

Ćwiczenie 7

Walidacja metody redoksymetrycznego oznaczania kwasu askorbowego w suplementach diety i w moczu osób suplementowanych witaminą C

Literatura

1. *Bulska E. Metrologia chemiczna, sztuka prowadzenia pomiarów. Malamut, Warszawa 2008.*
2. *Namieśnik J., Konieczka P., Zygmunt B. Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, 2009, Warszawa.*
3. *Cygański A. Chemiczne metody analizy ilościowej. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa 2005.*
4. *Walidacja metod analizy chemicznej, pod redakcją Pawlaczyk J, Zajęc M., Wydawnictwo Naukowe Akademii Medycznej im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań 2005.*

Celem ćwiczenia jest opanowanie zagadnień teoretycznych dotyczących procesu walidacji metod analitycznych oraz praktyczne poznanie procesu walidacji na przykładzie walidacji metody miareczkowania kwasu askorbowego zawartego w preparatach farmaceutycznych oraz w moczu osób suplementowanych witaminą C.

Zakres materiału: podstawy teoretyczne dotyczące walidacji metod analitycznych [definicja walidacji, parametry podlegające walidacji, statystyczne sposoby interpretacji wyników, zagadnienia statystyczne: średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe, przedziały ufności, test t-Student, test jednorodności dwóch wariancji (F-Snedecora). Zasada redoksymetrycznego oznaczania kwasu askorbowego przy użyciu 2,6-dichloroindofenolu oraz biologiczne znaczenie kwasu askorbowego. Zagadnienia z wykładu dotyczącego walidacji metod analitycznych.

I. Część teoretyczna

Walidacja metody analitycznej

Walidacja procedury pomiarowej jest jednym z elementów zapewniających jakość uzyskiwanych wyników pomiaru. **Walidacja jest to działanie mające na celu potwierdzenie w sposób udokumentowany, że zostały spełnione założone wymagania dotyczące metody analitycznej.** Walidacja ma na celu określenie parametrów analitycznych danej procedury pomiarowej w celu podjęcia decyzji o przydatności danej procedury do zamierzonego zastosowania.

Obowiązek walidacji metod analitycznych narzuca na producentów substancji aktywnych i/lub produktów leczniczych Rozporządzenie Ministra Zdrowia w sprawie wymagań Dobrej Praktyki Wytwarzania. Walidacja jest także wymagana przez urzędy państwowe w ramach rejestracji leków. Szczegółowe wymagania dotyczące walidacji metod analitycznych regulują wytyczne ICH (*ang. The International Conference of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use*): ICH Q2 (R1) "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology".

Przed przystąpieniem do procesu walidacji, należy określić przeznaczenie metody analitycznej oraz cechy charakterystyczne (tj. rodzaj oznaczanego składnika, poziom stężeń, rodzaj matrycy, obecność interferentów). Należy także określić, które parametry charakteryzujące metodę powinny być wyznaczone, a następnie wyznaczyć wartość tych parametrów i na tej podstawie określić czy metoda spełnia stawiane jej wymagania związane z zamierzonym zastosowaniem wyników analitycznych.

Do najważniejszych parametrów podlegających procesowi walidacji zaliczamy:

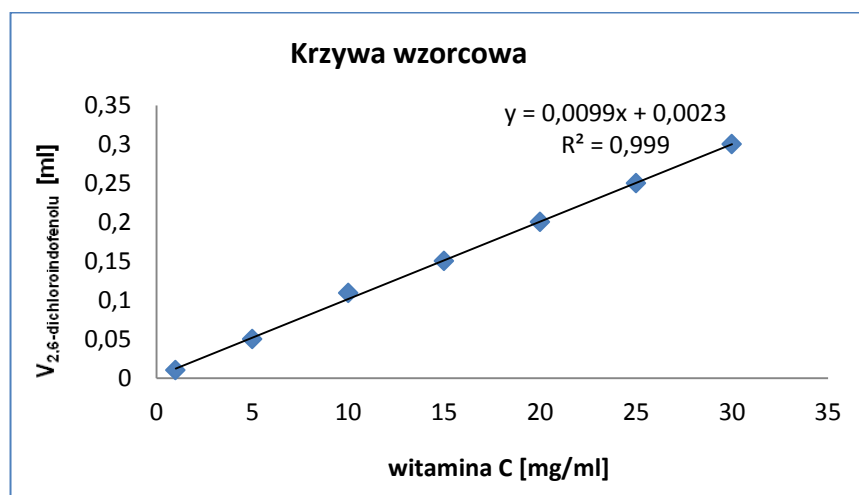
- liniowość
- dokładność
- precyzję (odtworzalność, powtarzalność)
- selektywność – specyficzność
- granicę wykrywalności
- granicę oznaczalności

Liniowość metody analitycznej określa możliwość uzyskania wartości mierzonej, jako wprost proporcjonalnej do stężenia analitu. Dlatego wykres powyższej zależności powinien mieć, w określonym przedziale stężeń, przebieg prostoliniowy. Zależność tą nazywamy **krzywą wzorcową** i wyrażamy wzorem:

$$y = ax + b$$

gdzie:

- y** – wartość mierzona
- x** – stężenie analitu
- a** – nachylenie krzywej wzorcowej
- b** – przesunięcie krzywej wzorcowej



W celu znalezienia zakresu liniowego krzywej wzorcowej przeprowadza się pomiary próbek roztworów wzorcowych na co najmniej 5 poziomach stężeń (najczęściej wykonując po 3 równoległe pomiary dla każdego poziomu). Dobór stężeń analitu w próbkach roztworów wzorcowych powinien obejmować zakres od 50 do 150% w odniesieniu do wartości oczekiwanej wyników analizy.

Dokładność metody określa stopień zgodności wyników uzyskanych z zastosowaniem danej metody analitycznej z wynikami rzeczywistymi (oczekiwanymi). Miarą dokładności metody analitycznej jest wielkość jej błędu systematycznego. Dokładność można wyznaczyć przeprowadzając badanie odzysku. Polega to na dodawaniu określonej ilości analitu do próbki, następnie oznaczeniu zawartość dodanego analitu i obliczenie odzysku na podstawie wzoru:

$$R = \frac{x_i}{\mu_i} \cdot 100\%$$

gdzie: x_i – oznaczona ilość analitu w badanej próbce; μ_i – znana ilość analitu w badanej próbce

Badanie odzysku powinno być przeprowadzone na podstawie co najmniej 9 równoległych oznaczeń na 3 różnych poziomach zawartości oznaczanego składnika (co najmniej po 3 oznaczenia na każdym poziomie stężeń). Metoda jest uznawana za dokładną jeżeli odzysk wynosić 95-105%.

Precyzja metody charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników oznaczeń wokół wartości średniej. Miarą precyzji jest względne odchylenie standardowe lub współczynnik zmienności W_z

(jeżeli wartość ta zostanie wyrażona w procentach). Precyzję określa się dla próbek na danym stałym poziomie stężeń. Precyzja obejmuje takie pojęcia jak: powtarzalność i odtwarzalność (wewnątrzlaboratoryjną i zewnątrzlaboratoryjną). **Powtarzalność** określa precyzję wyników uzyskiwanych w tych samych warunkach, czyli w danym laboratorium, za pomocą danej metody, dla danej próbki przez jednego analityka w krótkich odstępach czasu. Wartość odchylenia standardowego można obliczyć poprzez przeprowadzenie 6 niezależnych oznaczeń analitu w próbkach wzorcowych na poziomie stężenia odpowiadającego stężeniu w próbce rzeczywistej. **Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna** dotyczy wyników uzyskanych daną metodą, w danym laboratorium, w dłuższych odstępach czasu, jak również przy badaniach prowadzonych przez więcej niż jednego analityka. **Odtwarzalność zewnątrzlaboratoryjna** pozwala natomiast ocenić, czy dana metoda prowadzi do tych samych wyników w innym laboratorium, z różnymi analitykami, na innej aparaturze z zachowywaniem parametrów wymaganych w opisie metody.

Selektywność oznacza stopień, w jakim inne substancje obecne w próbce wpływają na sygnał analityczny. Pojęcie selektywności jest związane z oceną, na ile otrzymany wynik analityczny powstał wyłącznie w wyniku obecności analitu, a nie w wyniku obecności innych substancji o podobnych cechach chemicznych lub fizycznych. Oceny selektywności można dokonać na podstawie analizy roztworów substancji wzorcowej niezawierającej i zawierającej potencjalne substancje interferujące.

Granica wykrywalności (LOD) jest to najmniejsza ilość (stężenie) badanej substancji w próbce, która może być stwierdzona, lecz niekoniecznie oznaczona z odpowiednią dokładnością za pomocą danej metody.

Granica oznaczalności (LOQ) jest to najmniejsza ilość (stężenie) badanej substancji w próbce, jaka może być ilościowo oznaczona za pomocą danej metody z odpowiednią precyzją i dokładnością.

Oczywistym jest, że analityk powinien stosować metody analityczne i procedury pomiarowe właściwe do celu prowadzonych badań. Preferowane są metody opublikowane w normach międzynarodowych lub krajowych. Zalecenie takie wynika przede wszystkim z faktu, iż metody znormalizowane przeszły proces walidacji i są uznane za optymalne dla uzyskania wiarygodnych wyników.

Do metod, które wymagają walidacji zaliczamy:

- metody nie posiadające statusu normy czyli:
 - opracowania własne
 - procedury pochodzące z literatury naukowej
- metody o statusie normy ale, gdy:
 - są stosowane poza zakresem określonym przez normę,
 - metoda uległa zmianom, które mogą mieć wpływ na wynik oznaczenia (np. wymiana aparatu, inny rodzaj próbek),
 - kontrola jakości wykazała zmienność jej parametrów w czasie.

Kwas askorbowy/witamina C w organizmach żywych

Witaminy są grupą związków niezbędnych dla rozwoju i funkcjonowania organizmów żywych. Jedną z najważniejszych witamin dla człowieka jest kwas askorbowy zwany witaminą C. Ponieważ organizm człowieka nie ma zdolności wytwarzania kwasu askorbowego, musi go otrzymywać wraz z pożywieniem.

Witamina C podawana doustnie jest dobrze wchłaniana. Z fizjologicznej dawki wynoszącej do 180mg na dobę wchłania się w 70-80%. Profilaktycznie dorośli powinni przyjmować od 100-500mg witaminy C na dobę, w kilku dawkach. Po podaniu bardzo dużych dawek lek jest wydalony w postaci niezmięnionej w moczu i kale.

Witamina C jest uważana za jeden z najaktywniejszych antyoksydantów:

- chroni organizm przed wpływem wolnych rodników, które są odpowiedzialne za patogenezę wielu chorób,
- przyczynia się do stabilizacji i ochrony błony komórkowej, co wspomaga system immunologiczny organizmu.

Witamina C jest związkami niezbędnymi dla organizmu. Bierze udział w syntezie kolagenu i substancji międzykomórkowej – jest niezbędna do rozwoju chrząstki, kości, zębów a także w leczeniu ran. Bierze udział w przekształcaniu kwasu foliowego do kwasu folinowego, ułatwia wchłanianie żelaza z przewodu pokarmowego i uczestniczy w powstawaniu hemoglobiny i dojrzewaniu erytrocytów. Przenika szybko do tkanek, wiąże się z białkami osocza w ok 25%.

Niedobór kwasu askorbowego objawia się wolnym gojeniem ran, bladeścią skóry i błon śluzowych, zaburzeniami w przemianie kwasów tłuszczowych, osłabieniem naczyń włosowatych i możliwością powstawania mikrowylewów w różnych narządach, zmniejszeniem odporności na infekcje oraz występowaniem szkorbutu (obrzęki i krwawienie z dziąseł oraz wypadanie zębów). Natomiast nadmiar witaminy C wydalany jest z moczem.

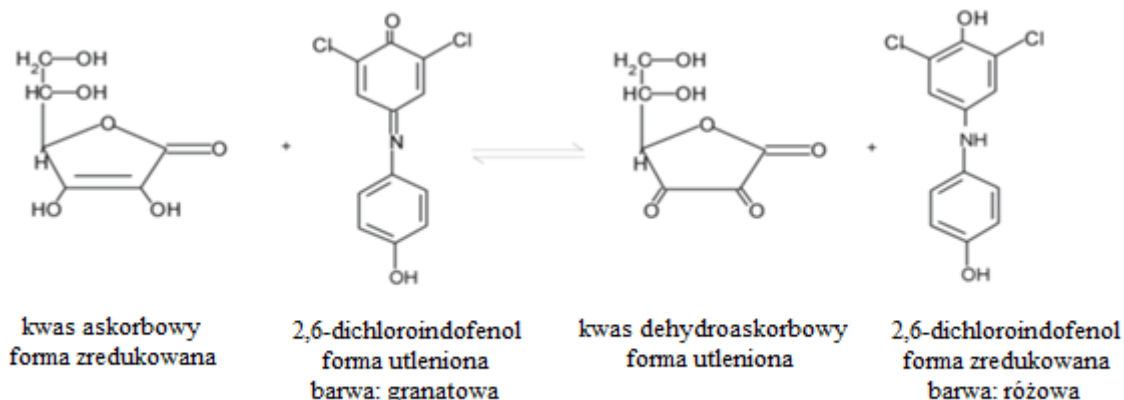
Witamina C występuje w dwóch formach, przy czym właściwości witaminy zachowują obie formy: forma zredukowana – kwas askorbowy i forma utleniona – kwas dehydroaskorbowy. Kwas askorbowy ma właściwości silnie redukujące, ponieważ ugrupowanie pomiędzy C-2 i C-3, zwane endiolowym, łatwo oddaje dwa protony i dwa elektrony, przechodząc w ugrupowanie diketonowe kwasu dehydroaskorbowego.

Przemiana kwasu askorbowego w kwas dehydroaskorbowy jest odwracalna. Obie substancje są wysoce niestabilne i łatwo ulegają dalszym nieodwracalnym przemianom, prowadzącym do utraty ich aktywności biologicznej jako witaminy C. Czynniki katalizującymi proces utleniania kwasu askorbinowego są: podwyższona temperatura, obecność tlenu, środowisko obojętne lub alkaliczne, promieniowanie UV, enzymy oksydacyjne oraz jony metali (miedzi, żelaza, srebra). Kwas askorbowy jest stabilny w środowisku kwaśnym, np. przy pH = 3 proces utleniania zachodzi dwa razy wolniej niż przy pH = 4,5, natomiast w środowisku zasadowym utlenianie zachodzi bardzo szybko.

II. Część doświadczalna

Zasada oznaczenia

Metoda oznaczenia oparta jest na redukcji barwnika 2,6-dichloroindofenolu przez kwas askorbowy. Kwas askorbowy oznaczany jest przez miareczkowanie analizowanej próbki, mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, w środowisku kwaśnym (zapobiega to utlenieniu kwasu askorbowego tlenem z powietrza). Rolę wskaźnika w oznaczeniu spełnia sam titrant - 2,6-dichloroindofenol, który w formie utlenionej ma barwę granatową, a w wyniku redukcji przyjmuje barwę różową. W związku z tym, po przekroczeniu PK miareczkowania od kropli nadmiaru titranta, miareczkowany roztwór dotychczas bezbarwny zabarwia się na różowo. Reakcja przebiega w sposób ilościowy, w stosunku 1:1.



1. Walidacja wybranych parametrów miareczkowej metody oznaczania kwasu askorbowego w preparatach farmaceutycznych

1.1. Selektowności metody

W celu określenia czy metoda jest selektywna należy zmiareczkować preparat farmaceutyczny zawierający w swoim składzie kwas askorbowy. Otrzymane wyniki należy porównać z wartością deklarowaną przez producenta (podaną na opakowaniu). Otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 1** (sprawozdanie).

Suplement diety:

1. Calcium C, tabletki musujące, Pliva:
 - jony wapnia w postaci mleczanu wapnia 177mg
 - kwas askorbowy 60mg

Wykonanie oznaczenia

- otrzymaną do analizy tabletkę zważyć z dokładnością do 0,1mg (zapisać dokładną masę), a następnie rozetrzeć w moździerzu,
- odważyć 40mg preparatu z dokładnością do 0,1mg (zapisać dokładną masę odważki),
- odważkę przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać 8ml 0,02% roztworu kwasu szczawowego i dokładnie wymieszać,
- dodać 10ml 0,5M roztworu H₂SO₄ i natychmiast miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, aż do pojawienia się trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć sześciokrotnie dla preparatu farmaceutycznego.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w tabletkce

$$x_i = C_{titr.} \cdot V_{titr.} \cdot \frac{M}{m} \quad [mg]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu użyta na miareczkowanie [ml]; M – całkowita masa preparatu (1 tabletkka) [g]; m – odważka preparatu [g]

Sprawdzenie selektywności metody

W celu sprawdzenia czy metoda jest selektywna należy sprawdzić dokładność i precyzję stosowanej metody dla otrzymanej serii wyników. W tym celu należy obliczyć błąd względny, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności.

Błąd względny – różnica pomiędzy wynikiem pomiaru a wartością rzeczywistą, podzielona przez wartość rzeczywistą, i wyrażona w %. Błąd względny jest miarą dokładności metody analitycznej.

$$E_{wz} = \left| \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \right| \cdot 100\%$$

Gdzie: \bar{x} – wartość średnia z pomiarów; μ – wartość rzeczywista (deklarowana przez producenta)

Odchylenie standardowe (S) i współczynnik zmienności (W_z) – odchylenie standardowe stanowi ocenę błędu przypadkowego, jest miarą rozrzutu wokół średniej. Im mniejsza jest wartość odchylenia standardowego, tym mniejszy jest rozrzut wyników i większa precyzja pomiaru. Metoda jest uznawana za precyzyjną, jeżeli współczynnik zmienności W_z mieści się w granicy 5%.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad W_z = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100 \%$$

Gdzie: S – odchylenie standardowe; W_z – współczynnik zmienności; n – liczba powtarzanych oznaczeń; x_i – wynik z pojedynczego pomiaru; \bar{x} – wartość średnia

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za selektywną, jeżeli obecności innych substancji w próbce nie wpływa na dokładność i precyzję oznaczenia składnika głównego.

Metodę uznaje się za selektywną jeżeli spełnione są poniższe warunki:

- błąd względny (E_{wz}) nie wynosi więcej niż 10% dla tabletki zawierającej poniżej 100mg kwasu askorbowego,
- błąd względny (E_{wz}) nie wynosi więcej niż 5% dla tabletki zawierającej powyżej 100mg kwasu askorbowego,
- współczynnik zmienności (W_z) mieści się w granicy 5%.

1.2 Liniowość metody

W celu sprawdzenia liniowości metody w wybranym zakresie stężeń należy wykonać miareczkowanie pięciu mieszanin modelowych (I-V) o różnej zawartości kwasu askorbowego oraz wyznaczyć parametry krzywej wzorcowej i przeprowadzić statystyczną analizę uzyskanych wyników.

Do sporządzenia krzywej wzorcowej posłużą mieszaniny modelowe o rzeczywistej zawartości kwasu askorbowego od 50% do 150%, względem wartości deklarowanej (200mg w 0,6g masy tabletkowej).

Mieszanina modelowa	Kwas askorbowy [g]	Placebo [g]	Całkowita masa preparatu, M [g]
I	0,1086	0,4959	0,6045
II	0,1555	0,4461	0,6016
III	0,2050	0,4054	0,6104
IV	0,2461	0,3758	0,6219
V	0,2909	0,3355	0,6264

Wykonanie oznaczenia

- odważyć kolejno około 40mg każdej mieszaniny modelowej (I-V) z dokładnością do 0,1mg (zapisać dokładną masę odważki),
- odważkę przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100ml, rozpuścić w niewielkiej ilości 0,02% roztworu kwasu szczawowego, dopełnić roztworem kwasu szczawowego do kreski,
- 8ml otrzymanego roztworu przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i natychmiast miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- dla każdej mieszaniny modelowej (I-V) wykonać po trzy miareczkowania.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w mieszaninie modelowej (I-V)

$$x' = C_{titr.} \cdot V_{sr} \cdot \frac{100}{8} \quad [mg]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; V_{sr} – średnia objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; $100/8$ – współczynnik rozcieńczeń.

Otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 2** (sprawozdanie) i na ich podstawie, korzystając z poniższych wzorów, należy obliczyć parametry prostej $y = ax + b$ (a , b , r). Należy zbadać również istotność wartości współczynnika korelacji r oraz współczynników a i b . Otrzymane wyniki należy umieścić w **tabeli 3** (sprawozdanie). Na wykresie należy przedstawić zależność objętości zużytego titranta od rzeczywistej zawartości kwasu askorbowego w próbce.

Wyznaczanie parametrów krzywej wzorcowej:

a) wyznaczenie współczynnika korelacji liniowej i zbadanie istotności współczynnika korelacji

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

Gdzie: r – współczynnik korelacji; x_i - rzeczywista zawartość kwasu askorbowego w pojedynczym pomiarze; \bar{x} – średnia zawartość kwasu askorbowego w badanych próbkach; y_i – objętość zużytego titranta na pojedyncze oznaczenie x_i ; \bar{y} – średnia zawartość zużytego titranta na zmiareczkowanie próbek \bar{x} ,

Jeżeli $r < 0,999$ można podejrzewać wystąpienie funkcji nieliniowej. Aby sprawdzić czy zależność $y = ax + b$ jest rzeczywiście prostoliniowa, należy obliczyć wartość t_r na podstawie równania:

$$t_r = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{n - 2}$$

Gdzie: t_r – parametr testu t-Studenta, r – współczynnik korelacji, n - liczba powtarzanych oznaczeń ($n=15$)

Uzyskaną wartość t_r porównać z wartością krytyczną $t_{(\alpha, k)}$ odczytaną z tablic rozkładu t-Studenta, przyjmując poziomu ufności $\alpha = 0,05$ oraz liczbę stopni swobody $k = n - 1$.

b) wyznaczenie współczynnika nachylenia (a) oraz przesunięcia (b)

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

c) sprawdzenie istotność współczynników a i b

W celu sprawdzenia istotności współczynników a i b stosuje się test t-Studenta. Sprawdzenie istotność współczynników polega na sprawdzeniu spełnienia zależności:

$$1. \quad t_a > t_{kryt}(\alpha, k), \text{ gdzie } t_a = \frac{a}{s_a}, \quad S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}, \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$$

$$2. \quad t_b \geq t_{kryt}(\alpha, k), \text{ gdzie } t_b = \frac{b}{s_b}, \quad S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}, \quad S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$$

Wartość $t_{kryt}(\alpha, k)$ dla stopni swobody $k = n - 2$ i poziomu istotności $\alpha = 0,05$ należy odczytać z tablic rozkładu t-Studenta.

Kryterium akceptacji

Metoda może być uznana za liniową w wybranym przedziale stężeń, jeżeli:

1. $t_r > t_{kryt}$ – oznacza to, że t_r nie różni się istotnie od 1, czyli funkcja ma przebieg liniowy
2. $t_a > t_{kryt}$ – potwierdza istotność współczynnika nachylenia a
natomiast gdy: $t_a < t_{kryt}$ – metoda charakteryzuje się bardzo złą precyzją.
3. $t_b \geq t_{kryt}$ – potwierdza istotność współczynnika przesunięcia b
natomiast gdy: $t_b < t_{kryt}$ – współczynnik przesunięcia jest równy zero.

1.3. Dokładność

W celu określenia, czy metoda jest dokładna, należy oznaczyć zawartość kwasu askorbowego analizując mieszaniny modelowe, które sporządzono przez dodanie do placebo wzorca kwasu askorbowego, w ilościach powyżej i poniżej deklarowanych, w preparatach farmaceutycznych. Otrzymane wyniki należy porównać z wartością rzeczywistą, oraz obliczyć odzysk. Wyniki umieścić w **tabeli 4** (sprawozdanie).

Mieszanina modelowa	Kwas askorbowy, μ [g]	Placebo [g]	Całkowita masa preparatu, M [g]
A	0,0520	0,5577	0,6097
B	0,0976	0,5175	0,6151
C	0,2081	1,5052	1,7133

Wykonanie oznaczenia

- odważyć około 40mg mieszaniny modelowej A z dokładnością do 0,1mg (zapisać dokładną masę odważki),
- odważkę przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50ml, rozpuścić w niewielkiej ilości 0,02% roztworu kwasu szczawiowego, dopełnić roztworem kwasu szczawiowego do kreski,
- 8ml otrzymanego roztworu przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i natychmiast miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć jeszcze dwukrotnie,
- oznaczenie powtórzyć dla mieszaniny modelowej B i C.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w mieszaninie modelowej A, B i C

$$x_i = C_{titr.} \cdot V_{titr.} \cdot \frac{M}{m} \cdot \frac{50}{8} \cdot 0,001 \quad [g]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; M – całkowita masa preparatu [g]; m – odważka preparatu [g], $50/8$ – współczynnik rozcieńczeń.

Obliczenie odzysku z poszczególnych miareczkowań dla mieszaniny modelowej A, B i C

$$R = \frac{x_i}{\mu} \cdot 100\%$$

Gdzie: x_i – oznaczona zawartość analitu (kwasu askorobwego) w badanej próbce; μ – znana ilość analitu (kwasu askorobwego) w badanej próbce (podana w tabeli powyżej)

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za dokładną jeżeli średni odzysk otrzymany dla serii pomiarów mieści się w granicach 95-105%

1.4. Precyzja i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

a) Precyzja

W celu sprawdzenia precyzji metody, należy dokonać analizy statystycznej wyników oznaczenia kwasu askorobwego w mieszaninie modelowej A, a otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 5** (sprawozdanie).

Wykonanie oznaczenia

- odważyć około 40mg mieszaniny modelowej A z dokładnością do 0,1mg (zapisać dokładną masę odważki),
- odważkę przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50ml, rozpuścić w niewielkiej ilości 0,02% roztworu kwasu szczawowego, dopełnić roztworem kwasu szczawowego do kreski,
- 8ml otrzymanego roztworu przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i natychmiast miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie należy powtórzyć jeszcze pięć razy

Obliczenie zawartość kwasu askorobwego w mieszaninie modelowej A

$$x_i = C_{titr.} \cdot V_{titr.} \cdot \frac{M}{m} \cdot \frac{50}{8} \cdot 0,001 \quad [g]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorobwego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; M – całkowita masa preparatu [g]; m – odważka preparatu [g], $50/8$ – współczynnik rozcieńczeń.

Wyznaczenie precyzji

Ponieważ miarą precyzji jest współczynnik zmienności W_z , korzystając z poniższych wzorów, dla otrzymanej serii wyników, należy obliczyć wartość S , W_z :

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad W_z = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Gdzie: S – odchylenie standardowe; n – liczba powtarzanych oznaczeń; x_i – wartość wyniku z pojedynczego oznaczenia; \bar{x} – wartość średnia

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za precyzyjną jeżeli współczynnik zmienności mieści się w granicy 5%.

b) Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

W celu sprawdzenia odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, należy wykonać dwie serie miareczkowań dla mieszaniny modelowej A i B, każda po sześć powtórzeń. Każda seria pomiarów powinna być wykonana przez inną osobę przy użyciu innej biurety. Do oceny czy wyniki uzyskane w takich warunkach różnią się istotnie, należy zastosować test jednorodności dwóch wariancji (F-Snedecora). Otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 6** (sprawozdanie).

Wykonanie oznaczenia

- odważyć około 40mg mieszaniny modelowej A z dokładnością do 0,1mg (zapisać dokładną masę odważki),
- odważkę przenieść ilościowo do kolby miarowej o pojemności 50ml, rozpuścić w niewielkiej ilości 0,02% roztworu kwasu szczawiowego, dopełnić roztworem kwasu szczawiowego do kreski,
- 8ml otrzymanego roztworu przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i natychmiast miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie należy powtórzyć jeszcze pięć razy,
- oznaczenie należy powtórzyć dla mieszaniny modelowej B.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w mieszaninie modelowej A i B

$$x = C_{titr.} \cdot V_{titr.} \cdot \frac{M}{m} \cdot \frac{50}{8} \cdot 0,001 \quad [g]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6 dichloroindofenolu; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; M – całkowita masa preparatu [g]; m – odważka preparatu [g]; $50/8$ – współczynnik rozcieńczeń.

Wyznaczenie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej

Do oceny, czy wyniki uzyskane w dwóch seriach pomiarowych, wykonanych przez dwie różne osoby różnią się istotnie, należy zastosować test F-Snedecora (test jednorodności dwóch wariancji). Jednorodność wariancji sprawdza się porównując odchylenia standardowe dwóch zbiorów wyników dla wykonanych serii pomiarów (mieszanina modelowa A i B). W tym celu należy obliczyć: średnią arytmetyczną pomiarów (\bar{x}) dla $n = 6$, odchylenie standardowe (S), oraz obliczyć wartość parametru testu F-Snedecora korzystając ze wzorów:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$
$$F = \frac{S_A^2}{S_B^2} \quad \text{dla} \quad S_A^2 > S_B^2 \quad \text{lub} \quad F = \frac{S_B^2}{S_A^2} \quad \text{dla} \quad S_B^2 > S_A^2$$

Gdzie: n – liczba powtarzanych oznaczeń; x_i – wartość wyniku z pojedynczego pomiaru.

Obliczony współczynnik F porównujemy z wartością krytyczną $F_{kryt.}$, dla przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$, oraz stopni swobody v_1 i v_2 (gdzie: $v_1 = n_1 - 1$, $v_2 = n_2 - 1$) odczytaną z tablic F-Snedecora.

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za odtwarzalną, jeżeli obliczona wartość F nie przewyższa wartości $F_{kryt.}$ ($F \ll F_{kryt.}$), w sytuacji takiej można wnosić, że obliczone wartości odchylenia standardowego nie różnią się w sposób statystycznie istotny, w związku z powyższym można stwierdzić, że precyzja obu serii pomiarów nie różni się między sobą, czyli metoda jest odtwarzalna.

1.5. Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności kwasu askorbowego można oznaczyć na podstawie wyznaczonej objętości 2,6-dichloroindofenolu potrzebnej do miareczkowania ślepej próby, czyli próbki przygotowanej w identyczny sposób jak do oznaczenia kwasu askorbowego nie zawierająca jednak kwasu askorbowego (tzw. tło). Przyjmuje się, że ilość roztworu mianowanego powinna stanowić 3-krotność poziomu tła.

Granice oznaczalności kwasu askorbowego można oznaczyć na podstawie wyznaczonej objętości 2,6-dichloroindofenolu potrzebnej do miareczkowania ślepej próby (tzw. tło). Przyjmuje się, że ilość roztworu mianowanego powinna stanowić 6-krotność poziomu tła. Uzyskane wyniki należy umieścić w **tabeli 7** (sprawozdanie).

W celu wykonania oznaczenia ślepej próby należy zmiareczkować próbę przygotowaną w taki sam sposób jak do oznaczenia kwasu askorbowego, nie zawierającą jednak kwasu askorbowego,

Wykonanie oznaczenia

- do kolby stożkowej dodać 8ml roztworu 0,02% kwasu szczawowego oraz 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i natychmiast miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć jeszcze 5 razy.

Obliczenie granicy wykrywalności

$$LOD = 3 \cdot V_{titr.} \cdot C_{titr.}$$

Obliczenie granicy oznaczalności

$$LOQ = 6 \cdot V_{titr.} \cdot C_{titr.}$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie ślepej próby [ml]

Kryterium akceptacji

Metodę można uznać za przydatną do oznaczania kwasu askorbowego w preparatach farmaceutycznych, w których deklarowana zawartość kwasu askorbowego jest równa lub wyższa od wyznaczonej granicy oznaczalności.

2. Walidacja wybranych parametrów miareczkowej metody oznaczania kwasu askorbowego w moczu pacjentów po suplementacji

2.1. Selektywność metody

Mocz jest materiałem biologicznym, w skład którego poza wodą wchodzi różnego rodzaju metabolity (głównie mocznik) oraz inne substancje jak np. barwniki żółciowe. W celu określenia czy substancje te nie wpływają na otrzymany wynik analityczny należy sprawdzić selektywność metody dla badanej próbki. W tym celu należy oznaczyć zawartość witaminy C w badanej próbce moczu i porównać ją z wartością otrzymaną inną sprawdzoną metodą. Otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 8** (sprawozdanie).

Wykonanie oznaczenia

- czystą pipetą pobrać 8ml próbki moczu nr 1 i roztwór przenieść ilościowo do kolby stożkowej

- dodać 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć jeszcze pięć razy.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w moczu

$$x = \frac{C_{titr.} \cdot V_{titr.}}{V_{pr.}} \cdot 1000 [\mu g/ml]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; $V_{pr.}$ – objętość próbki pobranej do analizy [ml].

Sprawdzenie selektywności metody

W celu sprawdzenia czy metoda jest selektywna należy sprawdzić dokładności i precyzję stosowanej metody dla otrzymanej serii wyników. W tym celu należy obliczyć błąd względny, odchylenie standardowe oraz współczynnik zmienności.

Błąd względny – różnica pomiędzy wynikiem pomiaru a wartością rzeczywistą, podzielona przez wartość rzeczywistą, i wyrażona w %. Metoda jest uznawana za dokładną, jeżeli błąd względny wynosi nie więcej niż 0,1%.

$$E_{wz} = \left| \frac{\bar{x} - \mu}{\mu} \right| \cdot 100\%$$

Gdzie: \bar{x} – wartość średnia z pomiarów; μ – wartość otrzymana za pomocą HPLC [$\mu_1 = 150,25\mu g/ml$; $\mu_2 = 149,20\mu g/ml$; $\mu_3 = 151,38\mu g/ml$]

Odchylenie standardowe (S) i współczynnik zmienności (W_z) – odchylenie standardowe stanowi ocenę błędu przypadkowego, jest miarą rozrzutu wokół średniej. Im mniejsza jest wartość odchylenia standardowego, tym mniejszy jest rozrzut wyników i większa precyzja pomiaru. Metoda jest uznawana za precyzyjną, jeżeli współczynnik zmienności W_z mieści się w granicy 5%.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad W_z = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

Gdzie: S – odchylenie standardowe; W_z – współczynnik zmienności; n – liczba powtarzanych oznaczeń; x_i – wynik z pojedynczego pomiaru; \bar{x} – wartość średnia

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za selektywną, jeżeli obecności innych substancji w próbce nie wpływa na dokładność i precyzję oznaczenia składnika głównego.

Metodę uznaje się za selektywną jeżeli spełnione są poniższe warunki:

- błąd względny (E_{wz}) nie wynosi więcej niż 0,1%
- współczynnik zmienności (W_z) mieści się w granicy 5%.

2.2. Liniowość metody

W celu sprawdzenia liniowości metody w wybranym zakresie stężeń należy wykonać miareczkowanie pięciu roztworów wzorcowych (I-V) o różnej zawartości kwasu askorbowego, odpowiadającej zakresowi zawartości kwasu askorbowego spotykanego w moczu, oraz wyznaczyć parametry krzywej wzorcowej i przeprowadzić statystyczną analizę uzyskanych wyników.

Do sporządzenia krzywej wzorcowej posłużą roztwory wzorcowe w zakresie o zawartości kwasu askorbowego od 50% do 150%, względem wartości oczekiwanej. W tym celu należy przygotować roztwory wzorcowe w zakresie stężeń od 50µg/ml do 175µg/ml.

Należy przygotować wzorce kwasu askorbowego do krzywej wzorcowej. Roztwór podstawowy kwasu askorbowego o stężeniu 5mg/ml sporządzamy przez rozpuszczenie 250mg kwasu askorbowego w 50ml 0,02% kwasu szczawiowego.

Lp.	Stęż. wzorca [µg/ml]	Ilość wzorca o stężeniu 5mg/ml [µl]	Kwas szczawiowy [ml]
I	50	500	49,500
II	80	800	49,200
III	110	1100	48,900
IV	140	1400	48,600
V	175	1750	48,250

Wykonanie oznaczenia

- czystą pipetą pobrać 8ml roztworu wzorcowego I i roztwór przenieść ilościowo do kolby stożkowej
- do kolby stożkowej dodać 10ml 0,5M roztworu H₂SO₄ i miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- dla każdego roztworu wzorcowego (I-V) wykonać po trzy miareczkowania.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w roztworach wzorcowych (I-V)

$$x = \frac{C_{titr.} \cdot V_{titr.}}{V_{pr.}} \cdot 1000 \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; $V_{pr.}$ – objętość próbki pobranej do analizy [ml].

Otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 9** (sprawozdanie) i na ich podstawie, korzystając z poniższych wzorów, należy obliczyć parametry prostej $y = ax + b$ (a, b, r). Należy zbadać również istotność wartości współczynnika korelacji r oraz współczynników a i b. Otrzymane wyniki należy umieścić w **tabeli 10** (sprawozdanie). Na wykresie należy przedstawić zależność objętości zużytego titranta od rzeczywistej zawartość kwasu askorbowego w próbce.

Wyznaczanie parametrów krzywej wzorcowej

a) Wyznaczenie współczynnika korelacji liniowej i zbadanie istotności współczynnika korelacji

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

gdzie: r – współczynnik korelacji; x_i - rzeczywista zawartość kwasu askorbowego w pojedynczym pomiarze; \bar{x} - średnia zawartość kwasu askorbowego w badanych próbkach; y_i – objętość zużytego titranta na pojedyncze oznaczenie x_i ; \bar{y} - średnia zawartość zużytego titranta na zmiareczkowanie próbek \bar{x} ,

Jeżeli $r < 0,999$ można podejrzewać wystąpienie funkcji nieliniowej. Aby sprawdzić czy zależność $y = ax + b$ jest rzeczywiście prostoliniowa, należy obliczyć wartość t_r na podstawie równania:

$$t_r = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \cdot \sqrt{n - 2}$$

Gdzie: t_r – parametr testu t-Studenta, r – współczynnik korelacji, n – liczba powtarzanych oznaczeń ($n=15$)

Uzyskaną wartość t_r porównać z wartością krytyczną $t_{(\alpha,k)}$ odczytaną z tablic rozkładu t-Studenta, przyjmując poziomu ufności $\alpha = 0,05$ oraz liczbę stopni swobody $k = n - 1$.

b) Wyznaczanie współczynnika nachylenia (a) oraz przesunięcia (b)

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$$b = \bar{y} - a\bar{x}$$

c) Sprawdzenie istotność współczynników a i b

W celu sprawdzenia istotności współczynników a i b stosuje się test t-Studenta. Sprawdzenie istotności współczynników polega na sprawdzeniu spełnienia zależności:

- $t_a > t_{kryt}(\alpha, k)$, gdzie $t_a = \frac{a}{S_a}$, $S_a = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$, $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$
- $t_b \geq t_{kryt}(\alpha, k)$, gdzie $t_b = \frac{b}{S_b}$, $S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$, $S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$

Wartość $t_{kryt}(\alpha, k)$ dla stopni swobody $k = n - 2$ i poziomu istotności $\alpha = 0,05$ należy odczytać z tablic rozkładu t-Studenta.

Kryterium akceptacji

Metoda może być uznana za liniową w wybranym przedziale stężeń, jeżeli:

1. $t_r > t_{kryt}$ – oznacza to, że t_r nie różni się istotnie od 1, czyli funkcja ma przebieg liniowy
2. $t_a > t_{kryt}$ – potwierdza istotność współczynnika nachylenia a
natomiast gdy: $t_a < t_{kryt}$ – metoda charakteryzuje się bardzo złą precyzją.
3. $t_b > t_{kryt}$ – potwierdza istotność współczynnika przesunięcia b
natomiast gdy: $t_b < t_{kryt}$ – współczynnik przesunięcia jest równy zero.

2.3. Dokładność

W celu określenia, czy metoda jest dokładna, należy oznaczyć zawartość kwasu askorbowego analizując trzy różne próbki moczu (pochodzące od 3 różnych osób). Otrzymane wyniki należy porównać z wartością odniesienia, oraz obliczyć odzysk. Wyniki umieścić w **tabeli 11** (sprawozdanie).

Wykonanie oznaczenia

- pobrać 8ml próbki nr 1 i roztwór przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać do kolby stożkowej 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć jeszcze 2 razy,
- oznaczenie należy powtórzyć dla próbki nr 2 i 3.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w próbce moczu nr 1, 2 i 3

$$x_i = \frac{C_{titr.} \cdot V_{titr.}}{V_{pr.}} \cdot 1000 [\mu g/ml]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; $V_{pr.}$ – objętość próbki pobranej do analizy [ml].

Obliczenie odzysku z poszczególnych miareczkowań dla próbki moczu nr 1, 2 i 3

$$R = \frac{x_i}{\mu} \cdot 100\%$$

Gdzie: x_i – oznaczona zawartość analitu (kwasu askorbowego) w badanej próbce; μ – wartość otrzymana za pomocą HPLC [$\mu_1 = 150,25\mu\text{g/ml}$; $\mu_2 = 149,20\mu\text{g/ml}$; $\mu_3 = 151,38\mu\text{g/ml}$].

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za dokładną jeżeli średni odzysk otrzymany dla serii pomiarów mieści się w granicach 95-105%

2.4. Precyzja i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

a) Precyzja

Wykonanie oznaczenia

- pobrać 8ml próbki nr 2 i przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać do kolby stożkowej 10ml 0,5M roztworu H_2SO_4 i miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć jeszcze 5 razy,

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w próbce nr 2

$$x_i = \frac{C_{titr.} \cdot V_{titr.}}{V_{pr.}} \cdot 1000 \quad [\mu\text{g/ml}]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu [mg/ml]; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; $V_{pr.}$ – objętość próbki pobranej do analizy [ml].

Wyznaczenie precyzji metody

Ponieważ miarą precyzji jest współczynnik zmienności W_z , korzystając z poniższych wzorów, dla otrzymanej serii wyników, należy obliczyć wartość S , W_z :

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad W_z = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

gdzie: S – odchylenie standardowe; n – liczba powtarzanych oznaczeń; x_i – wartość wyniku z pojedynczego oznaczenia; \bar{x} – wartość średnia

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za precyzyjną jeżeli współczynnik zmienności mieści się w granicy 5%.

b) Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

W celu sprawdzenia odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, należy wykonać dwie serie miareczkowań dla próbki nr 2 i próbki nr 3, każda po sześć powtórzeń. Każda seria pomiarów powinna być wykonana przez inną osobę przy użyciu innej biurety. Do oceny czy wyniki uzyskane w takich warunkach różnią się istotnie, należy zastosować test jednorodności dwóch wariancji (F-Snedecora). Otrzymane wyniki umieścić w **tabeli 12** (sprawozdanie).

Wykonanie oznaczenia

- pobrać 8ml próbki nr 1 i przenieść ilościowo do kolby stożkowej,
- dodać do kolby stożkowej 10ml 0,5M roztworu H₂SO₄ i miareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- miareczkowanie powtórzyć jeszcze 5 razy,
- oznaczenie powtórzyć dla próbki nr 3.

Obliczenie zawartość kwasu askorbowego w próbce nr 2 i 3

$$x_i = \frac{C_{titr.} \cdot V_{titr.}}{V_{pr.}} \cdot 1000 \quad [\mu g/ml]$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu; $V_{titr.}$ – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na miareczkowanie [ml]; $V_{pr.}$ – objętość próbki pobranej do analizy [ml].

Wyznaczenie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej

Do oceny, czy wyniki uzyskane w dwóch seriach pomiarowych, wykonanych przez dwie różne osoby różnią się istotnie, należy zastosować test F-Snedecora (test jednorodności dwóch wariancji). Jednorodność wariancji sprawdza się porównując odchylenia standardowe dwóch zbiorów wyników dla wykonanych serii pomiarów (próbka moczu nr 2 i 3). W tym celu należy obliczyć: średnią arytmetyczną pomiarów (\bar{x}) dla $n = 6$, odchylenie standardowe dla próbki nr 2 (S_1) i próbki nr 3 (S_2), oraz obliczyć wartość parametru testu F-Snedecora korzystając ze wzorów:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}, \quad S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$F = \frac{(S_1)^2}{(S_2)^2} \quad \text{dla} \quad (S_1)^2 > (S_2)^2 \quad \text{lub} \quad F = \frac{S_2^2}{S_1^2} \quad \text{dla} \quad (S_2)^2 > (S_1)^2$$

Gdzie: n – liczba powtarzanych oznaczeń; x_i – wartość wyniku z pojedynczego pomiaru

Obliczony współczynnik F porównujemy z wartością krytyczną $F_{kryt.}$ dla przyjętego poziomu istotności $\alpha = 0,05$, oraz stopni swobody v_1 i v_2 (gdzie: $v_1 = n_1 - 1$, $v_2 = n_2 - 1$) odczytaną z tablic F-Snedecora.

Kryterium akceptacji

Metoda jest uznawana za odtwarzalną, jeżeli obliczona wartość F nie przewyższa wartości $F_{kryt.}$ ($F \ll F_{kryt.}$), w sytuacji takiej można wnosić, że obliczone wartości odchylenia standardowego nie różnią się w sposób statystycznie istotny, w związku z powyższym można stwierdzić, że precyzja obu serii pomiarów nie różni się między sobą, czyli metoda jest odtwarzalna.

2.5. Granica wykrywalności (LOD) i granica oznaczalności (LOQ)

Granice wykrywalności kwasu askorbowego można oznaczyć na podstawie wyznaczonej objętości 2,6-dichloroindofenolu potrzebnej do miareczkowania ślepej próby, czyli próbki przygotowanej w identyczny sposób jak do oznaczenia kwasu askorbowego nie zawierającą jednak kwasu askorbowego (tzw. tła). Przyjmuje się, że ilość roztworu mianowanego powinna stanowić 3-krotność poziomu tła.

Granice oznaczalności kwasu askorbowego można oznaczyć na podstawie wyznaczonej objętości 2,6-dichloroindofenolu potrzebnej do miareczkowania ślepej próby (tzw. tła). Przyjmuje się,

że ilość roztworu mianowanego powinna stanowić 6-krotność poziomu tła. Uzyskane wyniki należy umieścić w **tabeli 13** (sprawozdanie).

Wykonanie oznaczenia

- w celu wykonania oznaczenia ślepej próby należy zmiareczkować próbę przygotowaną w taki sam sposób jak do oznaczenia kwasu askorbowego, nie zawierającą jednak kwasu askorbowego,
- do kolby stożkowej dodać 8ml roztworu 0,02% roztworu kwasu szczawowego oraz 10ml 0,5M roztworu H₂SO₄ i natychmiast zmiareczkować mianowanym roztworem 2,6-dichloroindofenolu, do uzyskania trwałego różowego zabarwienia,
- zmiareczkowanie powtórzyć jeszcze 5 razy.

Obliczanie granicy wykrywalności

$$LOD = 3 \cdot V_{titr.} \cdot C_{titr.}$$

Obliczanie granicy oznaczalności

$$LOQ = 6 \cdot V_{titr.} \cdot C_{titr.}$$

Gdzie: $C_{titr.}$ – masa kwasu askorbowego (mg), odpowiadająca 1,0 ml mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu; V – objętość mianowanego roztworu 2,6-dichloroindofenolu zużyta na zmiareczkowanie ślepej próby [ml]

Kryterium akceptacji

Metodę można uznać za przydatną do oznaczania kwasu askorbowego w moczu człowieka, jeżeli oznacza zawartość kwasu askorbowego jest równa lub wyższa od wyznaczonej granicy oznaczalności.

3. Porównanie przydatności metody zmiareczkowej do oznaczania kwasu askorbowego w preparatach farmaceutycznych i w moczu człowieka

Na podstawie wyznaczonych parametrów należy określić czy metoda spełnia stawiane jej wymagania związane z zamierzonym zastosowaniem wyników analitycznych, czyli czy zaproponowana metoda nadaje się do oznaczania kwasu askorbowego w preparatach farmaceutycznych i w materiale biologicznym. Decyzję uzasadnić w oparciu o kryteria akceptacji dla otrzymanych parametrów analitycznych.