



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν  
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

# Χημική κινητική

**Διάλεξη 6<sup>η</sup> –μέρος 2<sup>ο</sup>**

Δρ. Ανθή Πανάρα

Χημικός, MSc, PhD

# Χαρακτηριστικά ποιότητας αναλυτικών μεθόδων

- **Specificity / Selectivity** : Ειδικότητα / Εκλεκτικότητα
- **Accuracy**: Ακρίβεια
  - **Trueness**: Ορθότητα
- **Precision**: Πιστότητα
  - **Repeatability**: Επαναληψιμότητα
  - **Intermediate precision**: Ενδιάμεση πιστότητα
- **Ruggedness/Robustness**: Ανθεκτικότητα
- **Detectability**: Ανιχνευσιμότητα
  - **Detection Limit**: Όριο Ανίχνευσης
  - **Quantitation Limit**: Όριο Ποσοτικοποίησης
- **Sensitivity**: Ευαισθησία
- **Linearity**: Γραμμικότητα
- **Working Range**: Περιοχή Εργασίας

# Ειδικότητα (specificity) και εκλεκτικότητα (selectivity)

## Ειδικότητα (specificity)

Εκφράζει την **παρεμπόδιση** στον προσδιορισμό ενός συστατικού σε ένα δείγμα από τα άλλα συστατικά του μείγματος.

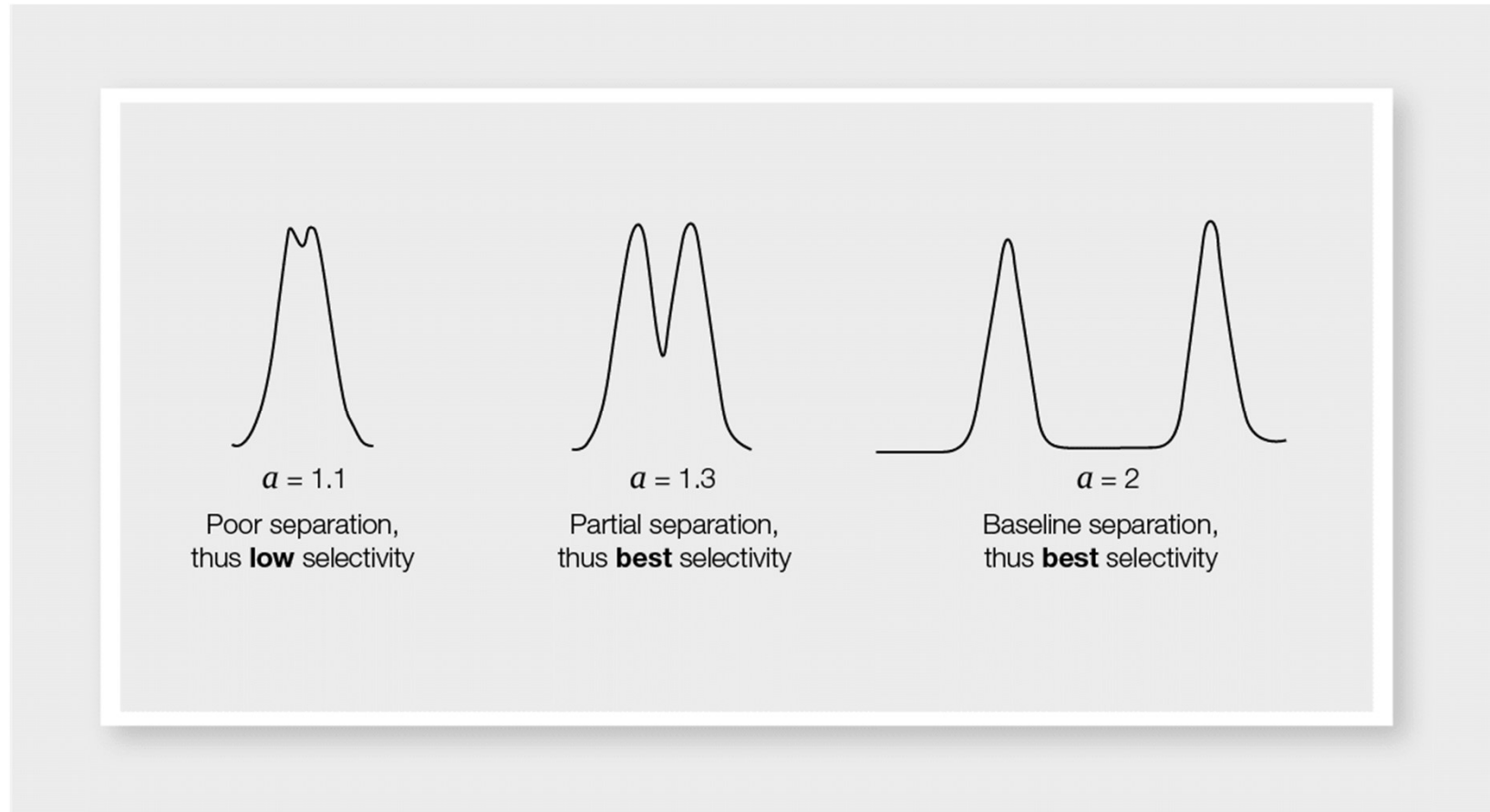
Μια μέθοδος είναι πλήρως **ειδική (specific)** για ένα αναλύτη, εάν η συγκέντρωσή του μπορεί να προσδιορισθεί με ακρίβεια χωρίς επίδραση από τα άλλα συστατικά του δείγματος. Τα άλλα συστατικά δεν παράγουν αναλυτικό σήμα.

## Εκλεκτικότητα (selectivity)

Μια μέθοδος είναι πλήρως **εκλεκτική (selective)**, εάν παρέχει ορθά αναλυτικά αποτελέσματα για τα διάφορα συστατικά του μείγματος χωρίς αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Μια εκλεκτική μέθοδος συνίσταται από μια σειρά ειδικών μετρήσεων.

Πολλές φορές δεν γίνεται διάκριση των δύο όρων και χρησιμοποιούνται ισοδύναμα

# Εκλεκτικότητα



$$R = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_A + w_B}$$

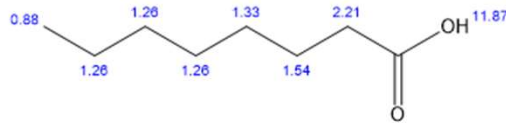
$t_R$  = χρόνοι ανάσχεσης (κατακρατήσεως)

$w$  = εύρος κορυφών

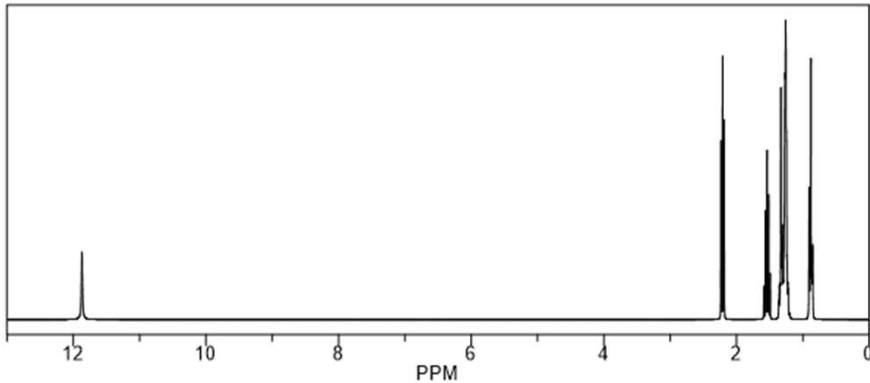
$R \geq 2$ , εάν  $R \leq 1,5$  ελέγχεται ο λόγος ύψους κορυφής προς κοιλάδα (peak to valley ratio)

# Εκλεκτικότητα

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation

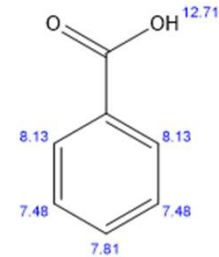


Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

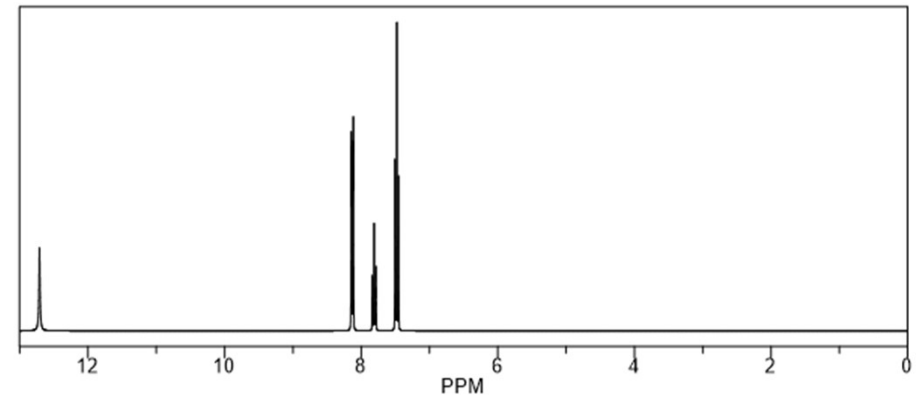


NMR φάσμα του εννεαονικού οξέος

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation



Estimation quality is indicated by color: good, medium, rough

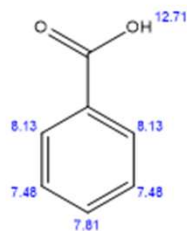
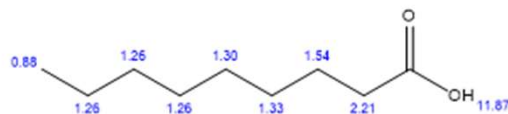


NMR φάσμα βενζοϊκού οξέος

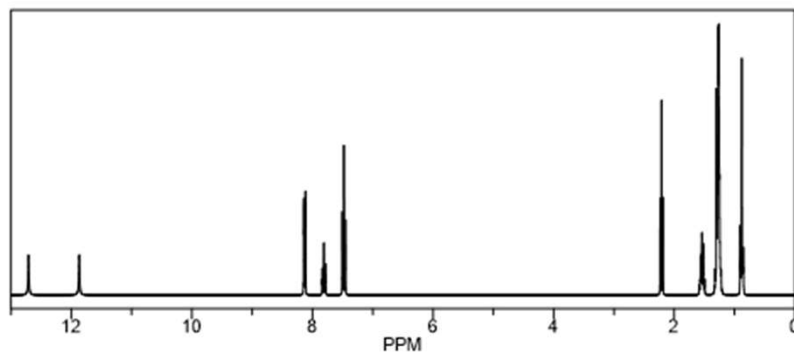
Τα φάσματα διαφέρουν. Η εκλεκτικότητα είναι ιδανική.

# Εκλεκτικότητα

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

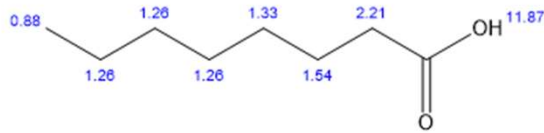


NMR φάσμα του μίγματος εννεονικού οξέος και βενζοϊκού οξέος

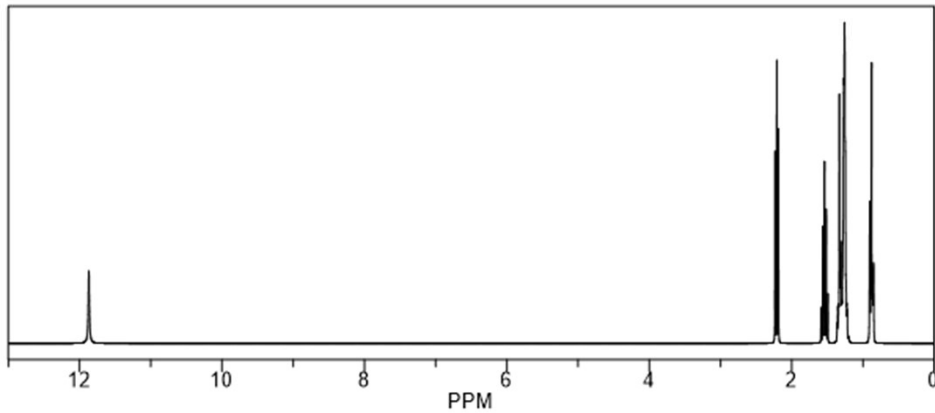
Το φάσμα NMR του μίγματος βενζοϊκού και εννεονικού οξέος. Μπορώ να τα ξεχωρίσω. Η εκλεκτικότητα είναι ιδανική. **Εκλεκτική μέθοδος.**

# Εκλεκτικότητα

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation

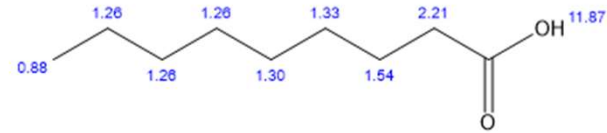


Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

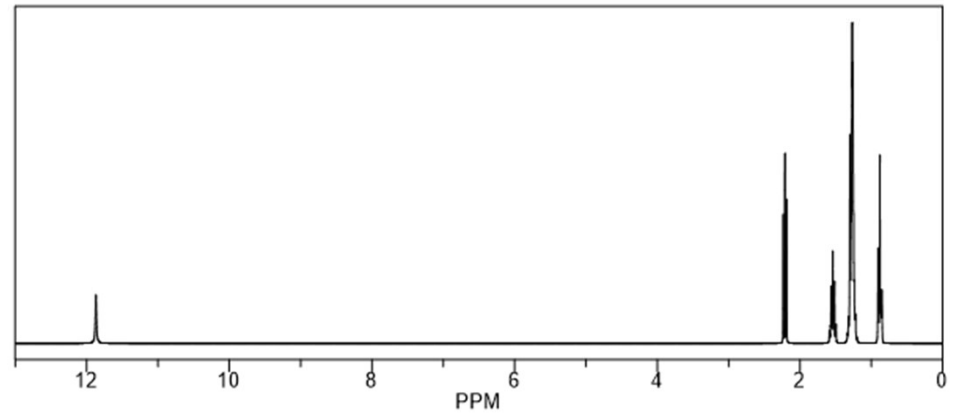


NMR φάσμα του εννεαονικού οξέος

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

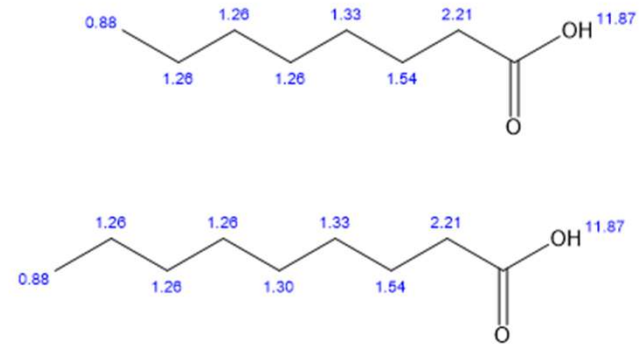


NMR φάσμα του δεκανοϊκού οξέος

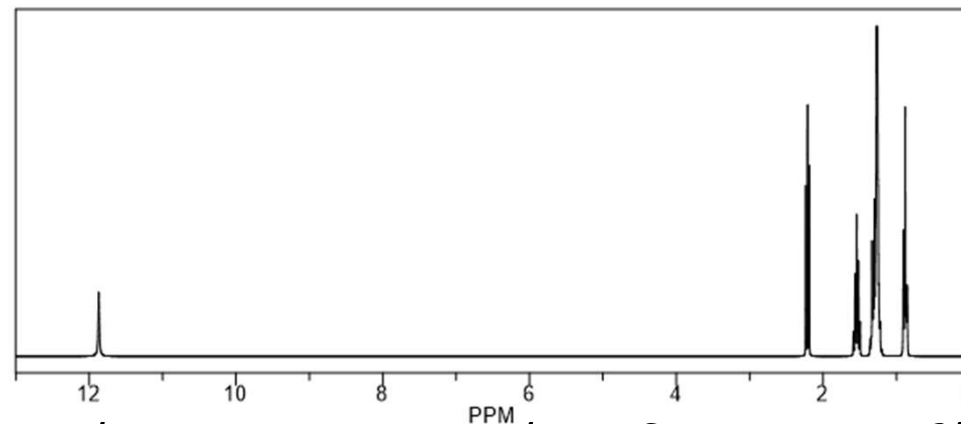
Τα φάσματα διαφέρουν πολύ λίγο. Η εκλεκτικότητα είναι πολύ μικρή.

# Εκλεκτικότητα

ChemNMR  $^1\text{H}$  Estimation



Estimation quality is indicated by color: **good**, **medium**, **rough**

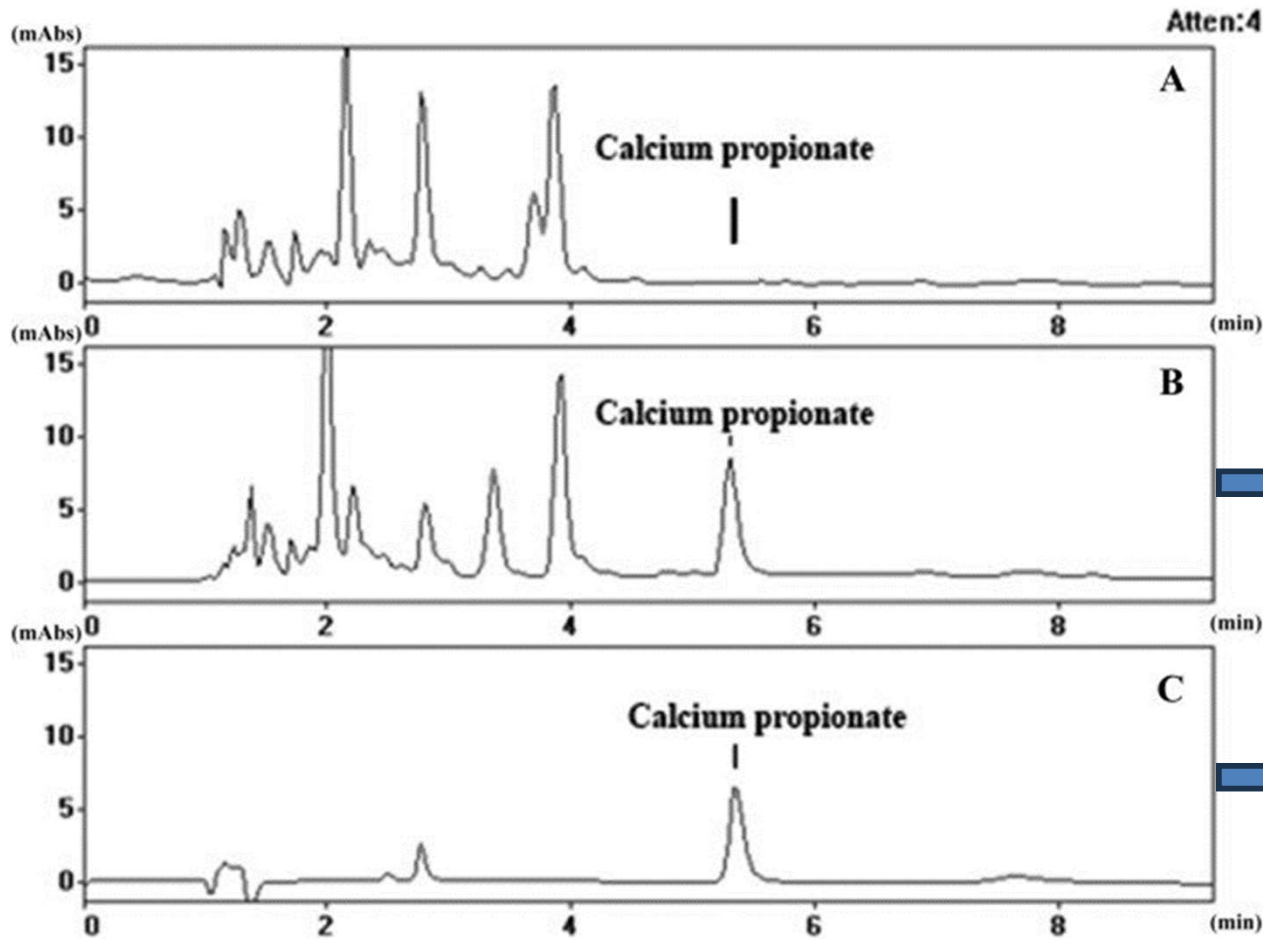


NMR φάσμα του μίγματος εννεαονικού και δεκανοϊκού οξέος

Από το φάσμα NMR δε μπορώ να τα διαχωρίσω. **Μη εκλεκτική μέθοδος.**



# Ειδικότητα (specificity) και εκλεκτικότητα (selectivity)



## Εκλεκτικότητα:

δεν έχει κάποια παρεμπόδιση  
στο χρόνο ελκούσης του  
calcium propionate

## Ειδικότητα :

δεν έχει άλλες  
παρεμποδίσεις

# Γραμμικότητα (linearity)

## Τι εκφράζει η γραμμικότητα;

Εκφράζει τη σχέση μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου και της απόκρισης του οργάνου.

$$y = a(\pm S_a)x + b(\pm S_b)$$

Όπου  $a$  : η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης

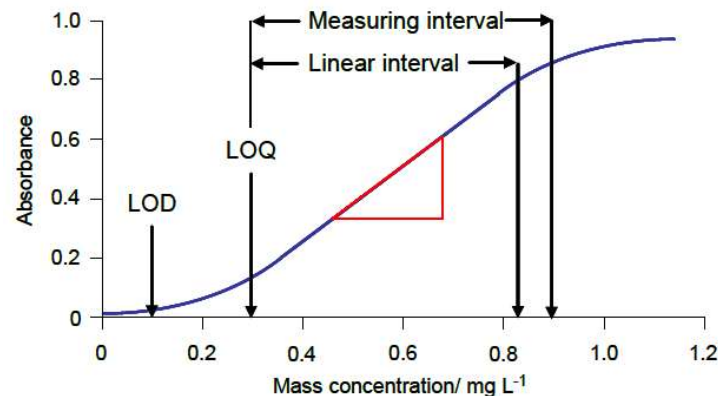
$S_a$  : τυπικό σφάλμα της κλίσης της ευθείας παλινδρόμησης

$b$  : τομή η τομή στον άξονα των  $y$  ( $y$ -intercept),

$S_b$  : τυπικό σφάλμα της τομής

## Που εξετάζεται η γραμμικότητα;

Εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου.



# Γραμμικότητα (linearity)

## Τι εκφράζει η γραμμικότητα;

Εκφράζει τη σχέση μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου και της απόκρισης του οργάνου.

$$y = a(\pm S_a)x + b(\pm S_b)$$

Όπου  $a$  : η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης

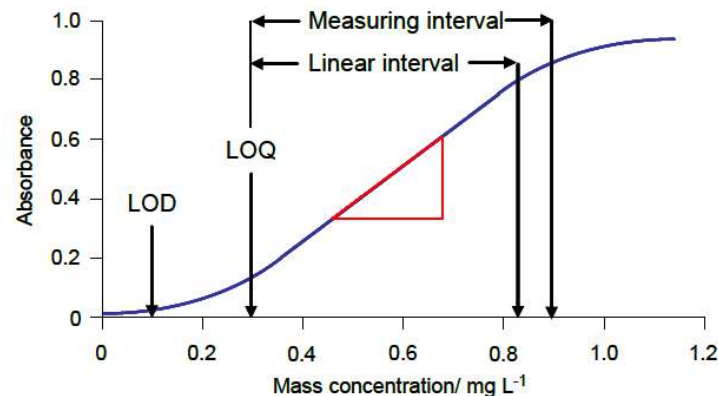
$S_a$  : τυπικό σφάλμα της κλίσης της ευθείας παλινδρόμησης

$b$  : τομή η τομή στον άξονα των  $y$  ( $y$ -intercept),

$S_b$  : τυπικό σφάλμα της τομής

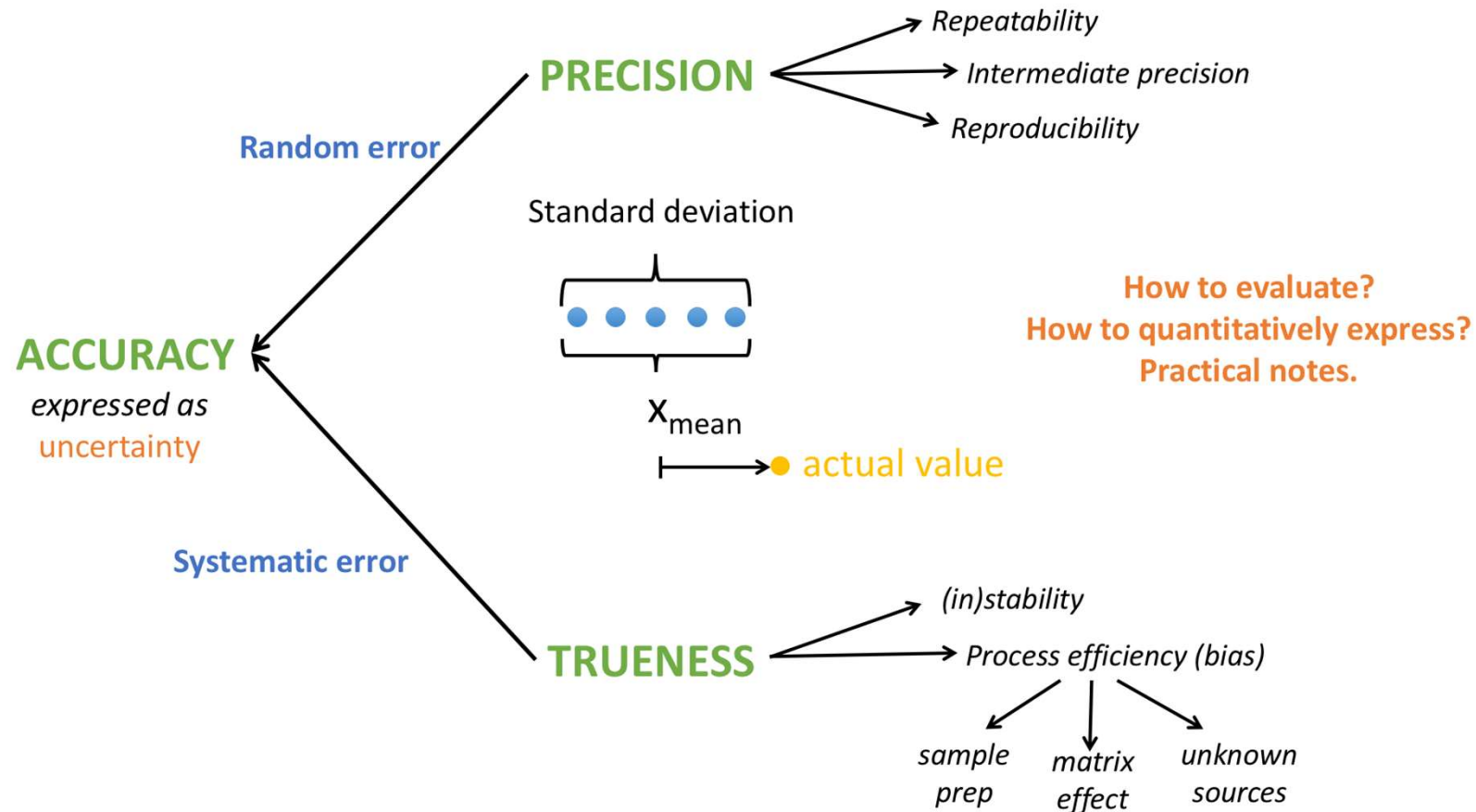
## Που εξετάζεται η γραμμικότητα;

Εξετάζεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων (range) της αναλυτικής μεθόδου.



# Ακρίβεια (accuracy)

- Η ακρίβεια εκφράζει την **εγγύτητα** ενός αποτελέσματος σε μια τιμή αναφοράς.
- Η επικύρωση της μεθόδου εξετάζει την ακρίβεια των αποτελεσμάτων, αξιολογώντας την επίδραση των **συστηματικών** και τα **τυχαίων σφάλματων** στα αποτελέσματα.
- Η ακρίβεια μελετάται ως η συνισταμένη της **ορθότητας** και της **πιστότητας**.



# Ορθότητα (Trueness)

## Πως εκφράζεται το bias;

Bias: στατιστικός όρος που αποδίδεται ως, αμεροληψία, συστηματικό σφάλμα, προκατάληψη, προδιάθεση, στρεβλότητα (Λεξικό χημικών όρων/[www.chem.uoa.gr](http://www.chem.uoa.gr))

Ως απόλυτο σφάλμα:  $b = x_{\text{mean}} - x_{\text{ref}}$

Ως σχετικό σφάλμα:

Αυστηρός τύπος  $R\% = \frac{C_{\text{spiked}} - C_0}{\Delta C} \times 100$

Ελαστικός τύπος  $R\% = \frac{C_{\text{spiked}}}{C_0 + \Delta C} \times 100$

- $x_{\text{mean}}$ : μέση τιμή
- $x_{\text{ref}}$ : τιμή αναφοράς
- $C_{\text{spiked}}$ : Συγκέντρωση εμβολιασμένου δείγματος
- $C_0$ : Αρχική συγκέντρωση δείγματος
- $\Delta C$ : Προστιθέμενη συγκέντρωση

# Πιστότητα (precision)

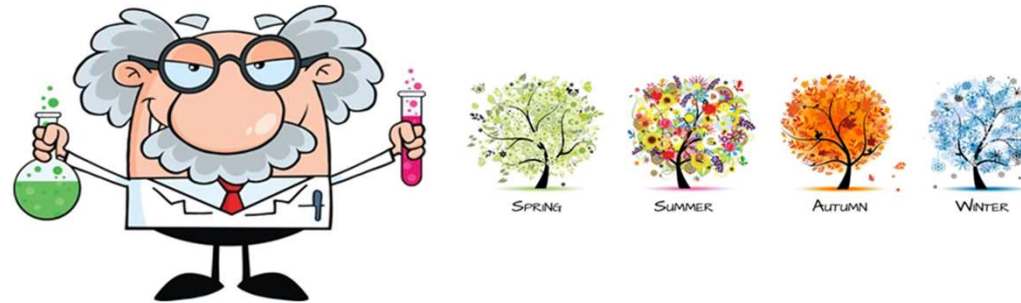
## Επαναληψιμότητα (repeatability)

ίδιες ακριβώς συνθήκες  
ίδιο εργαστήριο  
βραχύ χρονικό διάστημα



## ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision)

μακρύ χρονικό  
διάστημα εντός του  
ίδιου εργαστηρίου



## αναπαραγωγιμότητα (reproducibility)

διαφορετικό εργαστήριο



Υποσύνολα της  
πιστότητας

## Πιστότητα (precision)

Στην πράξη γίνονται περιορισμένες παρατηρήσεις (μετρήσεις) και λαμβάνονται ως εκτιμήτριες των:

- $\mu$  (αληθής τιμή): ο μέσος όρος (mean)  $x_{\text{mean}}$
- $\sigma$  (τυπική απόκλιση πληθυσμού): η τυπική απόκλιση  $s$  ή SD

Συχνά ως εκτιμήτρια της  $s$  μπορεί να ληφθεί από το εύρος (range) των μετρήσεων.

# Πιστότητα

## Πρακτικές παρατηρήσεις:

- Συνήθως ένα εργαστήριο ρουτίνας, μπορεί να προσδιορίσει την επαναληψιμότητα και την ενδιάμεση πιστότητα.
- Η αναπαραγωγιμότητα δεν μπορεί εύκολα να προσδιοριστεί.
- Ανάλογα με το μέγεθος του εργαστηρίου, στην ενδιάμεση πιστότητα το πιο σύνηθες είναι τα πειράματα να γίνονται σε διαφορετικές μέρες με διαφορετικούς αναλυτές ή αντιδραστήρια και αν είναι διαθέσιμα με διαφορετικά όργανα.
- Προσοχή στους όρους: παλαιότερα η ενδιάμεση πιστότητα και η αναπαραγωγιμότητα ταυτίζονταν.



# Ανιχνευσιμότητα

## Τι είναι η ανιχνευσιμότητα;

Η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει/ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη.

## Πως εκφράζεται;

Εκφράζεται ως:

- Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD)
- Όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ)

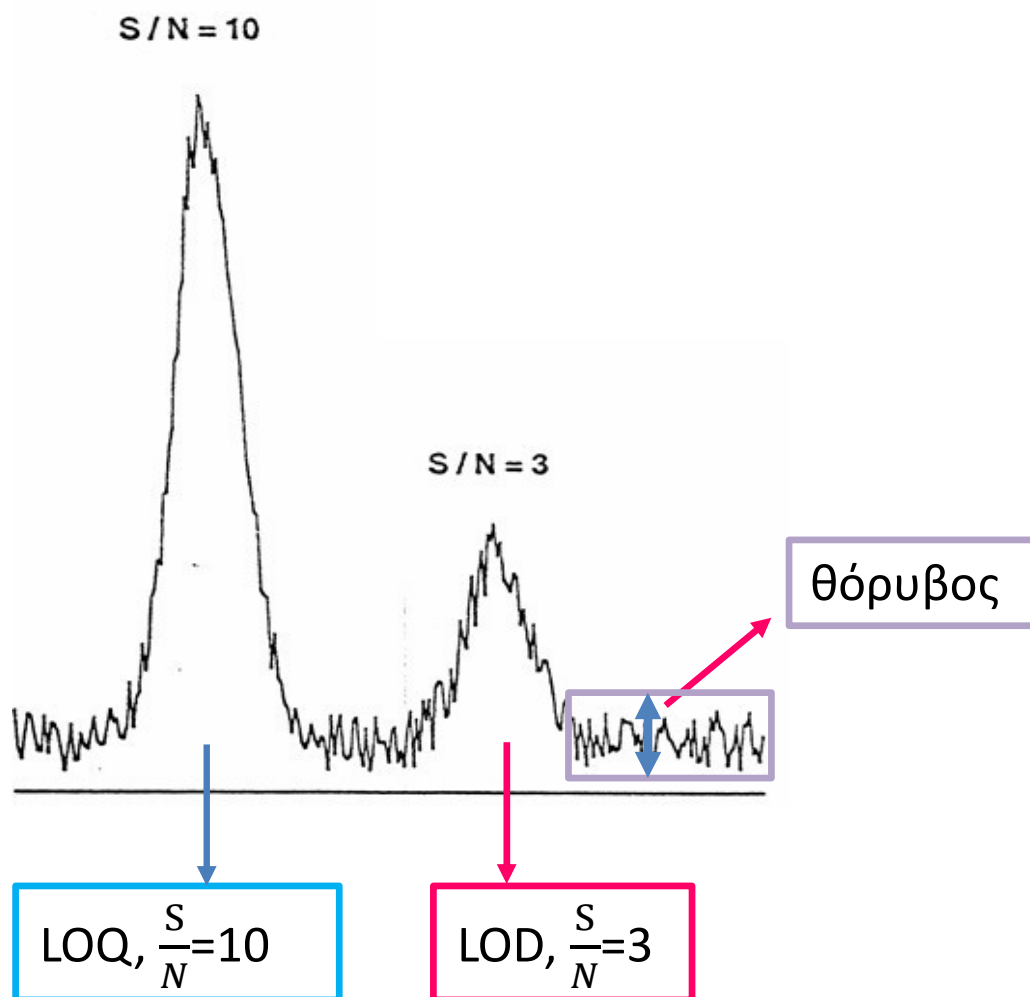
## Που βασίζεται ο ορισμός αυτών των ορίων;

Βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους.

# Αξιολόγηση ανιχνευσιμότητας

**Βάσει του λόγου σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio)**

Εφαρμόζεται σε **αναλυτικές μεθόδους** που παρουσιάζουν θόρυβο γραμμής βάσης (**baseline noise**). Γίνεται σύγκριση των σημάτων λευκού δείγματος (θόρυβος) και δειγμάτων με γνωστές χαμηλές συγκεντρώσεις.



$$\text{LOD}, \frac{S}{N} = 3,3 \text{ ή } \frac{S}{N} = 3$$

$$\text{LOQ}, \frac{S}{N} = 10$$

# Αξιολόγηση ανιχνευσιμότητας

Βάσει της τυπική απόκλισης (SD) της αναλυτικής απόκρισης (response) και της κλίσης (slope) (b) της καμπύλης απόκρισης:

$$LOD = \frac{3.3 \times SD}{b}$$

$$LOQ = \frac{10 \times SD}{b}$$

**Το SD μπορεί να εξαχθεί με διάφορους τρόπους:**

- Τυπική απόκλιση μετρηθέντων λευκών δείγματος (blank)
- Τυπική απόκλιση μετρηθέντων αγνώστων δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης
- Τυπική τυπικό σφάλμα της τομής (intercept)  $S_a$ ) καμπύλης αναφοράς σε χαμηλές συγκεντρώσεις (απαιτείται πειραματική επιβεβαίωση)
- Από το τυπικό σφάλμα των υπολοίπων ( $S_{y/x}$ ) της καμπύλης αναφοράς (απαιτείται πειραματική επιβεβαίωση)

# Ανθεκτικότητα

- Εκφράζει την αντοχή της μεθόδου σε τυχαίες μη σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων.
- Πραγματοποιούνται προσχεδιασμένες σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων.

## Περίπτωση HPLC:

Επίδραση μεταβολών pH κινητής φάσης

Επίδραση μεταβολών σύστασης κινητής φάσης

Διαφορετικές στήλες (παρτίδες ή/και προμηθευτής)

Θερμοκρασία

Ταχύτητα ροής

- Μπορεί να πραγματοποιηθεί κατά το τέλος των πειραμάτων βελτιστοποίησης ώστε να ελεγχθεί η ανθεκτικότητα, πριν προχωρήσουν τα επόμενα πειράματα.
- Μπορεί να αξιολογηθεί είτε ως ανάκτηση (%Recovery) είτε ως τυπική απόκλιση.
- **Προσοχή:** Δεν πραγματοποιούνται μεγάλες ή σημαντικές αλλαγές, σκοπός είναι να ελεγχθεί η αντοχή (robustness) σε μικροαλλαγές που ο αναλυτής δε θα μπορεί να ελέγξει κατά τη ρουτίνα.