



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Charakterizace a popis přípravy vzorku pro stopovou analýzu velmi malých vzorků

Školitel: Marie Konečná

Datum: 8.11.2013

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik



“Measure what is measurable,
and make measurable what is not so”

G. Galilei



Macroanalysis → Semi-microanalysis → Microanalysis

Stopová analýza (Trace Analysis)

Stopové množství (prvku) - průměrná koncentrace ve vzorku $\leq 100 \text{ ppm}^*$

Jednotky používané ve stopové analýze:

ppm (*part per million* $1 : 10^6$) $\mu\text{g.g}^{-1}$; mg.kg^{-1}

ppb (*part per billion* $1 : 10^9$) ng.g^{-1} ; $\mu\text{g.kg}^{-1}$

ppt (*part per trillion* $1 : 10^{12}$) pg.g^{-1} ; ng.kg^{-1}

ppq (*part per quadrilion* $1 : 10^{15}$) fg.g^{-1} ; pg.kg^{-1}

trace component 0,01 %

microtrace component 10^{-4} %

ultra-microtrace component 10^{-6} %

sub-microtrace component 10^{-8} %

stanovované analyty:

Anorganické (prvky, ionty, specie)

Organické (sloučeniny)



* - IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). ISBN 0-9678550-9-8. [doi:10.1351/goldbook](https://doi.org/10.1351/goldbook).

Pojmy (nejen) ve stopové analýze:

Měření (Measurement)

Soubor činností, jejichž cílem je stanovit hodnotu veličiny.

Set of operations having the object of determining a value of a quantity.

Skutečná hodnota (True value)

Hodnota charakterizující dokonale definovanou veličinu za podmínek, při nichž je veličina uvažována.

The value which characterizes a quantity perfectly defined in the conditions which exist when that quantity is considered

Konvenční skutečná hodnota (Conventional true value)

Hodnota veličiny, kterou můžeme pro daný účel nahradit skutečnou hodnotu veličiny.

A value of a quantity which, for a given purpose, may be substituted for the true value.

Dohodnutá referenční hodnota (Accepted reference value)

Hodnota, která se používá jako odsouhlasená referenční hodnota pro srovnání a která se získá jako

- a) teoretická nebo zavedená (ustanovená) hodnota, založená na vědeckých principech (viz skutečná hodnota)
- b) přidělená (určená) nebo certifikovaná hodnota založená na experimentální práci národní nebo mezinárodní organizace
- c) dohodnutá nebo certifikovaná hodnota založená na experimentální spolupráci pod dohledem (vedením) vědecké nebo inženýrské skupiny (viz konvenční skutečná hodnota)
- d) střední hodnota specifikovaného souboru výsledků měření, nejsou-li hodnoty podle a), b) a c) dosažitelné

A value that serves as an agreed-upon reference for comparison and which is derived as:

- a) a theoretical or established value, based on scientific principles;
- b) an assigned or certified value, based on experimental work of some national or international organisation;
- c) a consensus or certified value, based on collaborative experimental work under the auspices of a scientific or engineering group;
- d) when a), b), and c) are not available, the experimentation of the (measurable) quantity, i.e. the mean of a specified population of measurements.

Zjištěná hodnota (Observed value)

Hodnota určité vlastnosti získaná jako výsledek jediného pozorování

The value of a characteristic obtained as the result of a single observation

Výsledek zkoušky (testu) (Test result)

Hodnota určité vlastnosti získaná použitím určité zkušební metody.

The value of a characteristic obtained by carrying out a specified test method.

Výsledek měření (Result of a measurement)

Hodnota přisuzovaná měřené veličině získaná měřením.

Value attributed to a measurand, obtained by measurement.

Chyba výsledku (Error of result)

The test result minus the accepted reference value (of the characteristic).

Výsledek zkoušky minus dohodnutá referenční hodnota.



Náhodná chyba výsledku (Random error of result)

A component of the error which, in the course of a number of test results for the same characteristic, varies in an unpredictable way.

Složka chyby, která se u řady výsledků zkoušky na tutéž charakteristiku mění nepředvídatelným způsobem

Výsledek měření minus střední hodnota, která by se získala z nekonečně velkého souboru měření téže veličiny prováděných za podmínek opakovatelnosti. Náhodná chyba se rovná rozdílu chyby a systematické chyby. Vzhledem k tomu, že může být uskutečněn pouze konečný počet měření, je možné určit pouze odhad hodnoty náhodné chyby.

Systematická chyba výsledku (Systematic error of result)

A component of the error which, in the course of a number of test results for the same characteristic, remains constant or varies in a predictable way.

Složka chyby, která se u řady výsledků zkoušky na tutéž charakteristiku zůstává konstantní nebo se mění předvídatelným způsobem

Střední hodnota, která by se získala z nekonečně velkého souboru měření stejné veličiny získané za podmínek opakovatelnosti minus skutečná hodnota měřené veličiny. Systematická chyba je rovna rozdílu chyby a náhodné chyby. Stejně jako skutečná hodnota, nemohou být systematická chyba a její příčiny poznatelné.

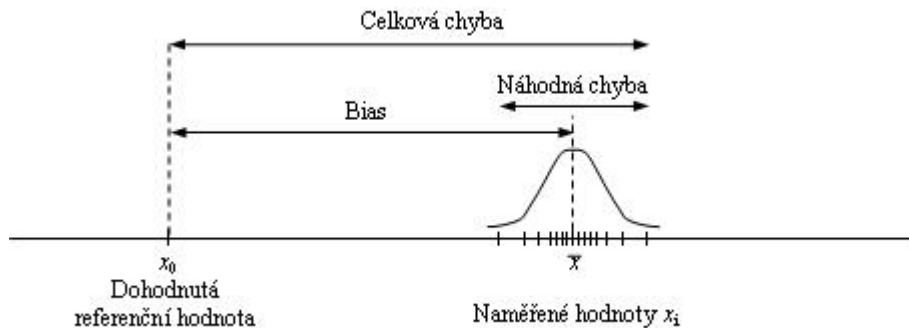
Odchylka (Bias)

The difference between the expectation of the test results and an accepted reference value.

Rozdíl mezi střední hodnotou výsledku zkoušky a přijatou referenční hodnotou.

Odchylka je celková systematická chyba (v protikladu k náhodné chybě). Složek systematické chyby, podílejících se na odchylce, může být více.

Větší systematická chyba od přijaté referenční hodnoty se projevuje ve větší hodnotě odchylky. Přijatou referenční hodnotou může být konvenční skutečná hodnota



Správnost (Accuracy)

The closeness of agreement between a test result and the accepted reference value.

Těsnost souhlasu mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou (konvenční skutečnou hodnotou) měřené veličiny.

Přesnost (Precision)

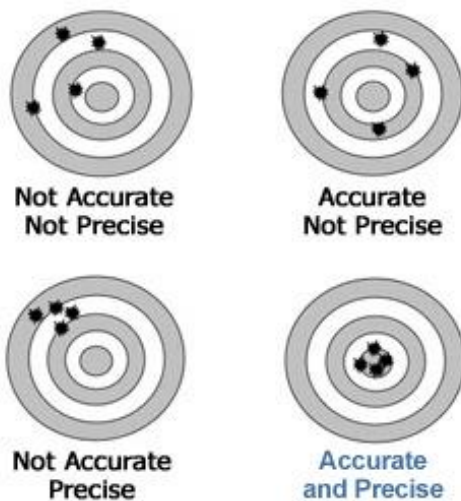
The closeness of agreement between independent test results obtained under stipulated conditions.

Těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušky získanými za předem specifikovaných podmínek.

Opakovatelnost (Repeatability)

Precision under repeatability conditions

Přesnost za podmínek opakovatelnosti.



Validace, verifikace

Regulační diagram

Standardní operační postup (SOP)

Certifikovaný referenční materiál

Kruhové testy



Calibration

The set of operations that establish, under specified conditions, the relationship between values of quantities indicated by a measuring instrument or measuring system, or values represented by a material measure or a reference material and the corresponding values realized by standards.

Calibration curve

Graphical representation of measuring signal as a function of quantity of analyte.

Noise

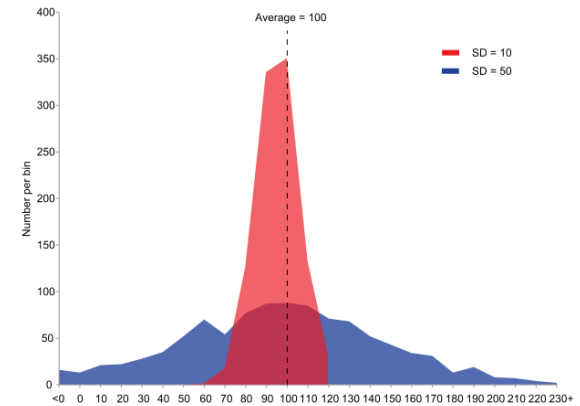
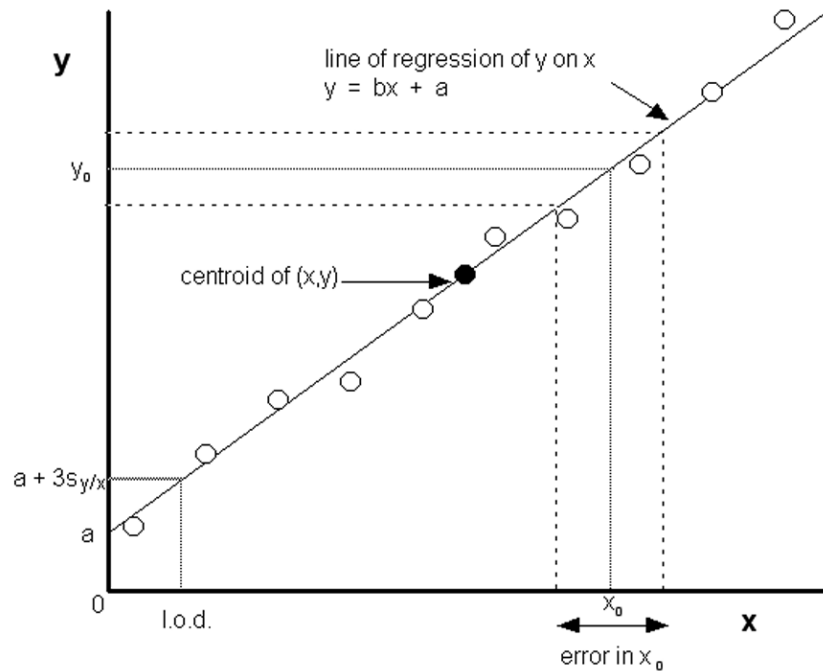
'difference between the maximum and minimum values of the signal in the absence of the analyte measured during two minutes'

Limit of detection (\neq sensitivity)

'the concentration of the analyte giving a signal equal to the blank plus 3 \times the standard deviation of the blank,

Limit of quantification (determination)

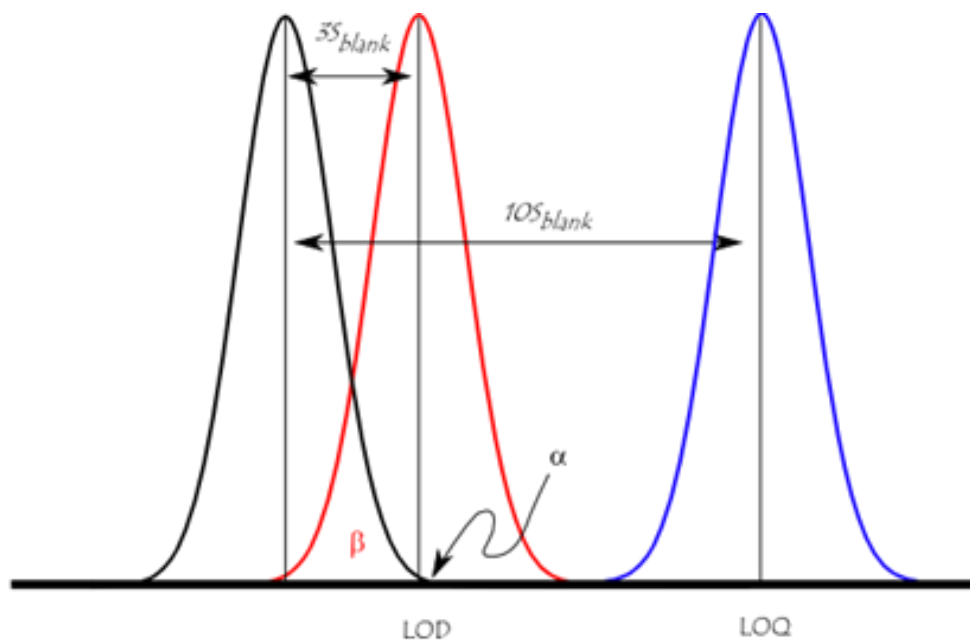
'the concentration of the analyte giving a signal equal to the blank plus 10 \times the standard deviation of the blank'



Směrodatná odchylka - kvadratický průměr odchylek hodnot znaku od jejich aritmetického průměru



Při předpokládaném Gaussovském rozložení, ze statistiky vyplývá, že v případě signálu rovnajícímu se hodnotě LOD je pouze 1% pravděpodobnost, že signál nepochází od analytu (α – error false positive). Nicméně, v případě, že koncentrace prvku ve vzorku má hodnotu LOD existuje 50% pravděpodobnost, že dostaneme signál nižší než LOD a prvek tak nebude detekován (β – error – false negative) viz. obrázek – červená křivka.

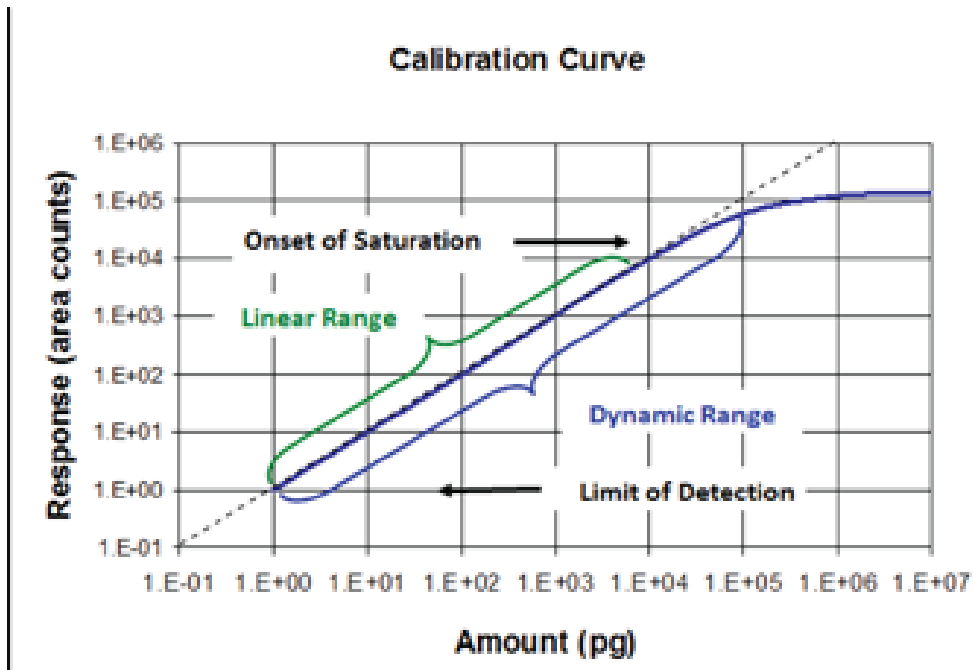


Z předcházejícího vztahu vyplývá, že LOQ je 3,33 násobkem limity detekce LOD. Dále lze ze statistiky vyvodit, že v případě meze stanovitelnosti dosahuje RSD hodnoty 15%. Pro představu pro dosažení RSD signálu 10% je třeba počítat s 15-ti násobkem směrodatné odchylky pozadí (5-ti násobek LOD) a pro dosažení RDS 5% pak s desetinásobkem LOD (viz lineární rozsah).

instrumentální mez detekce (měření blanků + čistých standardů)

<<

reálná mez detekce (zahrnuje i přípravu vzorku, možnost kontaminací, při měření interference a vliv matrice)



Spikování
Metoda standardního přídavku

-
-
-

Zaokrouhlování dle meze detekce:

LOD obvykle 1 platná číslice, stejný počet desetinných míst pro koncentraci analytu, ale u nejvyšších koncentrací je nutné zohlednit interval spolehlivosti!!!



Stopová analýza

Analýza technických vzorků, vod, ovzduší a plynů, potravin, zemědělských vzorků, půd, fyziologických vzorků, klinická a soudní analýza

Převod z makro do mikroměřítka

Chyby: vzrůst relativního povrchu kapaliny (zatímco v gramovém měřítku je nádobou kádinka v mikrogramovém měřítku je to kapilára \Rightarrow vliv koroze stěn nádoby, adsorpce na stěny, zvýšený styk se vzduchem, rychlejší odpařování, větší adsorpce plynů, mikrogramové měřítko – malé rozměry zařízení – eliminace chyb – manipulace v komůrce, opatření stěn hydrofóbní vrstvičkou,...)

Odběr vzorků: vliv velikosti částic, homogenizace,...

Mikrosonda

Mikrováhy (elektromagnetické, s křemenným rezonátorem)

Mikrogravimetrie

Mikroelektrogravimetrie

Mikrotitrace

Mikrofotometrie (speciální kyvety o objemu μl)



Kontaminace – zdroje:

Druhotné znečištění
z chemikálií
z prostředí

Částice v atmosféře

přírozený původ (půdní prach, mořská sůl, pyl, bakterie, sopečný popel)
průmyslový původ (polétavý prach, cementový prach, olejový spad)

Prach v laboratoři

Nábytek, přístroje, kovové potrubí, tlakové lahve, plynné kontaminanty,
zdroj kontaminace – práce v otevřených kádinkách

Požadavky na čistou laboratoř:

3 třídy čistých laboratoří (dle počtu částic o různém průměru / 1 m³
filtrace vzduchu (HEPA filtry)

ANALYTIK JAKO ZDROJ KONTAMINACÍ:

- OBLEČENÍ, PRSTY, RUKAVICE
- NEOPATRNÁ MANIPULACE SE VŠÍM
- JINÁ PRÁCE VE STEJNÉM PROSTŘEDÍ (KŘÍŽENÁ KONTAMINACE)
- VÍŘENÍ PRACHU

Instrumental methods in trace analysis:

- chromatography
 - spectral methods
 - elektrochemical methods
 - radiochemical metods
-
- **Hyphenated Techniques** combine chromatographic and spectral methods to exploit the advantages of both.

Biologicals and biomedical material:

- + fluids
- + tissues
- + foodstuffs

Preparation of the samples:

- + dilution (H_2O , HNO_3 , NH_3 , EDTA, Triton-X100, BuOH)
- + solubilization (TMAH 60-90°C)
- + digestion ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, MW)

Disadvantage of small sample volumes (amounts):

- no space for testing, optimization...
- risk of inadvertent dilution \Rightarrow analyte under LOD



BLOOD & URINE

Biological samples, such as dried blood and urine, in different forms of spots on different carriers (usually filter paper) can be analyzed by different manners. Extraction or ashing of blood spot punches (cut outs) followed by a solution analysis by atomic absorption spectrometry (AAS) or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is one of the most important ways how to analyze samples.

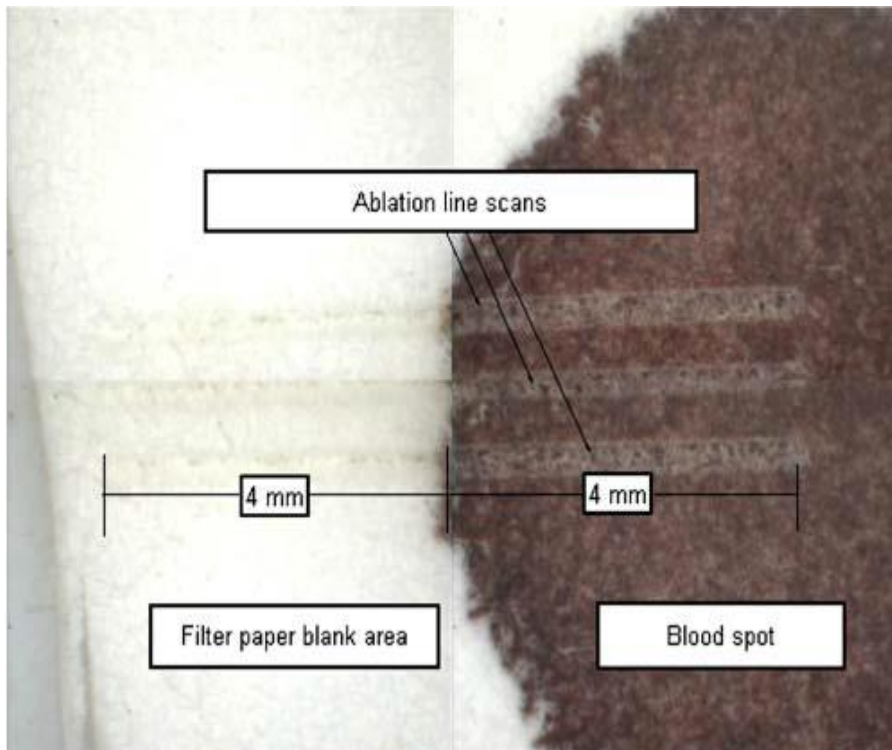
Rapid screening of dried blood or urine spots:

LA-ICP-MS (Laser Ablation – Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry)

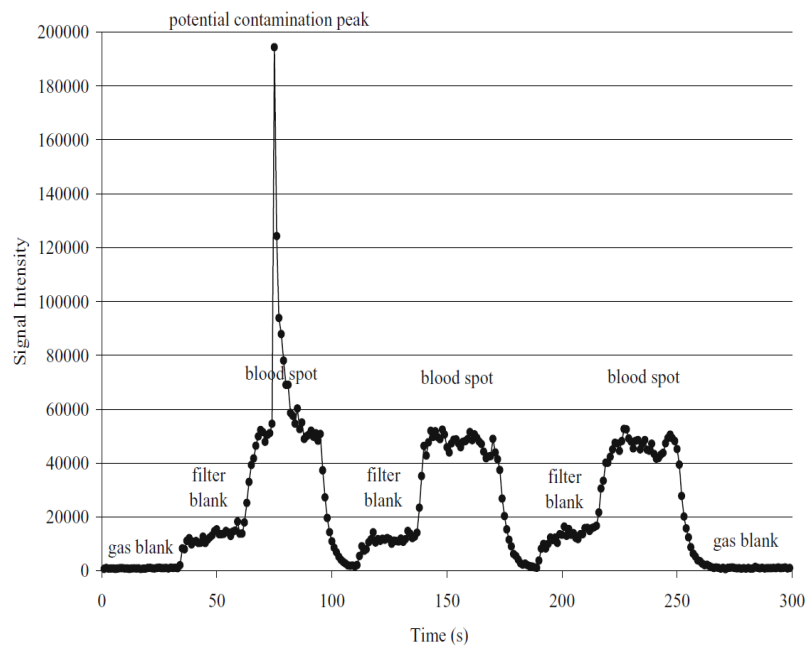
LIBS (Laser-Induced Breakdown Spectroscopy)



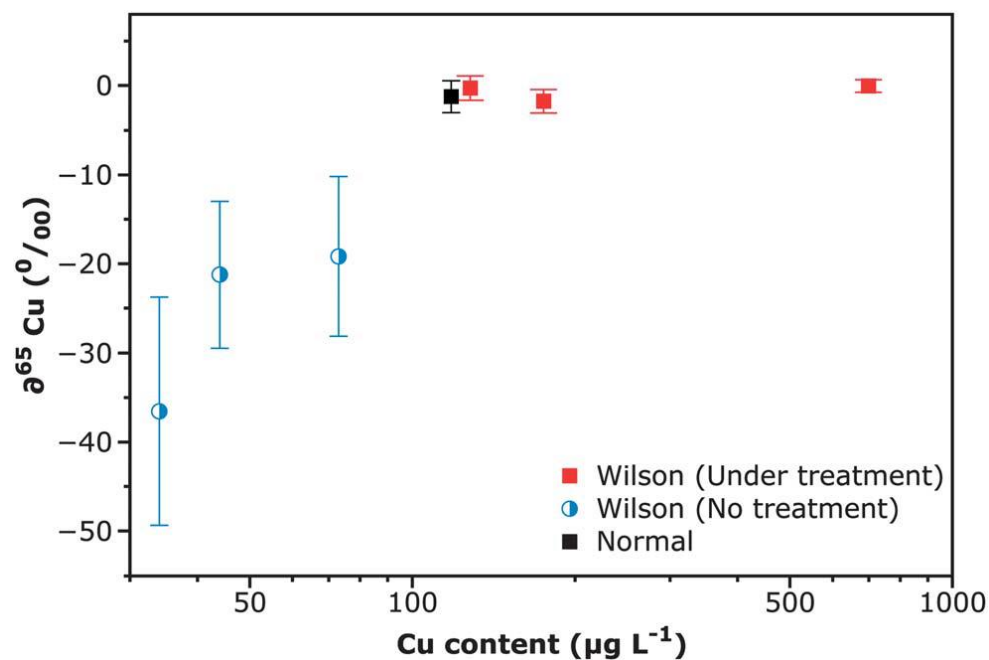
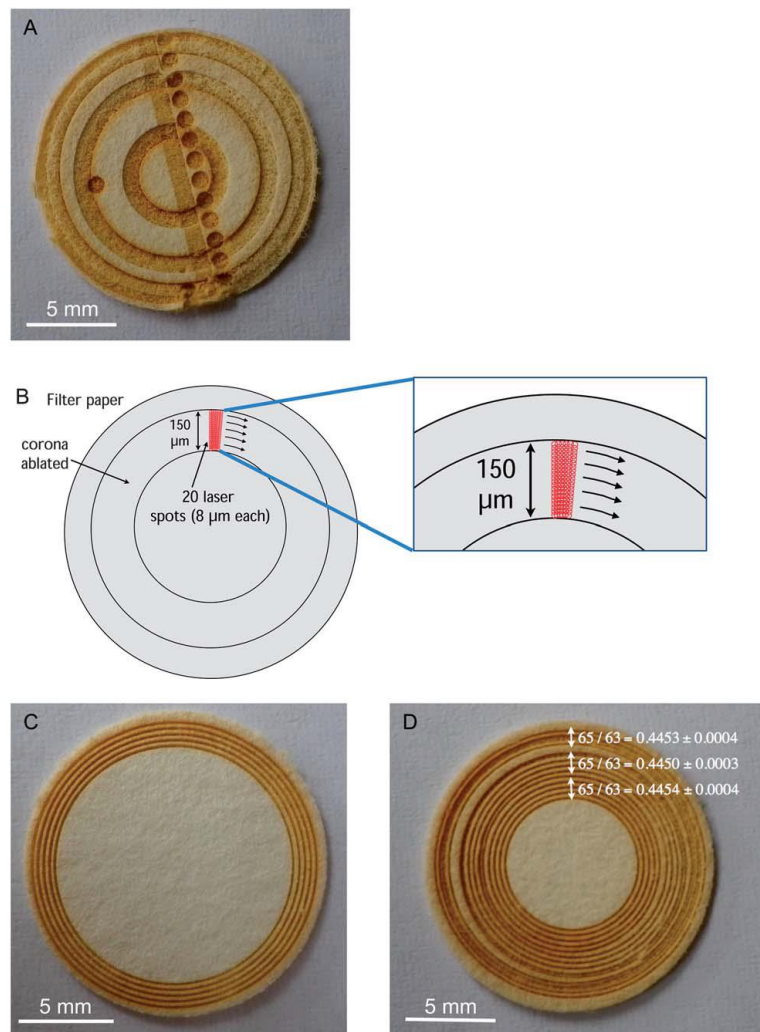
Cizdziel, J.V., *Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: a feasibility study*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007. **388**(3): p. 603-611.



ICP-MS Pb signal for three ablation scans of filter paper spotted with Seronorm whole blood reference material



Resano, M., et al., *Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease.* Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2013. **28**(1): p. 98-106.



References:

Metrologická terminologie v chemii (Terminologická komise: Doc. RNDr. Jiří Barek, CSc; Doc. Ing. Pavel Jánoš, CSc.; Ing. Ivan Koruna, CSc; Prof. RNDr. Milan Meloun, DrSc.; Ing. Zbyněk Plzák, CSc.; Ing. František Skácel, CSc.; Prof. Ing. Miloslav Suchánek, CSc.; Ing. Jan Tichý; Ing. Jan Vilímeč; Doc. Ing. František Vlášil, CSc.; Doc. MUDr. Tomáš Zima, DrSc.), dostupné na: http://www.vscht.cz/lam/new/barekterminologie2000_07_01.pdf

<http://goldbook.iupac.org/P04803.html>

K. Novotný a spol., Spektroskopie laserem buzeného plazmatu, MU Brno (rozpracovaná skripta)

S. L. R. Ellison, Trevor J. Farrant, Vicki Barwick: **Practical Statistics for the Analytical Scientist: A Bench Guide (RSC Publishing)**

<http://www.carolina.com/teacher-resources/Interactive/accuracy-versus-precision-beanbag-toss/tr10646.tr>



Thank you for your attention!





INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Thank you for your attention!

Reg.č.projektu: CZ.1.07/2.3.00/20.0148

Název projektu: Mezinárodní spolupráce v oblasti "in vivo" zobrazovacích technik

