



Κεφάλαιο 5: Διασφάλιση ποιότητας και μέθοδοι βαθμονόμησης

Ενόργανη Χημική Ανάλυση (ΜΠ 212)

Καθ. Έλια Ψυλλάκη

Εργαστήριο Υδατικής Χημείας
Σχολή Χημικών Μηχανικών και
Μηχανικών Περιβάλλοντος
Πολυτεχνείο Κρήτης

Γραφείο διδάσκουσας: Κ1.102

Τηλ: 2821037810

email: epsillakis@tuc.gr

Διασφάλιση ποιότητας και μέθοδοι βαθμονόμησης

Κεφάλαιο 5

Περίγραμμα κεφαλαίου

- 5-1 Οι βάσεις για τη διασφάλιση ποιότητας
- 5-2 Επικύρωση μεθόδου
- 5-3 Μέθοδος γνωστής προσθήκης
- 5-4 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

5-1 Οι βάσεις για τη διασφάλιση ποιότητας

Διασφάλιση ποιότητας

Διασφάλιση ποιότητας είναι η διαδικασία που ακολουθείται ώστε να ληφθούν σωστά αποτελέσματα.

- Η απάντηση πρέπει να έχει επαρκή ακρίβεια και πιστότητα ώστε να μπορεί να στηρίξει τις επακόλουθες αποφάσεις
- Εάν δεν είναι απαραίτητο, δεν συντρέχει λόγος να ξοδεύονται περαιτέρω χρήματα για την εξασφάλιση ενός πιο ακριβούς ή επαναλήψιμου αποτελέσματος.

Κριτήρια για ποιοτικά δεδομένα:

- Λήψη σωστών δεδομένων.
- Σωστή λήψη δεδομένων.
- Σωστή διατήρηση δεδομένων.

(Nancy W. Wentworth, U.S. EPA)

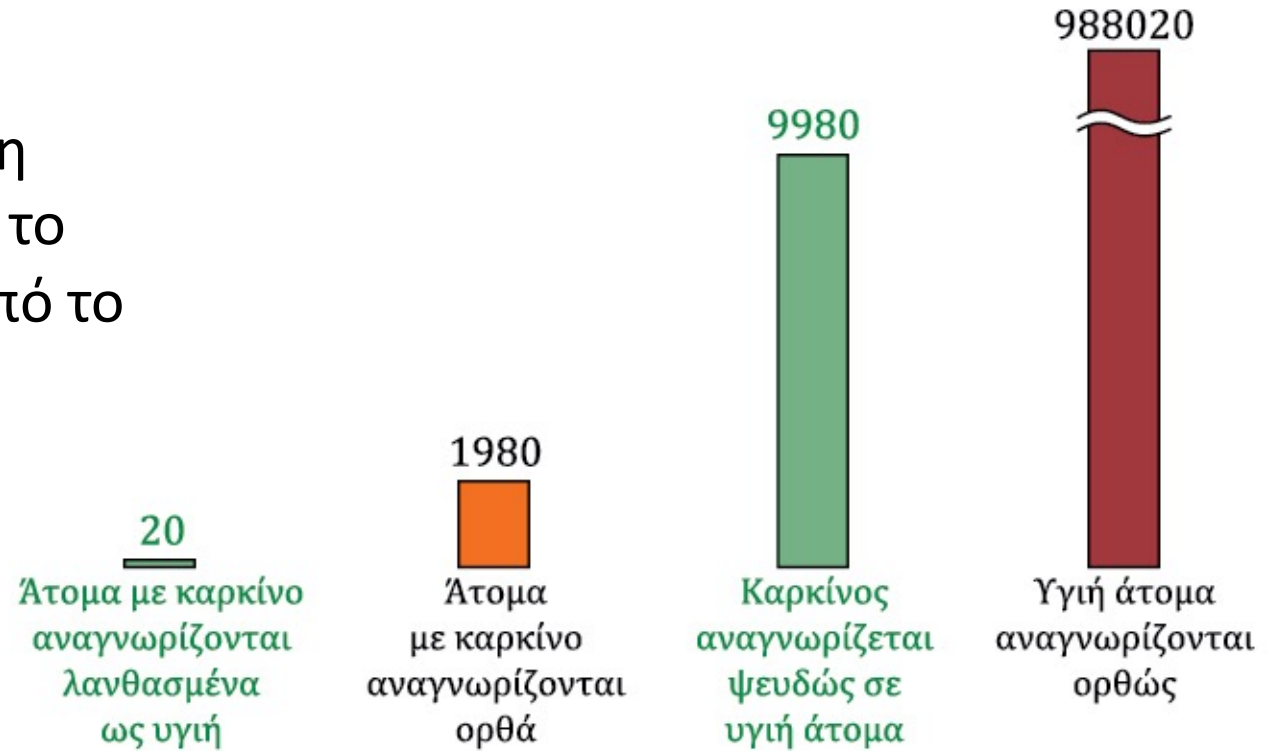


ΠΛΑΙΣΙΟ 5-1 Ιατρικές επιπτώσεις ψευδών θετικών αποτελεσμάτων

Το **ψευδώς θετικό** αποτέλεσμα δείχνει ότι η συγκέντρωση του επιμολυντή είναι πάνω από το νόμιμο όριο, ενώ στην πραγματικότητα είναι κάτω από το όριο.

Το **ψευδώς αρνητικό** αποτέλεσμα δείχνει ότι η συγκέντρωση του επιμολυντή είναι κάτω από το όριο, ενώ στην πραγματικότητα είναι πάνω από το όριο.

Ακόμη και όταν η μέθοδος εκτελείται σωστά, προκύπτουν κάποια λανθασμένα αποτελέσματα εξαιτίας τυχαίων σφαλμάτων.



Όταν επιλέγετε μια μέθοδο, σκεφτείτε

Επιλεκτικότητα είναι η ικανότητα επιλεκτικής διάκρισης του αναλύτη από άλλες ουσίες που υπάρχουν στο δείγμα (αποφεύγοντας τις παρεμποδίσεις)

Ευαισθησία είναι η δυνατότητα αξιόπιστης μέτρησης της απόκρισης κατά τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη

Το **λευκό της μεθόδου** είναι ένα δείγμα που περιέχει όλα τα συστατικά, εκτός από τον αναλύτη

- Λαμβάνεται σε όλα τα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας
- Πριν τον υπολογισμό της ποσότητας του αναλύτη στο δείγμα, αφαιρείται η απόκριση του λευκού της μεθόδου από την απόκριση του πραγματικού δείγματος

Τύποι λευκών δειγμάτων

Το λευκό της μεθόδου:

- Περιέχει όλα τα συστατικά, εκτός από τον αναλύτη.
- Λαμβάνεται σε όλα τα στάδια της αναλυτικής διαδικασίας
- Πριν τον υπολογισμό της ποσότητας του αναλύτη στο δείγμα, αφαιρείται η απόκριση του λευκού της μεθόδου από την απόκριση του πραγματικού δείγματος

Το λευκό αντιδραστήριο

- Είναι παρόμοιο με το λευκό της μεθόδου
- Δεν έχει υποβληθεί σε όλα τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος.

Το λευκό πεδίου

- Είναι παρόμοιο με το λευκό της μεθόδου, αλλά έχει εκτεθεί στο περιβάλλον του σημείου δειγματοληψίας

Ανάκτηση με εμβολιασμό

Μερικές φορές, η απόκριση του αναλύτη μπορεί να επηρεαστεί και να αυξηθεί ή μειωθεί από κάτι άλλο που υπάρχει στο δείγμα

Ο όρος **μήτρα** αναφέρεται σε οτιδήποτε άλλο περιέχεται στο δείγμα εκτός του αναλύτη.

Εμβολιασμός, που καλείται και εμπλουτισμός, είναι η προσθήκη γνωστής ποσότητας του αναλύτη στο υπό εξέταση δείγμα για να ελεγχθεί εάν η απόκριση στο εμβολιασμένο δείγμα είναι αυτή που αναμένεται από την καμπύλη βαθμονόμησης. Η ανάκτηση με εμβολιασμό μπορεί να δείξει ότι υπάρχουν προβλήματα όπως επιμόλυνση ή απώλεια αναλύτη

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ: Ανάκτηση με εμβολιασμό

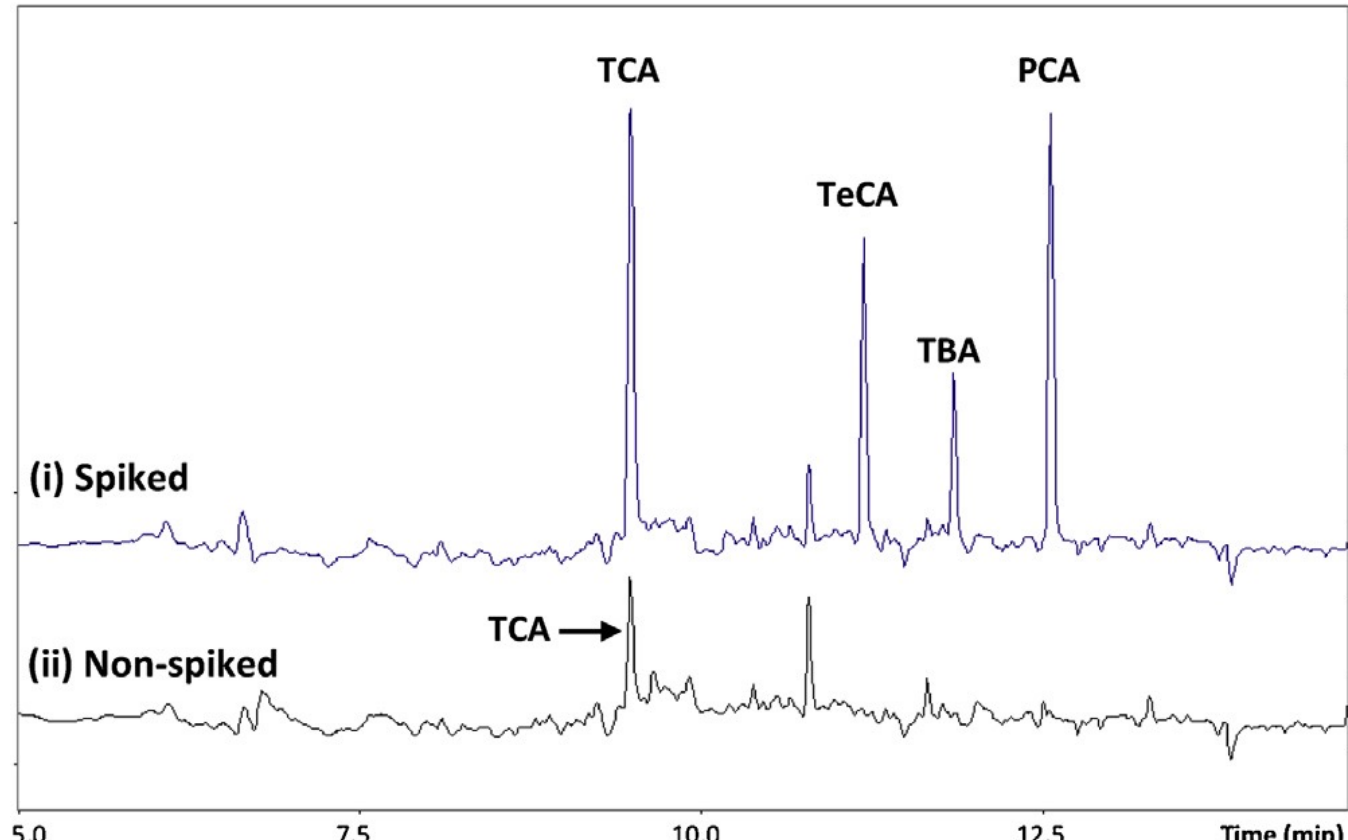
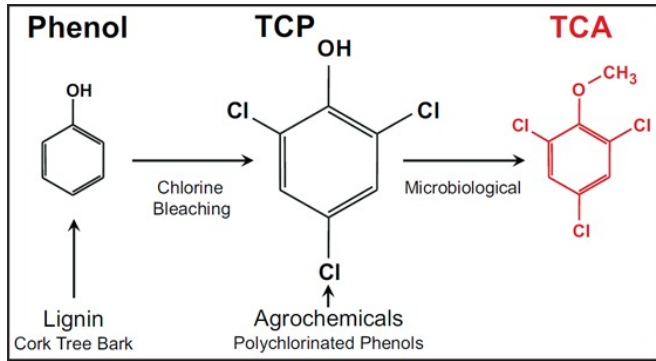
$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{C_{\text{εμβολιασμένου δείγματος}} - C_{\text{μη εμβολιασμένου δείγματος}}}{C_{\text{προστιθέμενο}}} \times 100$$

Ένα άγνωστο δείγμα βρέθηκε ότι περιέχει 10,0 μg αναλύτη σε ένα λίτρο. Έγινε εμβολιασμός με 5,0 μg/L σε ποσότητα του δείγματος του αγνώστου. Κατά την ανάλυση του εμβολιασμένου δείγματος η συγκέντρωση προσδιορίστηκε 14,6 μg/L. Να βρεθεί η επί τοις εκατό ανάκτηση του εμβολιασμού.

Λύση: Η επί τοις εκατό ανάκτηση του εμβολιασμού είναι

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{14.6 \text{ μg/L} - 10.0 \text{ μg/L}}{5.0 \text{ μg/L}} \times 100 = 92\%$$

Εάν τα αποδεκτά όρια ανάκτησης έχουν καθοριστεί στο εύρος από 96% έως 104%, τότε η τιμή 92% δεν είναι αποδεκτή. Απαιτείται βελτίωση της μεθόδου ή της τεχνικής.



Αντιμετώπιση μεγάλου αριθμού δειγμάτων

- Ανάγκη για περιοδικούς ελέγχους βαθμονόμησης.
- Οι μέθοδοι μπορεί να παρουσιάσουν μία αργή αλλαγή στην απόκρισή τους, που ονομάζεται **μετατόπιση** λόγω διαφόρων αιτιών όπως η αλλαγή θερμοκρασίας δωματίου ή η αλλοίωση των αντιδραστηρίων ή των προτύπων.
- Τα διαλύματα για τον έλεγχο της βαθμονόμησης πρέπει να είναι διαφορετικά από αυτά που χρησιμοποιούνται για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης.
- Τα **δείγματα ελέγχου απόδοσης** (που καλούνται επίσης **δείγματα ελέγχου ποιότητας** ή **τυφλά δείγματα**) είναι μέτρο ελέγχου της ποιότητας για να περιορίζονται οι αποκλίσεις που οφείλονται στον αναλυτή που γνωρίζει τη συγκέντρωση του δείγματος ελέγχου βαθμονόμησης.

5-2 Επικύρωση μεθόδου

Επικύρωση μεθόδου

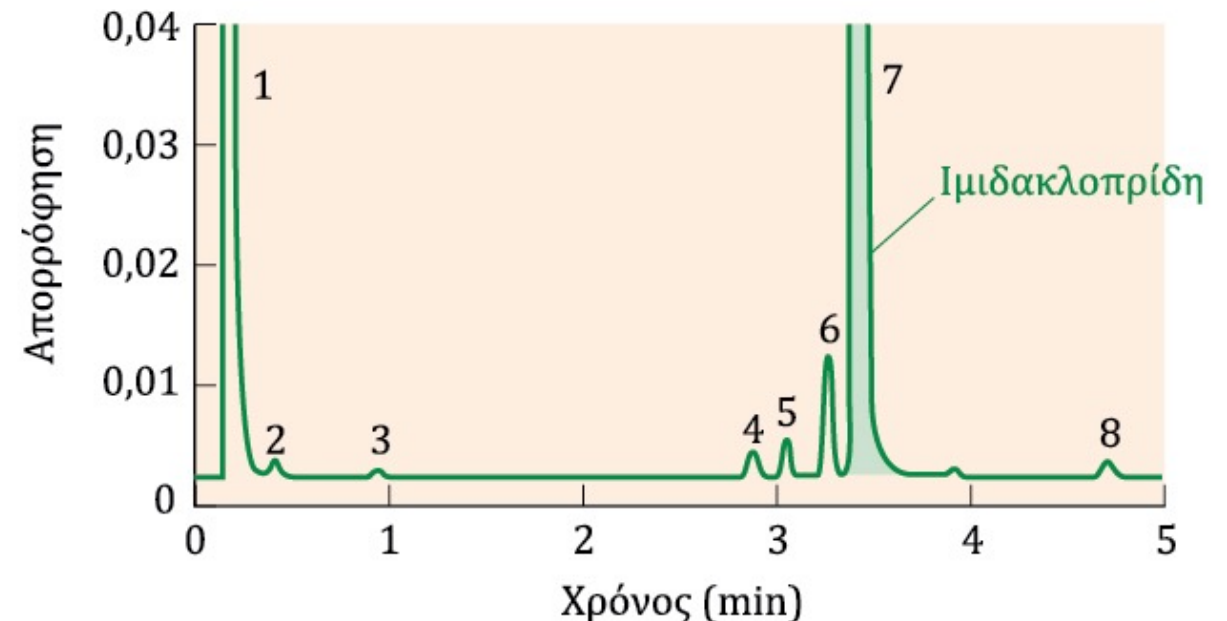
Επικύρωση μεθόδου είναι η διαδικασία που διασφαλίζει ότι μια αναλυτική μέθοδος είναι αποδεκτή για τον επιδιωκόμενο στόχο

- Επιλεκτικότητα της μεθόδου
- Γραμμικότητα
- Ακρίβεια
- Πιστότητα
- Εύρος
- Όριο ανίχνευσης
- Όριο ποσοτικοποίησης
- Ανθεκτικότητα της μεθόδου

Επιλεκτικότητα

Επιλεκτικότητα είναι η ικανότητα μιας αναλυτικής μεθόδου να διαχωρίζει τον αναλύτη από άλλες ουσίες που μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα

- Μία μέθοδος είναι ειδική αν η επιλεκτικότητα είναι απόλυτη, έτσι ώστε να μην υπάρχουν παρεμποδίσεις
- Η Χρωματογραφία είναι μία αναλυτική τεχνική στην οποία οι ουσίες διαχωρίζονται η μία από την άλλη λόγω της διαφορετικής τους αλληλεπίδρασης με τη στήλη.



ΕΙΚΟΝΑ 5-1 Χρωματογράφημα διαχωρισμού της ιμιδακλοπρίδης (κορυφή 7) από πιθανές προσμίξεις λόγω σύνθεσης (κορυφές 2 και 8) και από προϊόντα αποικοδόμησης (κορυφές 3-6) που σχηματίζονται μετά από έκθεση του φαρμάκου σε 3% H₂O₂ για 24 ώρες. Η κορυφή 1 είναι του H₂O₂. Ο διαχωρισμός διεξήχθη με υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Ενότητα 25-1). [Δεδομένα από J. Z. Tian and A. Rustum, "Development and Validation of a Stability-Indicating Reversed-Phase UPLC-UV Method for the Assay of Imidacloprid," *J. Chromatogr. Sci.* **2018**, 56, 131].

Γραμμικότητα

Η **γραμμικότητα** μετρά πόσο καλά μια καμπύλη βαθμονόμησης ακολουθεί μια ευθεία γραμμή → δείχνοντας ότι η απόκριση είναι ανάλογη με την ποσότητα του αναλύτη.

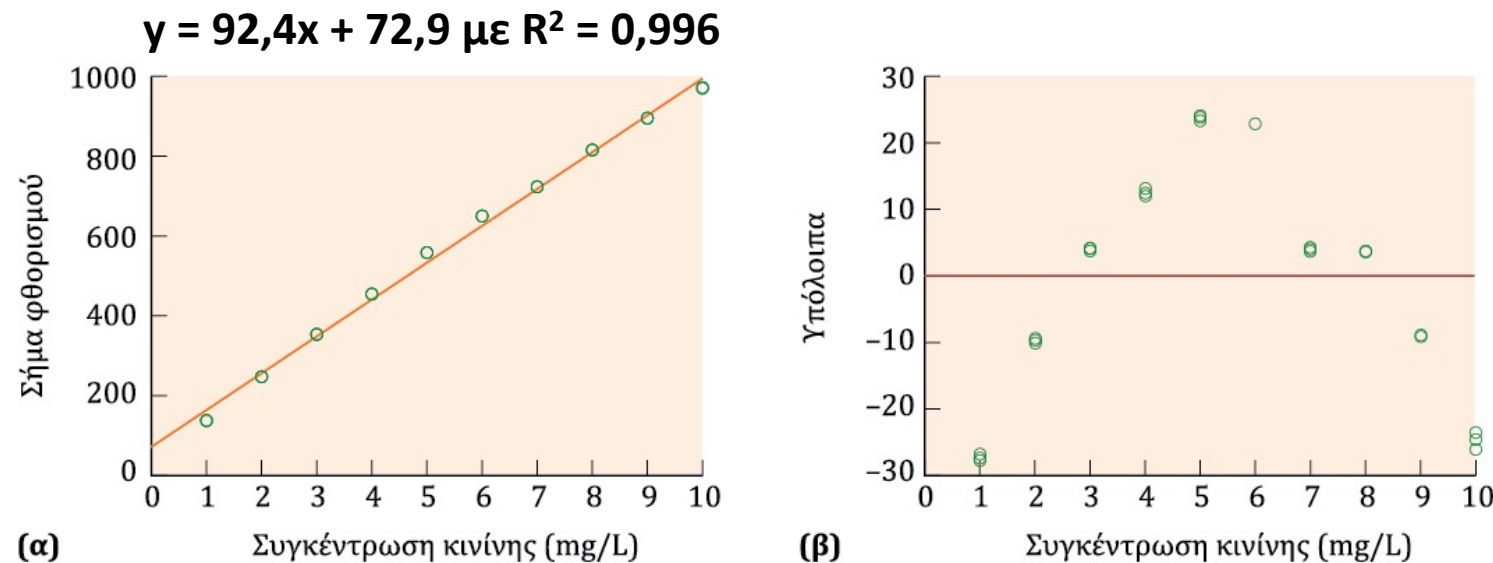
Ένας κοινός τρόπος μέτρησης της γραμμικότητας είναι το τετράγωνο του συντελεστή συσχέτισης, R^2 .

$$R^2 = \frac{[\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]^2}{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}$$

- Τιμή R^2 πάνω από 0,995 ή και 0,999, θεωρείται ικανοποιητική σε πολλές εφαρμογές.
- Η χάραξη του γραφήματος μας δείχνει την πραγματική συμπεριφορά της βαθμονόμησης.

Διαγράμματα κατανομής

Τα διαγράμματα κατανομής υπολοίπων τονίζουν τις διαφορές μεταξύ των δεδομένων βαθμονόμησης και της γραμμής ελαχίστων τετραγώνων.



$$\begin{aligned} \text{Υπόλοιπο} \\ d_i &= y_i - y \\ &= y_i - (mx_i + b) \end{aligned}$$

EIKONA 5-2 (α) Καμπύλη βαθμονόμησης κινίνης από 1 έως 10 mg/L με φασματομετρία φθορισμού. (β) Διάγραμμα κατανομής υπολοίπων που δείχνει την απόκλιση των δεδομένων βαθμονόμησης από τη γραμμή ελαχίστων τετραγώνων. [Δεδομένα από J. M. Jurado, A. Alcázar, R. Muñiz-Valencia, S. G. Ceballos-Magaña, and F. Raposo, "Some Practical Considerations for Linearity Assessment of Calibration Curves," *Talanta* **2018**, 172, 221].

Η ακρίβεια είναι «εγγύτητα στην αλήθεια»

Εκφράζεται με τους παρακάτω τρόπους:

- Ανάλυση των Πρότυπων Πιστοποιημένων Υλικών Αναφοράς σε μήτρα παρόμοια με εκείνη του αγνώστου
- Σύγκριση αποτελεσμάτων από δύο ή περισσότερες αναλυτικές μεθόδους
- Ανάλυση ενός λευκού δείγματος εμβολιασμένου με γνωστή προσθήκη αναλύτη.
- *Αν δεν μπορεί να παρασκευαστεί λευκό που να έχει την ίδια μήτρα με αυτή του αγνώστου, τότε πρέπει να πραγματοποιηθούν γνωστές προσθήκες του αναλύτη (Ενότητα 5-3) στο άγνωστο*

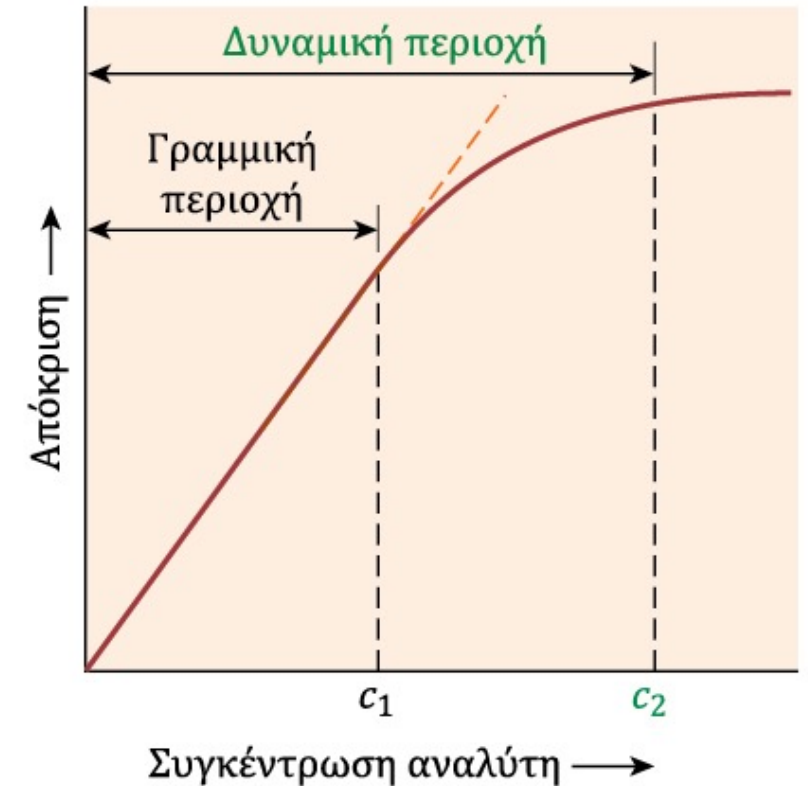
Τύποι Πιστότητας

- *Πιστότητα οργάνου* είναι η επαναληψιμότητα που παρατηρείται κατά την επαναλαμβανόμενη εισαγωγή (≥ 10 φορές) της ίδιας ποσότητας δείγματος σε ένα όργανο
- *Ενδοεργαστηριακή πιστότητα* είναι η επαναληψιμότητα που παρατηρείται όταν κλάσματα ομογενούς υλικού αναλύονται πολλές φορές από το ίδιο άτομο, την ίδια μέρα, με τον ίδιο εξοπλισμό.
- *Η ενδιάμεση πιστότητα*, είναι η μεταβλητότητα που παρατηρείται όταν μια ανάλυση πραγματοποιείται από διαφορετικούς αναλυτές, σε διαφορετικά όργανα, διαφορετικές μέρες στο ίδιο εργαστήριο
- *Διεργαστηριακή πιστότητα* είναι το πιο γενικό μέτρο αναπαραγωγιμότητας και παρατηρείται όταν κλάσματα του ίδιου δείγματος αναλύονται από διαφορετικά άτομα σε διαφορετικά εργαστήρια

Εύρος

Εύρος είναι η περιοχή των συγκεντρώσεων για την οποία η γραμμικότητα, η ακρίβεια και η πιστότητα είναι αποδεκτές

- **Γραμμικό εύρος:** εύρος συγκεντρώσεων όπου η καμπύλη βαθμονόμησης είναι γραμμική.
- **Δυναμικό εύρος:** εύρος συγκεντρώσεων όπου η απόκριση είναι μετρήσιμη

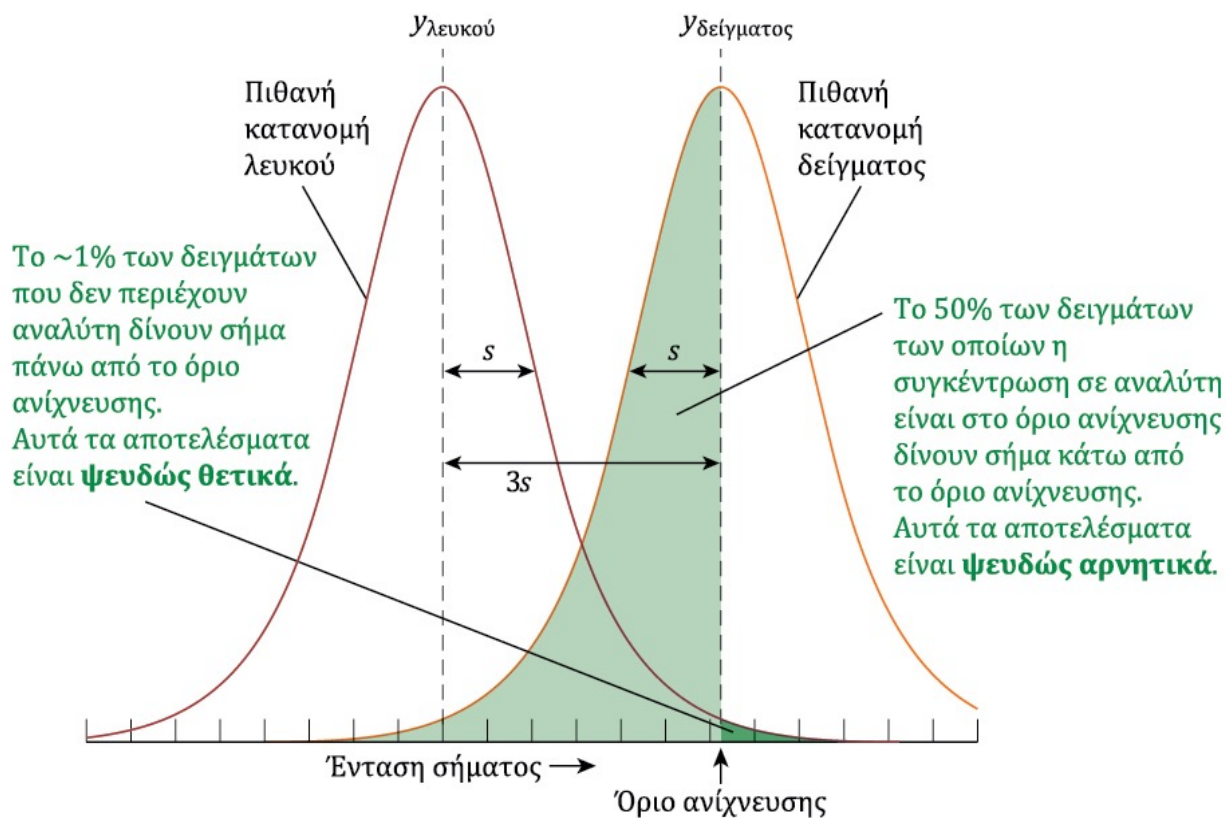


ΕΙΚΟΝΑ 4-14 Καμπύλη βαθμονόμησης όπου παρουσιάζονται η γραμμική και η δυναμική περιοχή.

Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Το όριο ανίχνευσης (που καλείται και κατώτερο όριο ανίχνευσης) είναι η μικρότερη ποσότητα αναλύτη που δίνει σήμα «σημαντικά διαφορετικό» από το λευκό

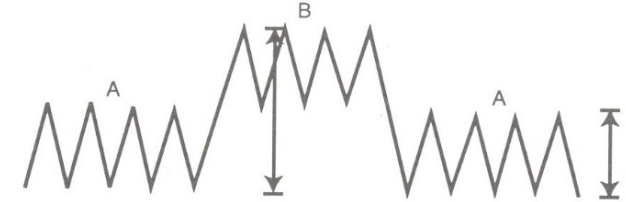
ΕΙΚΟΝΑ 5-3 Όριο ανίχνευσης. Οι καμπύλες δείχνουν την κατανομή των μετρήσεων που αναμένονται για ένα λευκό και ένα δείγμα που η συγκέντρωσή του είναι στο όριο ανίχνευσης. Το εμβαδόν κάθε περιοχής είναι ανάλογο του αριθμού των μετρήσεων στην περιοχή. Μόνο ~1% των μετρήσεων του λευκού αναμένεται να ξεπερνά το όριο ανίχνευσης. Ωστόσο, το 50% των μετρήσεων ενός δείγματος που περιέχει αναλύτη στο όριο ανίχνευσης, θα βρίσκεται κάτω από το όριο ανίχνευσης. Η πιθανότητα να διαπιστωθεί ότι το λευκό περιέχει αναλύτη πάνω από το όριο ανίχνευσης είναι 1% (ψευδώς θετικό). Εάν ένα δείγμα περιέχει αναλύτη στο όριο ανίχνευσης, η πιθανότητα να διαπιστωθεί ότι δεν υπάρχει αναλύτης είναι 50%, επειδή το σήμα του είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης (ψευδώς αρνητικό). Οι καμπύλες σε αυτή την εικόνα είναι κατανομές Student t, για 6 βαθμούς ελευθερίας, που είναι πιο ευρείες από την κατανομή Gauss.



Το σήμα που είναι 10 φορές μεγαλύτερο από τον θόρυβο ορίζεται ως **κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης**, ή η μικρότερη ποσότητα που μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια

Όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

1. Μετά τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου, παρασκευάζονται δείγματα που η συγκέντρωσή τους είναι ~ 1 έως 5 φορές το όριο ανίχνευσης.
2. Μετράται το σήμα από n υποδείγματα ($n \geq 7$).
3. Υπολογίζεται η τυπική απόκλιση (s) των n μετρήσεων.
4. Μετράται το σήμα n λευκών (που δεν περιέχουν αναλύτη) και βρίσκεται η μέση τιμή, y_{blank} .
5. Το ελάχιστο ανιχνεύσιμο σήμα, y_{dl} , καθορίζεται ως



Σήμα ορίου ανίχνευσης: $y_{\text{dl}} = y_{\text{λευκού}} + 3s$

6. Το διορθωμένο σήμα, $y_{\text{δείγματος}} - y_{\text{λευκού}}$, είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του δείγματος:

Εξίσωση βαθμονόμησης: $y_{\text{δείγματος}} - y_{\text{λευκού}} = m \times \text{συγκέντρωση δείγματος}$

όπου $y_{\text{δείγματος}}$ είναι το σήμα του δείγματος και m είναι η κλίση της γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης.

Όριο ανίχνευσης - Limit of Detection (LOD)

Ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση = $\frac{3s}{m}$

Όριο ποσοτικοποίησης - Limit of Quantification (LOQ)

Ελάχιστη ποσοτικοποιήσιμη συγκέντρωση = $\frac{10s}{m}$

ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ Όριο ανίχνευσης

Τα σήματα από επτά υποδείγματα με συγκέντρωση περίπου τρεις φορές αυτή του ορίου ανίχνευσης, βρέθηκε ότι είναι 5,0, 5,0, 5,2, 4,2, 4,6, 6,0 και 4,9 nA. Τα λευκά δείγματα έδωσαν τιμές 1,4, 2,2, 1,7, 0,9, 0,4, 1,5 και 0,7 nA. Η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης για υψηλές συγκεντρώσεις είναι $m = 0,229 \text{ nA}/\mu\text{M}$. **(α)** Βρείτε το όριο ανίχνευσης του σήματος και την κατώτερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση. **(β)** Ποια είναι η συγκέντρωση του αναλύτη σε ένα δείγμα που δίνει σήμα 7,0 nA;

Λύση: (α) Πρώτα υπολογίζεται η μέση τιμή του λευκού και η τυπική απόκλιση των δειγμάτων. Διατηρούνται περισσότερα μη σημαντικά ψηφία, ώστε να αποφευχθούν σφάλματα κατά τη στρογγυλοποίηση.

Blank: Μέσος όρος = $y_{\text{blank}} = 1.2_6 \text{ nA}$

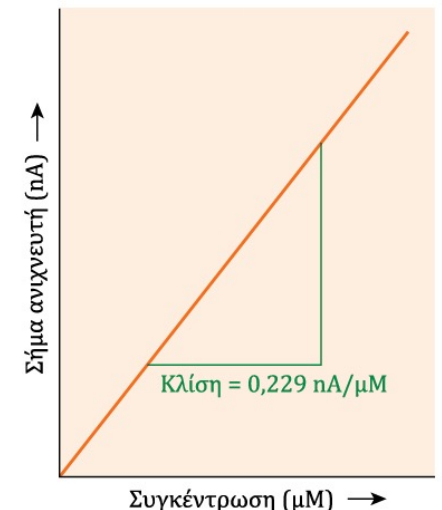
Sample: Τυπική απόκλιση = $s = 0.5_6 \text{ nA}$

Το όριο ανίχνευσης του σήματος από την Εξίσωση 5-4 είναι

$$y_{\text{dl}} = y_{\text{λευκού}} + 3s = 1.2_6 \text{ nA} + 3(0.5_6 \text{ nA}) = 2.9_4 \text{ nA}$$

Η κατώτερη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση υπολογίζεται από την Εξίσωση 5-6:

$$\text{Όριο ανίχνευσης} = \frac{3s}{m} = \frac{3(0.5_6 \text{ nA})}{0.229 \text{ nA}/\mu\text{M}} = 7.3 \mu\text{M} = 7 \mu\text{M}$$

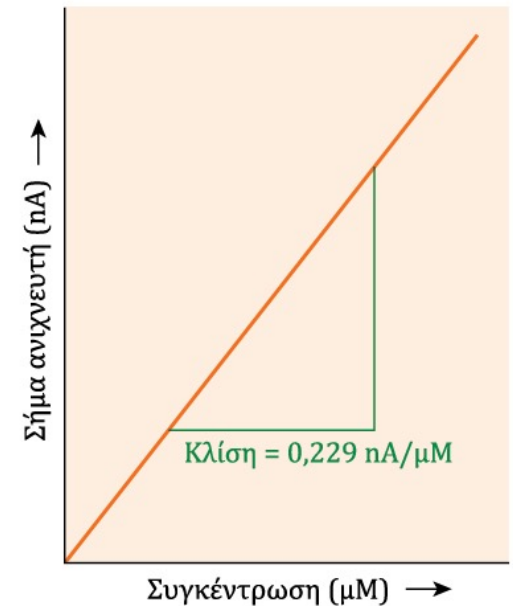


ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ Όριο ανίχνευσης

Λύση: (β) Για να βρεθεί η συγκέντρωση δείγματος που δίνει σήμα 7,0 nA, χρησιμοποιείται η Εξίσωση 5-5:

$$y_{\text{δείγματος}} - y_{\text{λευκού}} = m \times \text{concentration}$$

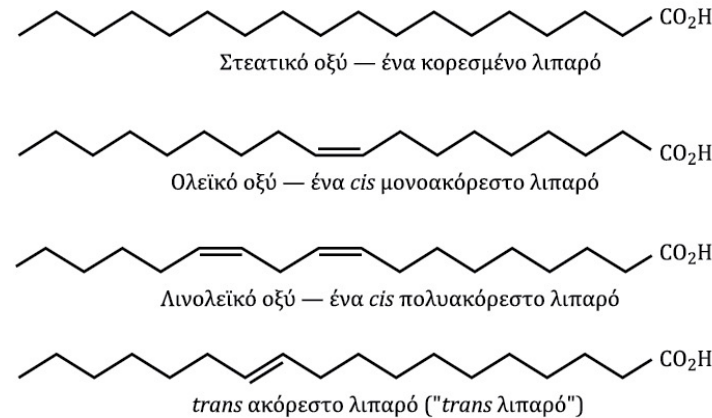
$$\Rightarrow \text{συγκέντρωση} = \frac{y_{\text{δείγματος}} - y_{\text{λευκού}}}{m} = \frac{7.0 \text{ nA} - 1.2_6 \text{ nA}}{0.229 \text{ nA}/\mu\text{M}} = 25.1 \mu\text{M}$$



Όριο αναφοράς

Το **όριο αναφοράς** είναι η συγκέντρωση κάτω από την οποία οι κανονισμοί υπαγορεύουν ότι θα αναγράφεται πως «ο αναλύτης δεν ανιχνεύθηκε».

- Αυτό δεν σημαίνει ότι ο αναλύτης δεν υπάρχει, αλλά ότι η συγκέντρωσή του είναι κάτω από ένα καθορισμένο επίπεδο.



Διατροφικά στοιχεία	
64 μερίδες ανά συσκευασία	
Μέγεθος μερίδας	1 κ.γ. (14g)
Ποσότητα Ανά Μερίδα	
Θερμίδες	130
% Ημερήσια Τιμή*	
Συνολικά λιπαρά 14g	18%
Κορεσμένα λιπαρά 2g	10%
Trans λιπαρά 0g	
Πολυακόρεστα Λιπαρά 4g	
Μονοακόρεστα Λιπαρά 6g	
Νάτριο 0mg	0%
Συνολικοί Υδατάνθρακες 0g	0%
Πρωτεΐνες 0g	

ΕΙΚΟΝΑ 5-4 Διατροφικά στοιχεία που αναγράφονται σε συσκευασία κράκερς. Το **όριο αναφοράς** για τα *trans* λιπαρά είναι 0,5 g/μερίδα. Οποιαδήποτε ποσότητα μικρότερη από αυτή αναφέρεται ως 0. Στο τέλος του Κεφαλαίου 6 εξηγούνται οι συμπτυκνωμένες δομές οργανικών ενώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη γραφή των παραπάνω ενώσεων με 18 άτομα άνθρακα.

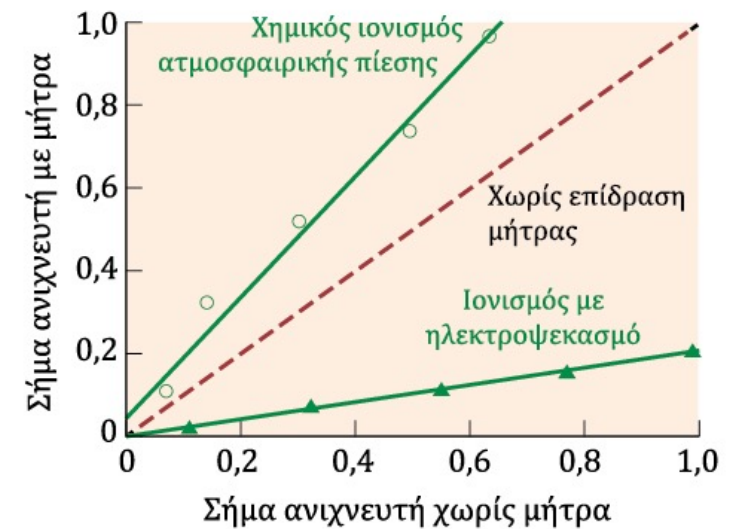
- Το **όριο αναφοράς** είναι τουλάχιστον 5 με 10 φορές υψηλότερο από το **όριο ανίχνευσης**.

5-3 Μέθοδος γνωστής προσθήκης

Μέθοδος γνωστής προσθήκης

Επίδραση μήτρας είναι η μεταβολή στην αναλυτική ευαισθησία (κλίση της καμπύλης αναφοράς) που προκαλείται από οτιδήποτε άλλο στο δείγμα, εκτός του αναλύτη

- Η σύσταση του δείγματος είναι άγνωστη ή πολύπλοκη και επηρεάζει το αναλυτικό σήμα.
- Σε αυτές τις περιπτώσεις, είναι αδύνατο ή δύσκολο να παρασκευαστούν λευκά και πρότυπα διαλύματα, των οποίων η σύσταση να ταιριάζει με αυτή του δείγματος.
- Αν η σύσταση των λευκών και πρότυπων διαλυμάτων δεν ταιριάζει με αυτή του αγνώστου δείγματος, η καμπύλη αναφοράς δεν θα είναι αξιόπιστη.



ΕΙΚΟΝΑ 5-5 Καμπύλη απόκρισης του προσδιορισμού κορτιζόνης σε πλάσμα αίματος με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας. [Δεδομένα από R. D. McCulloch and D. B. Robb, "Field-Free Atmospheric Pressure Photoionization-Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Steroids within Complex Biological Matrices," *Anal. Chem.* **2017**, 89, 4169].

Μέθοδος γνωστής προσθήκης

Το σήμα είναι ευθέως ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη

Συγκέντρωση του αναλύτη στο αρχικό διάλυμα

$$\frac{[X]_i}{[X]_f + [S]_f} = \frac{I_x}{I_{x+s}}$$

σήμα από το αρχικό διάλυμα

σήμα από το τελικό διάλυμα

Συγκέντρωση του αναλύτη και του προτύπου στο τελικό διάλυμα

$$[X]_f = [X]_i \left(\frac{V_i}{V_i + V_s} \right) \quad [S]_f = [S]_i \left(\frac{V_s}{V_i + V_s} \right)$$

Προστιθέμενος όγκος

αρχικός όγκος

Δεδομένα για το πείραμα γνωστής προσθήκης με μεταβλητό ολικό όγκο

Τέσσερις γνωστές προσθήκες.

ΕΙΚΟΝΑ 5-6 Δεδομένα για το πείραμα γνωστής προσθήκης με μεταβλητό ολικό όγκο. [Δεδομένα από A. Cheng, R. Tyne, Y. T. Kwok, L. Rees, L. Craig, C. Lapinee, M. D’Arcy, D. J. Weiss, and P. Salaün, “Investigating Arsenic Contents in Surface and Drinking Water by Voltammetry and the Method of Standard Additions,” *J. Chem. Ed.* **2016**, 93, 1945. Οι τέσσερις πρώτοι συγγραφείς ήταν προπτυχιακοί φοιτητές].

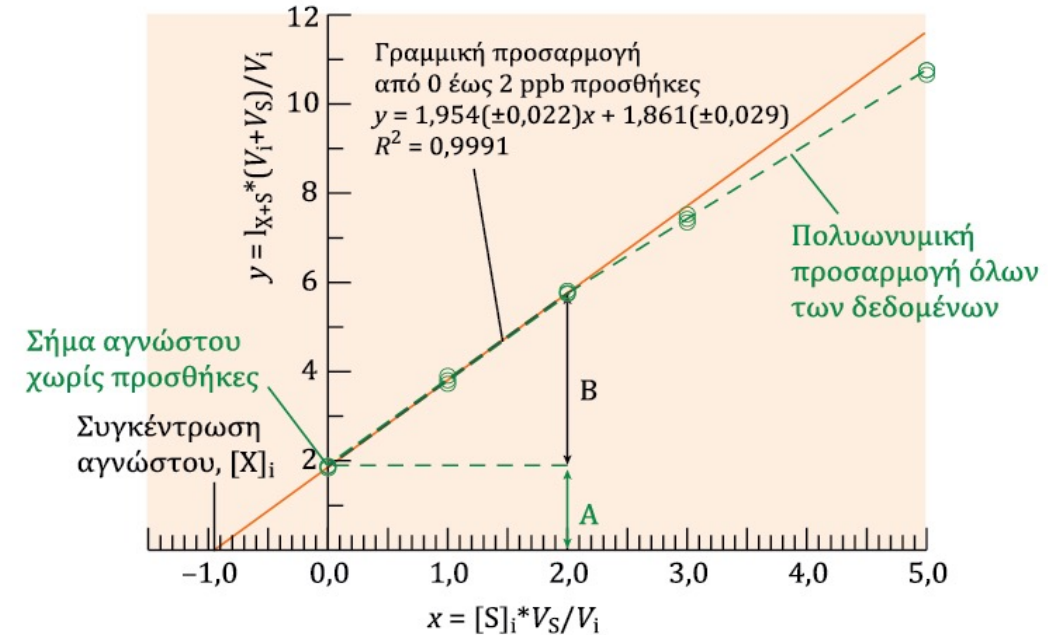
	A	B	Γ	Δ	E
1	Πείραμα γνωστής προσθήκης αρσενικού: Προσθήκη 1.000 ppb αρσενικού σε 1,0 mL νερού				
2					
3	V_i (mL) =	V_s = mL αρσενικού	I_{X+S} =	συνάρτηση άξονα x	συνάρτηση άξονα y
4	10,0	που προστίθεται	σήμα (μΑ)	$S_i \cdot V_s / V_i$	$I_{X+S} \cdot (V_i + V_s) / V_i$
5	$[S]_i$ (ppb) =	0,000	1,89	0,000	1,890
6	1.000	0,000	1,87	0,000	1,870
7		0,000	1,83	0,000	1,830
8		0,010	3,90	1,000	3,904
9		0,010	3,72	1,000	3,724
10		0,010	3,80	1,000	3,804
11		0,020	5,75	2,000	5,762
12		0,020	5,80	2,000	5,812
13		0,020	5,73	2,000	5,741
14		0,030	7,40	3,000	7,422
15		0,030	7,50	3,000	7,523
16		0,030	7,32	3,000	7,342
17		0,050	10,70	5,000	10,754
18		0,050	10,60	5,000	10,653
19		0,050	10,70	5,000	10,754
20		D5 = \$A\$6*B5/\$A\$4		E5 = C5*(\$A\$4+B5)/\$A\$4	

Κάθε σημείο εις τριπλούν

Γραφική προσέγγιση της μεθόδου γνωστής προσθήκης σε ένα διάλυμα

Για διαδοχικές προσθήκες σε ένα διάλυμα:

$$\underbrace{I_{X+S} \left(\frac{V_i + V_S}{V_i} \right)}_{\text{Συνάρτηση στον άξονα } y} = I_X + \underbrace{\frac{I_X}{[X]_i} [S]_i \left(\frac{V_S}{V_i} \right)}_{\text{Συνάρτηση στον άξονα } x}$$



ΕΙΚΟΝΑ 5-7 Γραφική προσέγγιση των δεδομένων του πειράματος γνωστής προσθήκης σε ένα διάλυμα με μεταβλητό ολικό όγκο. Δεδομένα από την Εικόνα 5-6. Οι γνωστές προσθήκες πρέπει να είναι μέσα στη γραμμική περιοχή και πρέπει να αυξάνουν το σήμα από 2 έως 5 φορές σε σχέση με την αρχική τιμή (δηλαδή, $B = 1A$ μέχρι $4A$). Η γραμμή ελαχίστων τετραγώνων στηρίζεται στα σκιασμένα δεδομένα της Εικόνας 5-6.

Γραφική προσέγγιση για πολλαπλά διαλύματα σταθερού τελικού όγκου

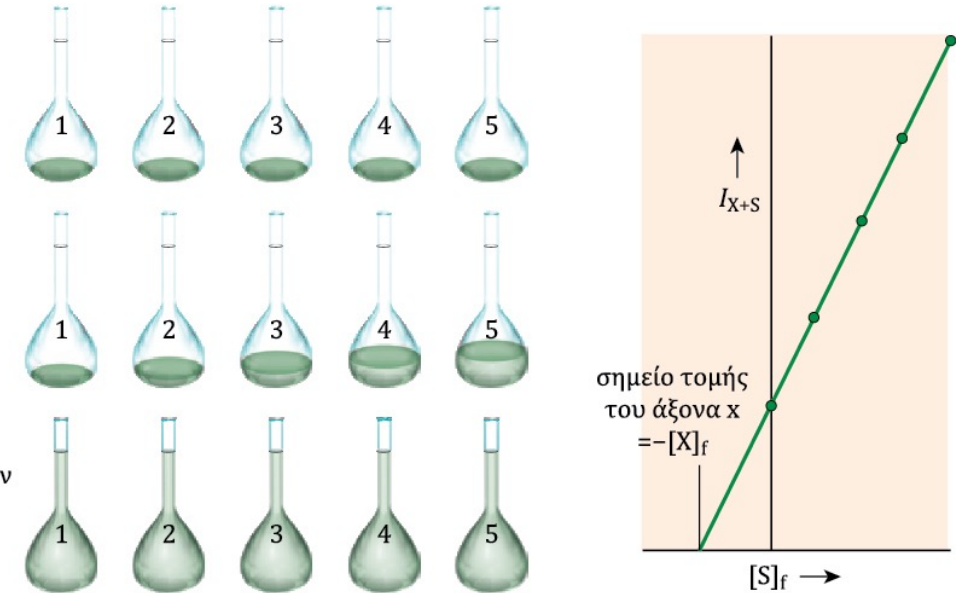
Η μέθοδος γνωστής προσθήκης για πολλαπλά διαλύματα σταθερού τελικού όγκου χρησιμοποιείται όταν η ανάλυση καταναλώνει ποσότητα διαλύματος.

- Η ποσότητα στο σημείο τομής του άξονα x είναι η τελική συγκέντρωση του αγνώστου, $[X]_f$, μετά την αραίωση του δείγματος στον τελικό όγκο.
- Η αρχική συγκέντρωση του αγνώστου, $[X]_i$, είναι η τελική συγκέντρωση του αγνώστου, $[X]_f$, διαιρούμενη με τον παράγοντα αραίωσης.

Προστίθενται 5 mL από το άγνωστο σε κάθε φιάλη.

Προστίθενται 0, 5, 10, 15, και 20 mL προτύπου στις πέντε φιάλες.

Προσθήκη αντιδραστηρίων σε κάθε φιάλη, αραίωση μέχρι τα 50 mL και καλή ανακίνηση.



ΕΙΚΟΝΑ 5-8 Πείραμα γνωστής προσθήκης με σταθερό τελικό όγκο. Καμπύλη I_{X+S} συναρτήσει $[S]_f$ και το σημείο τομής του άξονα x είναι $-[X]_f$. Οι γραμμές στις Εικόνες 5-7 και 5-8 προέρχονται από την Εξίσωση 5-10.

Πρότυπα

Μέθοδος γνωστής προσθήκης: Το προστιθέμενο πρότυπο είναι το ίδιο με τον αναλύτη.

Εσωτερικό πρότυπο: Το προστιθέμενο πρότυπο είναι διαφορετικό από τον αναλύτη.

Εξωτερικό πρότυπο: Διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης σε αναλύτη χρησιμοποιούνται για την κατασκευή καμπύλης αναφοράς.

5-4 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Εσωτερικά πρότυπα

Το **εσωτερικό πρότυπο** είναι μια γνωστή ποσότητα κάποιας ένωσης διαφορετικής από τον αναλύτη, η οποία προστίθεται στο άγνωστο

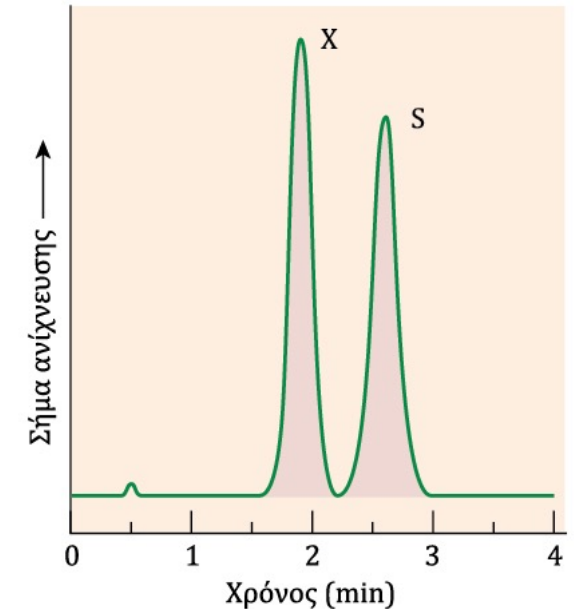
- Τα εσωτερικά πρότυπα είναι χρήσιμα σε αναλύσεις στις οποίες η ποσότητα του δείγματος που αναλύεται ή η απόκριση του οργάνου διαφέρει λίγο από μέτρηση σε μέτρηση
- Τα εσωτερικά πρότυπα είναι επίσης χρήσιμα όταν παρατηρείται απώλεια δείγματος στα στάδια προετοιμασίας του δείγματος, πριν την ανάλυση
- Είναι χρήσιμο το εσωτερικό πρότυπο να είναι χημικά παρόμοιο του αναλύτη, ώστε οι επιδράσεις της μήτρας που αυξάνουν ή μειώνουν το σήμα του αναλύτη να έχουν την ίδια επίδραση και στο εσωτερικό πρότυπο

Βαθμονόμηση ενός σημείου (εσωτερικό πρότυπο)

- Για την εφαρμογή της μεθόδου εσωτερικού προτύπου παρασκευάζεται ένα γνωστό μείγμα προτύπου και αναλύτη.
- Μετρίεται η σχετική απόκριση στις δύο ουσίες.
- Ο ανιχνευτής παρουσιάζει διαφορετική απόκριση για κάθε ουσία:
 - Αν οι συγκεντρώσεις τόσο του αναλύτη (X) όσο και του εσωτερικού προτύπου (S) είναι 10,0 mM.
 - Λέμε ότι ο παράγοντας απόκρισης, F, είναι 2,30 φορές μεγαλύτερος για το X απ' ό,τι για το S.
- **Παράγοντας απόκρισης, F**

$$\frac{\text{Σήμα αναλύτη}}{\text{Συγκέντρωση αναλύτη}} = F \frac{\text{Σήμα από εσωτερικό πρότυπο}}{\text{Συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου}}$$

$$\frac{A_x}{[X]_f} = F \left(\frac{A_s}{[S]_f} \right)$$



ΕΙΚΟΝΑ 5-9 Χρωματογραφικός διαχωρισμός του αγνώστου (X) και του εσωτερικού προτύπου (S). Μια γνωστή συγκέντρωση του S προστίθεται στο άγνωστο. Από τα σχετικά εμβαδά των κορυφών του X και S υπολογίζεται η συγκέντρωση του X στο μείγμα. Απαραίτητη είναι η πρωταρχική μέτρηση της σχετικής απόκρισης του ανιχνευτή σε κάθε ουσία.