

Οι απαντήσεις στις προηγούμενες έξι ερωτήσεις μπορούν να οδηγήσουν στην επιλογή της μεθόδου με την προϋπόθεση ότι είναι γνωστά τα χαρακτηριστικά απόδοσης των διαφόρων ενόργανων μεθόδων που περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1-1.

### 1Δ-2 Χαρακτηριστικά απόδοσης των οργάνων-μέτρα αξιολόγησης

Στον Πίνακα 1-3 περιλαμβάνονται τα ποσοτικά κριτήρια απόδοσης, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν προκειμένου να αποφασισθεί, εάν μια ενόργανη μέθοδος είναι κατάλληλη για την αντιμετώπιση ενός αναλυτικού προβλήματος. Τα χαρακτηριστικά αυτά εκφράζονται σε αριθμητικές τιμές και ονομάζονται μέτρα αξιολόγησης (figures of merit). Τα μέτρα αξιολόγησης μας επιτρέπουν να περιορίσουμε σε σχετικά μικρό αριθμό τις επιλογές των οργάνων για ένα δεδομένο αναλυτικό πρόβλημα. Στη συνέχεια η επιλογή μεταξύ αυτών μπορεί να βασισθεί σε ποιοτικά κριτήρια απόδοσης, που παρουσιάζονται στο Πίνακα 1-4.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-3 Μέτρα αξιολόγησης για την επιλογή αναλυτικών μεθόδων

Κριτήριο	Μέτρο αξιολόγησης	ΠΟΣΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
1. Επαναληψιμότητα	Απόλυτη τυπική απόκλιση, σχετική τυπική απόκλιση, συντελεστής μεταβλητότητας, μεταβλητότητα	
2. Μεροληψία	Απόλυτο συστηματικό σφάλμα, σχετικό συστηματικό σφάλμα	
3. Ευαισθησία	Ευαισθησία βαθμονόμησης, αναλυτική ευαισθησία	
4. Όριο αντίχενωσης	Άθροισμα τυφλού και του τριπλάσιου της τυπικής απόκλισης του τυφλού	
5. Περιοχή συγκεντρώσεων	Από το όριο συγκέντρωσης ποσοτικοποίησης (limit of quantitation, LOQ) έως το όριο συγκέντρωσης γραμμικότητας (limit of linearity, LOL)	
6. Εκλεκτικότητα	Συντελεστής εκλεκτικότητας	

Στο τμήμα αυτό ορίζουμε το καθένα από τα έξι μέτρα αξιολόγησης του Πίνακα 1-3. Τα αριθμητικά αυτά χαρακτηριστικά χρησιμοποιούνται στο υπόλοιπο του κειμένου κατά τη συζήτηση των οργάνων και των αναλυτικών μεθόδων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-4 Άλλα χαρακτηριστικά που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά την επιλογή μεθόδου

ΠΟΙΟΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
1. Ταχύτητα
2. Ευκολία και καταλληλότητα
3. Απαιτούμενη επδεξιότητα χρήστη
4. Κόστος και διαθεσιμότητα οργάνων
5. Κόστος ανά δείγμα

### Επαναληψιμότητα\*

Όπως δείχνουμε στο Τμήμα α1Α, του Παραρτήματος 1, η επαναληψιμότητα (precision) των αναλυτικών δεδομένων αποτελεί τον βαθμό αμοιβαίας συμφωνίας μεταξύ των δεδομένων τα οποία λαμβάνονται με τον ίδιο τρόπο. Η επαναληψιμότητα αποτελεί μέτρο του τυχαίου ή απροσδιόριστου σφάλματος της ανάλυσης. Στα κριτήρια αξιολόγησης της επαναληψιμότητας περιλαμβάνεται η απόλυτη τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας (coefficient of variation, CV) και η μεταβλητότητα ή διακύμανση (variance).

\* Σημ. μεταφραστών: Ως προς την απόδοση των όρων precision και accuracy στα ελληνικά βλέπε σελ. ΠΑΡ-1.

## Μεροληψία

→ Όπως δείχνουμε στο Τμήμα α1Α-2, του Παραρτήματος 1, η μεροληψία (bias) αποτελεί μέτρο του συστηματικού ή καθορισμένου σφάλματος μιας αναλυτικής μεθόδου. Η μεροληψία ορίζεται από την εξίσωση

$$\text{μεροληψία} = \mu - x_i \quad (1-1)$$

όπου  $\mu$  είναι η μέση τιμή του πληθυσμού για τη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα με πραγματική συγκέντρωση  $x_i$ . Ο προσδιορισμός της μεροληψίας πραγματοποιείται με ανάλυση ενός ή περισσότερων πρότυπων υλικών αναφοράς, των οποίων η περιεκτικότητα σε αναλύτη είναι γνωστή. Πηγές αυτού του είδους υλικών δίνονται στις αναφορές 3 και 4 στο Τμήμα α1Α-2 του Παραρτήματος 1. Ωστόσο τα αποτελέσματα μιας ανάλυσης αυτού του είδους θα περιλαμβάνουν τυχαία και συστηματικά σφάλματα. Εάν πραγματοποιηθεί ικανός αριθμός αναλύσεων, η μέση τιμή μπορεί να προσδιορισθεί με δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Όπως φαίνεται στο Τμήμα α1Β-2 του Παραρτήματος 1, η μέση τιμή 20 ή 30 επαναλαμβανόμενων μετρήσεων μπορεί να θεωρηθεί ως μια καλή εκτίμηση της μέσης τιμής του πληθυσμού για την Εξίσωση 1-1. Κάθε διαφορά μεταξύ αυτής της τιμής και της γνωστής συγκέντρωσης του αναλύτη στο πρότυπο υλικό αναφοράς μπορεί να θεωρηθεί ότι εκφράζει τη μεροληψία.

Εάν η εκτέλεση 20 επαναλαμβανόμενων μετρήσεων στο πρότυπο δείγμα είναι πρακτικά ανέφικτη, η πιθανή παρουσία ή απουσία μεροληψίας μπορεί να εκτιμηθεί, όπως δείχνεται στο Παράδειγμα α1-7 του Παραρτήματος 1.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1-5 Μέτρα αξιολόγησης της επαναληψιμότητας των αναλυτικών μεθόδων

Όροι	Ορισμός*
Απόλυτη τυπική απόκλιση, $s$	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$
Σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD)	$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$
Τυπική απόκλιση της μέσης τιμής, $s_m$	$s_m = s / \sqrt{N}$
Συντελεστής μεταβλητότητας, CV	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$
Μεταβλητότητα (ή διακύμανση)	$s^2$

\*  $x_i$  = αριθμητική τιμή της  $i$  μέτρησης

$$\bar{x} = \text{μέση τιμή } N \text{ μετρήσεων} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

Κανονικά κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου γίνεται κάθε προσπάθεια για να εντοπισθεί η πηγή μεροληψίας και στη συνέχεια να εξουδετερωθεί ή να διορθωθεί με τη χρήση *τυφλών* (blanks) και με βαθμονόμηση του οργάνου.



## Ευαισθησία

Έχει συμφωνηθεί ως *ευαισθησία* (sensitivity) ενός οργάνου ή μιας μεθόδου να προσδιορίζεται το μέτρο της ικανότητάς τους να διακρίνουν μικρές διαφορές στη συγκέντρωση του αναλύτη. Δύο παράγοντες καθορίζουν την ευαισθησία: η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και η επαναληψιμότητα της συσκευής μέτρησης. Μεταξύ δύο μεθόδων που παρουσιάζουν την ίδια επαναληψιμότητα, η πιο ευαίσθητη είναι εκείνη η οποία έχει καμπύλη βαθμονόμησης με τη μεγαλύτερη κλίση. Ανάλογα, εάν δύο μέθοδοι έχουν καμπύλες βαθμονόμησης με ίσες κλίσεις, η πιο ευαίσθητη είναι εκείνη με την καλύτερη επαναληψιμότητα.

Ο ποσοτικός ορισμός της ευαισθησίας που έχει γίνει δεκτός από τη Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC), αφορά την *ευαισθησία βαθμονόμησης*, η οποία εκφράζεται από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης στην περιοχή συγκέντρωσης που μας ενδιαφέρει. Οι περισσότερες καμπύλες βαθμονόμησης στην αναλυτική χημεία είναι γραμμικές και μπορούν να περιγραφούν με την εξίσωση

$$S = mc + S_{b1} \quad (1-2)$$

όπου  $S$  είναι το μετρούμενο σήμα,  $c$  η συγκέντρωση του αναλύτη,  $S_{b1}$  το σήμα του τυφλού (blank) και  $m$  η κλίση της ευθείας. Η ποσότητα  $S_{b1}$  αντιστοιχεί στην τομή της ευθείας γραμμής στην τεταγμένη. Στις καμπύλες αυτές, η *ευαίσθησία βαθμονόμησης* είναι ανεξάρτητη της συγκέντρωσης  $c$  και είναι ίση προς  $m$ . Η ευαισθησία βαθμονόμησης ως βαθμός αξιολόγησης μειονεκτεί στο ότι δεν εξαρτάται από την επαναληψιμότητα των επιμέρους μετρήσεων.

Οι Mandel και Stiehler<sup>2</sup> αναγνώρισαν την ανάγκη να περιλάβουν την επαναληψιμότητα σε ένα μαθηματικώς πληρέστερο ορισμό της ευαισθησίας και πρότειναν την *αναλυτική ευαισθησία*,  $\gamma$ :

$$\gamma = m / s_s \quad (1-3)$$

Εδώ  $m$  είναι πάλι η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και  $s_s$  είναι η τυπική απόκλιση της μέτρησης.

Πλεονέκτημα της αναλυτικής ευαισθησίας είναι η σχετική απουσία εξάρτησής της από διάφορους ενισχυτικούς παράγοντες. Για παράδειγμα πενταπλασιασμός της απολαβής (συντελεστή ενίσχυσης) ενός οργάνου θα προκαλέσει πενταπλασιασμό του  $m$ . Αυτή η αύξηση όμως θα συνοδεύεται και από αντίστοιχη αύξηση του  $s_s$ , οπότε η αναλυτική ευαισθησία θα παραμείνει σχεδόν η ίδια. Ένα δεύτερο πλεονέκτημα της αναλυτικής ευαισθησίας αποτελεί το γεγονός ότι είναι ανεξάρτητη από τις μονάδες μέτρησης του  $S$ .

Μειονέκτημα της αναλυτικής ευαισθησίας είναι η συχνή εξάρτησή της από τη συγκέντρωση, επειδή οι τιμές  $s_s$  μπορεί να εξαρτώνται από τη συγκέντρωση.

## Όριο ανίχνευσης

Ο γενικά αποδεκτός ορισμός του *ορίου ανίχνευσης* (detection limit) είναι, ότι αποτελεί την ελάχιστη συγκέντρωση ή μάζα του αναλύτη, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί με καθορισμένη στάθμη (ή επίπεδο) εμπιστοσύνης. Το όριο εξαρτάται από τον λόγο της τιμής του αναλυτικού σήματος προς το μέγεθος των στατιστικών διακυμάνσεων του σήματος του τυφλού. Εάν το αναλυτικό σήμα δεν είναι μεγαλύτερο από το σήμα του τυφλού κατά ένα πολλαπλάσιο της μεταβλητότητας του τυφλού  $k$ , λόγω τυχαίων σφαλμάτων, είναι αδύνατη η ανίχνευση αναλυτικού σήματος με βεβαιότητα. Επομένως το αναλυτικό σήμα και η τυπική του απόκλιση πλησιάζουν το σήμα του τυφλού  $S_{b1}$  και την τυπική του απόκλιση  $s_{b1}$ , καθώς προσεγγίζεται το όριο ανίχνευσης. Συνεπώς ως ελάχιστο αναλυτικό σήμα  $S_m$  που μπορεί να γίνει αντίληπτό θεωρείται το άθροισμα του μέσου τυφλού σήματος  $S_{b1}$  και του πολλαπλασίου ( $\times k$ ) της τυπικής απόκλισης του τυφλού, δηλαδή είναι

$$S_m = S_{b1} + kS_{b1}, \quad k=3$$

<sup>2</sup> J. Mandel and R. D. Stiehler, *J. Res. Natl. Bur. Std.*, 1964, A53, 155.

$S_m = \text{όριο ανίχνευσης}$   
detection limit

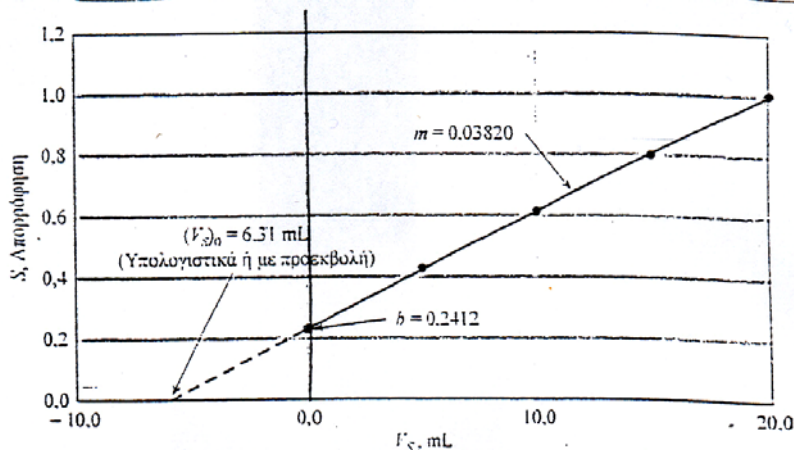
## 1Ε Η ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗ ΣΤΙΣ ΕΝΟΡΓΑΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Όλοι οι τύποι αναλυτικών μεθόδων, με δύο εξαιρέσεις, απαιτούν βαθμονόμηση (calibration), μια διαδικασία που συνδέει το μετρούμενο αναλυτικό σήμα με τη συγκέντρωση του αναλύτη.<sup>9</sup> Οι τρεις πιο συνηθισμένες μέθοδοι βαθμονόμησης περιλαμβάνουν τη χάραξη και χρήση καμπύλης βαθμονόμησης, τη μέθοδο γνωστής προσθήκης και του εσωτερικού προτύπου.

### 1Ε-1 Καμπύλες βαθμονόμησης

Κατά τη χρήση της τεχνικής της καμπύλης βαθμονόμησης (calibration curve) εισάγονται στο όργανο αρκετά πρότυπα διαλύματα με ακριβώς γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη και καταγράφεται η ένδειξη του οργάνου. Συνήθως ακολουθεί διόρθωση των ενδείξεων αυτών ως προς την ένδειξη του τυφλού. Στην ιδανική περίπτωση το τυφλό περιέχει όλα τα συστατικά του δείγματος εκτός από τον αναλύτη. Με τα προκύπτοντα δεδομένα σχεδιάζεται διάγραμμα της διορθωμένης ένδειξης του οργάνου ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

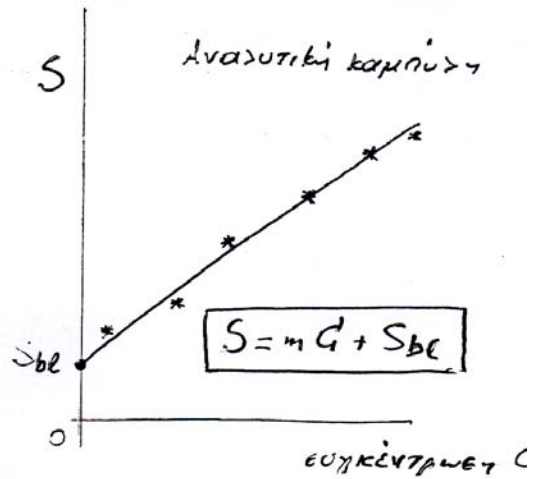
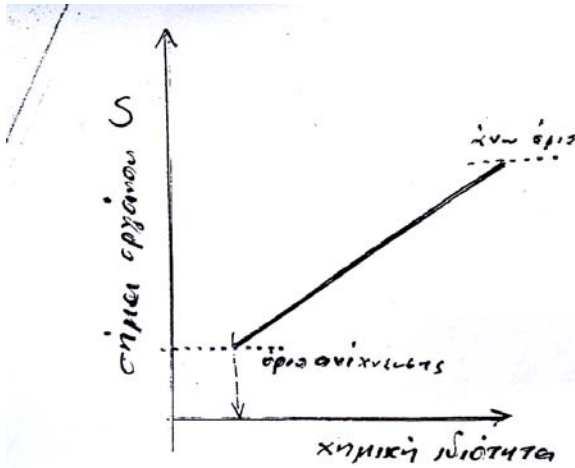
Στο Σχήμα 1-8 παρουσιάζεται μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης (που ονομάζεται επίσης καμπύλη εργασίας ή αναλυτική καμπύλη ή καμπύλη αναφοράς). Συχνά λαμβάνονται διαγράμματα τα οποία είναι γραμμικά σε μια αρκετά ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων (δυναμική περιοχή). Τα διαγράμματα αυτά είναι επιθυμητό να είναι γραμμικά, επειδή υπόκεινται σε μικρότερο βαθμό σε σφάλματα σε σχέση με τις μη γραμμικές καμπύλες. Δεν είναι όμως ασυνήθιστο να προκύπτουν μη γραμμικά διαγράμματα, τα οποία απαιτούν μεγαλύτερο αριθμό δεδομένων βαθμονόμησης (περισσότερα πρότυπα διαλύματα) για να εξακριβωθεί ακριβέστερα η σχέση μεταξύ ένδειξης οργάνου και συγκέντρωσης. Συνήθως, από την καμπύλη βαθμονόμησης προκύπτει μια εξίσωση με τη μέθοδο ελάχιστων τετραγώνων (Παράρτημα α11), ώστε να είναι δυνατός ο άμεσος υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων.



Σχήμα 1-8 Γραμμική καμπύλη βαθμονόμησης για τη μέθοδο των γνωστών προσθηκών. Η συγκέντρωση του αγνώστου υπολογίζεται από την κλίση  $m$  και την τομή στον άξονα των τεταγμένων  $b$ , ή από την προεκβολή της ευθείας, όπως περιγράφεται στο κείμενο.

<sup>9</sup> Οι δύο εξαιρέσεις είναι οι βαρυμετρικές και οι coulομετρικές μέθοδοι. Και στις δύο περιπτώσεις, η σχέση μεταξύ της μετρούμενης ποσότητας και της συγκέντρωσης του αναλύτη μπορεί να υπολογισθεί με χρήση επακριβώς γνωστών φυσικών σταθερών.





• Κάτω όριο = όριο ανίχνευσης ( $S_m$ ) (detection limit)

• από την κλίση βρίσκουμε την ευαισθησία:  $m$

• άνω όριο = το βήμα αλλοιώνεται ή θάβει στον κόρσο

• Αναλυτική ευαισθησία:  $\gamma$

$$\gamma = \frac{m}{S}$$

$S$  = τυπική απόκλιση.

ελάχιστο αναλυτικό βήμα

$$S_m = S_{be} + 3S_k$$

\* όριο ανίχνευσης: Detection Limit (DL) ή Limit of Detection (LOD),  
 $S_m \equiv DL = LOD = 3 \frac{S_{be}}{m}$  (είναι η μικρότερη συγκέντρωση δείγματος για την οποία υπάρχει σφάλμα μικτά 95% για την ύπαρξη αναλύτη στο δείγμα).

\* Στοθμη Ποσοτική Μέτρηση (LOQ) ( $\Rightarrow k=10$ )  $\Rightarrow LOQ = 10 \cdot \frac{S_{be}}{m}$   
 (είναι η μικρότερη συγκέντρωση για την οποία έχουμε αξιοπλήρη μέτρηση).

# Example- Sensitivity

## EXAMPLE 1-1

A least-squares analysis of calibration data for the determination of lead based upon its flame emission spectrum yielded the equation

$$S = 1.12 c_{\text{Pb}} + 0.312$$

where  $c_{\text{Pb}}$  is the lead concentration in parts per million and  $S$  is a measure of the relative intensity of the lead emission line. The following replicate data were then obtained:

Concn, ppm Pb	No. of Replications	Mean Value of $S$	$s$
10.0	10	11.62	0.15
1.00	10	1.12	0.025
0.000	24	0.0296	0.0082

Calculate (a) the calibration sensitivity, (b) the analytical sensitivity at 1 and 10 ppm of Pb, and (c) the detection limit.

- (a) By definition, the calibration sensitivity  $m$  is the slope of the straight line. Thus,  $m = 1.12$ .  
(b) At 10 ppm Pb,  $\gamma = m/s_S = 1.12/0.15 = 7.5$ .  
At 1 ppm Pb,  $\gamma = 1.12/0.025 = 45$ .  
(c) Applying Equation 1-4,

$$S_m = 0.0296 + 3 \times 0.0082 = 0.054$$

Substituting into Equation 1-5 gives

$$c_m = \frac{0.054 - 0.0296}{1.12} = 0.022 \text{ ppm Pb.}$$

## *Calibration Sensitivity*

$$S = mc + S_{bl}$$

where

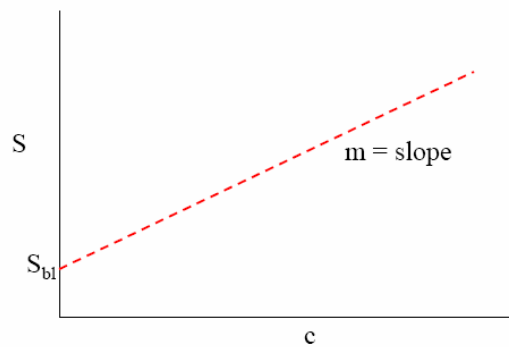
$S$  = signal

$c$  = concentration

$S_{bl}$  = signal of blank

$m$  = slope (Calibration Sensitivity)

## *Calibration Sensitivity (m)*



$$S = mc + S_{bl}$$

## *Analytical Sensitivity*

$$\gamma = m / s_s$$

where

$m$  = slope

$s_s$  = standard deviation  
of the measurement

## *Signal Detection Limit*

$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl}$$

where,

$S_m$  = minimum distinguishable signal

$\bar{S}_{bl}$  = mean blank signal

$s_{bl}$  = standard deviation of blank signal

$k$  = 3 for Detect. Limit and 10 for LOQ



## *Concentration Detection Limit*

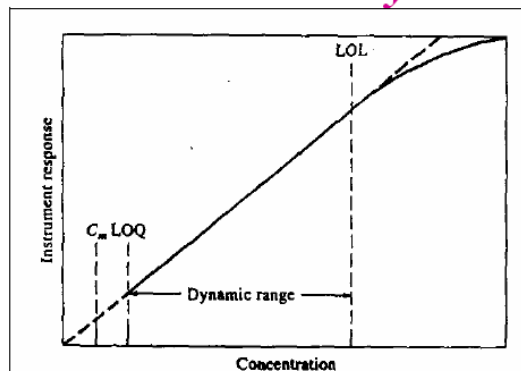
$$S_m = \bar{S}_{bl} + k s_{bl}$$

$$S = mc + S_{bl}$$

$$c = \frac{S - S_{bl}}{m}$$

$$c_m = \frac{S_m - S_{bl}}{m}$$

## *Limits of Quantitation and Linearity*



**Figure 1-7** Useful range of an analytical method. LOQ = limit of quantitative measurement; LOL = limit of linear response.

## Example- Sensitivity

### EXAMPLE 1-1

A least-squares analysis of calibration data for the determination of lead based upon its flame emission spectrum yielded the equation

$$S = 1.12 c_{Pb} + 0.312$$

where  $c_{Pb}$  is the lead concentration in parts per million and  $S$  is a measure of the relative intensity of the lead emission line. The following replicate data were then obtained:

Concn, ppm Pb	No. of Replications	Mean Value of $S$	$s$
10.0	10	11.62	0.15
1.00	10	1.12	0.025
0.000	24	0.0296	0.0082

Calculate (a) the calibration sensitivity, (b) the analytical sensitivity at 1 and 10 ppm of Pb, and (c) the detection limit.

- (a) By definition, the calibration sensitivity  $m$  is the slope of the straight line. Thus,  $m = 1.12$ .  
 (b) At 10 ppm Pb,  $\gamma = m/s_S = 1.12/0.15 = 7.5$ .  
 At 1 ppm Pb,  $\gamma = 1.12/0.025 = 45$ .  
 (c) Applying Equation 1-4,

$$S_m = 0.0296 + 3 \times 0.0082 = 0.054$$

Substituting into Equation 1-5 gives

$$c_m = \frac{0.054 - 0.0296}{1.12} = 0.022 \text{ ppm Pb.}$$

## Selectivity

$$S = m_A c_A + m_B c_B + m_C c_C + S_{bl}$$

$$k_{B,A} = m_B / m_A$$

$$k_{C,A} = m_C / m_A$$

$$S = m_A (c_A + k_{B,A} c_B + k_{C,A} c_C) + S_{bl}$$

where the k's are the selectivity coefficients

## Calibration Selectivity

