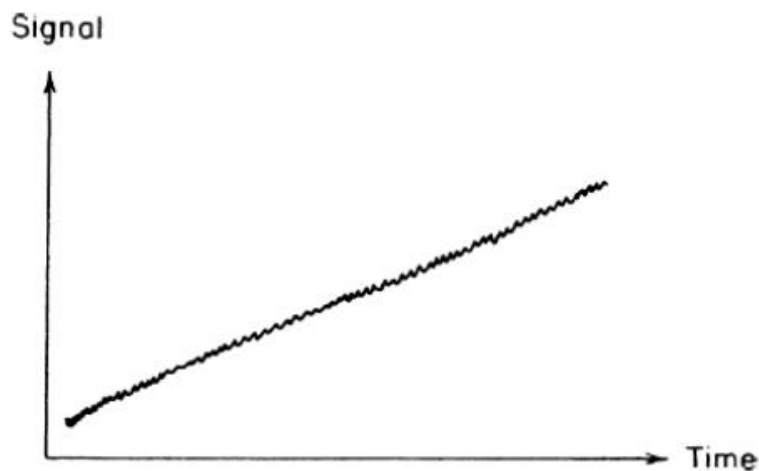




Drift základní linie měřicího přístroje

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

- odchylka základní linie v čase, projevuje se nárůstem směrnice



Výtěžnost (recovery)

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

C_{obs} je nalezená koncentrace (nebo množství) analytu získaná aplikací měřicího postupu

C_{ref} je hodnota CRM nebo hodnota daná “spikem” nebo změřená dohodnutou metodou

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.

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 **těsnost 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.

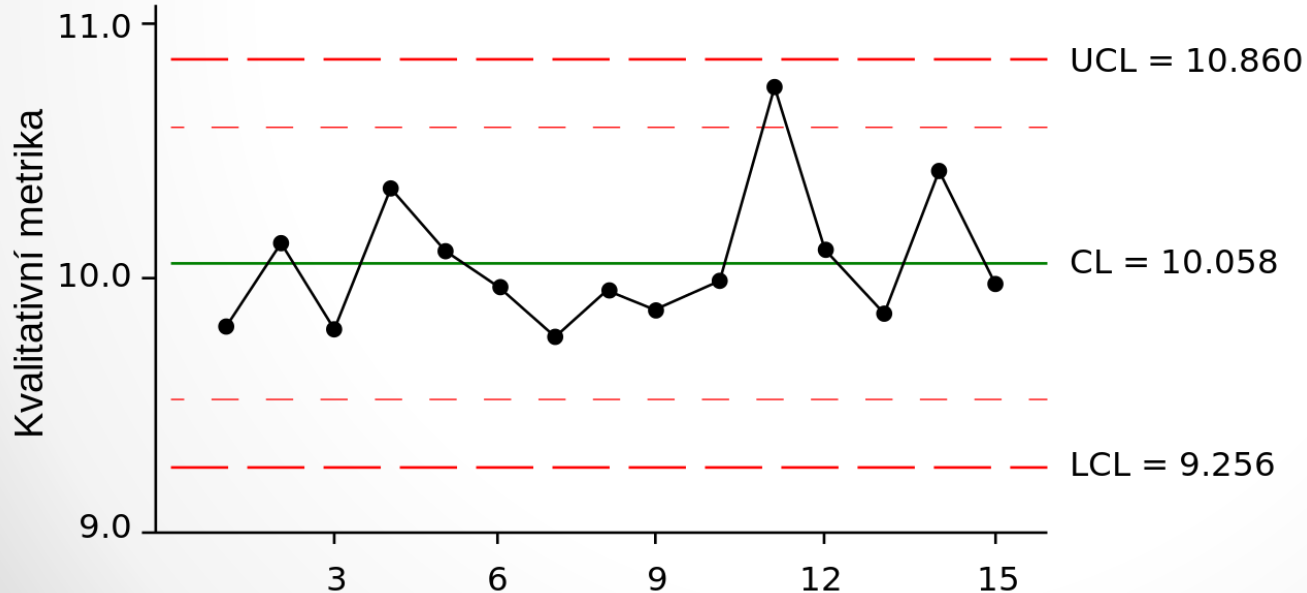
Regulační diagram má vždy označenu střední hodnotu (*CL - Central Line*) a horní a dolní regulační mez (*UCL – Upper Control Line* a *LCL – Lower Control Line*), tzv. akční meze, které jsou určeny buď z historických dat, nebo jsou cílovou hodnotou určenou předpisem. Z časového průběhu diagramu je možné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

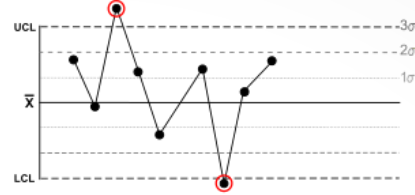
Regulační diagram:

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.

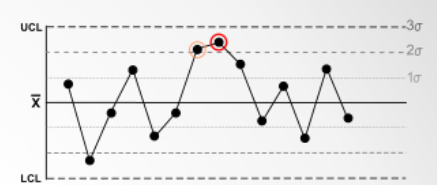


Regulační diagram:

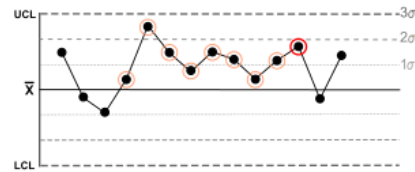
Rule 1: One point is more than 3 standard deviations from the mean



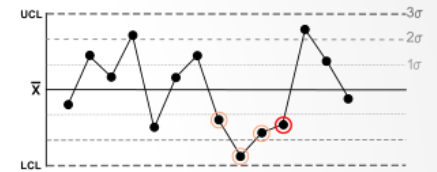
Rule 5: Two (or three) out of three points in a row are more than 2 standard deviations from the mean in the same direction



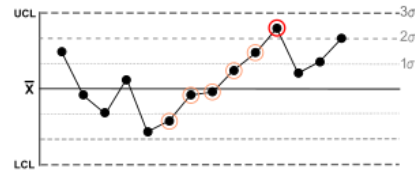
Rule 2: Nine (or more) points in a row are on the same side of the mean



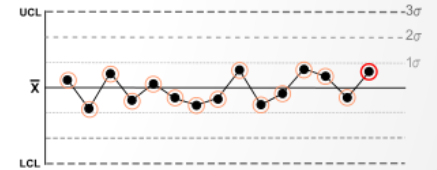
Rule 6: Four (or five) out of five points in a row are more than 1 standard deviation from the mean in the same direction



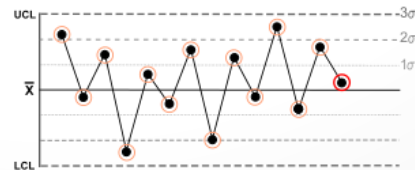
Rule 3: Six (or more) points in a row are continually increasing (or decreasing)



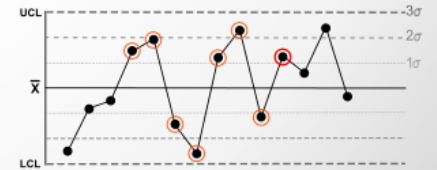
Rule 7: Fifteen points in a row are all within 1 standard deviation of the mean on either side of the mean



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

Regulační diagram:

Profesionální sw. pro tvorbu, např.:

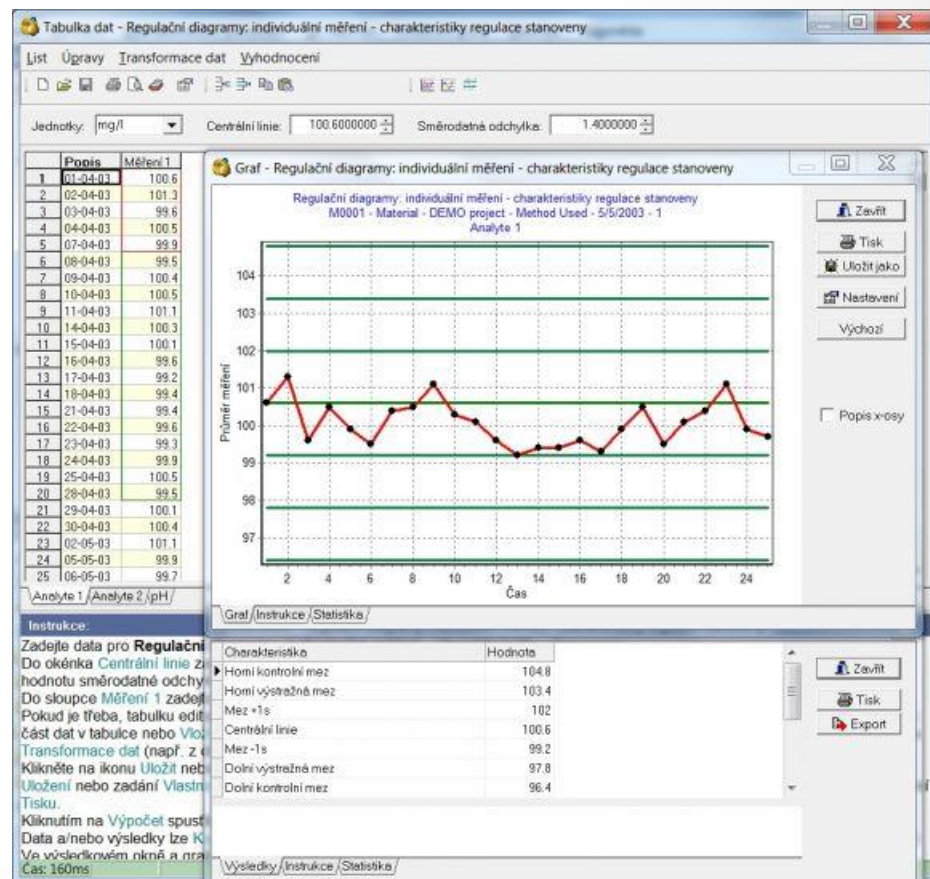
Effichem - <http://www.effichem.cz/>

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

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

A mnoho jiných, **ale**

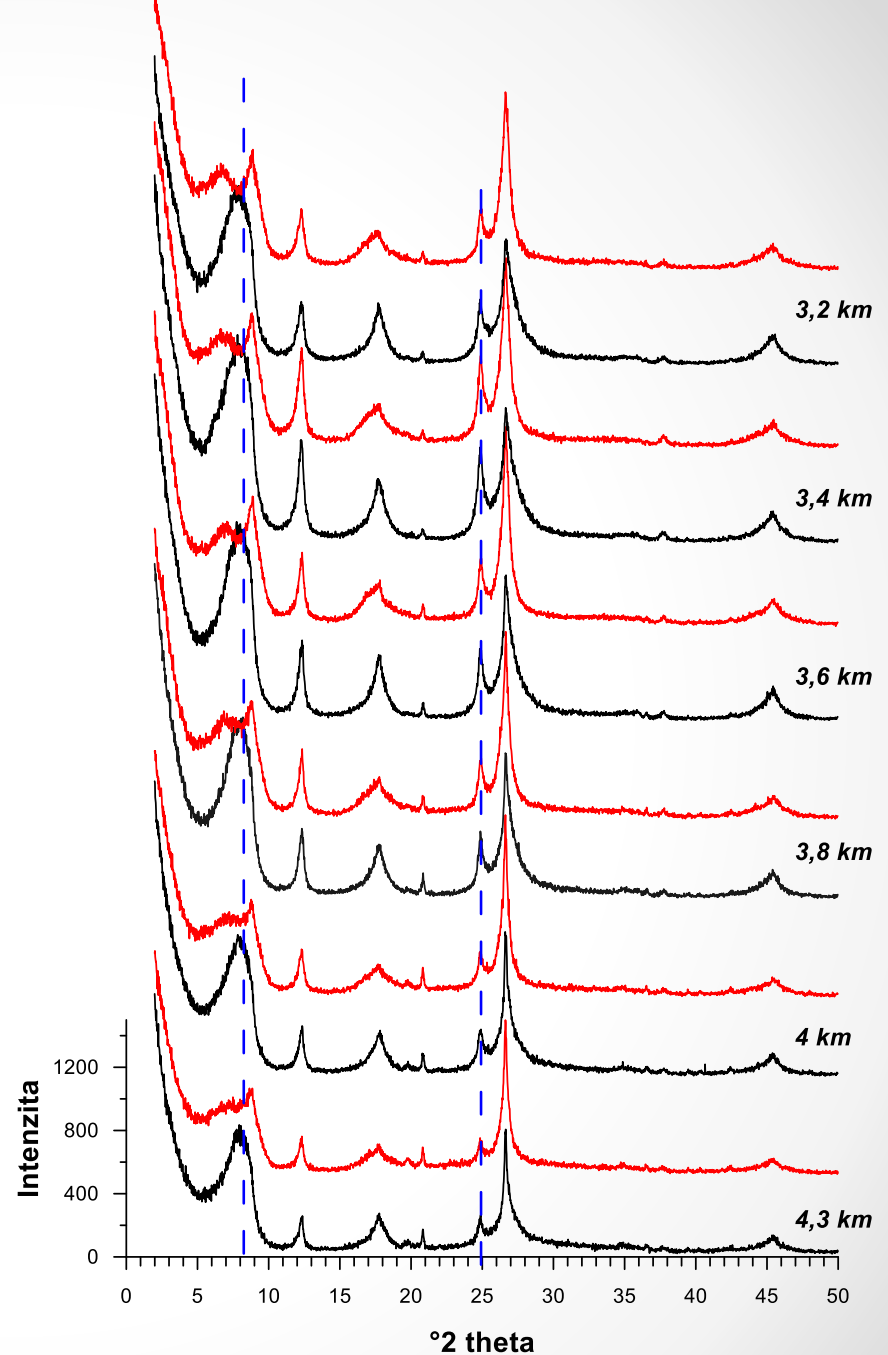
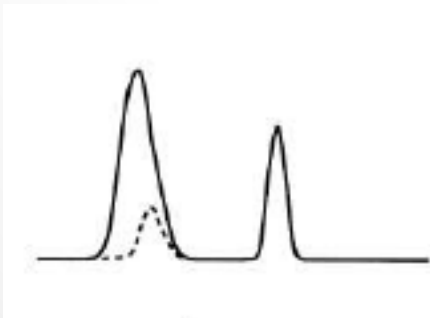
velmi jednoduše lze připravit v jakémkoliv tabulkovém procesoru (MS Excel) i manuálně na papíře.



<http://www.effichem.cz>

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.



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
- změna podmínek v laboratoři (teplota, koncentrace, doba extrakce).

Porovnání s referenčním materiálem

- materiál musí být dostupný, musí mít deklarovanou koncentraci a danou směrodatnou odchylku
- Opakovaně se analyzuje 6-10x
- Vypočte se směrodatná odchylka a průměrná hodnota
- Porovnáme s deklarovanými hodnotami
- Pro validaci správnosti metody je třeba použít tolik referenčních materiálů aby se pokryl celá koncentrační rozsah a všechny matrice, na které se metoda používá.

Certifikovaný referenční materiál (CRM - Certified Reference Material, v USA SRM): Referenční materiál doprovázený dokumentem vydaným způsobilou osobou a poskytující jednu nebo více specifikovaných hodnot vlastnosti s přidruženými nejistotami a návaznostmi s použitím platných postupů.

Analýza hornin, zemin

- stanovení organických sloučenin
- stanovení anorganických sloučenin

Specifické problémy environmentálních analýz

- nízká homogenita vzorků
- nízká stabilita vzorků
- hodně typů matrice
- široké spektrum koncentrací
- monitorování na hranici detekčních limitů
- rizika sekundárních kontaminací
- vysoká finanční náročnost

Chemická analýza geomateriálů anorganická

- Stanovení hlavních a vedlejších prvků (silikátová analýza)
- Stanovení stopových prvků
- Stanovení izotopových poměrů stabilních i radiogenních izotopů

Pevný vzorek je nutné upravit (nábrus, tableta atp.)
případně převést do roztoku mineralizací (rozkladem)



Validace analytických metod

- prokázání toho, že použitý postup je vhodný pro zamýšlené použití nebo aplikaci.
- ✓ potvrzení prostřednictvím skutečných pozorování, měření a zkoušení
- ✓ zahrnuje sérii experimentů, které prokáže při opakovaném použití reprodukovatelné výsledky
- ✓ je nutné přesně definovat podmínky, za kterých je metoda použitelná

pravidla validace

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

Analýza neznámé látky: první kroky

skupenství

vzhled (tuhá látka, velikost, amorfní hmota, krystalická,)

barva, zápach

rozpustnost ve vodě

reakce s HCl

orientační zjištění zda je materiál organického nebo anorganického původu.

čistá látka x směs

Vzorek ... analyt zředěný matricí, jednotkou zředění je procento (%).

1% = 1g analytu ve 100g vzorku

Stopové obsahy

Obsah analytu

= 10 %,

hlavní komponenta

= méně než 10 %

vedlejší komponenta

Pod 10^{-4} %

stopová množství

Menší než 10^{-6} %

ultrastopové množství

Čistota laboratoří

Čistota chemikálií

- *technický produkt (desítky % cizí látky),*
- *chemicky čistý produkt (jednotky % cizí látky),*
- *p.a. preparáty pro analýzu (menší než 0,01% určených cizích látek)*

Chemická analýza anorganická

- analýza bez narušení povrchu – rentgenová fluorescence, neutronová aktivační analýza
- pevný vzorek je nutné upravit (nábrus, tableta atp.) případně převést do roztoku

Výjimečně je vzorek rozpustný za studena nebo po zahřátí.

Materiál nerozpustný je třeba rozložit a převést na formu vhodnou pro další analytický postup.

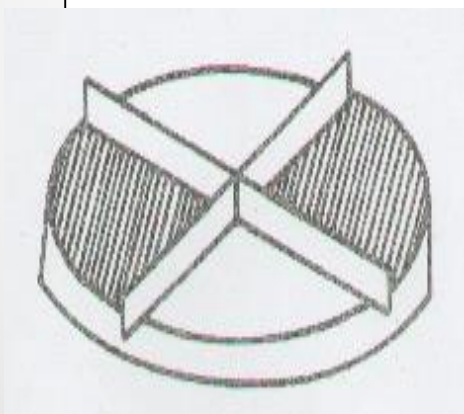
- *rozklady probíhají jednak **za mokra** (kyselinami nebo zásadami) jednak **za sucha** (tavením)*

Možnosti úpravy vzorků

- bez úpravy, homogenizace, sítování, mletí
- převedení do roztoku za použití nereaktivních nebo reaktivních rozpouštědel

Úprava vzorků

- kvartace
- drcení – hmoždíř, třecí miska
- mletí – kulový mlýn, elektrický mlýnek
- prosívání – síta o různých velikostech ok



Zdroj: K. Volka, Analytická chemie I

Převádění anorganických látek do roztoku

Rozklady na mokré cestě

- HCl, HNO₃, HCl + HNO₃ (s přísádky oxidovadel),
- HCl + HNO₃ 3:1 lučavka královská, HCl + HNO₃ 3:1 lefortova lučavka
- H₂SO₄, HClO₄, HF, NaOH, NH₃

HCl + HNO₃ 3:1 lučavka královská, nerozpustný zbytek může obsahovat:

- halogenidy stříbra nebo AgCN
- sírany BaSO₄, SrSO₄, PbSO₄
- CaF₂
- oxidy kovů Al₂O₃, Cr₂O₃, TiO₂, SnO₂
- SiO₂, některé křemičitany, Si, C, SiC

Rozklady na suché cestě – tavení

převádí analyzovaný materiál na sloučeniny rozpustné ve vodě nebo zředěných kyselinách

Rozlišujeme

tavení kyselé – do roztoku převedeme bazické složky (kovové oxidy)

tavení alkalické – do roztoku převedeme složky kyselé (sírany, křemičitany)

Alkalické tavení

- karbonátové
- s NaOH nebo KOH
- síroalkalické
- alkalicko-oxidační

Kyselé tavení

- disíranové
- s oxidem boritým

Tlakové rozklady

- rozklad s kyselinami (HCl, HF, HNO₃) za zvýšeného tlaku
- probíhá v ocelových nebo hliníkových autoklávech
- můžeme rozkládat i materiály, které se za normálního tlaku kyselinami nerozkládají
- slouží k rozkladu korundu (Al₂O₃), silikátů, slitin drahých kovů

Tabulka 1.5: Srovnání detekčních limitů nejběžnějších metod užívaných v analýze geomateriálů

| Prvek | FAAS ¹⁾ | | ICP OES ¹⁾ | | ICP MS ²⁾ | | XRF | | OES |
|-------|--------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| | ideální roztok (mg l ⁻¹) | celková hornina (mg kg ⁻¹) | ideální roztok (mg l ⁻¹) | celková hornina (mg kg ⁻¹) | ideální roztok (mg l ⁻¹) | celková hornina (mg kg ⁻¹) | ED ³⁾ hornina ** (mg kg ⁻¹) | WD ⁴⁾ hornina ** (mg kg ⁻¹) | jiskrový hornina (mg kg ⁻¹) |
| Si | 0,45 | 90 | 0,024 | 5 | * | * | 982 | 467 | 20 |
| Ti | 0,21 | 42 | 0,007 6 | 1,5 | 0,000 1 | 0,1 | 180 | 144 | 2 |
| Al | 0,06 | 12 | 0,046 | 9 | 0,000 5 | 0,5 | 888 | 280 | 10 |
| Fe | 0,015 | 3 | 0,012 4 | 2,5 | 0,05 | 50 | 175 | 182 | 8 |
| Mn | 0,006 | 1,2 | 0,002 8 | 15 | 0,000 05 | 0,05 | 116 | 186 | 2 |
| Mg | 0,000 6 | 0,12 | 0,06 | 12 | 0,000 1 | 0,1 | 1 542 | 561 | 5 |
| Ca | 0,003 | 0,6 | 0,02 | 4 | * | * | 117 | 65 | 50 |
| Na | 0,001 | 0,2 | 0,058 | 12 | 0,001 | 1 | 7 122 | 1 781 | 500 |
| K | 0,003 | 0,6 | 12 | 2 400 | 0,005 | 5 | 175 | 61 | 7 000 |
| P | 120 | 24 000 | 0,152 | 30 | 0,1 | 100 | 234 | 65 | 2 000 |
| Cr | 0,009 | 3 | 0,014 | 3 | 0,000 05 | 0,05-0,5 | *** | 10 | 2 |
| Sr | 0,015 | 1 | 0,000 84 | 2 | 0,000 005 | 0,005-0,05 | *** | 10 | 1 |
| Rb | 0,015 | 1 | 75 | 15 000 | 0,000 05 | 0,05-0,5 | *** | 8 | 6 |
| Pb | 0,06 | 1 | 0,084 | 20 | 0,000 005 | 0,005-0,05 | *** | 20 | 40 |
| U | 90 | 10 000 | 0,674 | 80 | 0,000 005 | 0,005-0,05 | *** | 25 | 430 |
| La | 6 | 1 200 | 0,022 | 7 | 0,000 001 | 0,001 | *** | 20 | 30 |

* - nestanovuje se, ** - tavená peleta, *** - neuvedeno

Zdroje: ¹⁾ Potts (1995); ²⁾ např. Strnad (2005, 2008); ³⁾ Potts et al. (1984); ⁴⁾ Norrish a Hutton (1969).

Organické látky



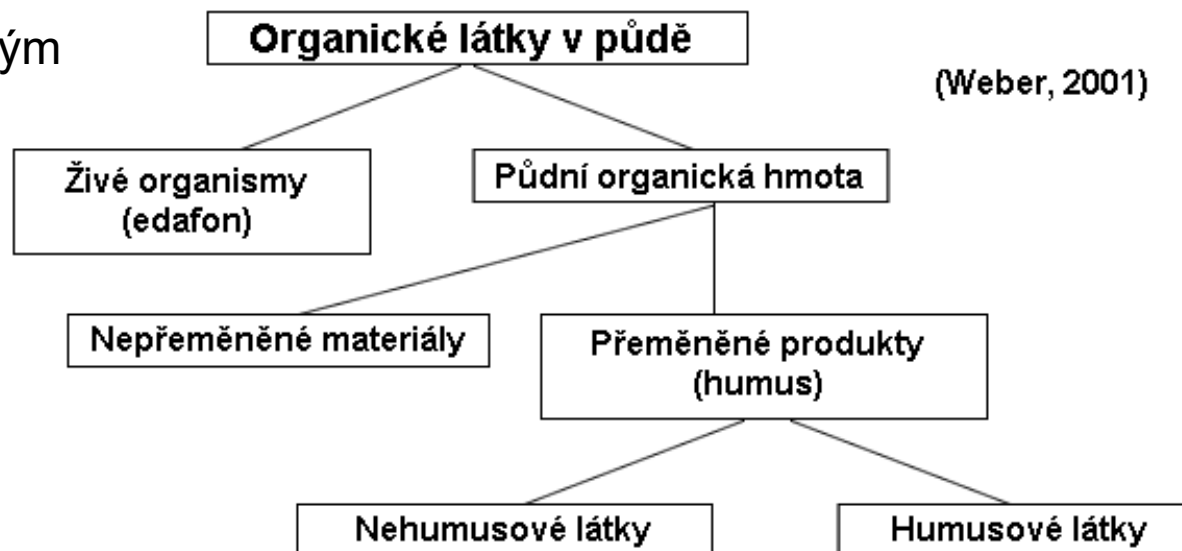
- Vysoká diverzita s ohledem na strukturu a fyzikálně chemické vlastnosti
- Vyskytují se ve vodě nebo půdě podle polarit vyjádřené hodnotou K_{ow} (hydro / lipofilní) – vliv na transport a následnou distribuci

•Antropogenní látky

prioritní polutanty
nové polutanty

•Přírodní látky

Xenobiotika – látky cizorodé živým organismům



Chemická analýza organická

Extrakce - cílem je přemístit analyt do chemické fáze vhodné pro analýzu, při odstranění interferujících složek a při dosažení vhodné koncentrace

- volba rozpouštědlanejlépe rozpouštějící analyt, volba z manuálu nebo zkušenosti

Rozpouštědla

Pentan

Diethylether

Ethylacetát

Benzen

Propanol

Nitromethan

Acetonitril

Methanol

Extrakční techniky:

- solvent extrakce
- liquid-liquid exktrakce
- solid phase extrakce a mikroextrakce
- semipermeable membrane separation
- head space analysis

Extrakce

- rozrušování nebo částečný rozklad vzorku (matrice) při extrakci (nebo před)
- selektivita extrakce – při dobré extrakci analytu by se balastní látky měly extrahovat co nejméně
- volba teploty a časového intervalu extrakce
- extrakce v inertní atmosféře, ultrazvukové lázni, za varu, třepáním

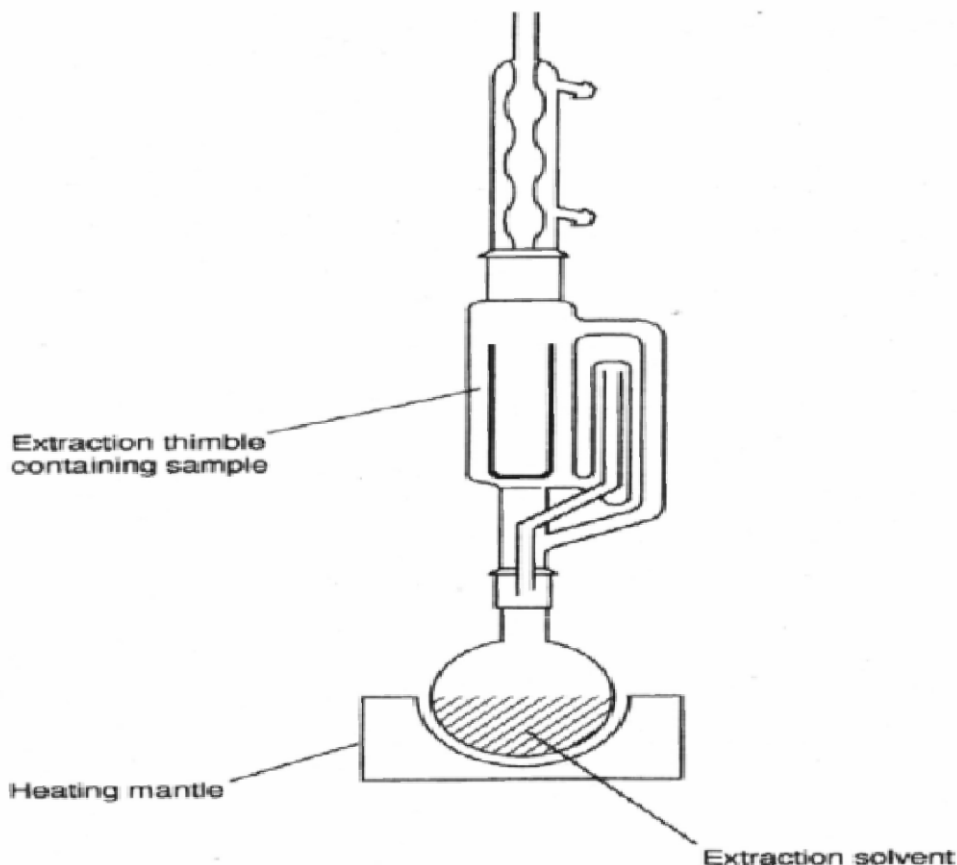
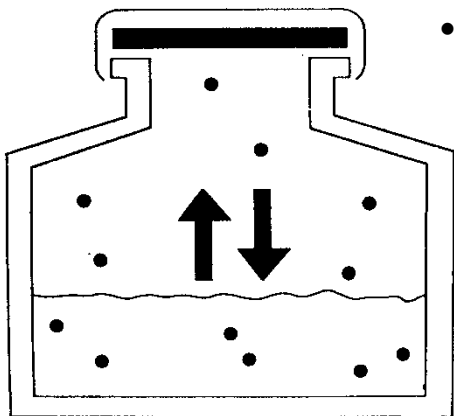


Figure 5.1 Schematic of a Soxhlet extraction system.

Extrakce

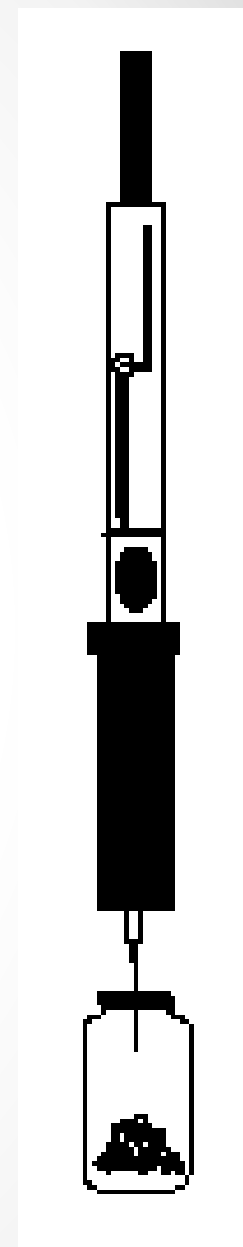
"Head-space" analýza zemin

- statická
- dynamická



Mikroextrakce na tuhé fázi

- solid phase microextraction (**SPME**)
- původně vyvinuta pro stopová množství organických látek ve vodných roztocích
- adsorpce na tenký film polysiloxanu
- tepelná desorpce v GC injektoru



Stanovení organických látek v environmentálních vzorcích

Chromatografie

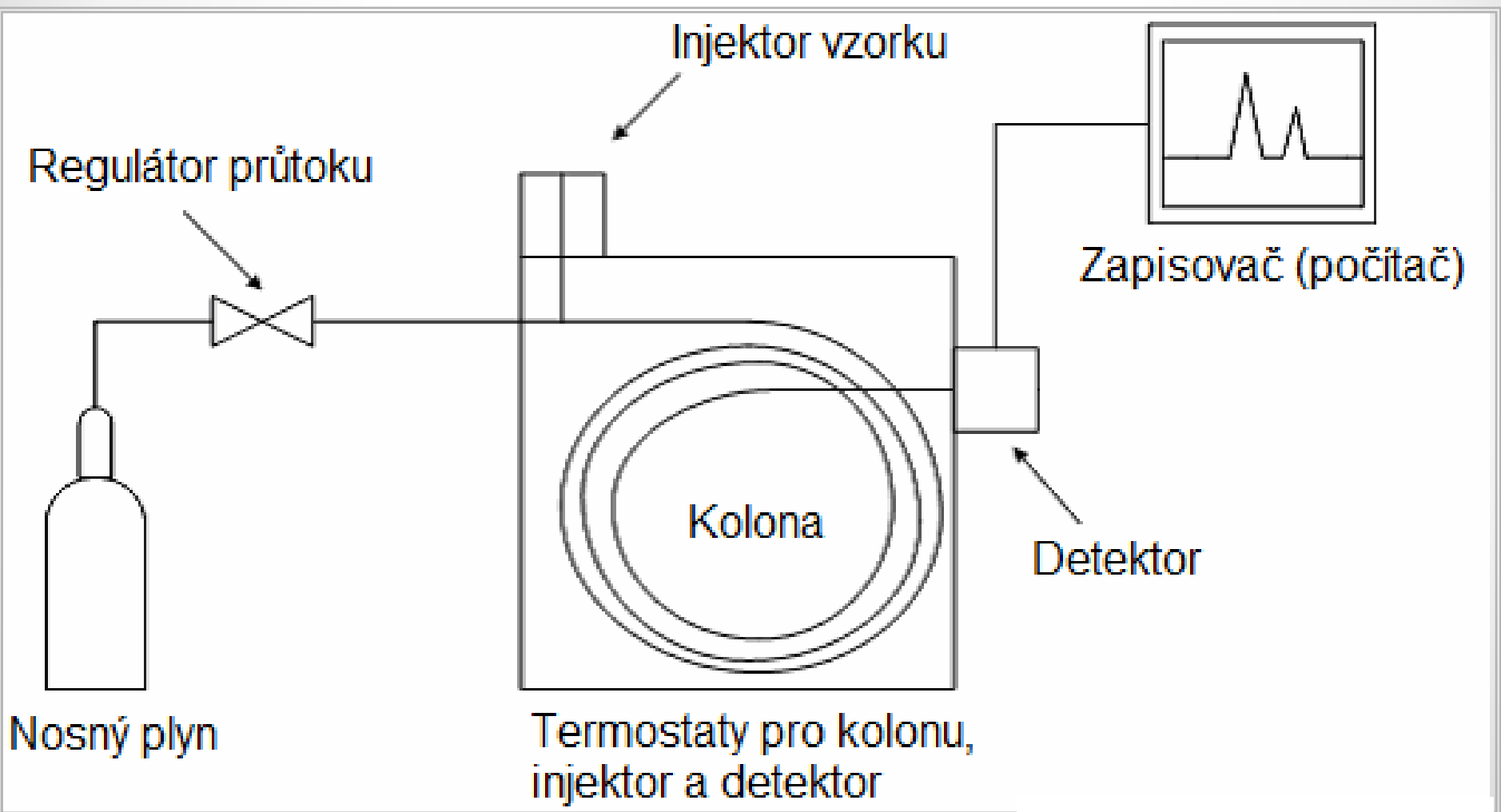
je fyzikální metoda separace, při které jsou separované sloučeniny distribuovány mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je stacionární a druhá mobilní.

Chromatografický proces probíhá díky opakované sorpci a desorpci sloučenin ve vzorku během kontaktu se stacionární fází.

Separace sloučenin je způsobena rozdílností distribučních konstant jednotlivých sloučenin v daném separačním systému.

Výsledkem tohoto procesu je rozdílná migrace chromatografovaných sloučenin.

- GC, HPLC, GC-MS, LC-MS, HRGC



Obecné schéma plynového chromatografu

Analýza

Nosný plyn: Vodík, Helium, Argon, Dusík

Nástřik vzorku: Split / splitless, On-column, PTV; SPME

Separace: Izotermická analýza, teplotní programování; konst. p či V (ml/min)

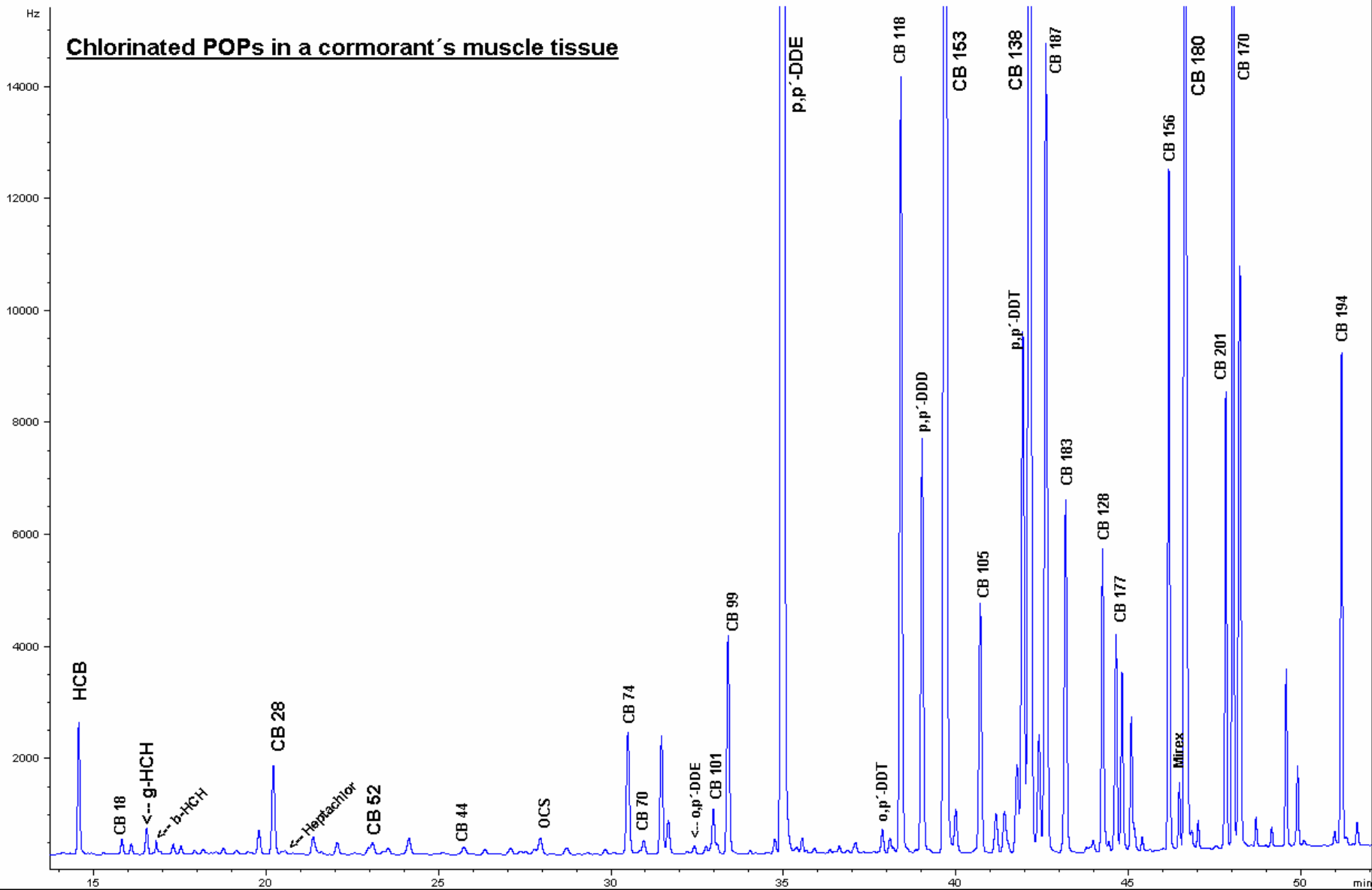
Detektory: ECD, FID, TCD;



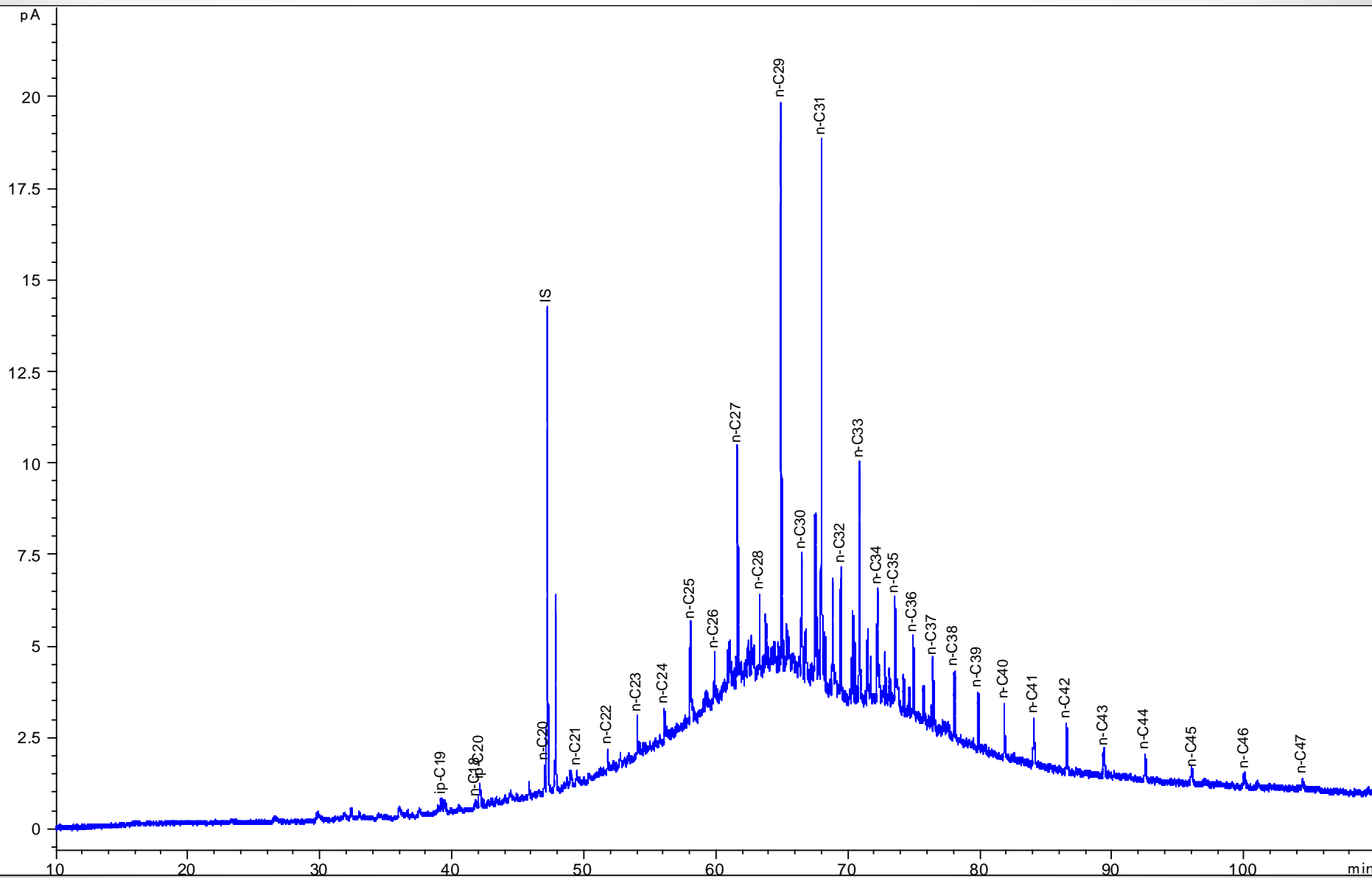
Analýza - PCB

ECD1 A, (LANAWZDRKY~1WFU_505.D)

Chlorinated POPs in a cormorant's muscle tissue



Analýza – NEL



Analýza – PAU

