

Postup při vývoji nové analytické metody

Počáteční impuls

- **Požadavek z praxe** (metody pro současnost)
 - zavedení používaných metod
 - zdokonalení používaných metod
 - vývoj nových metod
- **Základní výzkum** (metody pro budoucnost)
 - vývoj nových metod
 - zdokonalení metod současných

Jak začít?

- **Přesné definování cíle/požadavku**
 - typ analytu
 - požadované stanovované koncentrace
 - pravděpodobné matrice pro stanovení
- **Důkladná literární řešerše**
 - volba vhodných klíčových slov
 - ISI Web of Knowledge, CAS SciFinder

Typ analytu

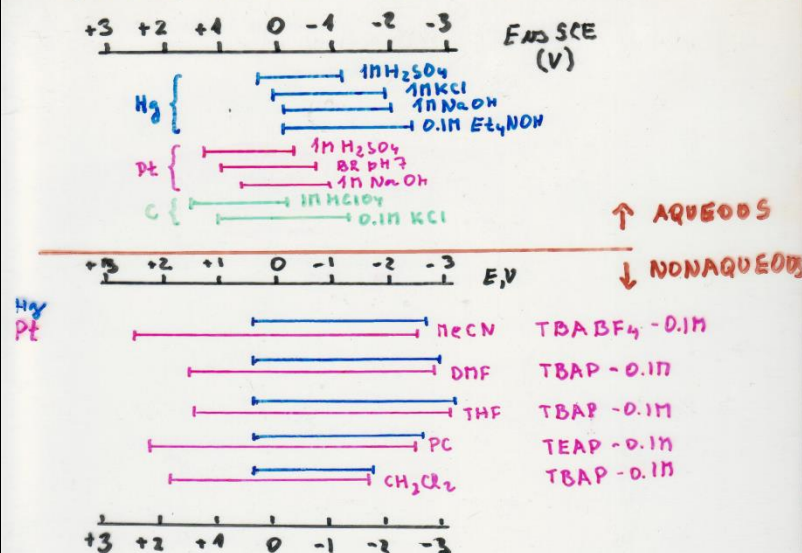
- **Environmentální analýza**
 - polutanty (těžké kovy, DDT, PCB, dioxiny, NPAH)
 - agrochemikálie (růstové stimulanty, pesticidy)
- **Klinická analýza**
 - léčiva
 - metabolity léčiv
 - hormony
- **Toxikologická analýza**
 - jedy
 - chemické karcinogeny
 - endokrinní disruptory

Důležité otázky (vhodnost?)

- **Pracovní elektroda**
 - obnovovatelný povrch (pasivace)
 - pevný povrch (akumulace)
- **Technika**
 - DPV (přímá stanovení do 10^{-7} mol L⁻¹)
 - ASV, AdSV (nižší koncentrace)
- **Prostředí a podmínky**
 - bohaté literární zdroje
 - voda × organická rozpouštědla
- **Podmínky pro předběžnou úpravu vzorku**
 - předběžná separace a prekoncentrace
- **Vhodný způsob vyhodnocování**

Prostředí

POTENTIAL WINDOW



NONAQUEOUS MEDIA

- PURIFICATION
- REF. ELECTRODE $\text{Ag}/0.01\text{M AgNO}_3$ PLESKOV

ADVANTAGES

- SOLUBILITY
- POT. WINDOW
- REACTIVITY
- REVERSIBILITY
- INTERMEDIATE'S STABILITY

MIXED MEDIA

DISADVANTAGES

- PRICE AND AVAILABILITY
- PURITY
- TOXICITY
- REF. ELECTRODES
- DEOXYGENATION
- INFLUENCE OF MOISTURE
- IR ↑ (HIGH RESISTANCE)
- THEORETICAL COMPLICATIONS (pH, general chemistry, etc)
- VOLATILITY
 - PREBUBBLER
 - PROBLEMS WITH SMALL VOLUMES

**Voltametrické stanovení
submikromolárních koncentrací
genotoxického 2-nitrofluorenu
na meniskem modifikované
stříbrné pevné amalgamové elektrodě**

Deriváty fluorenu ve výfukových plynech

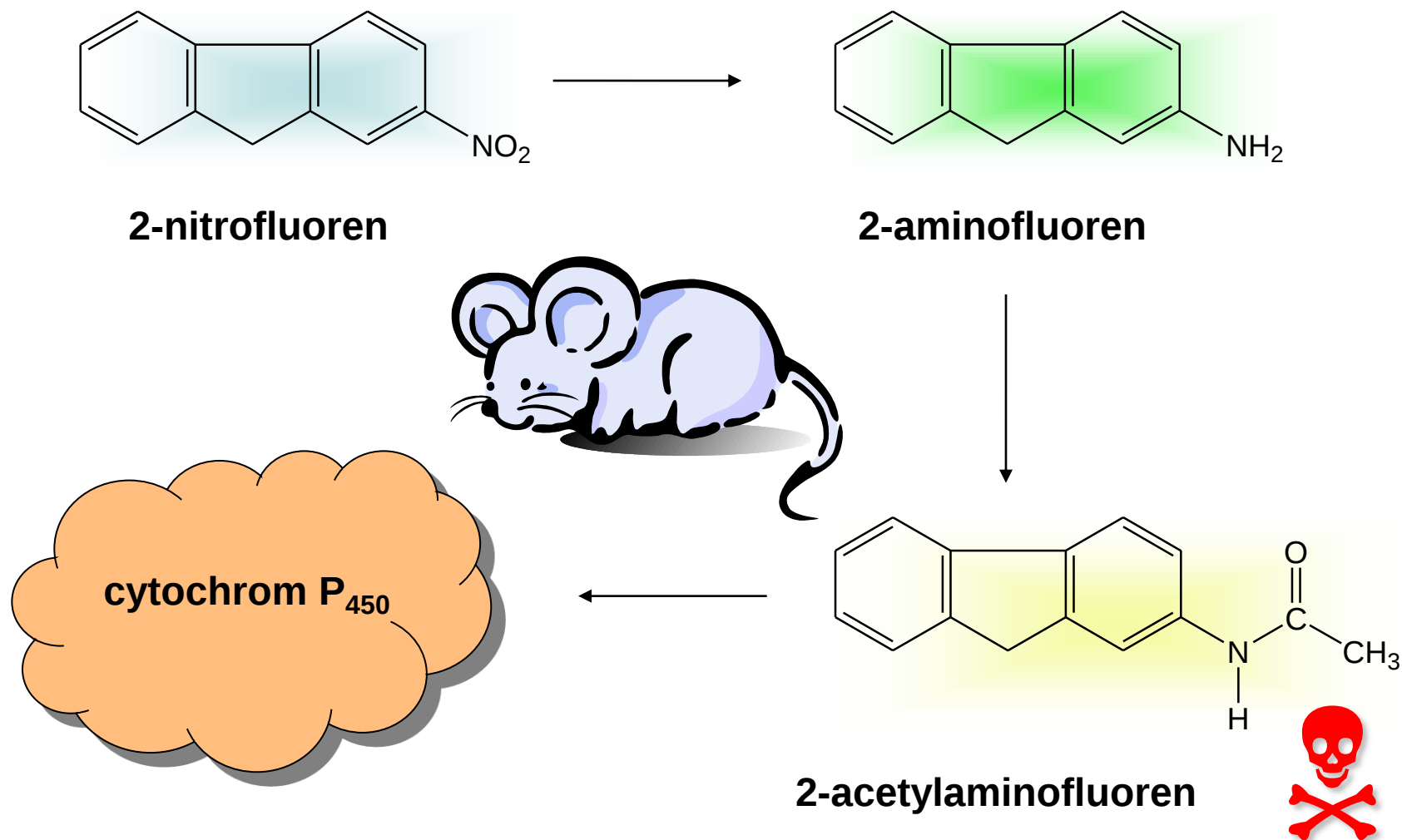
- ☑ **Nitrované polyaromatické uhlovodíky v emisích dieselových motorů**
 - vznikají při teplotách kolem 1000 °C pyrolýzou nedokonale spáleného paliva
 - tvoří asi 1% izolovaných pevných částic
 - v pevných částicích identifikováno kolem 70 nitro-PAU sloučenin (GC-MS)
 - největší zastoupení 1-nitropyren

- ☑ **Koncentrace vybraných polutantů indentifikovaných v extrahovaných částicích emisí nízkovýkonových dieselových motorů (4 – 6 válců)**

fluoren	0,1 µg/g
2-nitrofluoren	1,8 µg/g (marker)
2,7-dinitrofluoren	4,2 µg/g
2,7-dinitro-9-fluorenon	8,6 µg/g
3-nitrofluoranthren	4,4 µg/g (marker)
pyren	3,5 – 8,0 µg/g
1-nitropyren	18,9 µg/g (marker)



Genotoxické působení 2-nitrofluorenu



Moller L.: Environ. Health Perspect. 102, 139 (1994).

Vytyčené cíle naší práce

- ☑ **Stanovení 2-nitrofluorenu na rtuťovým meniskem modifikované stříbrné tuhé amalgamové elektrodě (m-AgSAE)**
 - studování vlivu pH na elektrochemické chování ve směsi methanol – Brittonův-Robinsonův (**BR**) pufr (H_3PO_4 , H_3BO_3 , CH_3COOH + NaOH), HCl nebo NaOH
 - nalezení optimálních podmínek stanovení (pH + regenerační potenciály)
 - měření kalibračních závislostí s cílem dosáhnout nejnižší meze stanovitelnosti (L_Q)
- ☑ **Porovnání dosažených výsledků s alternativními metodami stanovení 2-nitrofluorenu**
 - UV spektrofotometrie
 - polarografie na klasické rtuťové kapající elektrodě (DME)
 - voltametrie na visící rtuťové kapkové elektrodě (HMDE)
- ☑ **Pokus o rozdělení směsi 3 markerů nitrovaných polyaromatických uhlovodíků pomocí HPLC s UV/VIS a EC (na bázi AgSAE) detekcí**
 - 2-nitrofluoren, 1-nitropyren a 3-nitrofluoranthren

Aparatura a použité voltametrické techniky

☑ Počítačem řízený potenciostat

- Eco-Tribo Polarograph (Polaro-Sensors, ČR)
- PolarPro 5.1 software (Polaro-Sensors, ČR)

☑ Tříelektroodový systém

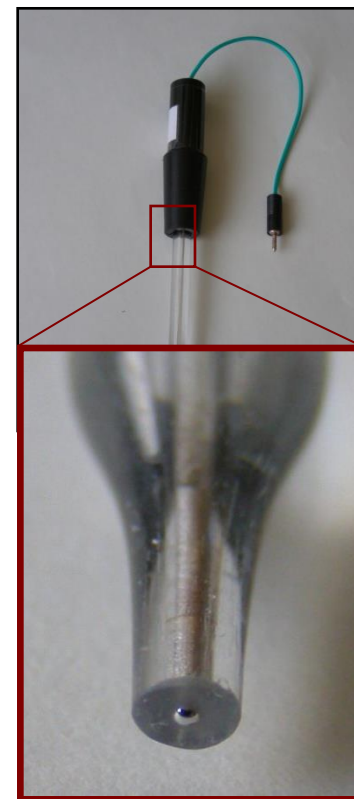
- argentchloridová (3M KCl) referentní elektroda
- platinová drátková pomocná elektroda
- pracovní elektroda - **meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda (m-AgSAE)**

☑ Voltametrické techniky

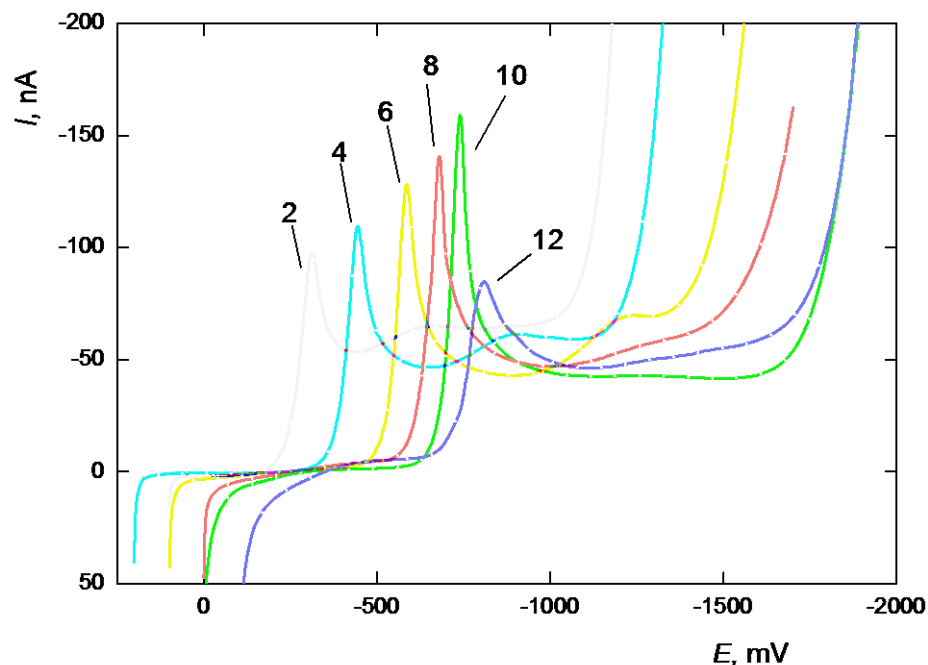
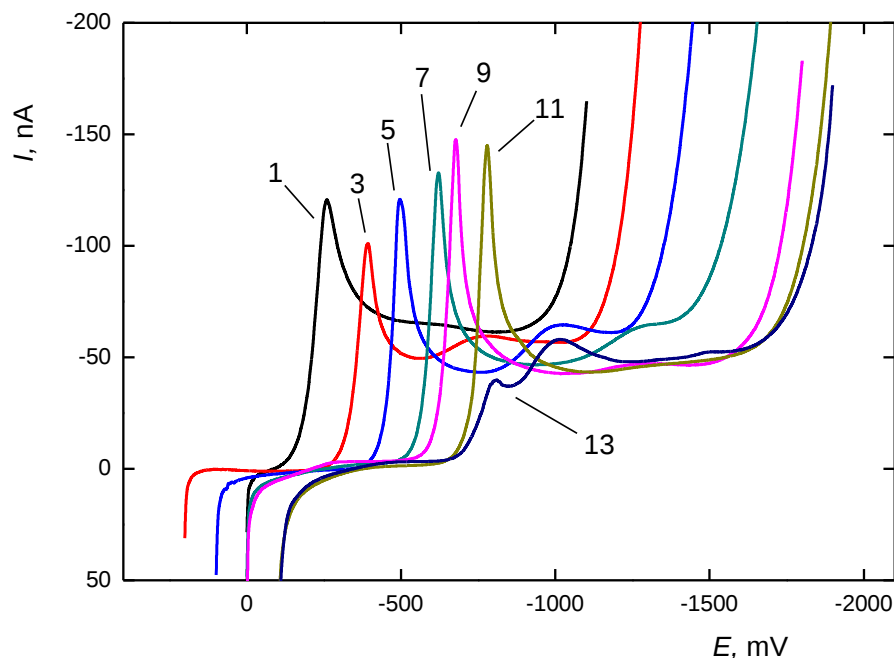
- DC voltametrie (**DCV**) na m-AgSAE
- diferenční pulsní voltametrie (**DPV**) na m-AgSAE

☑ Prostředí základního elektrolytu

- methanol - Brittonův-Robinsonův pufr (objemový poměr 1:1)

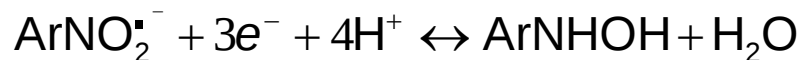
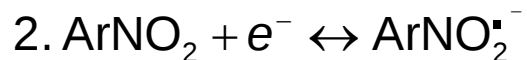
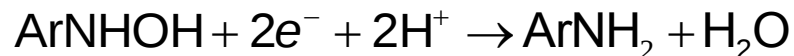
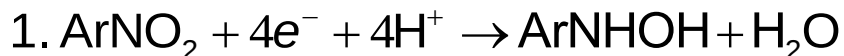


DC voltametrie – vliv pH

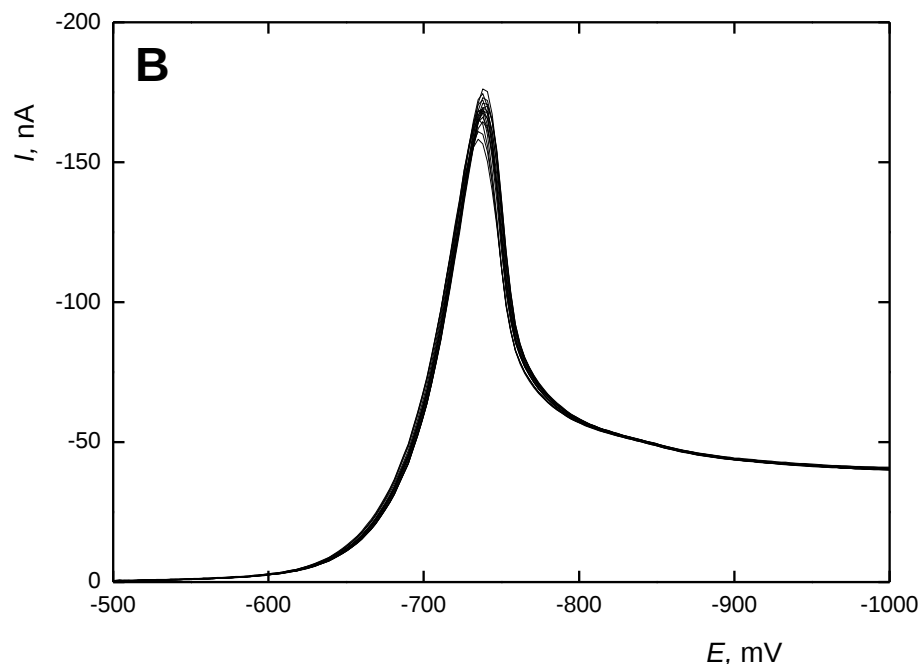
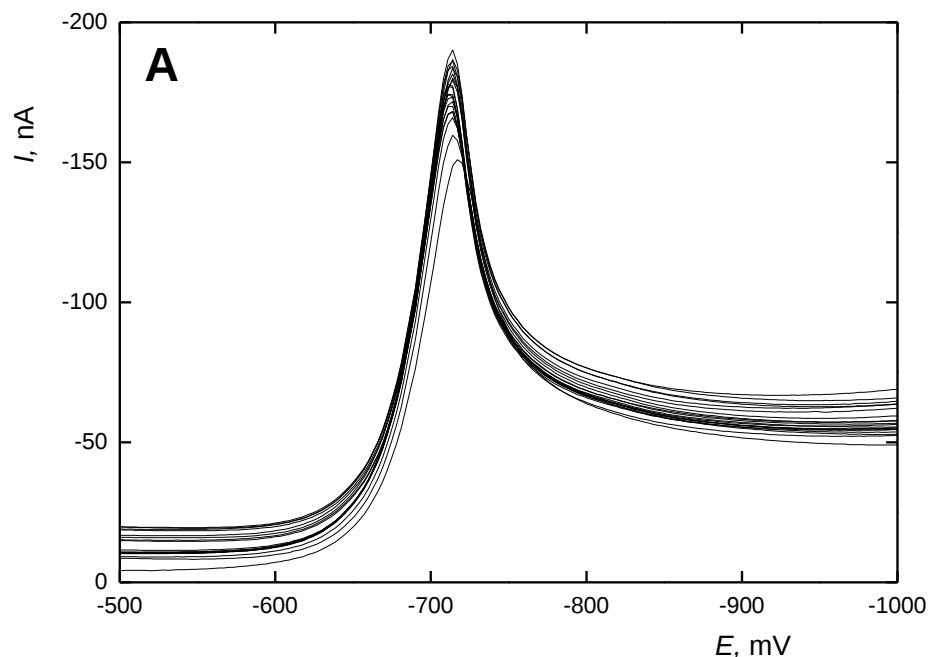


DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno v prostředí methanol – BR pufr (či $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ pro pH 1 a $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ pro pH 13) o příslušném pH (1:1).

☑ Mechanismus elektrochemické redukce



DC voltametrie – regenerace / opakovatelnost



DC voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno v prostředí methanol – BR pufr 10 (1:1), počet měření = 20.

☑ Regenerace povrchu elektrody

A – bez regeneračního kroku, B – regenerace ($E_{in} = -200 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$)

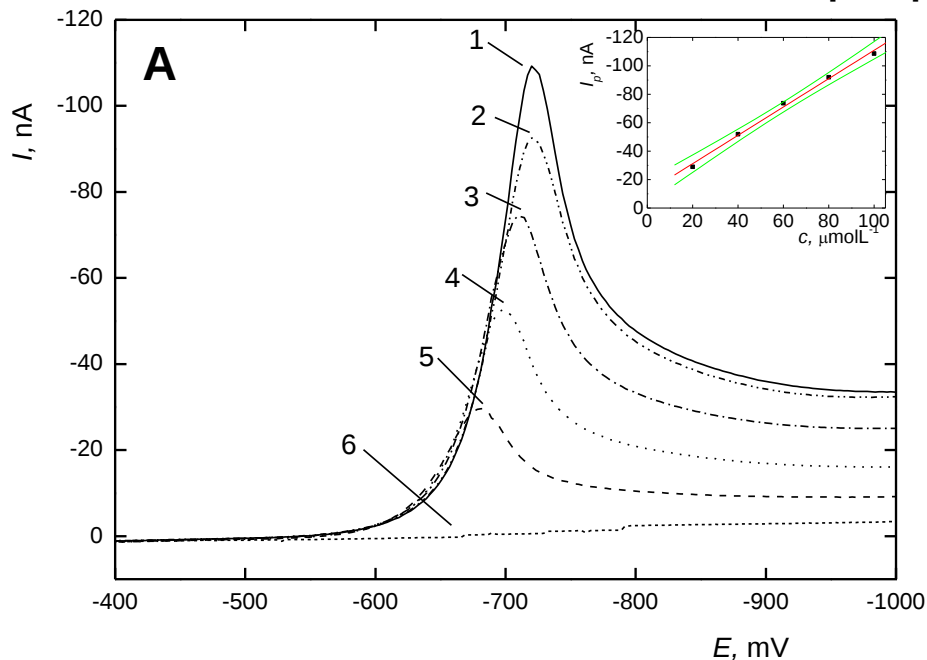
☑ Opakovatelnost měření v rámci jednoho vzorku po regeneraci

1,32% ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$),

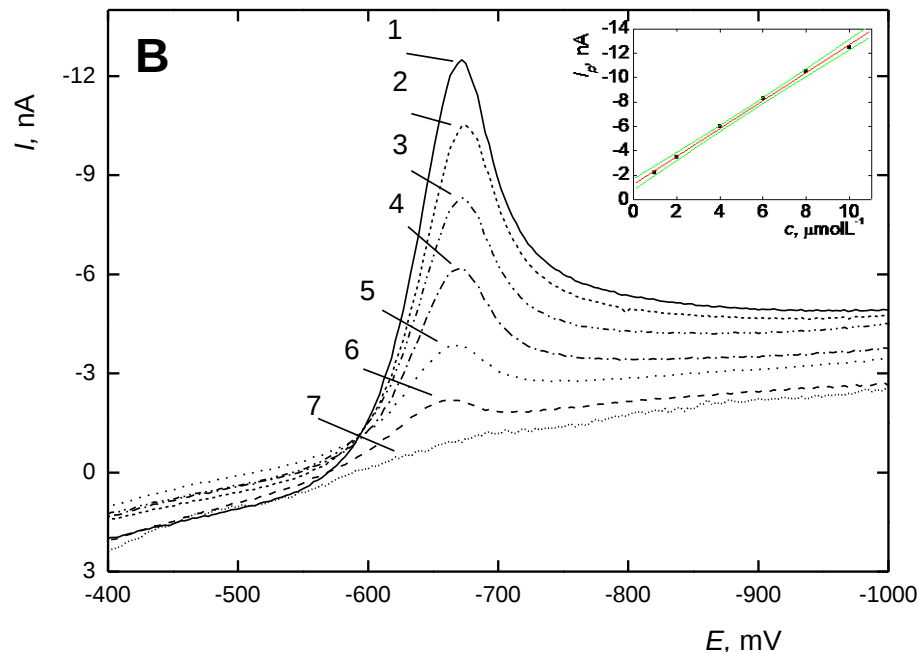
6,88% ($c = 1 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)

DC voltametrie – kalibrační závislosti

DC voltamogramy 2-nitrofluorenu na m-AgSAE, $c = (1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-4}) \text{ mol L}^{-1}$.
Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 10 (1:1); $E_{in} = -200 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$.



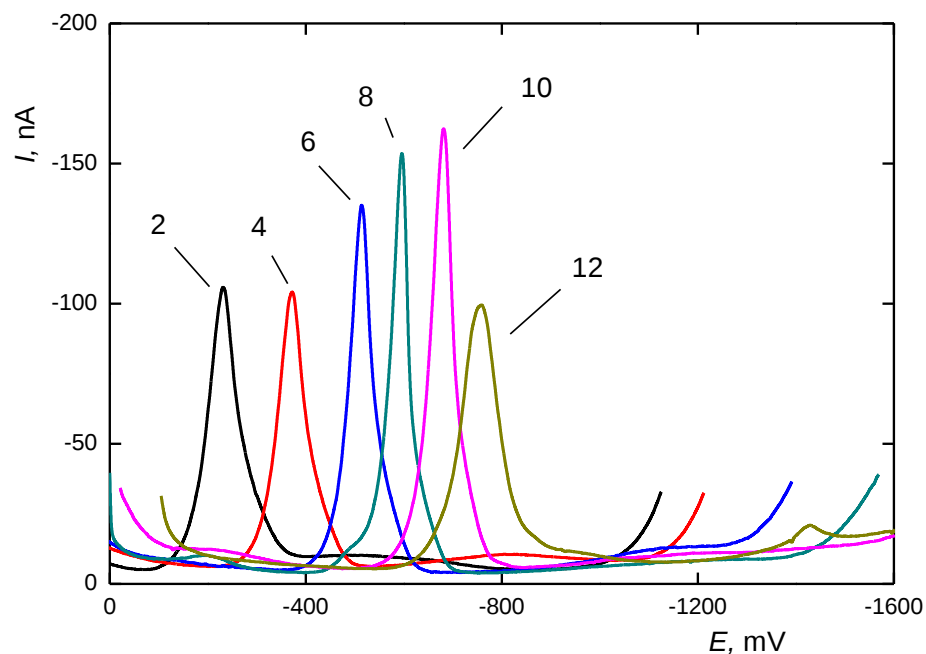
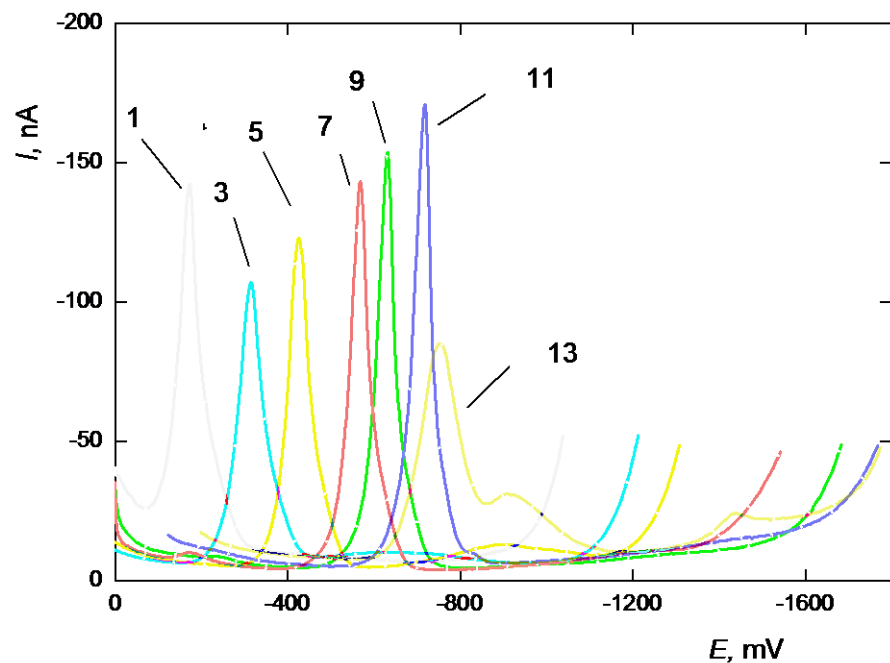
c (2-nitrofluoren) = $1 \cdot 10^{-4}$ (1), $8 \cdot 10^{-5}$ (2), $6 \cdot 10^{-5}$ (3), $4 \cdot 10^{-5}$ (4), $2 \cdot 10^{-5}$ (5) mol L^{-1} a ZE (6).



c (2-nitrofluoren) = $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5), $1 \cdot 10^{-6}$ (6) mol L^{-1} a ZE (7).

$c [\text{mol L}^{-1}]$	směrnice [mA L mol^{-1}]	úsek [nA]	R	$L_Q [\text{mol L}^{-1}]$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-0,99	-11,9	-0,9977	—
$(1 - 10) \cdot 10^{-6}$	-1,15	-1,2	-0,9989	$1,33 \cdot 10^{-6}$

DP voltametrie – vliv pH

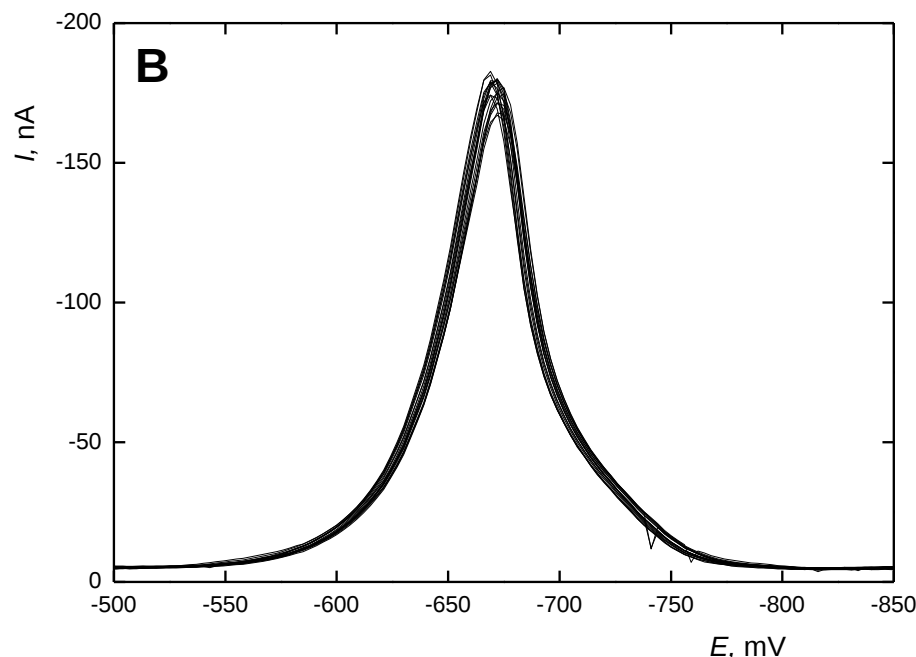
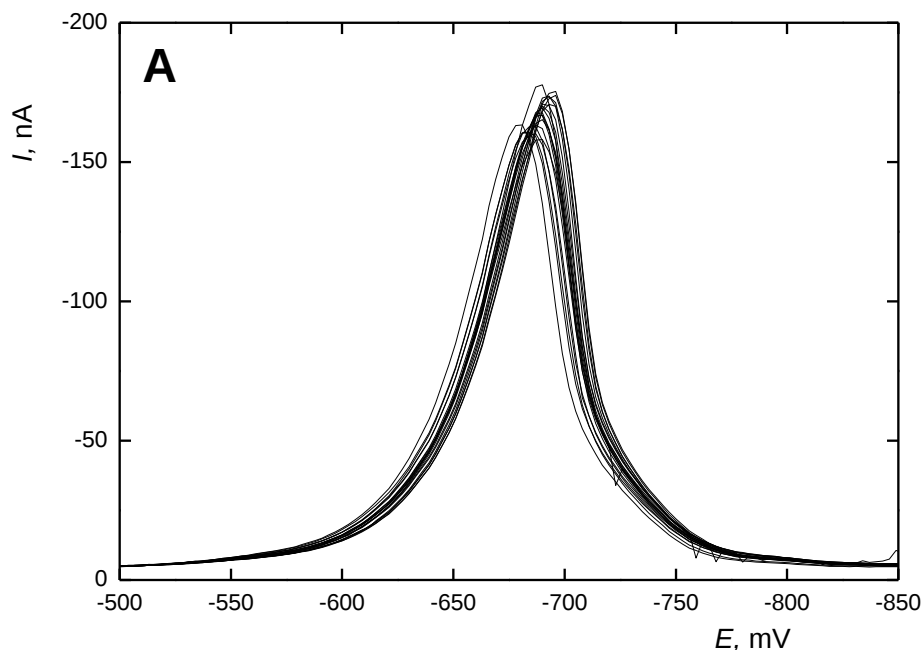


DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno v prostředí methanol – BR pufr (či $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl}$ pro pH 1 a $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$ pro pH 13) o příslušném pH (1:1).

☒ **Optimální prostředí pro stanovení 2-nitrofluorenu**

- methanol – BR pufr pH 10 (1:1)

DP voltametrie – regenerace / opakovatelnost



DP voltamogramy 2-nitrofluorenu ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Měřeno v prostředí methanol – BR pufr 10 (1:1), počet měření = 20.

☒ Regenerace povrchu elektrody

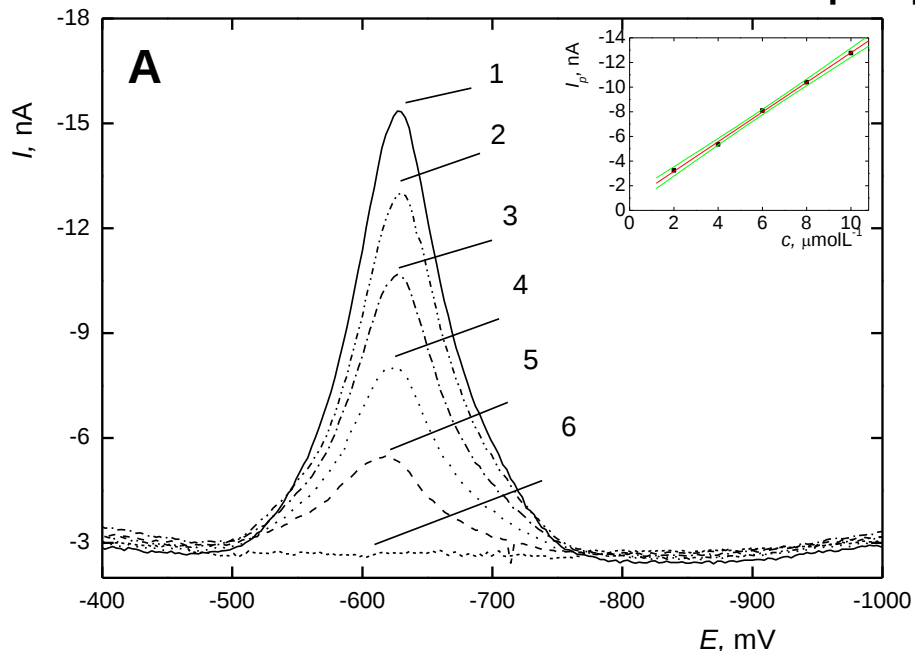
A – bez regeneračního kroku, B – regenerace ($E_{in} = -200 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$)

☒ Opakovatelnost měření v rámci jednoho vzorku po regeneraci

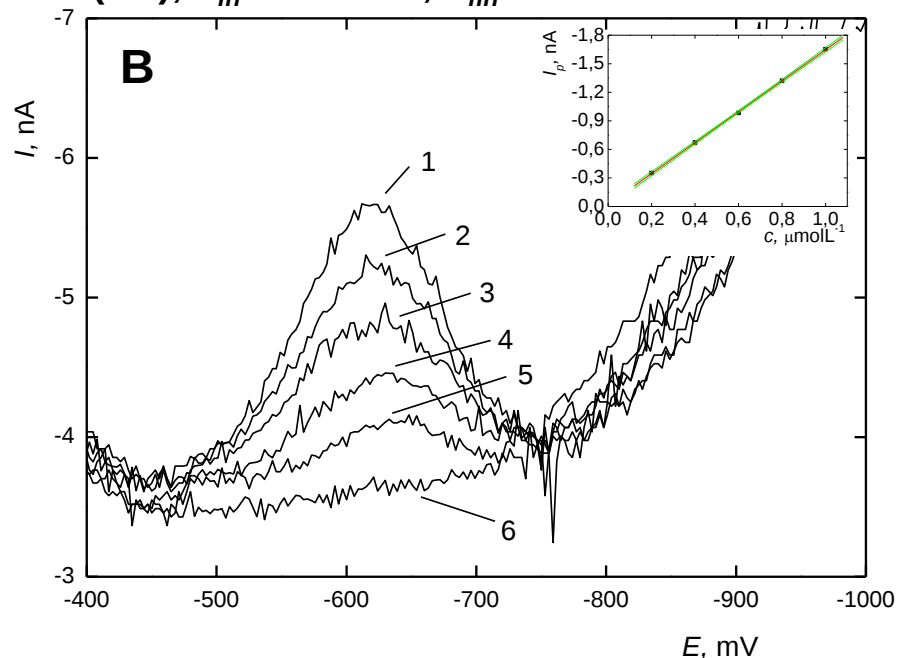
0,96 % ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), **3,15 %** ($c = 1 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$)

DP voltametrie – kalibrační závislosti

DP voltamogramy 2-nitrofluorenu na m-AgSAE, $c = (2 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-5}) \text{ mol L}^{-1}$.
Měřeno v roztoku methanol – BR pufr pH 10 (1:1); $E_{in} = -200 \text{ mV}$, $E_{fin} = -1500 \text{ mV}$.



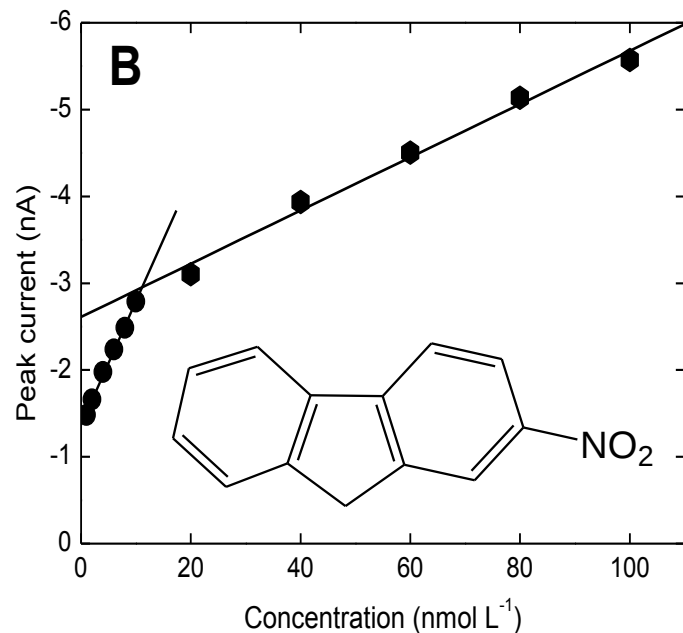
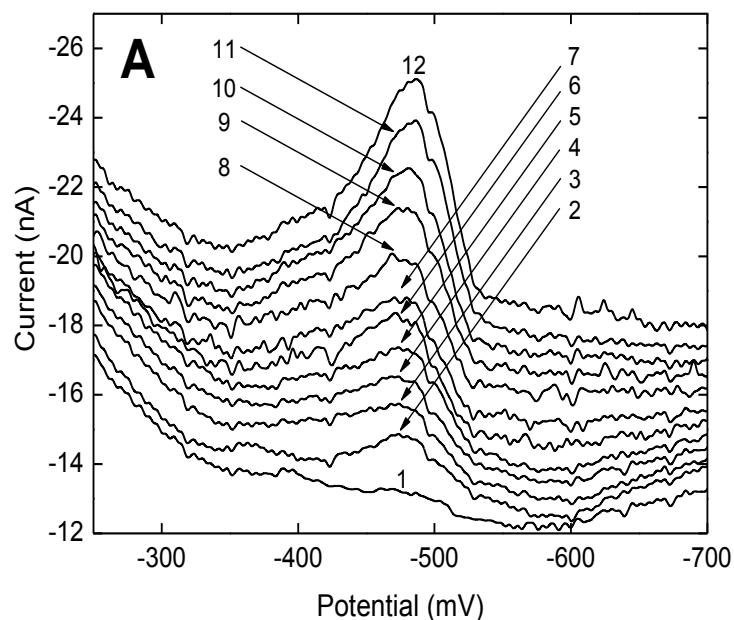
c (2-nitrofluoren) = $1 \cdot 10^{-5}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $6 \cdot 10^{-6}$ (3), $4 \cdot 10^{-6}$ (4), $2 \cdot 10^{-6}$ (5) mol L^{-1} a ZE (6).



c (2-nitrofluoren) = $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4), $2 \cdot 10^{-7}$ (5) mol L^{-1} a ZE (6).

c [mol L^{-1}]	směrnice [mA L mol^{-1}]	úsek [nA]	R	L_Q [mol L^{-1}]
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	-1,08	-10,6	-0,9980	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	-1,20	-0,7	-0,9994	—
$(1 - 10) \cdot 10^{-7}$	-1,63	-0,02	-0,9999	$1,13 \cdot 10^{-7}$

AdSDP voltametrie – kalibrační závislosti



2-Nitrofluoren (v prostředí $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1} \text{ LiOH}$ – methanol, 9:1)

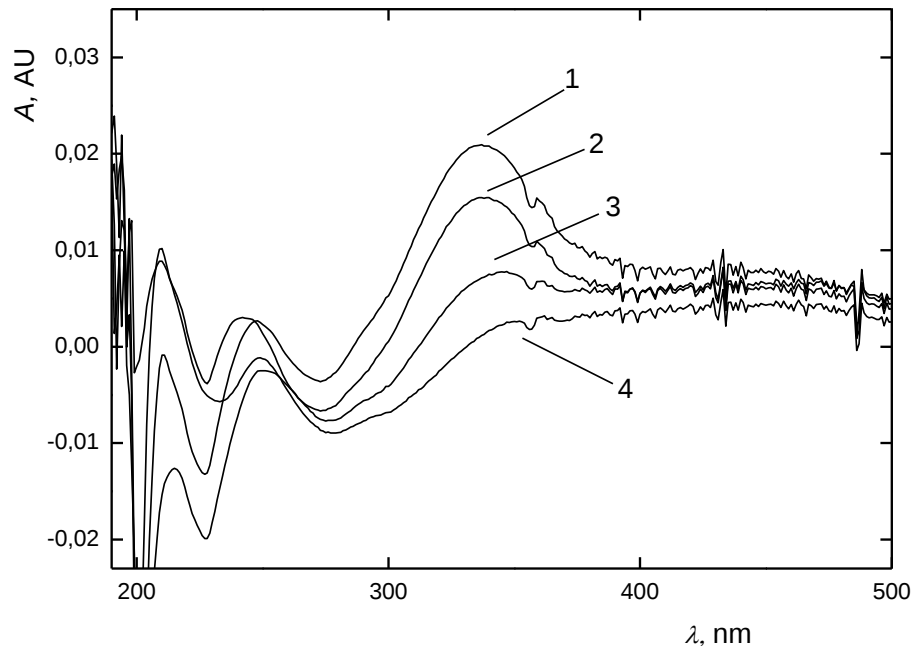
AdSDPV na m-AgSAE ($E_{\text{acc}} -200 \text{ mV}$, $t_{\text{acc}} 60 \text{ s}$)

1 – 100 nmol L⁻¹

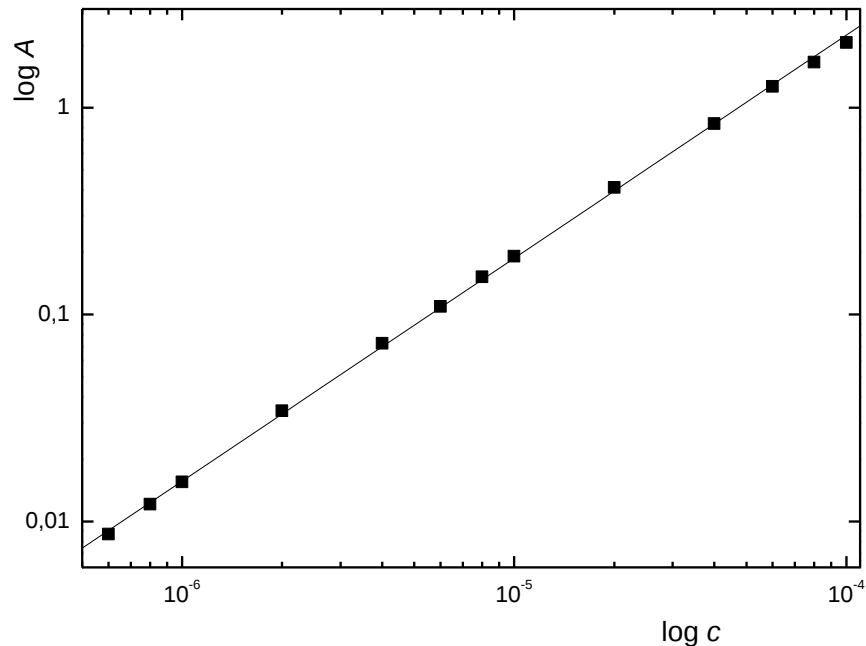
$L_Q \sim 2 \text{ nmol L}^{-1}$

($L_Q \sim 3 \text{ nmol L}^{-1}$ pro AdSDPV na HMDE)

UV stanovení 2-nitrofluorenu



UV spektrofotometrická spektra 2-nitrofluorenu v methanolu. c (2-nitrofluoren) = $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-7}$ (2), $6 \cdot 10^{-7}$ (3), $4 \cdot 10^{-7}$ (4) mol L^{-1} .



Logaritmická závislost absorbance 2-nitrofluorenu na jeho koncentraci v celém studovaném koncentračním rozmezí ($4 \cdot 10^{-7} - 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) UV spektrometrického stanovení 2-nitrofluorenu v methanolu.

$c [\text{mol L}^{-1}]$	směrnice [AU L mol ⁻¹]	úsek [AU]	R	$L_Q [\text{mol L}^{-1}]$
$(2 - 10) \cdot 10^{-5}$	20,65	0,010	0,9980	—
$(2 - 10) \cdot 10^{-6}$	21,68	-0,014	0,9994	—
$(4 - 10) \cdot 10^{-7}$	24,68	0,006	0,9999	$5,11 \cdot 10^{-7}$

Přehled a srovnání

☑ Byly vypracovány metody stanovení 2-nitrofluorenu na m-AgSAE

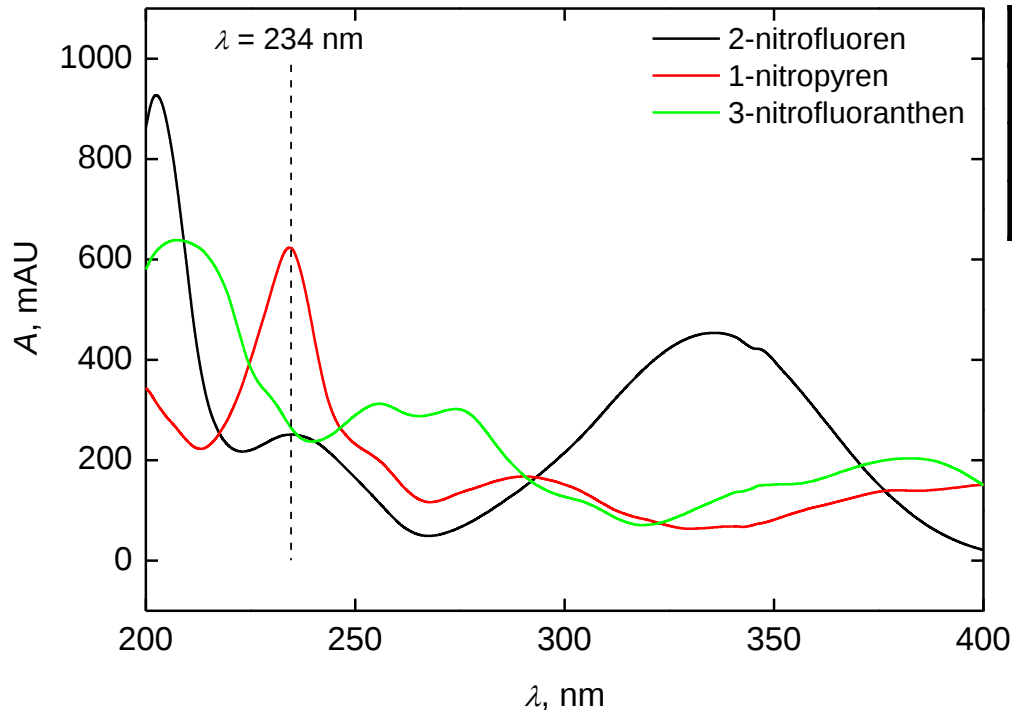
- DC voltametrie na m-AgSAE
- diferenční pulsní voltametrie na m-AgSAE

☑ Porovnání dosažených výsledků s alternativními metodami stanovení 2-nitrofluorenu

technika	elektroda	prostředí	L_Q [mol L ⁻¹]
DCV	m-AgSAE	methanol – BR pufr pH 10 (1:1)	$1 \cdot 10^{-6}$
DPV		methanol – BR pufr pH 10 (1:1)	$1 \cdot 10^{-7}$
AdSDPV ^a		methanol – 1×10^{-4} mol L ⁻¹ LiOH (1:9)	$2 \cdot 10^{-9}$
DCTP	DME	methanol – BR pufr pH 12 (1:1)	$4 \cdot 10^{-6}$
DPP		methanol – BR pufr pH 12 (1:1)	$4 \cdot 10^{-7}$
DPV	HMDE	methanol – BR pufr pH 12 (1:9)	$4 \cdot 10^{-8}$
AdSV ^b		methanol – BR pufr pH 12 (1:9)	$3 \cdot 10^{-9}$
UV spektrofotometrie	—	methanol	$5 \cdot 10^{-7}$

^a – $t_{acc} = 60$ s, $E_{acc} = -200$ mV, ^b – $t_{acc} = 600$ s, $E_{acc} = -300$ mV

HPLC separace



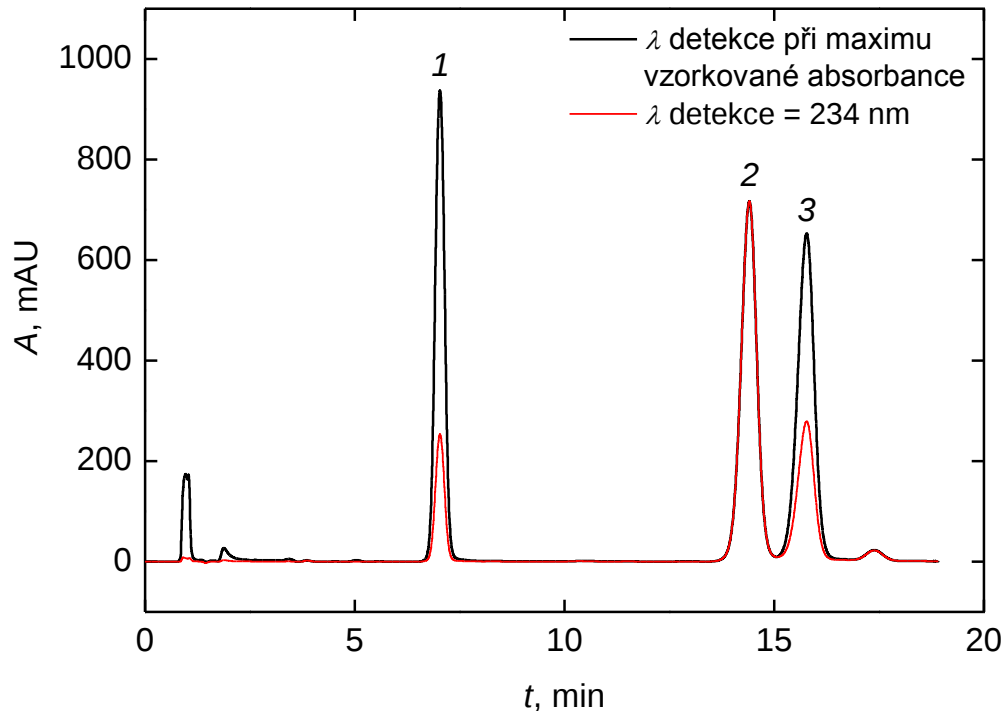
pík	látka	c, mol L ⁻¹	t _R , min
1	2-nitrofluoren	3·10 ⁻⁴	7,0
2	1-nitropyren	3·10 ⁻⁴	14,4
3	3-nitrofluoranthen	3·10 ⁻⁴	15,8

UV absorpční spektra 2-nitrofluorenu, 1-nitropyrenu a 3-nitrofluoranthenu.

☑ Další možné inovace

- konstrukce robustního elektrochemického detektoru na bázi AgSAE, schopného konkurovat citlivostí UV/VIS detektoru
- vypracování metody HPLC separace směsi 2-nitrofluorenu, 1-nitropyrenu a 3-nitrofluoranthenu s EC detekcí na bázi AgSAE
- vypracování metody HPLC separace směsi dalších nitroderivátů fluorenu (-onu) (např. 2,7-dinitrofluoren, 2-nitro-9-fluorenol) s EC detekcí na bázi AgSAE

HPLC separace



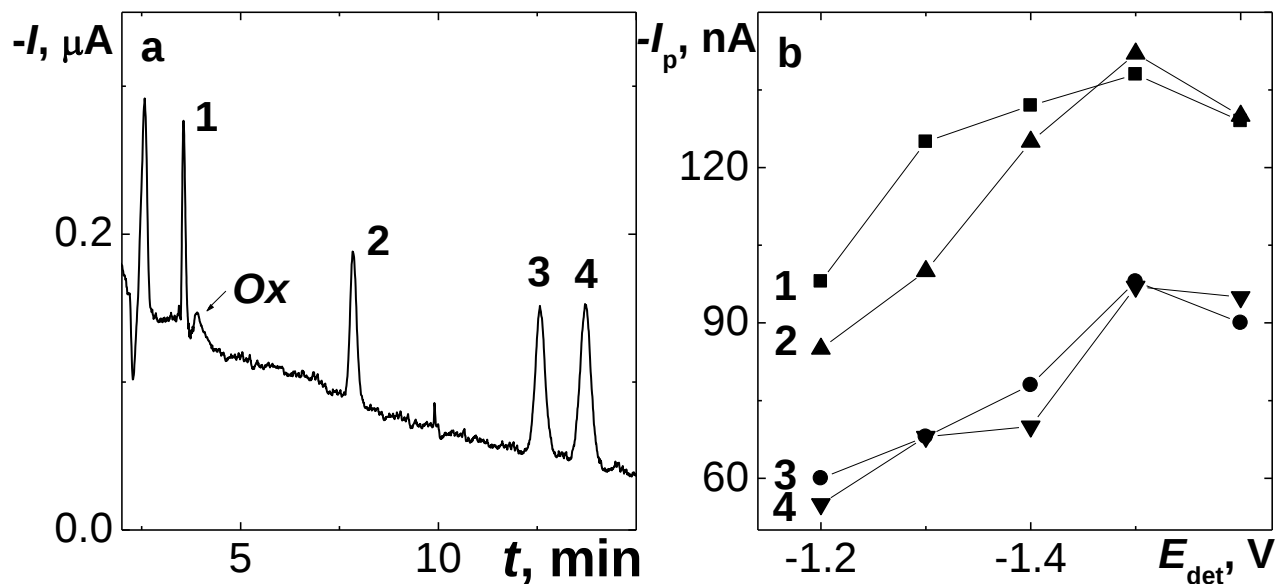
pík	látko	c, mol L ⁻¹	t_R , min
1	2-nitrofluoren	$3 \cdot 10^{-4}$	7,0
2	1-nitropyren	$3 \cdot 10^{-4}$	14,4
3	3-nitrofluoranthenu	$3 \cdot 10^{-4}$	15,8

Chromatogramy 2-nitrofluorenu (1), 1-nitropyrenu (2) a 3-nitrofluoranthenu (3); HPLC s UV/VIS “diode-array” detekcí, kolona RP C-18, mobilní fáze methanol – fosforečnanový pufr pH 7 (70:30).

☑ Další možné inovace

- konstrukce robustního elektrochemického detektoru na bázi AgSAE, schopného konkurovat citlivostí UV/VIS detektoru
- vypracování metody HPLC separace směsi 2-nitrofluorenu, 1-nitropyrenu a 3-nitrofluoranthenu s EC detekcí na bázi AgSAE
- vypracování metody HPLC separace směsi dalších nitroderivátů fluorenu (-onu) (např. 2,7-dinitrofluoren, 2-nitro-9-fluorenol) s EC detekcí na bázi AgSAE

HPLC separace s ED



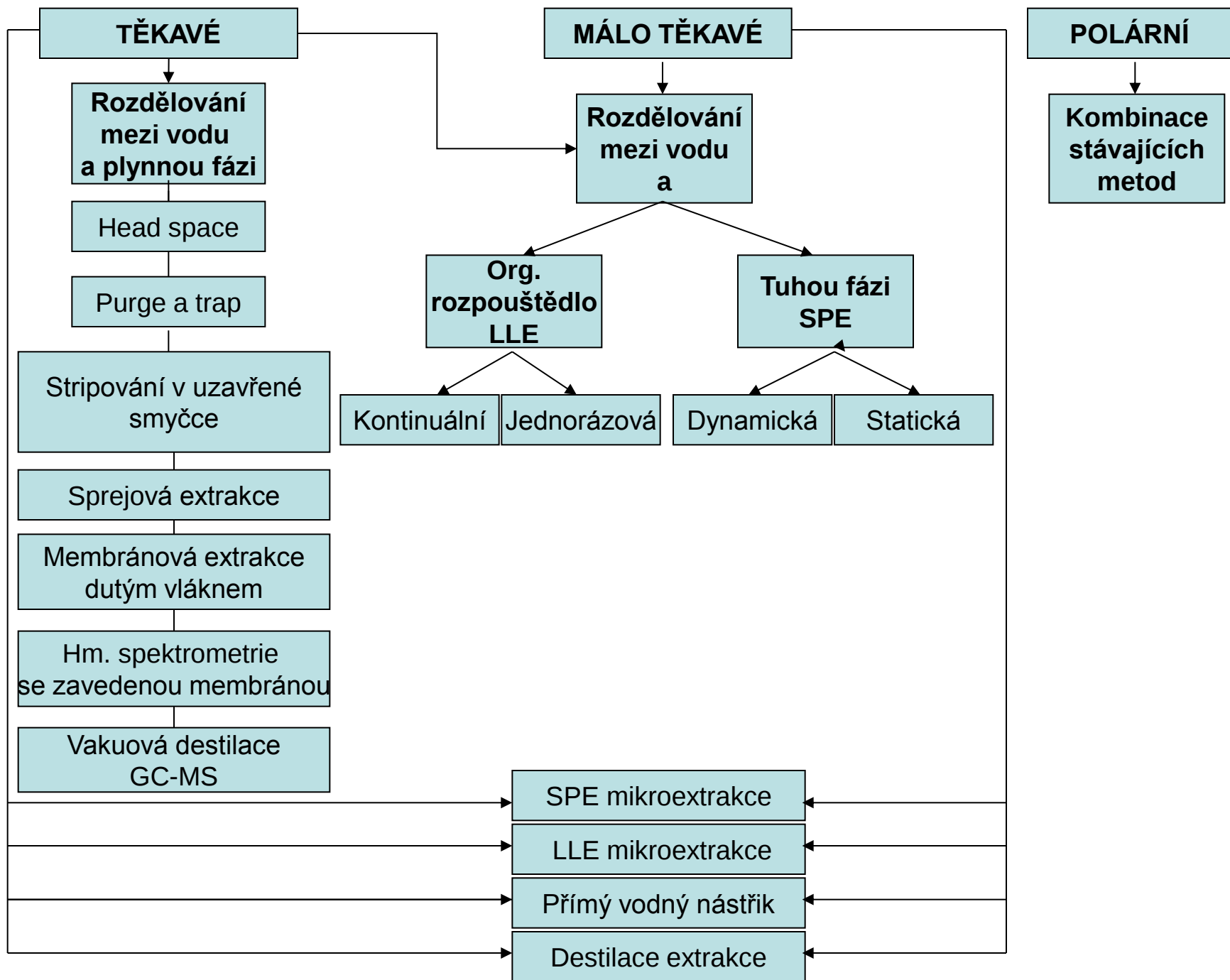
- (a) Chromatogram směsi 5-NQ (1), 2-NF (2), 1-NP (3) a 3-NFt (4) zaznamenaný pomocí HPLC-ED s „wall-jet“ detektorem (s pracovní elektrodou m-AgSAE) pro koncentraci $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ v pitné vodě po SPE; potenciál detekce -1.5 V ; Ox – pík kyslíku.
- (b) Závislost výšek píků I_p na potenciálu detekce E_{det} 5-NQ (1), 2-NF (2), 1-NP (3) a 3-NFt (4). Koncentrace všech analytů $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Pro (a) a (b): mobilní fáze 0.01 mol L^{-1} fosfátový pufr pH 7.0 : methanol (15:85; v/v), $F_m = 1 \text{ mL min}^{-1}$, $V_{\text{inj}} = 20 \mu\text{L}$.

HPLC separace – ED vs UV

	Analyt	Lineární dynamický rozsah [μmol L ⁻¹]	Směrnice	Úsek	Korelační koeficient	L _D [μmol L ⁻¹]
A) Optimalizované podmínky v deionizované vodě						
ED	5-NQ	10-75	-1,28	-0,6	-0,9972	8,9
	2-NF	25-100	-1,45	-2,1	-0,9798	7,8
	1-NP	25-100	-0,91	-15,5	-0,9935	12,5
	3-NFt	25-100	-1,00	1,0	-0,9985	11,4
UV	5-NQ	1-100	0,502	-0,12	0,9999	1,6
	2-NF	1-100	0,423	-0,19	0,9998	1,9
	1-NP	1-100	0,882	-0,39	0,9999	0,9
	3-NFt	1-100	0,943	-0,12	0,9999	0,8
B) Stanovení v pitné vodě po SPE						
ED	5-NQ	0,5-5	-25,9	2,3	-0,9997	0,66
	2-NF	2-10	-20,7	-13,0	-0,9957	0,83
	1-NP	2-10	-20,3	-15,2	-0,9823	0,84
	3-NFt	2-10	-16,0	7,8	-0,9766	1,1
UV	5-NQ	0,5-10	10,2	-4,0	0,9829	0,38
	2-NF	0,5-10	8,0	-4,2	0,9937	0,50
	1-NP	0,5-10	16,0	-3,1	0,9940	0,24
	3-NFt	0,5-10	21,2	-5,0	0,9882	0,18

Prekoncentrace organických látek



KAPALINOVÁ EXTRAKCE

(liquid-liquid extraction – LLE)

$$D_c = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

$$E = \frac{m_{org}}{m_{aq}} = \frac{D_c}{D_c + \frac{V_{aq}}{V_{org}}}$$

Procentuální výtěžek jednostupňové extrakce, $E[\%]$, udává, jaký procentuální podíl látky x je možno vyextrahovat z vodné do organické fáze: $E[\%] = E \cdot 100$ tj:

$$E (\%) = \frac{100 \cdot D_{c,x}}{D_{c,x} + \frac{V_{aq.}}{V_{org.}}}$$

Procentuální výtěžek n -krát opakované extrakce, $E_n[\%]$:

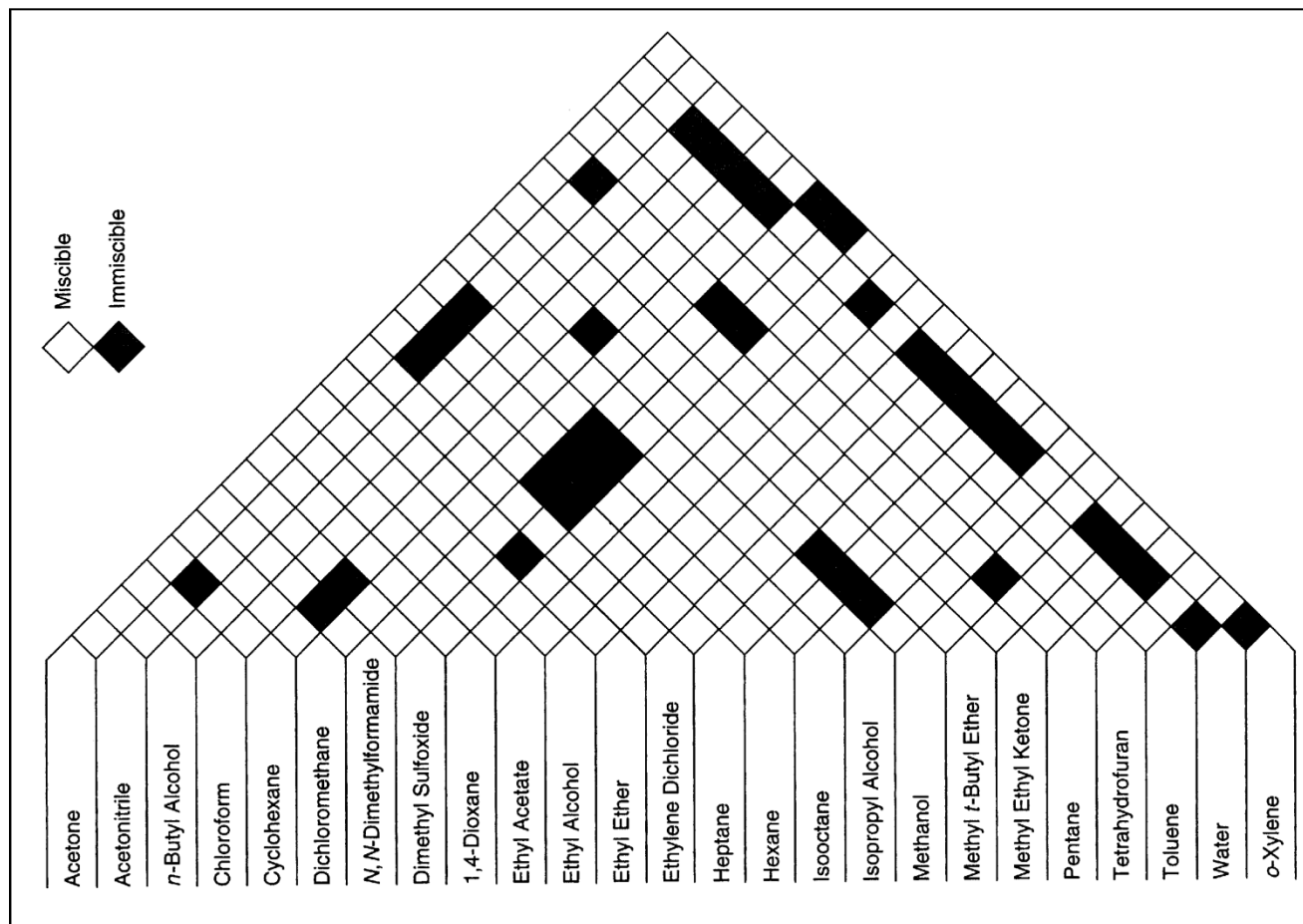
$$E_n (\%) = 100 \left[1 - \left(\frac{100 - E}{100} \right)^n \right]$$

kde E je výtěžek jednostupňové extrakce pro dané fáze a hodnotu β .

Počet extrakcí, n , nutných k dosažení výsledné extrakční účinnosti E_n

$$n = \frac{\log \left(\frac{100 - E_n}{100} \right)}{\log \left(\frac{100 - E}{100} \right)}$$

Mísitelnost rozpouštědel



mísitelné = dvě rozpouštědla mohou být smíchána ve **všech** možných objemových poměrech bez vytvoření dvou fází

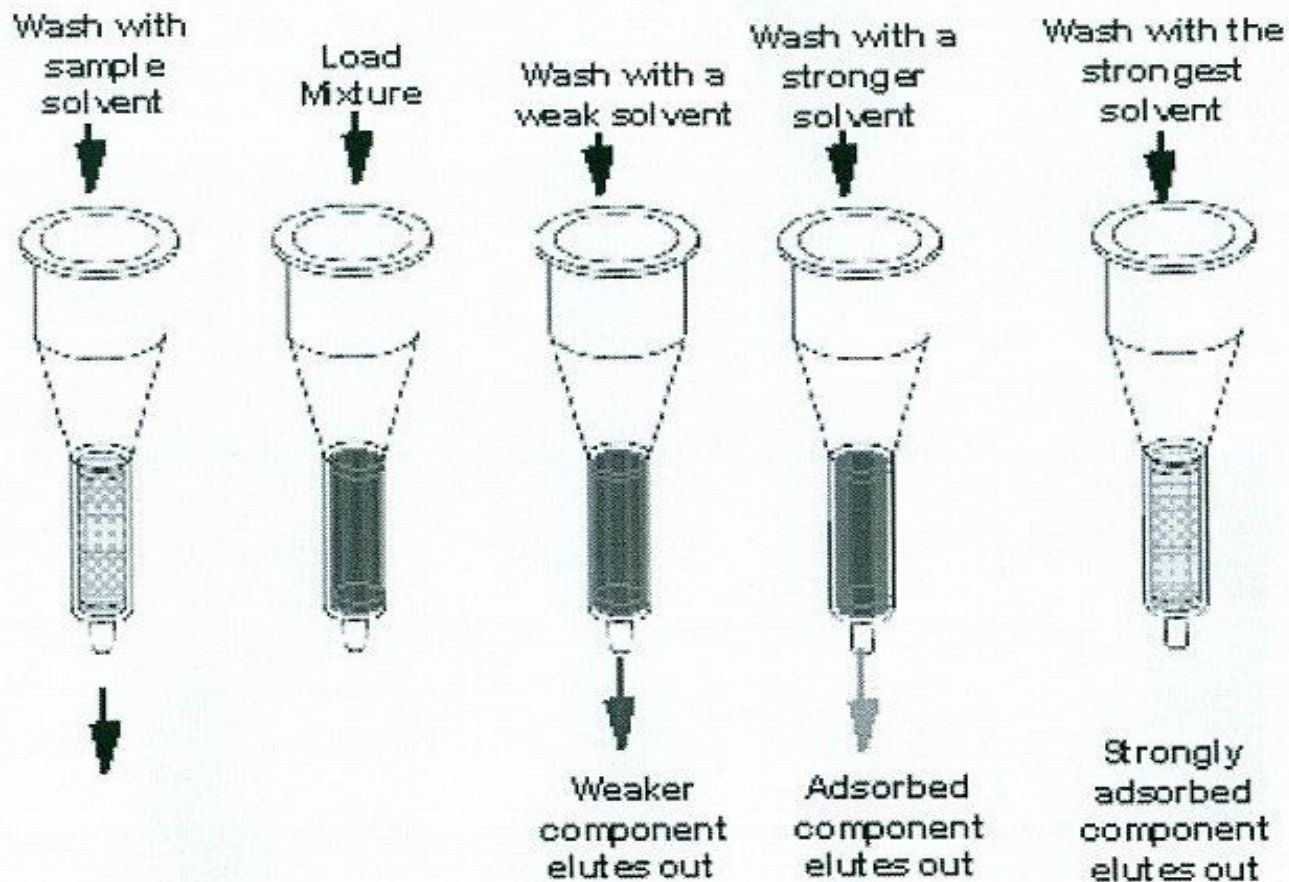
EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI **(solid phase extraction – SPE)**

HLAVNÍ KROKY

- **Aktivace sorbentu (methanol)**
- **Destilovaná voda**
- **Vzorkování**
- **Sušení?!**
- **Čištění extraktu – eluce slabším rozpouštědlem**
- **Eluce analytu methanolem**
- **Instrumentální koncovka**

EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI

General Elution



Extrakce na tuhou fázi

Separace analytů:

- eluce může být provedena v několika různých krocích = separace analytů do skupin, např. aromatické a alifatické sloučeniny

Jednoduché čištění:

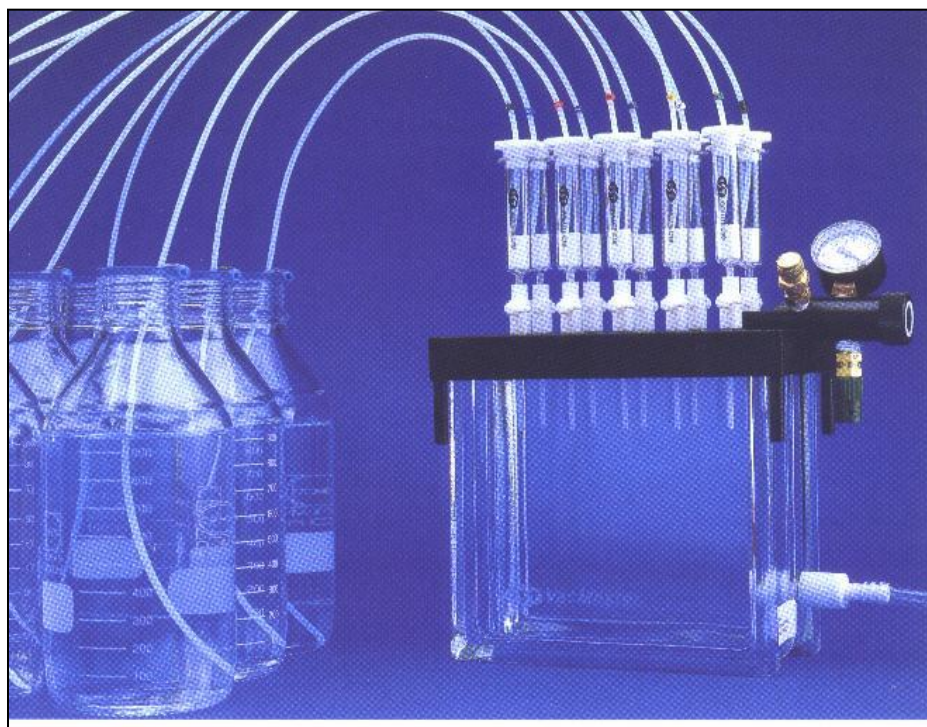
- pouze interferenty jsou zachycovány a analyty procházejí nezměněné

Výměna rozpouštědla:

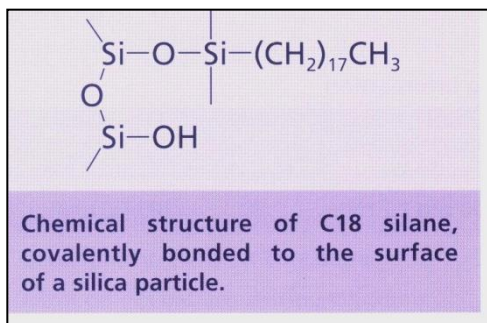
- voda může být ze vzorku vyextrahována a eluce provedena methanolem

Prekoncentrace analytů:

- 1000 ml může být extrahováno a eluce může být provedena 1 ml = 1000-násobná prekoncentrace



Tuhé fáze pro SPE



Většina materiálů jsou fáze kovalentně navázané na hrubě porézní částice křemenu (o.d. $\approx 50 \mu\text{m}$, povrch $500 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$)

Nepolární sorbenty (reversní fáze):

- C18 – C8 – C6 – C4 – C2
- cyklohexyl
- fenyl
- kyanoprolyl

Polární sorbenty (normální fáze):

- kyanopropyl
- čistý křemen
- diol
- aminoalkyl

Iontově výměnné sorbenty:

- SAX (Strong Anion eXchanger)
- SCX (Strong Cation eXchanger)
- slabé anionto- a kationtoměniče

„Endcapped“ sorbenty:

- dostupné –SiOH jsou pokryté trimethylsilanem
- méně polární a s menším všeobecným použitím

Zpracování dat

Terminologie

Analytický systém: Zahrnuje analytickou techniku, charakterizaci metody a analytického postupu a podrobný popis postupu, tzv.návod. Patří sem nejen metodika vzorkování, ale i postupy vyhodnocování analytických výsledků.

Analytická technika: zahrnuje vědecký princip, který byl zvolen jako nejvhodnější pro získání informace o složení vzorku. Jako příklad – voltametrie. Každá analytická technika je založena na určitých přírodních zákonitostech a na empirické zkušenosti generací analytiků.

Analytická metoda: je konkrétní adaptace analytické techniky pro určitý účel. Např. stanovení NPAH metodou voltametrické analýzy je příkladem analytické metody. V literatuře i v analytické praxi existuje řada elektroanalytických stanovení NPAH. Je však na analytikovi, aby zvolil metodu optimální.

Analytický postup: se skládá z písemných pokynů, jak použít analytickou metodu. Většina norem představuje příklady analytických postupů. Analytický postup zahrnuje i použití analytické metody na konkrétní matici.

Např. stanovení NPAH metodou voltametrie na m-AgSAE v říční vodě podle normy ČSN je příkladem konkrétního analytického postupu.

Metrologická terminologie

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 (Repeatibility): Přesnost za podmínek opakovatelnosti. Vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu, provedených stejnou metodou, stejným pracovníkem, na stejné přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku.

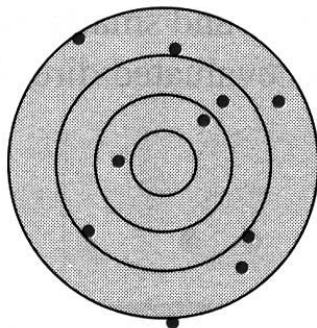
Reprodukovatelnost (Reproducibility): Přesnost za podmínek reprodukovatelnosti. Vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky měření stejného analytu ve vzorcích stejného materiálu, kdy jsou jednotlivá měření prováděna za různých podmínek (pracovník, přístroj, místo, podmínky, čas, avšak stejná metoda).

Správnost (Accuracy): Těsnost souhlasu mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou (konvenční skutečnou hodnotou) měřené veličiny. Správnost kombinuje přesnost a pravdivost, tj. vlivy náhodných a systematických faktorů. Za předpokladu, že výsledky použité metody vykazují nulovou nebo malou chybu, správnost se rovná přesnosti. Správnost lze zjistit analyzováním vhodného referenčního materiálu.

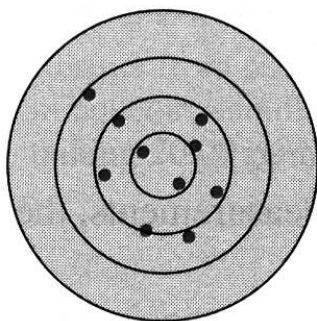
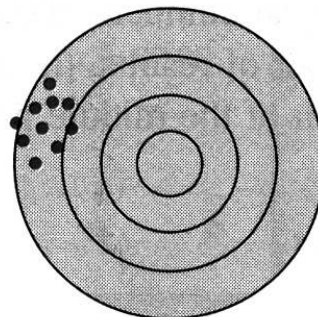
Pravdivost (Trueness): Těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření a dohodnutou referenční hodnotou (skutečnou hodnotou, konvenční skutečnou hodnotou). Pravdivý výsledek je zatížen nulovou systematickou chybou. Míra pravdivosti je odchylka. Průměrnou hodnotou je v definici myšlena střední hodnota základního (statistického) souboru.

Přesnost a správnost:

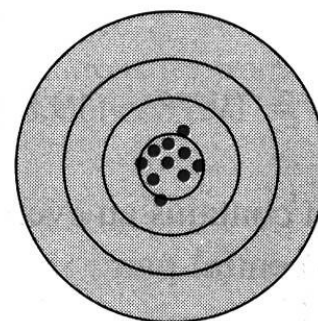
Nepřesné a nesprávné



Přesné, ale nesprávné



Nepřesné, ale správné



Přesné a správné

Citlivost (Sensitivity): Podíl změny odezvy měřicího zařízení a odpovídající změny podnětu. Citlivost analytické metody je rovna směrnici kalibrační závislosti. Není-li kalibrační závislost lineární, mění se citlivost s koncentrací analytu. Je-li citlivost závislá na matrici, nepostačuje kalibrace na čisté látky.

Citlivost: příklad:

Dvoubodovou kalibrací stanovení olova ve vodě metodou DPP byl pro koncentraci 12,5 mg/l naměřen signál 15,4 jednotek, pro 23,5 mg/l signál 19,5 jednotek. Směrnice z těchto dvou bodů

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} = \frac{19,5 - 15,4}{23,5 - 12,5} = 0,373 \frac{\text{jednotek}}{\text{mg / l}}$$

je citlivostí stanovení olova. (Běžně se ale používá vícebodová kalibrace).

Enter

Mez detekce (Limit of detection LOD): Mez detekce daného analytického postupu je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které může být detekováno. Mez detekce závisí na poměru signál/šum. Je stanovována opakovanou analýzou alikvotního podílu slepého pokusu a je to taková koncentrace analytu, jehož odezva je ekvivalentní průměrné odezvě slepého pokusu plus trojnásobek odhadu směrodatné odchylky.

$$LOD = \overline{X}_{sl.} + 3.s_{sl.}$$

↖
Průměrná hodnota
slepého pokusu

↖
Směrodatná odchylka pro
slepý pokus

Mez stanovitelnosti (Limit of determination (quantitation, quantification) LOQ): Mez stanovitelnosti určité metody je 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. Měla by být zjištěna za použití vhodného etalonu či vzorku, tj. obvykle je to nejnižší bod kalibrační křivky (při vyloučení slepého pokusu). Neměla by být stanovována extrapolací.

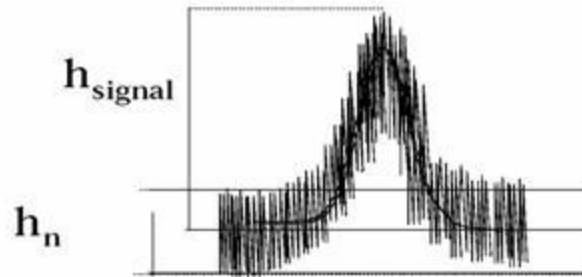
$$LOD = \overline{X}_{sl.} + 10 \cdot s_{sl.}$$

↗
Průměrná hodnota
slepého pokusu

↖
Směrodatná odchylka
pro slepý pokus

Citlivost jako směrnice kalibrační křivky a mez detekce (LOD – limit of detection) a mez stanovitelnosti (LOQ – limit of quantification) spolu úzce souvisí. Podle usance se v elektroanalytických metodách mez detekce vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie. Mezi citlivostí (m) a oběma limity pak můžeme dovodit vztah:

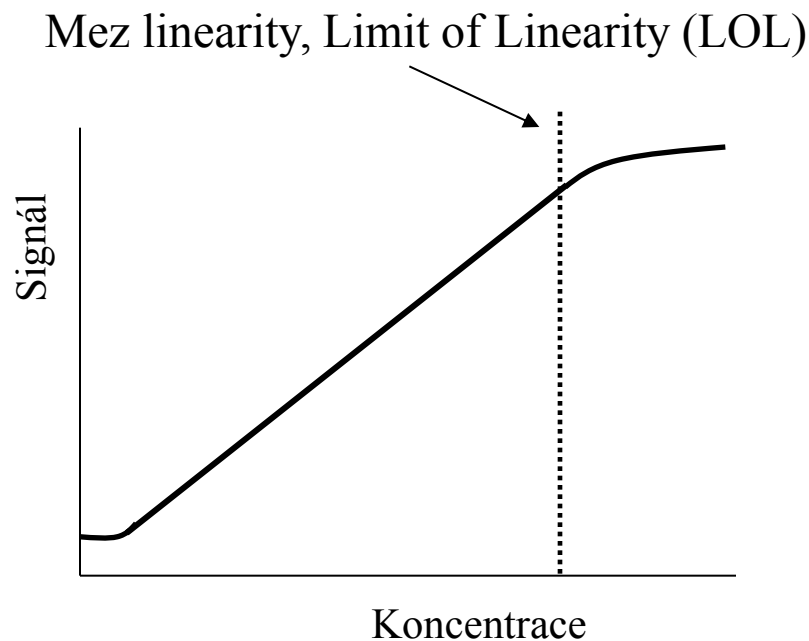
$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m} \qquad LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m}$$



$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m}$$

kde h_n je šum na základní linii a m je směrnice kalibrační křivky. Předpokladem správného výpočtu je, aby šum a výška píku byly ve stejných jednotkách.

Linearita (Linearity, linearity limit): Definuje schopnost metody poskytnout výsledky zkoušky přímo úměrné ke koncentraci analytu. Je zjišťována analýzou vzorků s koncentracemi analytu, které pokrývají deklarovaný rozsah metody. Výsledky jsou použity pro výpočet regresní přímky s použitím metody nejmenších čtverců. Je výhodné, jestliže je metoda lineární v celém rozsahu.



Rozsah (Range, Dynamic range): Rozsah mezi Mezí stanovitelnosti (LOQ) a Mezí linearity (LOL). Je to 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.

Selektivita (Selectivity): Udává rozsah, do kterého může být jednotlivý analyt (skupina analytů) stanoven(a) v komplexní směsi, aniž by došlo k interferenci s ostatními složkami ve směsi. O metodě, která je naprosto selektivní (limitně) pro analyt nebo skupinu analytů, říkáme, že je specifická.

Robustnost (Robustness): Robustnost analytického postupu je mírou jeho kapacity zůstat netečný vůči malým, ale záměrným změnám parametrů metody a poskytuje indikaci o jeho spolehlivosti během obvyklého používání. Robustnost (metody, postupu) je experimentálně zjišťována pomocí záměrného vnášení malých změn do metody a zkoumání jejich důsledků. Robustnost je obvykle zjišťována laboratoří, která metodu zavádí, před tím, než metodu budou používat ostatní laboratoře.