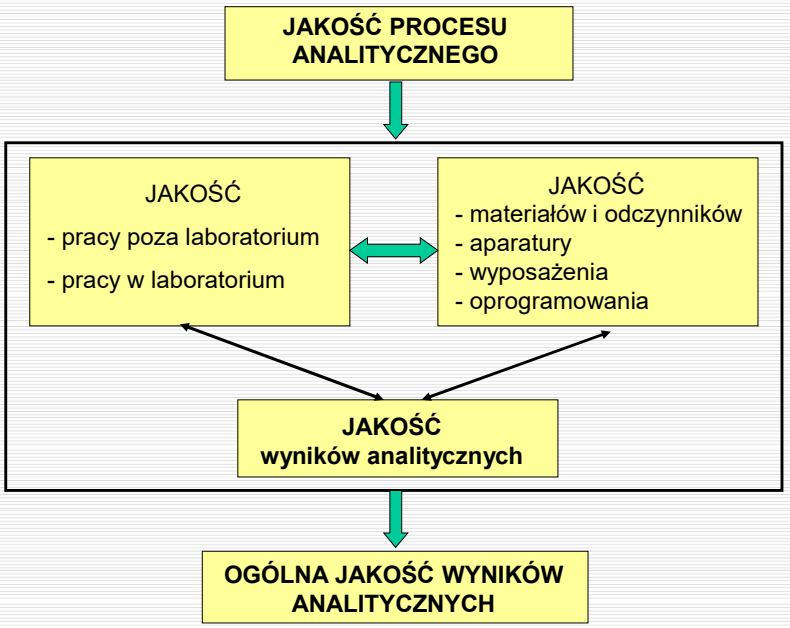
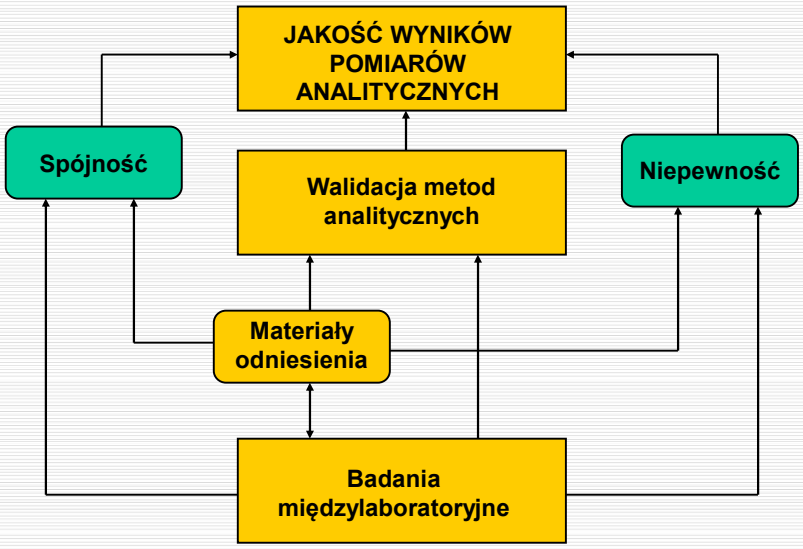
# CHEMIA ANALITYCZNA W KRYMINALISTYCE





## *Elementy składowe systemu kontroli i zapewnienia jakości*






## Niepewność pomiaru

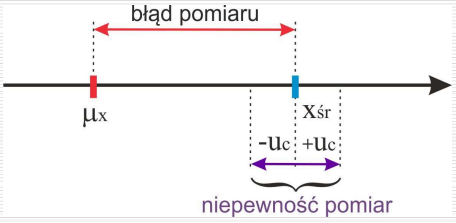
- parametr wiązany z wynikiem pomiaru, określający *przedział wokół wartości przyjętej* (*zwykle obliczonej jako wartość średnia*), w którym na *założonym poziomie prawdopodobieństwa* można się spodziewać *wystąpienia wartości oczekiwanej.*

*Standardowa niepewność pomiaru* ($u_{(xi)}$) - niepewność pomiaru przedstawiona i obliczona *jako odchylenie standardowe.*

*Niepewność względna* ($u_{r(xi)}$) - stosunek niepewności do wielkości mierzonej.

*Rozszerzona niepewność* ($u$) - wielkość określająca *przedział wokół uzyskanego wyniku analizy*, w którym można, na odpowiednim przyjętym poziomie prawdopodobieństwa, spodziewać się *wystąpienia wartości oczekiwanej.*

$\mu_x$ – *wartość oczekiwana*
$X_{śr}$ – *średnia wartość arytmetyczna*
$u_c$ – *niepewność rozszerzona wyniku*



## Źródła niepewności pomiaru (*wybrane*)

- błędnie lub nieprecyzyjnie zdefiniowany analit
- niespełnienie reprezentatywności dla pobranej próbki
- nieprawidłowo zastosowana metoda oznaczenia
- nie ilościowy przebieg procesu rozdzielania / zatężania
- możliwość kontaminacji próbki na każdym z etapów procesu
- nieznajomość wpływu wszystkich warunków zewnętrznych na procedurę analityczną
- niepewność związana z kalibracja stosowanych przyrządów
- wartości przypisane wzorcom i materiałom odniesienia
- przybliżone wartości stałych wykorzystywanych w obliczeniach
- przybliżenia i założenia upraszczające w procedurze pomiarowej
- błędy osobowe odczytu wyników



***Niepewność pomiaru typu A***

- metoda szacowania niepewności na podstawie obliczeń statystycznych (*oparta na wartości odchylenia standardowego*)

***Niepewność pomiaru typu B***

- inne niż statystyczne metody szacowania niepewności:

*a) wcześniejsze doświadczenia i wyniki podobnych badań*;
*b) specyfikacje instrumentów, odczynników, naczyń miarowych*;
*c) niepewność obliczona na podstawie materiałów odniesienia*;
*d) dostarczone przez zleceniodawcę specyfikacje przyrządów itd.*

***Niepewność etapu kalibracji:***

*- powtarzalność odczytu wartości sygnału,*

*- niepewność związana z odczytem wartości odniesienia dla wzorców,*

*- wpływ sposobu przygotowania próbek wzorcowych,*

*- niewłaściwe przybliżenie punktów pomiarowych za pomocą krzywej regresji*

## Spójność pomiarowa

- właściwość wyniku pomiaru (*wzorca jednostki miary*), którą można powiązać z określonymi odniesieniami (najczęściej z wzorcami państwowymi lub międzynarodowymi jednostkami miar) za pośrednictwem *nieprzerwanego łańcucha porównań*, o określonej niepewności.

## Trudności zachowania spójności w pomiarach

- określenie, co jest przedmiotem oznaczenia;
- interferencje;
- niejednorodność i nietrwałość próbki;
- przygotowanie próbki;
- prawidłowość wykonania pomiaru;
- wyznaczenie niepewności wyniku.



*Kontrola jakości* (*QC*) – jest to proces zapewniający, że stosowane techniki operacyjne i czynności wykonywane w laboratorium analitycznym dostarczają *wyników stosownych do zamierzonego celu*.

Aby wprowadzić system kontroli jakości, niezbędna jest *dogłębna znajomość chemicznych podstaw metod analitycznych i czynności w nich stosowanych, a także prawdopodobnych źródeł i wielkości błędów na każdym etapie*. *Procesy kontroli jakości obejmują m.in.:*

- *sprawdzenie dokładności i precyzji wyników*;
- *prowadzenie kart kontrolnych w celu określenia systemu kontroli aparatury i powtórzeń analiz*;
- *zabezpieczenie pełnej dokumentacji i spójności pomiarowej wyników z uznanymi materiałami odniesienia*;
- *konserwowanie i kalibrowanie aparatury zgodne z zaleceniami*;
- *szkolenie pracowników*;
- *zewnętrzną weryfikację wyników, gdy tylko jest to możliwe*;
- *akredytację laboratorium przez niezależną organizację*.

*Zapewnienie jakości* (*QA*) – polega na połączeniu planowanych i systematycznych działań, potrzebnych do osiągnięcia odpowiedniego stopnia pewności, że proces kontroli jakości spełnia określone wymagania.

*Badania międzylaboratoryjne* – polegają na wykonaniu analiz jednego lub wielu identycznych, jednorodnych materiałów w określonych warunkach przez kilka laboratoriów.

Sprawdzenie *biegłości laboratorium* jest specjalnym badaniem, pozwalającym *porównać jedno laboratorium z innymi*.

*Ocena nowej metody i badania certyfikujące* podejmowane są w celu sprawdzenia określonej metody lub materiału odniesienia.

*Laboratoria mogą wprowadzać własne systemy jakości starać się o ich sprawdzenie i akredytację przez organizację normalizacyjną najbardziej odpowiednią dla ich działalności.*

W: XI B. Baś Chemia analityczna w kryminalistyce

Organizacje akredytujące i ich wzorce jakości

| **Nazwa organizacji** | **Wzorzec jakości** |
|---|---|
| Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (*Organization for Economic Co-operation and Development*, ***OECD***) | Dobra Praktyka Laboratoryjna (***GLP***) |
| Międzynarodowa Organizacja Wzorców (*International Standard Organization*, ***ISO***) | wzorce jakości serii **ISO 9000**<br>**ISO Guide 25** – *ogólne wymagania odnośnie fachowości w kalibrowaniu i testowaniu laboratoriów* |
| Europejski Komitet Normalizacji (*Comité Européen Standard Organization*, ***CEN***) | seria **EN 29 000**;<br>seria **EN 45 000** |
| Brytyjski Instytut Standaryzacji (*British Standards Institution, **BSI***) | wzorzec jakości **BS 5750**;<br>seria **BS 7500** |
| Narodowa Służba do Pomiarów i Akredytacji (*National Measurement Accreditation Service, **NAMAS***) | **NAMAS** |

# BŁĘDY W ANALIZIE CHEMICZNEJ

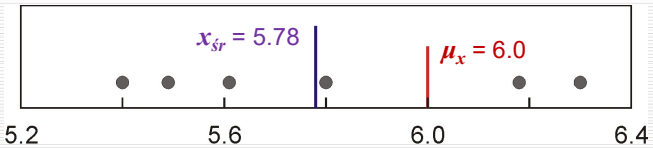


W ramach procedury analitycznej chemicy przeprowadzają zwykle od *2* do *5 powtórzeń* pomiaru dla danej próbki, gdyż *pojedyncza analiza nie dostarcza* żadnych *informacji* o *zmienności wyników*.

*Powtórzenia* stanowią próbkę (statystyczną) o określonym rozmiarze, złożoną z wyników uzyskanych w toku analizy *w dokładnie taki sam sposób*.

Powtórzenia mogą się również odnosić do *pojedynczych pomiarów* wykonanych dla *kilku próbek analizowanego materiału*.

*Wartość centralną serii* ($x_{śr}$) powtórzonych pomiarów zwykle utożsamiana jest ze *średnią arytmetyczną*, *modą* lub *medianą*. ($\mu_x$ - *wartość prawdziwa*)



## Analiza statystyczna wyników pomiaru

- powala rozstrzygnąć wiele niepewności i odpowiedzieć na pytania, np.:

- *jak dokładny* jest wynik oznaczenia;

- *ile oznaczeń* powinno się wykonać, aby *zwiększyć precyzję* pomiaru;

- czy badany produkt *spełnia stawiane mu wymogi*, normy itd.

Uzyskane w efekcie zastosowania określonej metody analitycznej *wyniki pomiarów*, można traktować jako *niezależne zmienne losowe*.

*Zbiór otrzymanych wyników oznaczeń tworzy rozkład* (*empiryczny*).

Najczęściej stosowane rozkłady to: *rozkład normalny*, *jednostajny* i *trójkątny*.

*Wybór odpowiedniej statystycznej metody opracowania wyników* pomiaru wymaga zarówno merytorycznej *znajomości badanych zjawisk* jak i *doświadczenia w stosowaniu* różnych metod statystycznych lub świadomości ich możliwości i ograniczeń.



## Podstawowe cechy statystyczne

Podstawowe cechy statystyczne wykorzystywane do opisu właściwości zbioru danych to: miary *położenia* i *zmienności* oraz miary *asymetrii* i *koncentracji*.

*Miary położenia* - wskazują *wartość najlepiej reprezentującą* wszystkie wyniki pomiarów:

*Średnia arytmetyczna* - suma wartości cechy mierzalnej podzielona przez liczbę jednostek skończonej zbiorowości statystycznej:

$$x_{śr} = \frac{\sum x_i}{n}$$

*właściwości średniej arytmetycznej:*

- *średnia arytmetyczna jest wrażliwa na skrajne wartości cechy*;

- *suma wartości cechy równa się iloczynowi* ($x_{śr}$) *i liczebności zbioru* ($n$);

- *średnia arytmetyczna spełnia warunek:*

$$x_{min} < x_{śr} < x_{max}$$

*właściwości średniej arytmetycznej*:

*- suma odchyleń poszczególnych wartości cechy od ($x_{śr}$) równa się zero*

$$\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{śr}) = 0$$

*- suma kwadratów odchyleń poszczególnych wartości cechy od ($x_{śr}$) jest minimalna*

$$\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{śr})^2 = min$$

*Średnia arytmetyczna ważona* - średnia z kilku serii wyników:

$$x_{śr} = \frac{\sum w_i x_i}{\sum w_i}$$

$w_i$ - *liczebności każdej serii wyników*

*Średnia geometryczna* - pierwiastek *n-tego* stopnia z iloczynu ($n$) wyników:

$$x_{śr} = \sqrt[n]{x_1 \cdot x_2 \cdot \ldots \cdot x_n}$$



## *Miary położenia*

*Modalna $M_0$* (*dominanta, moda, wartość najczęstsza*) - cecha wartości statystycznej, *występująca najczęściej*. W zbiorze wyników może występować *kilka takich wartości*, które stanowią *wartość modalną*.

*Mediana Me* (*wartość środkowa*) - to *środkowa liczba* w rosnąco uporządkowanej zbiorowości (*o liczności nieparzystej*) lub *średnia arytmetyczna dwóch liczb środkowych* (*zbiorowość o liczności parzystej*).

*Kwantyle Q* (*kwartyle, decyle*) - definiuje się jako wartości cechy badanej zbiorowości, przedstawionej w postaci szeregu statystycznego, które *dzielą zbiorowość na określone części pod względem liczby jednostek*. *Części te pozostają w stosunku do siebie w określonych proporcjach* (*kwantyle rzędu: 1/4, 2/4, 3/4 - to kwartyle; kwantyle rzędu: 1/10, 2/10, …, 9/10 - to decyle itd.*)

*Decyl pierwszy oznacza, że 10% jednostek ma wartości cechy mniejsze bądź równe od decyla pierwszego, a 90% jednostek wartości cechy równe lub większe od decyla pierwszego.*

## Miary rozproszenia (zmienności, dyspersji)

- odnoszą się do określenia różnic między obserwacjami a wartością średnią. Do najczęściej stosowanych miar rozproszenia należą:
  - rozstęp,
  - wariancja,
  - odchylenie standardowe,
  - odchylenie przeciętne,
  - współczynnik zmienności.

Rozstęp (**R**) - to różnica między wartością maksymalną a minimalną cechy:

$$R = x_{max} - x_{min}$$

Wariancja ($s^2$) - to średnia arytmetyczna sumy kwadratów odchyleń poszczególnych wartości cechy od średniej arytmetycznej zbiorowości:

$$s^2 = \frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(x_i - x_{śr})^2$$

W: XI B. Baś Chemia analityczna w kryminalistyce

## Miary rozproszenia (zmienności, dyspersji)

Odchylenie standardowe (**s**, **SD**) - pierwiastek kwadratowy z wariancji, jest definiowane jako miara rozproszenia uzyskanych poszczególnych wartości oznaczeń wokół wartości średniej:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x_{śr})^2}{n-1}}$$

- **SD** jest równe zeru pod warunkiem, że wszystkie wyniki są identyczne, w każdym innym wypadku **s** > **0**,
- im większe rozproszenie wyników tym większa wartość **SD**,
- jeżeli do każdej wartości wyniku pomiaru doda się lub odejmie stałą wartość to wartość **SD** nie zmieni się,
- jeżeli każdą wartość wyniku pomiaru pomnoży się lub podzieli przez dowolną stałą wartość to wartość **SD** zostanie pomnożona lub podzielona przez tą stałą,
- **SD** jest zawsze liczbą mianowaną, wyrażaną w takich samych jednostkach jak miano wartości wyniku.

## Miary rozproszenia (zmienności, dyspersji)

Jeżeli znana jest wartość oczekiwana ($\mu_x$) to odchylenie standardowe ***SD***:

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \mu_x)^2}{n}}$$

*Względne odchylenie standardowe* (***RSD***) – uzyskuje się przez *podzielenie wartości* (***SD***) *przez wartość średnią* ($x_{śr}$):

$$RSD = \frac{s}{x_{śr}} \qquad X_{śr} \neq 0$$

*Odchylenie standardowe średniej arytmetycznej* ($\bar{s}$) oblicza się:

$$\bar{s} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

W: XI B. Baś Chemia analityczna w kryminalistyce

## Miary rozproszenia (zmienności, dyspersji)

*Odchylenie standardowe metody analitycznej* ($s_g$) (*ogólne*) – jest wyznaczane na podstawie wyników uzyskanych dla serii pomiarów:

$$s_g = \sqrt{\frac{1}{n-k}\sum_{i=1}^{k} s_i^2\,(n_i - 1)}$$

dla serii równolicznych →

$$s_g = \sqrt{\frac{1}{k}\sum_{i=1}^{k} s_i^2}$$

***k*** *- liczba serii równoległych oznaczeń*

*Współczynnik zmienności* (***CV***) - jest *wartością statystyczną niemianowaną* najczęściej wyrażaną w procentach:

$$CV = RSD \cdot 100\%$$

*CV stosuje się w przypadku porównywania zróżnicowania:*

*- kilku zbiorowości pod względem tej samej cechy,*

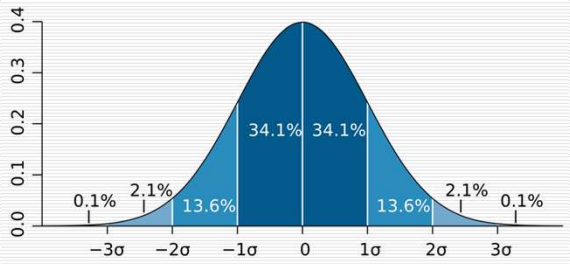
*- tej samej zbiorowości pod względem kilku różnych cech.*

## Rozkład normalny – rozkład Gaussa

*Stosowanie parametru odchylenia standardowego* do charakteryzowania serii wyników wymaga założenia, że rozkład tych wyników jest *rozkładem normalnym*. Wówczas można wykorzystać tzw. *regułę trzech sigm* ($3\delta$) (odchyleń standardowych).

Wg tej reguły w *przedziale* ($x_{śr} \pm \delta$) znajduje się *ponad dwie trzecie* (68%) wszystkich wyników. *Tylko 5%* wyników wykracza poza przedział ($x_{śr} \pm 2\delta$) natomiast poza przedziałem ($x_{śr} \pm 3\delta$) znajduje się *niespełna 0.3%* wyników.

*Tylko jeden na 370 wyników pomiarów różni się od średniej arytmetycznej o więcej niż ($3\delta$).*






## Populacja i próbka statystyczna

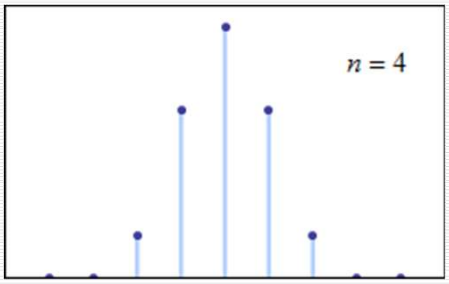
Zwykle na podstawie niewielkiej liczby pomiarów - *próbki statystycznej* dąży się do uzyskania informacji opisującej ogólną *populację wyników*.

*Populacja to np. setki tysięcy wyprodukowanych tabletek leku*, podczas gdy do analizy wybiera się określoną, *małą próbkę tabletek*.

Wnioski z analizy przeprowadzonej na tej próbce uogólnia się następnie na całą populację.

Jeżeli nie ma błędu systematycznego średnia populacji ($x_{śr}$), odpowiada wartości prawdziwej ($\mu_x$).

Wraz ze wzrostem liczby pomiarów, ($n$) różnica między ($\mu_x$) a ($x_{śr}$) maleje i jest zaniedbywalna dla $20 < n < 30$.



## Rodzaje błędów w praktyce laboratoryjnej

*Błąd przypadkowy* (*losowy, nieokreślony*) – odpowiada za mniej lub bardziej symetryczny rozrzut wyników wokół wartości średniej. *Błędy przypadkowe determinują precyzję pomiaru*.

*Błąd systematyczny* (*określony*) – generuje istotną różnicę między wartością średnią serii pomiarów a wartością prawdziwą. Jest powodem istotnego zawyżenia/zaniżenia wszystkich wyników danej serii pomiarów.

*Rozróżnia się trzy rodzaje błędów systematycznych*:

a) *błędy instrumentalne* – spowodowane są wadliwym działaniem przyrządu pomiarowego, niewłaściwą kalibracją, użytkowaniem itd.

b) *błędy metody* – powstają wskutek odstępstw od przewidywanego chemicznego lub fizycznego zachowania analitu

c) *błędy osobowe* – są wynikiem niedbałości, nieuwagi lub innych ograniczeń eksperymentatora

*Rozróżnia się błędy systematyczne stałe oraz proporcjonalne.*



*Błąd* – określa różnicę *między wartością zmierzoną* a *wartością prawdziwą*. Często niewłaściwie utożsamiany jest on z *oszacowaną niepewnością pomiaru* lub procedury eksperymentalnej.

*Błąd bezwzględny* ($d_{xi}$) pomiaru pewnej wielkości ($x$) to różnica między wartością zmierzoną ($x_i$) a wartością prawdziwą ($\mu_x$).

$$d_{x_i} = x_i - \mu_x$$

*- znak błędu bezwzględnego informuje, czy uzyskana wartość jest większa czy mniejsza od wartości prawdziwej.*

*Błąd względny* ($\%d_{xi}$) pomiaru uzyskuje się dzieląc błąd bezwzględny ($d_{xi}$) przez wartość prawdziwą ($\mu_x$). W zależności od wielkości wyniku błąd względny może być wyrażony w procentach, częściach na tysiąc itd.

$$\%d_{x_i} = \frac{d_{x_i}}{\mu_x} \cdot 100$$

*Błędy stałe nie zależą od wielkości próbki. Błędy proporcjonalne rosną lub maleją wraz z jej wielkością.*

## Przedział ufności

*Estymacja przedziałowa* - oszacowanie wartości parametru ($x$) rozkładu i podanie dokładności z jaką to oszacowanie przeprowadzono.

***Przedziałem ufności*** dla parametru ($x$) na poziomie ufności (1 - $\alpha$) nazywa się przedział ($x_1$, $x_2$) spełniający warunki:

- jego końce ($x_1$) i ($x_2$) są funkcjami próby i nie zależą od wartości szacowanego parametru,
- prawdopodobieństwo pokrycia przez ten przedział nieznanego parametru ($x$) jest równe (1 - $\alpha$), co można zapisać:

$$P(x_1 < x < x_2) = 1 - \alpha$$

*Stosowana terminologia:*

$\alpha$ - *poziom istotności*

(1 - $\alpha$) - *poziom ufności*



## Przedział ufności

Przedział ufności *dla średniej rozkładu normalnego* o nieznanej wartości wariancji:

$$x_{śr} - CI < x < x_{śr} + CI$$

gdzie

$$CI = t_\alpha \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$t_\alpha$ - $\alpha$-*procentowa wartość* ($t$), którą odczytuje się z tablic *t*-Studenta przy poziomie ufności (1 - $\alpha$) oraz ($n$ - 1) stopniach swobody.

*Poziom istotności* ($\alpha$) *wynosi najczęściej* 0,05 *lub* 0,01.

*Test Q-Dixona* - jest stosowany w celu sprawdzenia, czy w danym zbiorze nie ma wyniku obarczonego błędem grubym.

- *warunkiem stosowania testu jest liczność zbioru* 3 – 10,
- *za jego pomocą można odrzucić z danego zbioru tylko jeden wynik.*

Sposób postępowania:

- *uszeregować wyniki w ciąg nie malejący*,
- *obliczyć wartość rozstępu*:

$$R = x_n - x_1$$

- *obliczyć wartości parametrów* ($Q_1$) *i* ($Q_n$) *ze wzorów*:

$$Q_1 = \frac{x_2 - x_1}{R} \qquad Q_n = \frac{x_n - x_{n-1}}{R}$$

- *otrzymane wartości porównać z wartością krytyczną* ($Q_{kr}$) (*z tabeli*) *jeżeli któraś z wartości* ($Q_1$) *lub* ($Q_n$) *przekracza wartość krytyczną* ($Q_{kr}$) *to wynik na podstawie, którego został obliczony* ($x_n$ lub $x_1$) *należy odrzucić jako obarczony błędem grubym i policzyć ponownie wartości* ($x_{śr}$) *i* ($s$).

W: XI B. Baś Chemia analityczna w kryminalistyce

***Cyfry znaczące*** *to w zapisie dziesiętnym danej liczby wszystkie jej cyfry bez początkowych zer*.

Aby określić ile jest cyfr znaczących w liczbie, *należy „czytać" liczbę od lewej strony, aż do napotkania pierwszej cyfry różnej od zera*. Ta cyfra i każda następna to są cyfry znaczące:

*Przykład:* 11.23; 0.00123; 0.1200; 203.20; $3.3 \cdot 10^3$

*Zapis wyniku wymaga podania wartości niepewności z dwiema cyframi znaczącymi i wyniku z taką samą dokładności (liczba miejsc dziesiętnych) co do wartości niepewności.*

Wyniki obliczeń (*dodawanie, odejmowanie, mnożenie, dzielenie*) ***mają tyle cyfr znaczących, ile wyraz z najmniejszą liczbą cyfr znaczących***.

*Przykład:* *3.4 + 0.020 + 7.31 = 10.730 =* ***10.7***

*Zaokrąglanie wyników* – w przypadku liczby zakończonej *cyfrą* 5 wynik zaokrąglenia zakończony jest cyfrą parzystą lub nieparzystą np.

**0.635 = 0.64 i 0.625 = 0.62**

# Walidacja metod analitycznych



## Rozrzut wyników analitycznych

| Materiał | Pierwiastek | Liczba laboratoriów | Rozstęp wyników |
|---|---|---|---|
| Liście tytoniu *Oriental* *CTA-OTL-1* | Cr | 43 | **0.038** – **11.6** µg/g **30 526%** |
| | Cs | 17 | **0.117** – **11.8** µg/g **10 085%** |
| | Ni | 43 | **48.20** – **8083** µg/g **16 770%** |
| | Pb | 40 | **0.051** – **19.5** µg/g **38 235%** |

**Uwagi:**

- *rozstęp wyników analiz* wykonywanych przez różne laboratoria np. uczestniczących w porównaniach międzylaboratoryjnych może sięgać nawet *kilku rzędów wielkości,*
- generalnie, za rozrzut wyników odpowiedzialne są *błędy analityczne*.

## Walidacja metod analitycznych (wg *ISO*)

- to proces *oceny metody analitycznej* prowadzony w celu zapewnienia *zgodności ze stawianymi jej wymogami*, umożliwiający *opis tej metody* oraz pozwalający *określić jej przydatność*.

Walidacja metody analitycznej obejmuje sprawdzenie jej ważnych cech charakterystycznych.

*Ostatecznym celem walidacji jest pewność, że proces analizy przebiega w sposób rzetelny i precyzyjny oraz daje miarodajne wyniki.*

*Walidacja* obejmuje szerszy zakres zagadnień niż *testowanie*, które polega jedynie na znajdowaniu błędów i nieprawidłowości działania systemu, tj. różnic pomiędzy wynikami spodziewanymi a uzyskanymi.

W: XI B. Baś Chemia analityczna w kryminalistyce

***Walidacji*** (*rewalidacji*) metody analitycznej dokonuj się gdy:

- *opracowywana jest nowa procedura analityczna,*
- *prowadzone są próby rozszerzenia zakresu stosowalności znanej metody, np. oznaczenie tego samego analitu, ale w innej matrycy,*
- *kontrola jakości stosowanej metody wykazała zmienność jej parametrów w czasie,*
- *dana metoda ma być wykorzystana w innym laboratorium (nie w tym, w którym była już poddana walidacji),*
- *przeprowadza się porównanie nowej metody analitycznej ze znaną metodą odniesienia.*

## *Zakres parametrów wyznaczanych w trakcie walidacji:*

- zależy od *charakteru badań* analitycznych (*analiza jakościowa, ilościowa*, *analiza pojedynczej próbki*, *analizy rutynowe* itd.),
- zależy od *wymogów* stawianych danej metodzie,
- *czasochłonności* i *kosztów* jakie mogą być poniesione w procesie walidacji.

## *Warunki uzyskania miarodajnych wyników walidacji:*

- *stosowanie odczynników, roztworów i substancji porównawczych o odpowiedniej, znanej czystości* (*wzorce, CRM*),
- *stosowanie próbek ze znaną ilością dodanego analitu,*
- *stosowanie sprawnej i sprawdzonej aparatury,*
- *wykonanie badań przez personel o odpowiednich kwalifikacjach,*
- *dokumentowanie każdego etapu procesu walidacyjnego,*
- *obróbki statystycznej zbiorów wyników.*



## *Cechy charakterystyczne metody określane przed walidacją*

- *rodzaj* oznaczanego składnika (analitu),
- *poziom stężenia* anlitu,
- *zakres stężenia* analitu,
- rodzaj *matrycy*,
- obecność substancji przeszkadzających (*interferentów*),
- odgórne *regulacje* i *wymogi*, którym powinna sprostać metoda,
- rodzaj *oczekiwanej informacji* (jakościowa, ilościowa),
- wymagana wartość *granicy wykrywalności* i *oznaczalności*,
- oczekiwana i wymagana *precyzja* oraz *dokładność* procedury,
- wymagana *odporność* metody,
- wymagania co do *aparatury*, *kwalifikacji* personelu itp.,
- możliwość zastosowania walidowanej metody w *innym laboratorium*.

## Testy stosowane do oceny miarodajności wyników oznaczenia:

- *zgodności wyników oznaczeń równoległych,*
- *zgodności wyników uzyskanych dwoma niezależnymi metodami,*
- *wykonanie porównań międzylaboratoryjnych,*
- *zastosowanie metody dodatku roztworu wzorcowego (odzysk),*
- *porównanie uzyskanych wyników oznaczenia z wynikami analizy materiałów odniesienia (CRM).*

*W celu zapewnienia odpowiedniego poziomu pewności wyniku pomiaru stosuje się zwykle kombinację dwu lub więcej, niezależnych, dobrze scharakteryzowanych metod analitycznych.*



## Podstawowe kryteria walidacji:

- *specyficzność / selektywność,*
- *precyzja (powtarzalność, odtwarzalność, precyzja pośrednia),*
- *dokładność (poprawność, prawdziwość),*
- *liniowość i zakres pomiarowy,*
- *czułość,*
- *granica wykrywalności,*
- *granica oznaczalności,*
- *odporność i elastyczność metody.*

*Badanie elastyczności (stabilności) metody powinno udowodnić niezawodność analizy po wprowadzeniu niewielkich (celowych) zmian parametrów procesu.*

Jeżeli pomiar jest wrażliwy na zmianę warunków to powinny one być odpowiednio kontrolowane i dokładnie opisane w procedurze.

## Selektywność metody analitycznej

- definiuje się jako możliwość oznaczenia *jednego składnika* (lub *grupy składników*) *wobec innych*, w złożonej próbce rzeczywistej, bez interferencji składników towarzyszących.

## Specyficzność metody analitycznej

- metoda jest *idealnie selektywna* (*specyficzna*), gdy w złożonej mieszaninie sygnał ($Y_i$) jest generowany tylko przez analit ($i$) czyli:

$$Y_i = f(x_i)$$

w przypadku próbek rzeczywistych jest *wiele substancji*, które mogą wpływać na wartość sygnału:

$$Y_i = f(x_i, x_A, x_B, \ldots, x_N)$$

w takim przypadku mówi się o *interferencjach* poszczególnych składników próbki na sygnał analitu.



*Selektywność metody* charakteryzuje się za pomocą *współczynnika selektywności* ($Sel(i,j)$):

$$Sel(i,j) = \frac{Y_i}{Y_j} = \frac{a_i x_i}{\sum(a_j x_j)}$$

$a_i$, $a_j$ – czułość metody wobec analitu ($i$) oraz substancji ($j$).
$x_i$, $x_j$ – stężenie (ilość) analitu ($i$) oraz substancji ($j$).

**W procesie określania selektywności należy:**

- *rozpoznać czynniki nie interferujące, obecne w analizowanej próbce,*
- *zminimalizować ilość składników przeszkadzających przez ich oddzielenie lub zamaskowanie,*
- *dokładnie kontrolować obecność substancji przeszkadzających.*

## Dokładność

- to *stopień zgodności* pomiędzy uzyskanym *wynikiem pomiaru* ($x_i$) (*pojedynczego!*) a *wartością rzeczywistą* (oczekiwaną) ($\mu_x$):

$$d_{x_i} = x_i - \mu_x \qquad \%d_{x_i} = \frac{d_{x_i}}{\mu_x} \cdot 100$$

## Poprawność (*prawdziwość*)

- to *stopień zgodności* między *wynikiem oznaczenia* ($x_{śr}$) - obliczonym jako średnia arytmetyczna z serii wyników) z *wartością oczekiwaną* ($\mu_x$):

$$d_{x_{śr}} = x_{śr} - \mu_x \qquad \%d_{x_{śr}} = \frac{d_{x_{śr}}}{\mu_x} \cdot 100$$

*Poprawność można ustalić także przez porównanie z wynikami uznanej metody albo w drodze międzylaboratoryjnych badań porównawczych.*



*Różnicę* ($x_{śr} - \mu_x$) określa się terminem *błędu systematycznego*.

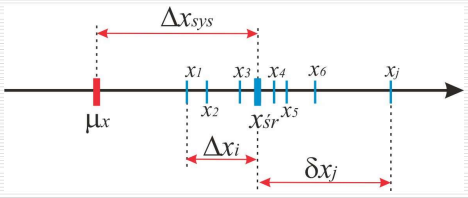
Stąd, *miarą poprawności metody analitycznej* może być wielkość jej *błędu systematycznego*:

- *stałego*, niezależnego od stężenia oznaczanego analitu,
- *zmiennego*, którego wartość zależy od stężenia analitu.

*Całkowity błąd, jakim jest obarczony wynik pomiaru jest sumą błędów: systematycznego, przypadkowego* i *grubego*:

$$d_{x_i} = x_i - \mu_x = \Delta x_{sys} + \Delta x_i + \delta x_j$$

$d_{xi}$ - *całkowity błąd wyniku pomiaru,*
$x_i$ - *wartość wyniku pomiaru,*
$\mu_X$ - *wartość oczekiwana,*
$\Delta x_{sys}$ - *błąd systematyczny,*
$\Delta x_i$ - *błąd przypadkowy,*
$\delta x_j$ - *błąd gruby.*



## Poprawność metody wyznacza się:

- przeprowadzając *analizę próbki*, w której *zawartość analitu* jest *dokładnie znana* (wzorzec, CRM),
- przez *porównanie wyników* uzyskanych walidowaną metodą z wynikami otrzymanymi *metodą referencyjną*, której dokładność jest powszechnie znana,
- badając *odzysk znanej ilości analitu* dodanego *do matrycy*, nie zawierającej substancji oznaczanej,
- wyznaczając *odzysk znanej ilości analitu* dodanego do *badanej próbki*.

## Odzysk analitu

W tym celu, próbkę badaną dzieli się na *dwie równe części* i do jednej dodaje się znaną ilość analitu ($s_i$). Po przeprowadzeniu całego procesu analitycznego z próbką bez dodatku ($x$) i z próbką z dodatkiem analitu ($x + s_i$) oblicza się odzysk ($R$).

W: XI B. Baś Chemia analityczna w kryminalistyce

$$R = \frac{(x + s_i) - (x)}{s_i} \cdot 100\%$$

$s_i$ - dodatek analitu.

Obie próbki ($x$ oraz $x + s_i$) muszą być analizowane *tą samą metodą* i *w tych samych warunkach*.

*Odzysk* zależy od *rodzaju matrycy*, *zastosowanej procedury pomiaru* i od *stężenia analitu* w próbce.

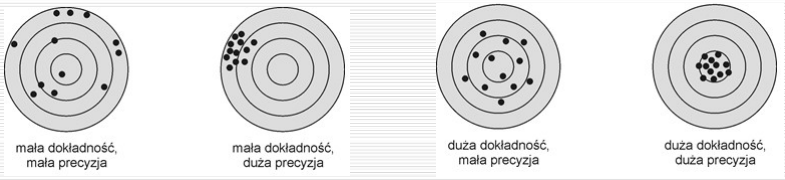
Akceptowalny wg AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) średni odzysk w zależności od stężenia analitu w próbce.

| Stężenie analitu | Średni odzysk [%] |
|---|---|
| 1% | 97 – 103 |
| 0.1% | 95 – 105 |
| 100 ppm | 90 – 107 |
| 10 – 0.1 ppm | 80 – 110 |
| 10 ppb | 60 – 115 |
| 1 ppb | 40 – 120 |

*Precyzja* - charakteryzuje powtarzalność pomiarów czyli rozrzut wyników uzyskanych *w dokładnie taki sam sposób*.

*Dokładność* - wskazuje *jak blisko wartości prawdziwej* (*oczekiwanej*) lub wzorcowej znajduje się uzyskany wynik pomiaru. Ilościowo wyraża ją *błąd pomiaru*.

*Ilustracja dokładności oraz precyzji*




*Możliwe jest uzyskanie bardzo precyzyjnych wyników z wartością średnią o małej dokładności lub dokładnej wartości średniej dla wyników o małej precyzji.*



## Powtarzalność

- wyraża *precyzję* oznaczeń wykonanych w *krótkim odstępie czasu*, przez *tego samego analityka* i *w tych samych warunkach* (te same odczynniki, ten sam instrument pomiarowy itd.).

W ramach badań powtarzalności wyznacza się *wartość średnią, odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe współczynnik zmienności* i/lub *przedział ufności,* uzyskanych wyników.

## Odtwarzalność

- to precyzja wyników uzyskanych w *różnych laboratoriach* (*warunkach* przez *różny personel*) z zastosowaniem danej metody pomiarowej, przy zachowaniu tych samych wymagań.

W przypadku oceny odtwarzalności badania są prowadzone analogicznie jak w przypadku powtarzalności i wyznaczane są te same parametry statystyczne: wartość średnią, przedział ufności itd.

*Typowe relacje (c - CV): 1000 ppm - 5%; 1 ppm - 16%; 1 ppb - 45%*

## Liniowość metody analitycznej

Zależność funkcyjna $Y = f(c)$ dla badanej próbki jest prostoliniowa tylko w ograniczonym zakresie, stąd wyróżnia się dwa zakresy:

- *dynamiczny zakres wskazań przyrządu*
- *liniowy zakres wskazań* (*zakres roboczy*)

Przy niskich stężeniach zakres liniowy ograniczony jest *dolną granicą oznaczalności* (***LOD***) (*wpływ szumów i efekty matrycy*).

Koniec zakresu prostoliniowego to punkt, w którym odchylenie od prostoliniowości przekracza 3%, czyli:

$$Y_{teor} - Y_{rzecz} = 0{,}03Y_{teor}$$

$Y_{teor}$ - wartość wyznaczona metodą najmniejszych kwadratów;
$Y_{rzecz}$ - sygnał rzeczywisty wyznaczony eksperymentalnie.

Innym kryterium liniowości wskazań jest współczynnik korelacji ($r$). Przyjmuje się, że dla *3 powtórzeń krzywej kalibracji z pięcioma roztworami* dla każdej krzywej $r > 0.995$.

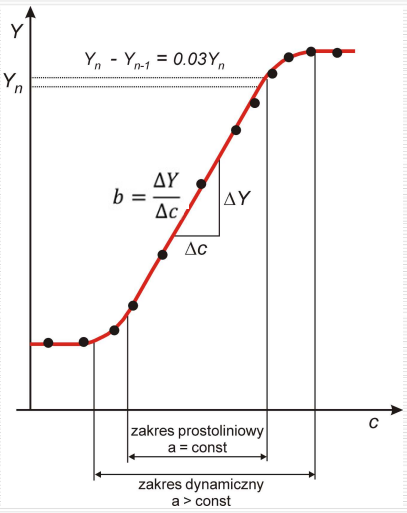


## Czułość metody analitycznej

- to *najmniejsza różnica stężenia* (zawartości) analitu jak *może być oznaczona* za pomocą danej metody. Matematycznie parametr ten jest *współczynnikiem kierunkowym* wykresu kalibracyjnego.

$$b = \frac{\Delta Y}{\Delta c}$$

*Im większa zmiana sygnału przy małej zmianie stężenia analitu, tym większa czułość pomiaru.*




*Zakres pomiarowy* - to *przedział między najniższym a najwyższym stężeniem* (wraz z tymi stężeniami), jakie mogą być oznaczone za pomocą danej metody z założoną *precyzją*, *dokładnością* i *liniowością*.

## Granica wykrywalności i oznaczalności

Funkcję kalibracyjną można przedstawić jako:

$$Y = Y_{blank} + bx + E_y$$

$Y$ - *mierzony sygnał*;
$Y_{blank}$ - *sygnał ślepej próby* (bez analitu);
$b$ - *czułość metody* (nachylenie krzywej kalibracyjnej);
$x$ - *stężenie analitu* (zawartość);
$E_Y$ - *błąd pomiaru*.

Sygnał ($Y_x$) zależny od stężenia analitu ($x$) ma wartość:

$$Y_x = Y - Y_{blank} \qquad Y_x = bx + E_y$$

*Wartość sygnału ślepej próby* ($Y_{blank}$) i precyzja jego wyznaczenia ma istotne znaczenie dla określenia *granicy wykrywalności* i *granicy oznaczalności*.



## Granica wykrywalności (*limit of detection - LOD*)

- to *najmniejsza zawartość* (*stężenie*) *analitu możliwa do wykrycia* za pomocą *danej procedury analitycznej* (brany jest także pod uwagę wpływ pozostałych składników próbki) *z określonym prawdopodobieństwem*. Inaczej *najmniejsze stężenie analitu*, przy którym istnieje *pewność jego obecności* w próbce.

- Wartość ***LOD*** jest ściśle związana z *poziomem szumów* stosowanego urządzenia. *Przyjmuje się, że wartość **LOD** to 3-krotny poziom szumów*.

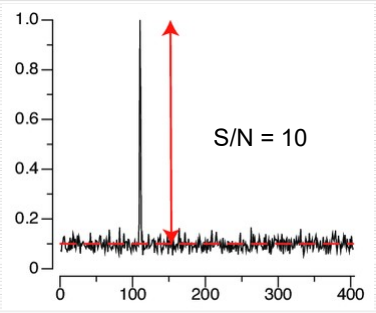
Sygnał ($Y_{LOD}$) określany jest eksperymentalnie, zwykle przeprowadza się 10 niezależnych pomiarów sygnału ($Y_{blank}$) dla 10-ciu niezależnie przygotowanych ślepych próbek. Dla uzyskanych wyników pomiarów oblicza wartość średniej ($Y_{blank}$) oraz odchylenie standardowe ($s_{blank}$). Sygnał na granicy wykrywalności ***LOD***:

$$Y_{LOD} = \overline{Y_{blank}} + 3s_{blank}$$

## Granica wykrywalności

*Stosunek sygnału do szumu* (*signal to noise ratio* - ***S/N***) to wielkość bezwymiarowa, która stanowi *stosunek sygnału analitycznego do średniego poziomu szumów* dla określonej próbki.

*W praktyce wyrażany jest jako stosunek średniej arytmetycznej serii pomiarów dla próbek ślepych (lub o najniższym stężeniu analitu) do wartości odchylenia standardowego dla tej serii pomiarów.*




*Granica wykrywalności stosowanego instrumentu pomiarowego* (*instrumental detection limit* - ***IDL***) to *najmniejsza zawartość* oznaczanego analitu, jak może *zostać wykryta* za pomocą *danego urządzenia* pomiarowego.

*Zwykle IDL < LOD, gdyż IDL jest wyznaczana na podstawie oznaczania zawartości analitu w roztworach wzorcowych (lub tzw. „ślepych prób") bez poddawania tych roztworów całej procedurze analitycznej.*



## Granica wykrywalności

*Granica wykrywalności metody analitycznej* (*method detection limit* - ***MDL***) to *najmniejsza zawartość* oznaczanego analitu, jak może *zostać wykryta* przy zastosowaniu *danej metody analitycznej*.

*Na wartość **MDL** mają wpływ wszystkie etapy metody analitycznej, dlatego **MDL** jest zawsze większa od **IDL**.*

## Granica oznaczalności (*limit of quantification* - ***LOQ***)

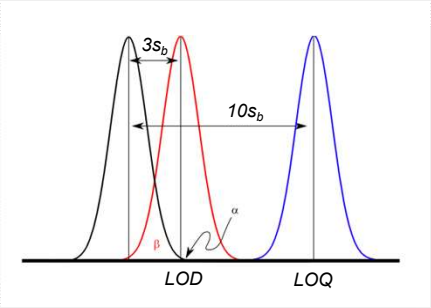
- to *najmniejsza zawartość* (*stężenie*) analitu możliwa do *ilościowego oznaczenia* daną metodą analityczną z *założoną dokładnością i precyzją*.

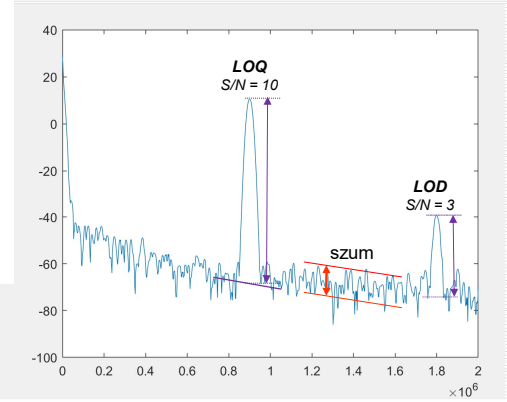
- ***LOQ*** jest zawsze wielokrotnością wyznaczonej wartości ***LOD***, zwykle:

$$LOQ = 3LOD$$

## Granica wykrywalności

Zależność wartości ***LOD*** i ***LOQ*** od *poziomu szumu*.






## Granica oznaczalności (*limit of quantification* – ***LOQ***)

***LOQ*** – na podstawie odchylenia standardowego (***s***) zbioru sygnałów i kata nachylenia krzywej kalibracji (***b***):

$$LOQ = \frac{3{,}3s}{b}$$

***b*** - *współczynnik kierunkowy krzywej kalibracji* (*czułość metody*).

Odchylenie standardowe wyznacza się na trzy sposoby:

- jako odchylenie standardowe wyników dla serii próbek ślepych (***s***);
- resztkowe odchylenie standardowe krzywej kalibracji ($s_{xy}$);
- odchylenie standardowe wyrazu wolnego z krzywej kalibracji ($s_a$).

Jeżeli podstawą obliczenia ***LOQ*** jest wartość:

***s*** *- to wyznacza się granicę wykrywalności metody analitycznej* ***MDL***

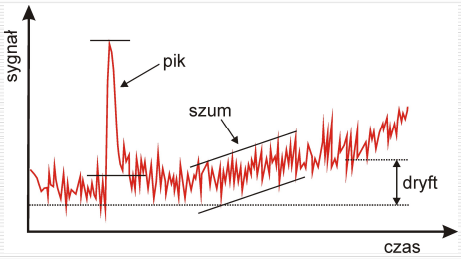
$s_{xy}$ lub $s_a$ *- to wyznacza się granicę wykrywalności przyrządu pomiarowego* ***IDL***

Każdy pomiar wytwarza, oprócz sygnałów pożądanych, nazywanych *sygnałami analitycznymi*, *także sygnały niepożądane, nazywane szumami i dryftem*.

*Zarówno szumy, jak i dryft są fluktuacjami przypadkowymi i nie zawierają informacji analitycznych.*

Poziom szumów bada się bez analitu wywołującego sygnał a ich wartość wyznacza się:

- mierząc różnicę między najwyższą i najniższą wartością szumów;
- obliczając wartość odchylenia standardowego dla *n* wartości sygnałów szumu.






## Raport z przebiegu walidacji metody analitycznej

- jest sporządzany po zakończeniu wszystkich czynności związanych z walidacją i zawiera:

- *przedmiot i zakres walidacji*
- *opis przeprowadzonego eksperymentu (metody)*
- *rodzaj oznaczanego analitu(-ów) i typ matrycy*
- *używane odczynniki, wzorce, materiały odniesienia itd.*
- *opis stosowanej aparatury (typ, klasa, producent)*
- *parametry pomiaru*
- *obliczenia i testy statystyczne*
- *reprezentatywne wykresy*
- *kryteria akceptacji*
- *kryteria rewalidacji*
- *względy bezpieczeństwa*
- *podsumowanie i wnioski.*

## *Podsumowanie*

- zagadnienia jakość w laboratorium analitycznym
- spójność pomiarowa, niepewność, źródła niepewności
- analiza statystyczna wyników pomiaru
- podstawowe cechy statystyczne (miary położenia i rozproszenia)
- populacja i próbka statystyczna, rozkład Gaussa
- rodzaje błędów w praktyce laboratoryjnej
- przedział ufności, test Q-Dixona, liczby znaczące
- walidacja i rewalidacja metod analitycznych
  - warunki uzyskania miarodajnych wyników walidacji
  - *cechy charakterystyczne metody określane przed walidacją*
  - podstawowe kryteria walidacji (*specyficzność; selektywność; precyzja; powtarzalność; odtwarzalność; precyzja pośrednia; dokładność; poprawność; prawdziwość; liniowość; zakres pomiarowy; czułość; granica wykrywalności i oznaczalności).*