

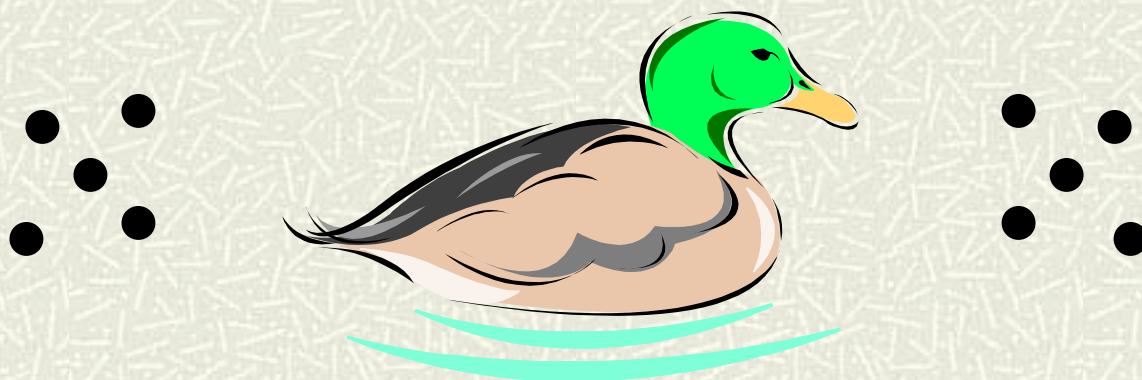
# **WALIDACJA METODYK ANALITYCZNYCH**

**Dr inż. Piotr Konieczka**  
**Katedra Chemii Analitycznej**  
**Wydział Chemiczny**  
**Politechnika Gdańska**

**Walidacja metody** (*method validation*) – proces oceny metody analitycznej prowadzony w celu zapewnienia zgodności ze stawianymi tej metodzie wymogami, definiujący tę metodę oraz pozwalający określić jej przydatność.

- ocena;
- zgodność z wymogami;
- definicja;
- przydatność;

**Dokładność** (*accuracy*) – zgodność pomiędzy uzyskanym wynikiem pomiaru z wartością rzeczywistą (oczekiwaną).

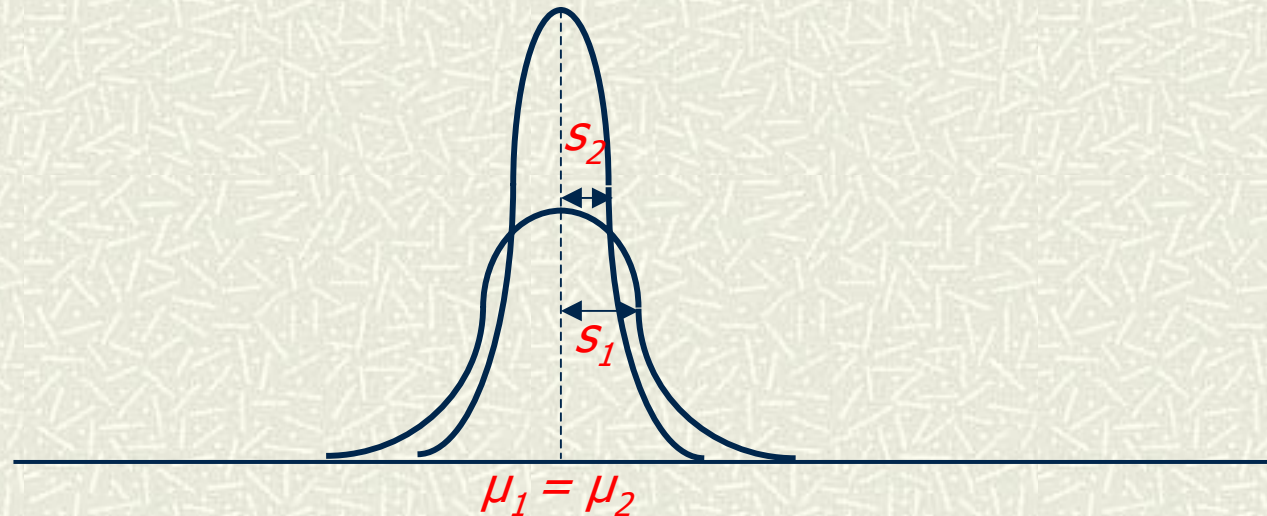
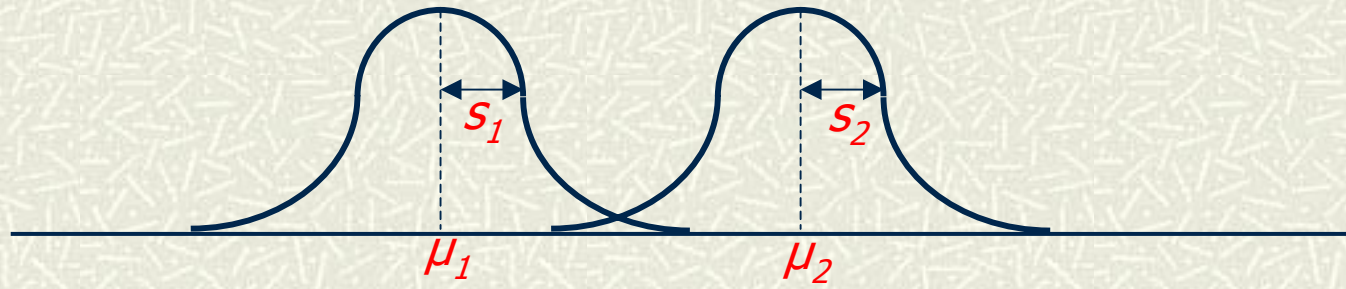


średnio kaczka została zabita

ale obiadu nie ma....

**Prawdziwość** (*trueness*) – zgodność wyniku oznaczenia (obliczonego na podstawie serii pomiarów) z wartością oczekiwaną.

**Precyzja** (*precision*) – zgodność pomiędzy niezależnymi wynikami uzyskanymi w trakcie analizy danej próbki z zastosowaniem danej procedury analitycznej.



**Powtarzalność** (*repeatability*) – precyzja wyników uzyskanych w tych samych warunkach pomiarowych (dane laboratorium, analityk, instrument pomiarowy, odczynniki).

- wyznaczana na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego serii pomiarów przeprowadzonych:
  - w danym laboratorium;
  - przez danego analityka;
  - z wykorzystaniem danego urządzenia pomiarowego;
  - w krótkim okresie czasu;

## Powtarzalność ...

- wartość wyznaczonej powtarzalności metody może dotyczyć zarówno bardzo specyficznej procedury analitycznej, w której określony i zdefiniowany jest skład matrycy (czyli np.: metoda oznaczania zawartości analitu X w matrycy Y) jak i procedury oznaczania danego analitu bez sprecyzowania składu matrycy;
- w pierwszym przypadku wartość odchylenia standardowego jest obliczana na podstawie pomiarów wykonanych w próbkach o jednakowym składzie matrycy, w drugim natomiast przypadku należy wartość odchylenia standardowego obliczać na podstawie pomiarów przeprowadzonych dla próbek różniących się składem matrycy;

**Precyzja pośrednia** (*intermediate precision*) – długoterminowe odchylenie procesu pomiarowego, do którego wyznaczenia wykorzystuje się odchylenie standardowe serii pomiarów uzyskanych w danym laboratorium w kilkutygodniowym okresie czasu. Precyzja pośrednia jest pojęciem szerszym od powtarzalności.

- jest pojęciem szerszym od powtarzalności, gdyż na jej wartość wpływ mają:
- czynniki osobowe – różni analitycy wykonujący oznaczenia jak i niestabilność pracy danego analityka w ciągu całego okresu czasu;
  - czynniki aparaturowe – ze względu na to, że pomiary mogą być przeprowadzone z wykorzystaniem:
    - różnych instrumentów;
    - roztworów wzorcowych i odczynników;
    - różnych akcesoriów;



**Odtwarzalność** (*reproducibility*) – precyzja wyników uzyskanych w różnych laboratoriach z zastosowaniem danej metody pomiarowej.

Warunki prowadzenia pomiarów analitycznych jakie **muszą** być zachowane w trakcie wyznaczania powtarzalności, precyzji pośredniej i odtwarzalności.

Warunek	Powtarzalność	Precyzja pośrednia	Odtwarzalność
Aparatura	S	Z	Z
Partia akcesoriów	S	Z	Z
Analitik	S	Z	Z
Skład matrycy	Z	Z	Z
Stężenie	Z	Z	Z
Partia odczynników	S	Z	Z
Warunki laboratoryjne	S	Z	Z
Laboratorium	S	S	Z

S – konieczność zachowania stałości parametru

Z – możliwość zmiany danego parametru

**Zakres pomiarowy** (*range*) – zakres wartości (stężeń analitu), w którym błąd urządzenia pomiarowego jest poniżej założonego. Coraz częściej jednak określa się go jako zakres wartości stężeń wyznaczonych z założoną precyzją, dokładnością i niepewnością;

**Liniowość** (*linearity*) – przedział zakresu pomiarowego metody analitycznej, w którym sygnał wyjściowy jest proporcjonalny do oznaczanego stężenia analitu.

**Stosunek sygnału do szumu** (*Signal to Noise Ratio – S/N*): wielkość bezwymiarowa, która określa stosunek sygnału analitycznego do średniego poziomu szumów tła dla określonej próbki.

- jego wartość może służyć do określania wpływu poziomu szumu na względny błąd pomiaru;
- najbardziej praktyczną metodą jego wyznaczenia jest stosunek średniej arytmetycznej serii pomiarów dla próbek ślepych (bądź zawierających analit na bardzo niskim poziomie) do wartości odchylenia standardowego uzyskanego dla tej serii pomiarów;

**Granica wykrywalności** (*Limit of Detection - LOD*): najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji (pierwiastka, jonu, związku) możliwe do wykrycia za pomocą danej metody czy też techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.

- związana ściśle z określoną procedurą analityczną (jej wartość liczbowa zależy nie tylko od poziomu zawartości oznaczanego składnika, ale również od obecności innych składników występujących w analizowanej próbce)
- jest najmniejszym stężeniem analitu, przy którym istnieje pewność jego obecności w próbce;
- jej wartość charakteryzuje się wymiarem zawartości czy stężenia (takim jak oznaczany analit czyli np.  $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ );
- ściśle związana z poziomem szumów stosowanego urządzenia pomiarowego (przyjmuje się, że jej wartość to trzykrotność tego poziomu szumów);

**Granica oznaczalności** (*Limit of Quantification - LOQ*): najmniejsza ilość lub najmniejsze stężenie substancji, możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją.

- jej wartość jest zawsze wielokrotnością wyznaczonej wartości granicy wykrywalności – najczęściej:  $LOQ = 3 \cdot LOD$ ;
- chociaż znane są takie definicje granicy oznaczalności, w których jej wartość jest równa  $2 \cdot LOD$  czy też  $6 \cdot LOD$ ;

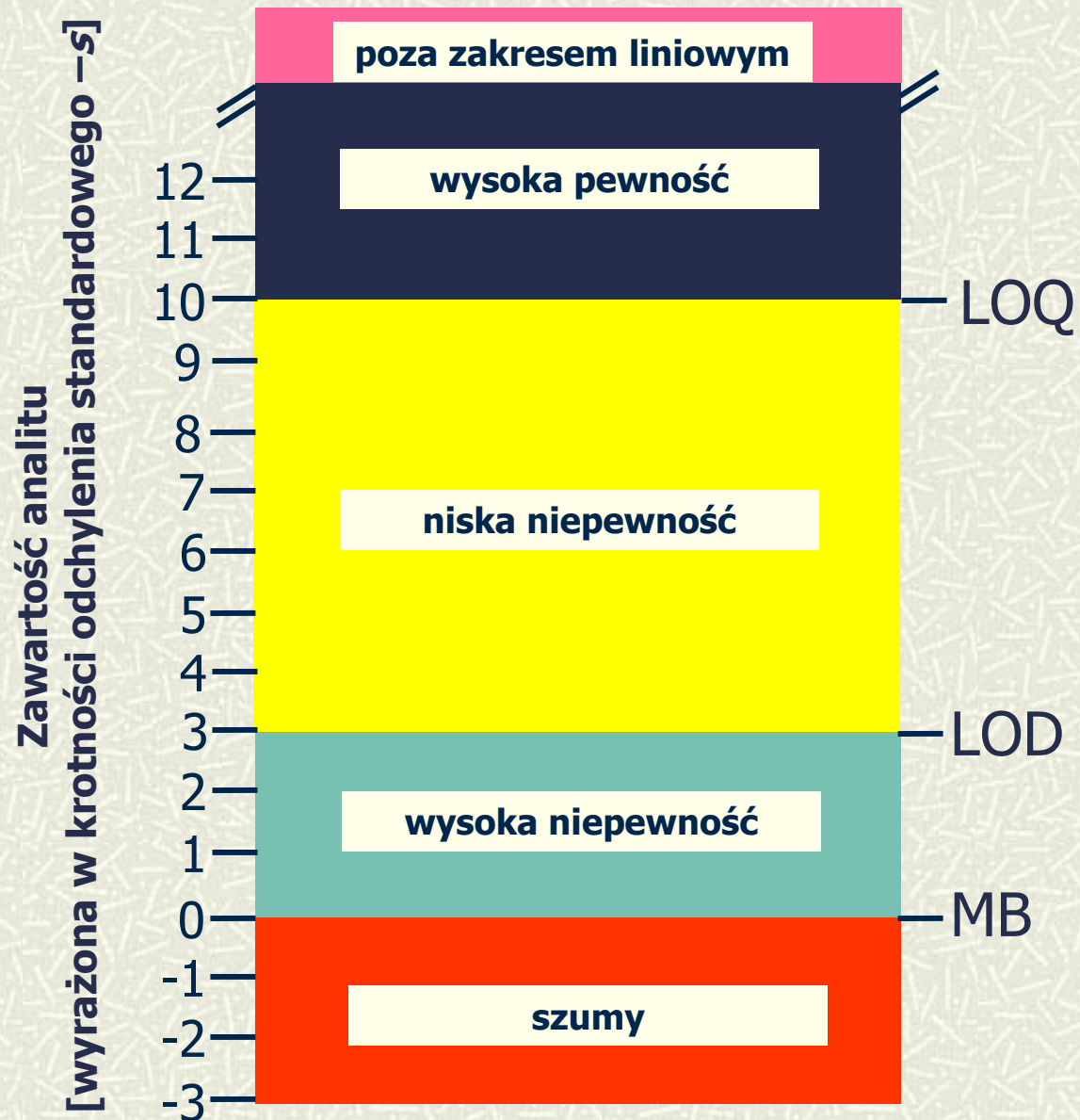
**Granica wykrywalności stosowanego instrumentu pomiarowego (np. detektora) (*Instrument Detection Limit - IDL*):** najmniejsza zawartość oznaczanego analitu jaka może zostać wykryta (bez ilościowego jej oznaczenia) przy pomocy danego urządzenia pomiarowego.

- wartość ta jest z reguły niższa niż wyznaczana granica wykrywalności procedury analitycznej i jest wyznaczana na podstawie oznaczania zawartości analitu w sporządzonych roztworach wzorcowych (ślepe próby), bez poddawania tych roztworów całej procedurze analitycznej;



**Granica wykrywalności procedury (metody) analitycznej** (*Method Detection Limit - MDL*): najmniejsza zawartość analitu jaka może zostać wykryta przy zastosowaniu danej procedury analitycznej.

- na wartość tak wyznaczonej MDL mają wpływ wszystkie etapy procedury analitycznej;
- wartość MDL jest zawsze większa od odpowiedniej (stosowanej w ramach tej procedury) wartości IDL;



## Metoda powinna zostać poddana procesowi walidacji gdy:

- opracowywana jest nowa metoda analityczna;
- prowadzone są próby rozszerzenia zakresu stosowalności znanej metody analitycznej np. do oznaczania danego analitu ale w innej matrycy;
- kontrola jakości stosowanej metody stwierdziła zmienność jej parametrów walidacyjnych w czasie;
- dana metoda analityczna ma być wykorzystywana w innym laboratorium (różnym od tego w którym była już poddana procesowi walidacji), bądź z zastosowaniem innej aparatury czy też oznaczenia za jej pomocą mają być wykonywane przez innego analityka;
- przeprowadza się porównanie nowej metody analitycznej ze znaną metodą standardową;

Poza wyznaczeniem parametrów walidacyjnych, przed przystąpieniem do procesu walidacji należy określić podstawowe cechy charakterystyczne metody analitycznej a mianowicie:

- rodzaj oznaczanego składnika;
- poziom stężeń;
- zakres stężeń analitu;
- rodzaj matrycy;
- obecność substancji przeszkadzających (interferentów) wraz z określeniem konieczności ich oznaczenia;
- istnienie ogólnych regulacji i wymogów, którym powinna sprostać metoda analityczna;

- rodzaj oczekiwanej informacji – ilościowa czy jakościowa;
- wymagana granica wykrywalności i oznaczalności;
- oczekiwana i wymagana precyzja i dokładność metody;
- wymagana wrażliwość (odporność) metody;
- wymagana aparatura – czy oznaczenia z wykorzystaniem danej metody mają być przeprowadzone w oparciu o ściśle zdefiniowany instrument, czy też może być przeprowadzana w oparciu o aparaturę tego samego typu;
- możliwość zastosowania walidowanej metody w innym niż dane laboratorium;

# Zestawienie parametrów metody analitycznej podlegających procesowi walidacji zalecane przez ICH i USP

<b>Parametr</b>	<b>ICH</b>	<b>USP</b>
Precyzja	+	+
- powtarzalność	+	
- precyzja pośrednia	+	
- odtwarzalność		
Dokładność	+	+
Granica wykrywalności	+	+
Granica oznaczalności	+	+
Specyficzność/selektywność	+	+
Liniowość	+	+
Zakres pomiarowy	+	+
Odporność		+
Trwałość (ruggedness)/Elastyczność		+

ICH – The International Conference on Harmonization

USP – The United States Pharmacopoeia

Proces walidacji metody analitycznej może być przeprowadzony właściwie w dowolnej kolejności (jeśli brać pod uwagę kolejność określania badanych parametrów), jednak najbardziej logicznym wydaje się jej przeprowadzenie zgodnie z poniższym schematem:

- określenie selektywności w oparciu o analizę roztworów wzorcowych;
- wyznaczenie liniowości, granic wykrywalności i oznaczalności, zakresu pomiarowego;
- określenie powtarzalności;
- wyznaczenie precyzji pośredniej;
- określenie selektywności w oparciu o wyniki uzyskane w trakcie analiz próbek rzeczywistych;
- wyznaczenie dokładności na podstawie analizy materiałów odniesienia na różnych poziomach zawartości;
- określenie odporności metody – np. na podstawie wyników porównań międzylaboratoryjnych;

Metoda może zostać poddana procesowi walidacji jedynie wówczas, gdy wcześniej została zoptymalizowana.

Najpierw optymalizacja metody

Dopiero potem jej walidacja



Proces walidacji metody analitycznej powinien być zakończony sporządzeniem raportu końcowego zawierającego:

- przedmiot i cel metody analitycznej (zakres jej stosowalności, rodzaj);
- podstawy metrologiczne;
- rodzaj analitu(ów) i skład matrycy;
- spis wszystkich wykorzystywanych odczynników, wzorców, materiałów odniesienia wraz z ich dokładną specyfikacją (czystość, jakość, producent, w przypadku syntezy w laboratorium – dokładny opis tej syntezy);
- opis procedur służących do sprawdzania czystości stosowanych substancji i jakości wykorzystywanych wzorców;
- środki ostrożności;

- plan opisujący sposób przeniesienia metody z warunków laboratoryjnych do pomiarów rutynowych;
- parametry metody;
- spis parametrów krytycznych – tzn. tych, których niewielkie wahania mogą w sposób znaczący wpływać na wynik końcowy oznaczenia – parametry wynikające z określenia odporności metody analitycznej;
- spis wszelkiego rodzaju sprzętu laboratoryjnego wraz z ich cechami charakterystycznymi (wymiary, klasa dokładności itp.), schematy blokowe w przypadku skomplikowanych zestawów aparaturowych;

- szczegółowy opis warunków przeprowadzenia procedury analitycznej;
- opis postępowania statystycznego wraz z załączonymi odpowiednimi równaniami i obliczeniami;
- opis procedury w celu kontroli jakości w przypadku analiz rutynowych;
- odpowiednie rysunki i wykresy np. chromatogramy, krzywe kalibracyjne;
- zgodność wyznaczonych parametrów metody z założonymi wartościami granicznymi;

- wartość niepewności pomiaru analitycznego;
- kryteria, które należy spełnić w procesie rewalidacji;
- imię i nazwisko osoby, przeprowadzającej proces walidacji;
- spis wykorzystywanej literatury;
- podsumowanie i wnioski;
- potwierdzenie i podpis osoby odpowiedzialnej za sprawdzenie i zatwierdzenie procesu walidacji;

**Niepewność pomiaru** (*uncertainty*) – parametr związany z wynikiem pomiaru, który określa przedział wokół wartości średniej, w którym może (na założonym poziomie istotności) znaleźć się wartość oczekiwana.

**Standardowa niepewność pomiaru** (*standard uncertainty*)  
–  $u(x_i)$  - niepewność pomiaru przedstawiona i obliczona jako odchylenie standardowe.

**Całkowita standardowa niepewność** (*combined standard uncertainty*) –  $u_c(y)$  – standardowa niepewność wyniku  $y$  pomiaru, której wartość jest obliczona na podstawie niepewności parametrów wpływających na wartość wyniku analizy z zastosowaniem prawa propagacji niepewności.

**Rozszerzona niepewność** (*expanded uncertainty*) - ***U*** – wielkość określająca przedział wokół uzyskanego wyniku analizy, w którym można, na odpowiednim, przyjętym poziomie istotności (prawdopodobieństwa) oczekiwać wystąpienia wartości oczekiwanej;



**Współczynnik rozszerzenia** (*coverage factor*) –  **$k$**  – wartość liczbowa użyta do wymnożenia całkowitej standardowej niepewności pomiaru w celu uzyskania rozszerzonej niepewności, wartość współczynnika zależy od przyjętego poziomu prawdopodobieństwa (np.: dla 95 % wynosi 2) i najczęściej jest wybierana z przedziału 2-3;

**Metoda typu A szacowania niepewności** – metoda szacowania niepewności oparta na pomiarach statystycznych (w oparciu o odchylenie standardowe serii pomiarów);

**Metoda typu B szacowania niepewności** – metoda szacowania niepewności wykorzystująca inne metody niż statystyczne:

- wcześniejsze doświadczenia;
- wcześniejsze wyniki podobnych badań;
- dostarczone przez producenta specyfikacje wykorzystywanych instrumentów, stosowanych odczynników czy też np. naczyń miarowych;
- wyniki zaczerpnięte z wcześniejszych raportów np. dotyczące kalibracji;
- niepewność obliczona na podstawie wyników badań dla materiału odniesienia.

# Sposób postępowania przy wyznaczaniu niepewności całkowitej pomiaru analitycznego (1)

W/g GUM (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement) w celu określenia niepewności wyniku analizy należy:

## 1. Zdefiniować procedurę pomiarową i wielkość oznaczaną

Należy jasno zdefiniować wielkość, jaka nas interesuje w danym pomiarze, wraz z jej jednostką a także jasno określić wielkość obserwowaną oraz parametr poszukiwany (rezultat).

# Sposób postępowania przy wyznaczaniu niepewności całkowitej pomiaru analitycznego (2)

2. Opracować model (najczęściej w postaci w matematycznej) służący do obliczenia wyniku analizy na podstawie mierzonych parametrów

Model matematyczny wiąże wynik analizy (tę którą mamy określić) z wartościami obserwowanymi (pomiarowymi). Zależność ta ma postać:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n)$$

gdzie:

$y$  – wartość wyniku;

$x_1, x_2, \dots, x_n$  – wartości pomiarowe;

# Sposób postępowania przy wyznaczaniu niepewności całkowitej pomiaru analitycznego (3)

3. Nadać wartość wszystkim możliwym parametrom mogącym mieć wpływ na wynik końcowy analizy wraz z określeniem dla każdego z nich wielkości standardowej niepewności

Każda w wielkości charakteryzuje się nazwą, jednostką, wartością, standardową niepewnością oraz ilością stopni swobody.

Metoda typu A szacowania niepewności - wartość niepewności standardowej jest równa odchyleniu standardowemu średniej arytmetycznej.

Metoda typu B szacowania niepewności - wartość ściśle związana z rozkładem prawdopodobieństwa jaki opisuje rozkład zmiennej.

Np.: gdy zmienna charakteryzuje się rozkładem jednostajnym (prostokątnym) – obliczona wartość niepewności standardowej wynosi:  $a/\sqrt{3}$

zmienna charakteryzuje się rozkładem trójkątnym:  $a/\sqrt{6}$

# Sposób postępowania przy wyznaczaniu niepewności całkowitej pomiaru analitycznego (4)

## 4. Zastosować prawo propagacji niepewności do obliczenia całkowitej standardowej niepewności wyniku analizy

Dla danego modelu matematycznego wiążącego wynik końcowy analizy z parametrami mierzonymi, obliczenie niepewności standardowej następuje na podstawie prawa propagacji wg wzoru:

$$u_c^2(y) = \sum \left( \frac{\delta f}{\delta x_i} \right)^2 \cdot (u(x_i))^2$$

## Sposób postępowania przy wyznaczaniu niepewności całkowitej pomiaru analitycznego (5)

5. Przedstawić wynik końcowy analizy w postaci wynik  $\pm$  rozszerzona niepewność (po zastosowaniu odpowiedniego współczynnika  $k$ ).

Obliczona wg powyższego równania niepewność jest całkowitą standardową niepewnością wyniku końcowego oznaczenia. W celu obliczenia wartości rozszerzonej niepewności należy niepewność standardową pomnożyć przez odpowiedni współczynnik rozszerzenia  $k$ .



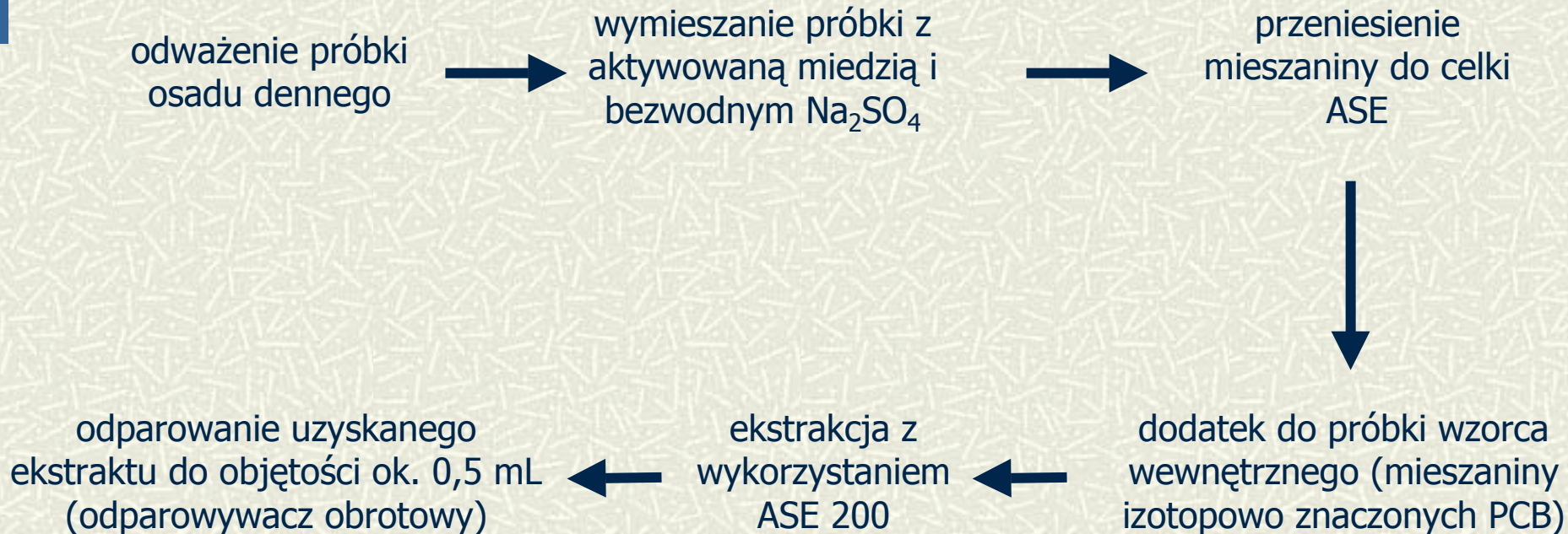
## Końcowy wynik analizy zawiera zatem:

- jasno zdefiniowaną procedurę pomiarową;
- określenie wartości oznaczanej wraz z jej jednostką;
- wynik wraz z rozszerzoną niepewnością ( $y \pm U$  wraz z jednostkami dla  $y$  i dla  $U$ );
- współczynnik  $k$  dla którego obliczono rozszerzoną niepewność.

## Przykład szacowania niepewności

Szacowano wartość rozszerzonej niepewności dla oznaczania stężeń wybranych analitów z grupy polichlorowanych bifenyli (PCB No 28, 101, 153 i 170) w osadzie dennym.

# Przygotowanie próbki (ekstraktu)



# Przygotowanie próbki (oczyszczenie ekstraktu, analiza)

wypełnienie kolumnienki SPE kwaśną krzemionką (40 % wag.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) oraz bezwodnym  $\text{Na}_2\text{SO}_4$



przemycie złoża heksanem (kondycjonowanie)



oczyszczenie ekstraktu na kolumnie SPE (heksan)

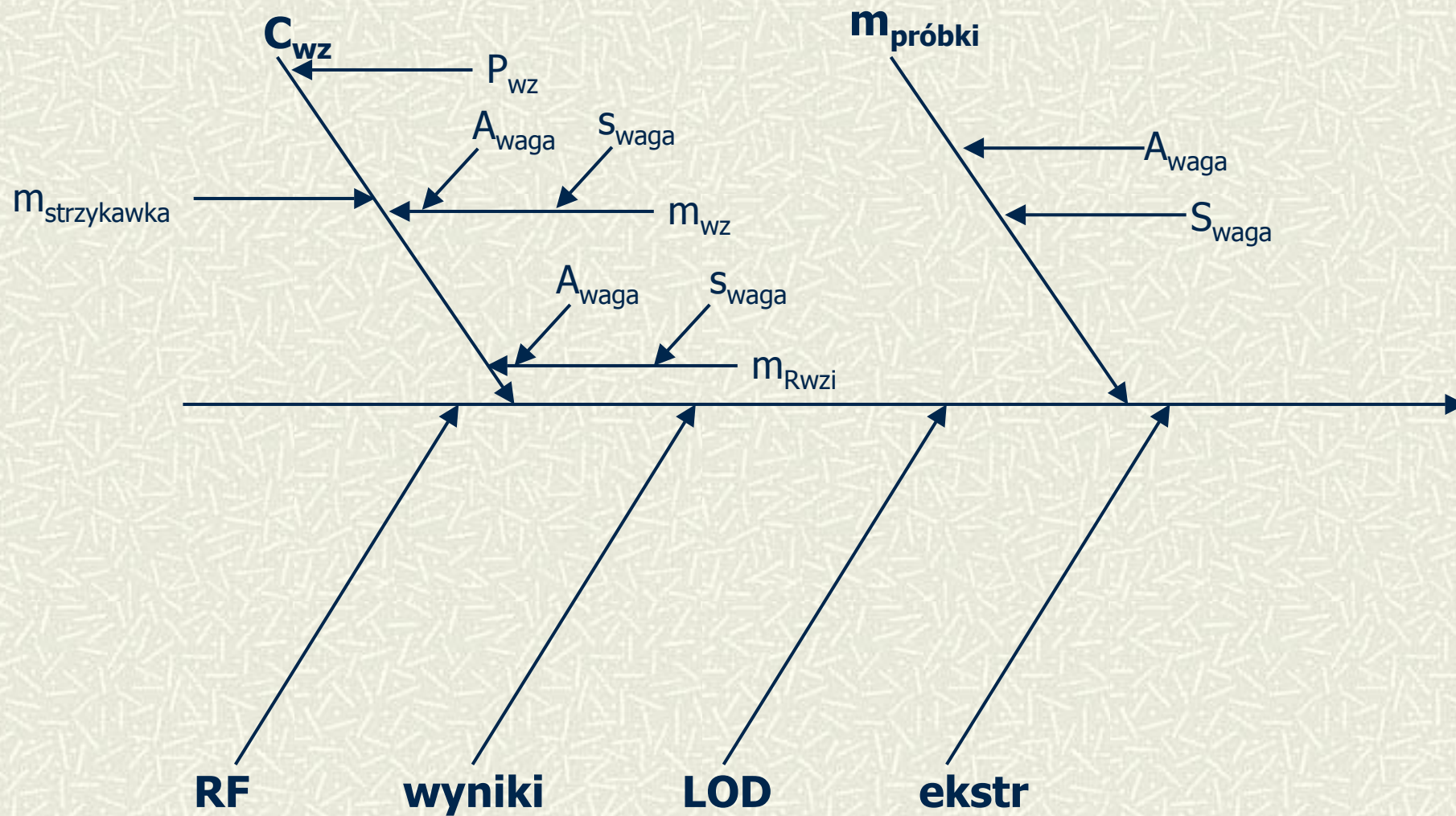


odparowanie uzyskanego ekstraktu do objętości ok. 0,5 mL (odparowywacz obrotowy)



analiza GCMS

# Źródła niepewności



# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{śr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s^2_{RF}}{n_1} + \frac{s^2_{\text{wyniki}}}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

gdzie:

*U* – rozszerzona niepewność;

*k* – współczynnik rozszerzenia (zwykle 2);

*c<sub>śr</sub>* - średnie stężenie analitu;

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s_{\text{RF}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{wyniki}}^2}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$u(c_{\text{wz}})$  – standardowa niepewność określenia stężenia wykorzystywanego wzorca;

$$u(c_{\text{wz}})^2 = \underline{u(P_{\text{wz}})^2} + u(m_{\text{wz}})^2 + \sum_{i=1}^j u(m_{\text{rwz}_i})^2 + u(m_{\text{strzykawka}})^2$$

gdzie:

$u(P_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia czystości stosowanego wzorca;

$$u(P_{\text{wz}})^2 = (U / \sqrt{3} / P)^2$$

gdzie:

$U$  - niepewność określenia czystości stosowanego wzorca (podana przez producenta wzorca);

$P$  - czystość stosowanego wzorca (podana przez producenta);

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s_{\text{RF}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{wyniki}}^2}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$u(c_{\text{wz}})$  – standardowa niepewność określenia stężenia wykorzystywanego wzorca;

$$u(c_{\text{wz}})^2 = u(P_{\text{wz}})^2 + \underline{u(m_{\text{wz}})^2} + \sum_{i=1}^j u(m_{\text{rwz}_i})^2 + u(m_{\text{strzykawka}})^2$$

gdzie:

$u(P_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia czystości stosowanego wzorca;

$u(m_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia masy użytego wzorca (dla czystej substancji)

$$u(m_{\text{wz}})^2 = \left( \sqrt{s_{\text{waga}}^2 + A_{\text{waga}}^2} / m_{\text{wz}} \right)^2$$

gdzie:

$s_{\text{waga}}$  - odchylenie standardowe dla wykorzystywanej wagi;

$A_{\text{waga}}$  - dokładność wykorzystywanej wagi;

$m_{\text{wz}}$  - masa wzorca;



# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s_{\text{RF}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{wyniki}}^2}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$u(c_{\text{wz}})$  – standardowa niepewność określenia stężenia wykorzystywanego wzorca;

$$u(c_{\text{wz}})^2 = u(P_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{wz}})^2 + \sum_{i=1}^j u(m_{\text{rwz}_i})^2 + u(m_{\text{strzykawka}})^2$$

gdzie:

$u(P_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia czystości stosowanego wzorca;

$u(m_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia masy użytego wzorca (dla czystej substancji)

$u(m_{\text{rwz}})$  - standardowa niepewność wyznaczenia masy roztworu wzorcowego;

$$u(m_{\text{rwz}})^2 = \left( \sqrt{s_{\text{waga}}^2 + A_{\text{waga}}^2} / m_{\text{rwz}} \right)^2$$

gdzie:

$m_{\text{rwz}}$  - masa roztworu wzorcowego;

\*obliczona dla wszystkich roztworów wzorcowych wykorzystywanych w procedurze analitycznej (z uwzględnieniem rozcieńczeń);

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s^2_{\text{RF}}}{n_1} + \frac{s^2_{\text{wyniki}}}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$u(c_{\text{wz}})$  – standardowa niepewność określenia stężenia wykorzystywanego wzorca;

$$u(c_{\text{wz}})^2 = u(P_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{wz}})^2 + \sum_{i=1}^j u(m_{\text{rwz}_i})^2 + \underline{u(m_{\text{strzykawka}})^2}$$

gdzie:

$u(P_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia czystości stosowanego wzorca;

$u(m_{\text{wz}})$  - standardowa niepewność określenia masy użytego wzorca (dla czystej substancji)

$u(m_{\text{rwz}})$  - standardowa niepewność wyznaczenia masy roztworu wzorcowego;

$u(m_{\text{strzykawka}})$  - standardowa niepewność określenia masy wzorca wewnętrznego (roztworu izotopowo znaczonych PCB);

$$u(m_{\text{strzykawka}})^2 = (RSD_{\text{strzykawka}})^2$$

gdzie:

$RSD_{\text{strzykawka}}$  - względne odchylenie standardowe pomiaru 20  $\mu\text{L}$  wzorca wewnętrznego określone na podstawie pomiaru masy;

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s_{\text{RF}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{wyniki}}^2}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$u(m_{\text{próbka}})$  – standardowa niepewność określenia masy próbki osadu dennego;

$$u(m_{\text{próbka}})^2 = \left( \sqrt{s_{\text{waga}}^2 + A_{\text{waga}}^2} / m_{\text{próbka}} \right)^2$$

gdzie:

$m_{\text{próbka}}$  - masa próbki osadu dennego;

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s_{RF}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{wyniki}}^2}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$s_{RF}$  – odchylenie standardowe wyznaczenia współczynnika odpowiedzi;

$n_1$  – liczba niezależnych analiz (nastrzyków) roztworów standardowych, na podstawie których wyznaczono współczynnik odpowiedzi;

$$s_{RF}^2 = (RSD_{RF})^2$$

gdzie:

$RSD_{RF}$  - względne odchylenie standardowe wyznaczonego współczynnika odpowiedzi;

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s_{\text{RF}}^2}{n_1} + \frac{s_{\text{wyniki}}^2}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + u(c_{\text{ekstr}})^2}$$

$s_{\text{wyniki}}$  – odchylenie standardowe uzyskanych wyników;

$n_2$  – liczba niezależnych, analizowanych próbek osadu dennego;

$$s_{\text{wyniki}}^2 = \left( RSD_{\text{wyniki}} \right)^2$$

gdzie:

$RSD_{\text{wyniki}}$  - względne odchylenie standardowe wyników;

# Niepewność - obliczenia

$$U = k \cdot c_{\text{sr}} \cdot \sqrt{u(c_{\text{wz}})^2 + u(m_{\text{próbka}})^2 + \frac{s^2_{\text{RF}}}{n_1} + \frac{s^2_{\text{wyniki}}}{n_2} + u(c_{\text{LOD}})^2 + \cancel{u(c_{\text{ekstr}})^2}}$$

$u(c_{\text{LOD}})$  – standardowa niepewność wyznaczenia stężenia analitu dla ślepej próby;

$u(c_{\text{ekstr}})$  – standardowa niepewność wyznaczenia niepewności ekstrakcji:

$$u(c_{\text{LOD}})^2 = \left( \frac{\text{LOD}}{c_{\text{sr}}} \right)^2$$

gdzie:

LOD – wyznaczona granica oznaczalności;

W przypadku zastosowania techniki rozcieńczenia izotopowego obliczenia są oparte na wyznaczeniu stosunku sygnałów dla analitu i jego izotopowo znaczonego odpowiednika (dodawanego do próbki na samym początku procedury jej przygotowywania do analizy). Przy założeniu, iż obie formy są ekstrahowane w tym samym stopniu z matrycy (ich stosunek jest stały) ekstrakcja nie ma wpływu na wynik oznaczenia – stąd wartość niepewności tego parametru wynosi 0.

# Uzyskane wyniki

PCB	$u(c_{wz})$	$u(m_{próbk})$	$RSD_{RF}$	$RSD_{wyniki}$	LOD
	[%]				
<b>28</b>	0,69	0,141	1,00	1,36	0,97
<b>101</b>	0,69	0,141	1,83	1,11	0,25
<b>153</b>	0,60	0,141	3,77	0,92	0,23
<b>170</b>	1,08	0,141	2,05	2,62	2,16

- najmniejszy wpływ na całkowitą niepewność pomiaru ma wyznaczenie masy próbki osadu dennego (względna standardowa niepewność 0,14 %);
- pozostałe składowe mają podobny udział w całkowitej niepewności (ok. 1%);
- należy także zauważyć, że w przypadku PCB 170 zarówno wyznaczona wartość  $u(c_{LOD})$  jak i  $RSD_{wyniki}$  są najwyższe (w stosunku do pozostałych PCB), co wiąże się z jednej strony z najniższym poziomem oznaczanego stężenia w przypadku tego PCB (wpływ na wartość  $u(c_{LOD})$ ) a z drugiej strony czułością detektora w stosunku do PCB 170 (wpływa na  $RSD_{wyniki}$ ).

# Uzyskane wyniki

<b>PCB</b>	$C_{\text{sr}}$ [ng/g]	$U^*$ [ng/g]	$U^*$ [%]
<b>28</b>	64,3	2,2	3,5
<b>101</b>	48,6	1,1	2,3
<b>153</b>	53,4	1,5	2,8
<b>170</b>	11,42	0,83	7,2

\*obliczenia przeprowadzono dla  $k = 2$



# Uwaga!!!

- W tym miejscu należy jasno uwypuklić różnice pomiędzy błędem pomiaru a niepewnością całkowitą.
- Błąd to różnica pomiędzy wartością oznaczaną a oczekiwaną.
- Niepewność całkowita to zakres przedziału, w którym wartość oczekiwana może się z danym prawdopodobieństwem znaleźć. Wartość niepewności całkowitej nie może zatem służyć do skorygowania uzyskanego wyniku pomiaru.

## Przykład walidacji metodyki analitycznej

- Opracowano metodykę izolacji i oznaczania zawartości tributyllocyny (TBT) w próbkach osadu dennego.
- Zastosowano technikę przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (Accelerated Solvent Extraction-ASE).
- Na etapie oznaczenia końcowego wykorzystano chromatografię gazową sprzężoną z detektorem spektrometrii mas (GCMS).
- Analizę ilościową przeprowadzono wykorzystując technikę rozcieńczenia izotopowego (IDMS).

# Metodyka analityczna – wstępne przygotowanie próbki

- Do odważonej próbki osadu dennego dodawano roztworu wzorcowego zawierającego izotopowoznaczony chlorek tributylowy -  $^{117}\text{Sn}$ .
- Następnie dodawano roztworu HCl w celu uzyskania wartości pH ok. 2.
- Po dokładnym wymieszaniu składników (15 minutowe wytrząsanie) dodawano bezwodnego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  w celu otrzymania „suchego proszku”.

- TBT izolowano z tak otrzymanych próbek wykorzystując technikę przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ASE) stosując jako rozpuszczalnik 0,05 % roztwór tropolonu w n-heksanie.
- Pozostałe warunki procesu ekstrakcji były następujące:
  - Cisnienie: 14 MPa (2000 psi);
  - Temperatura: 125 °C;
  - Czas ogrzewania: 6 min;
  - Czas cyklu statycznego (właściwej ekstrakcji): 5 minut;

## Metodyka analityczna – oczyszczanie ekstraktu (*clean-up*)

- Do tak uzyskanego ekstraktu dodawano w celu jego osuszenia bezwodnego  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
- Warstwę organiczną izolowano poprzez dekantację a następnie odparowywano do objętości 1 ml z wykorzystaniem odparowywacza obrotowego, po czym do objętości końcowej 0,3 ml w strumieniu azotu.

## Metodyka analityczna – derywatywacja

- Kolejnym etapem opracowywanej metodyki analitycznej była derywatywacja z wykorzystaniem odczynnika Grignarda.
- W tym celu do uzyskanego wzbogaconego ekstraktu dodawano 0,3 ml odczynnika derywatyzującego (2,0 molowego roztworu bromku pentylomagnezowego).
- Reakcja derywatywacji przebiegała w temperaturze pokojowej przez 45 minut.
- Po tym czasie w celu wyizolowania nadmiaru odczynnika derywatyzującego dodawano 1 ml roztworu (20 %)  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

## Metodyka analityczna – oznaczenie końcowe

- Uzyskane warstwy rozdzielano poprzez odwirowanie a następnie warstwę organiczną przenoszono do fiolek i poddawano analizie chromatograficznej.
- Na etapie oznaczenia końcowego stosowano technikę GC-IDMS.

# Metodyka analityczna – optymalizacja

- Optymalizacji poddano etap ekstrakcji oraz etap kalibracji.
- W przypadku etapu ekstrakcji przeprowadzono po 6 niezależnych oznaczeń TBT w dostarczonych próbkach osadu dennego stosując 4-cykliczną i 8 cykliczną ekstrakcję.
- W przypadku optymalizacji kalibracji zastosowano dwie metody: krzywej wzorcowej i dodatku wzorca. Także i w tym przypadku przeprowadzono po 6 niezależnych pomiarów.



# Metodyka analityczna – optymalizacja

Otrzymane wyniki (wraz z ich analizą statystyczną) zestawiono w Tabelach:

	Ekstrakcja	
	4 cykliczna	8 cykliczna
zawartość TBT ng Sn/g	96,6	100,3
	92,0	99,3
	91,3	90,8
	93,0	83,9
	89,8	98,4
	84,9	87,2
średnia	91,3	93,3
odchylenie standardowe	3,9	7,0
$R \pm U(k=2)^*$	<b>0,98 ± 0,17</b>	

	Kalibracja	
	Krzywa wzorcowa	Dodatek wzorca
zawartość TBT ng Sn/g	108,2	86,2
	101,5	88,1
	83,2	102,8
	98,3	104,8
	98,5	92,7
	99,6	92,3
średnia	98,2	94,5
odchylenie standardowe	8,2	7,7
$R \pm U(k=2)^*$	<b>1,04 ± 0,23</b>	

gdzie:

$$R = \frac{\overline{x_1}}{\overline{x_2}} \quad U = k \cdot \frac{\sqrt{(s_1^2 + s_2^2)}}{\left( \frac{\overline{x_1 + x_2}}{2} \right)}$$

$U$  - rozszerzona niepewność dla wyznaczonego stosunku;  
 $k$  - współczynnik rozszerzenia, którego wartość zależy od przyjętego poziomu prawdopodobieństwa – najczęściej 95 %, dla którego  $k = 2$ ;

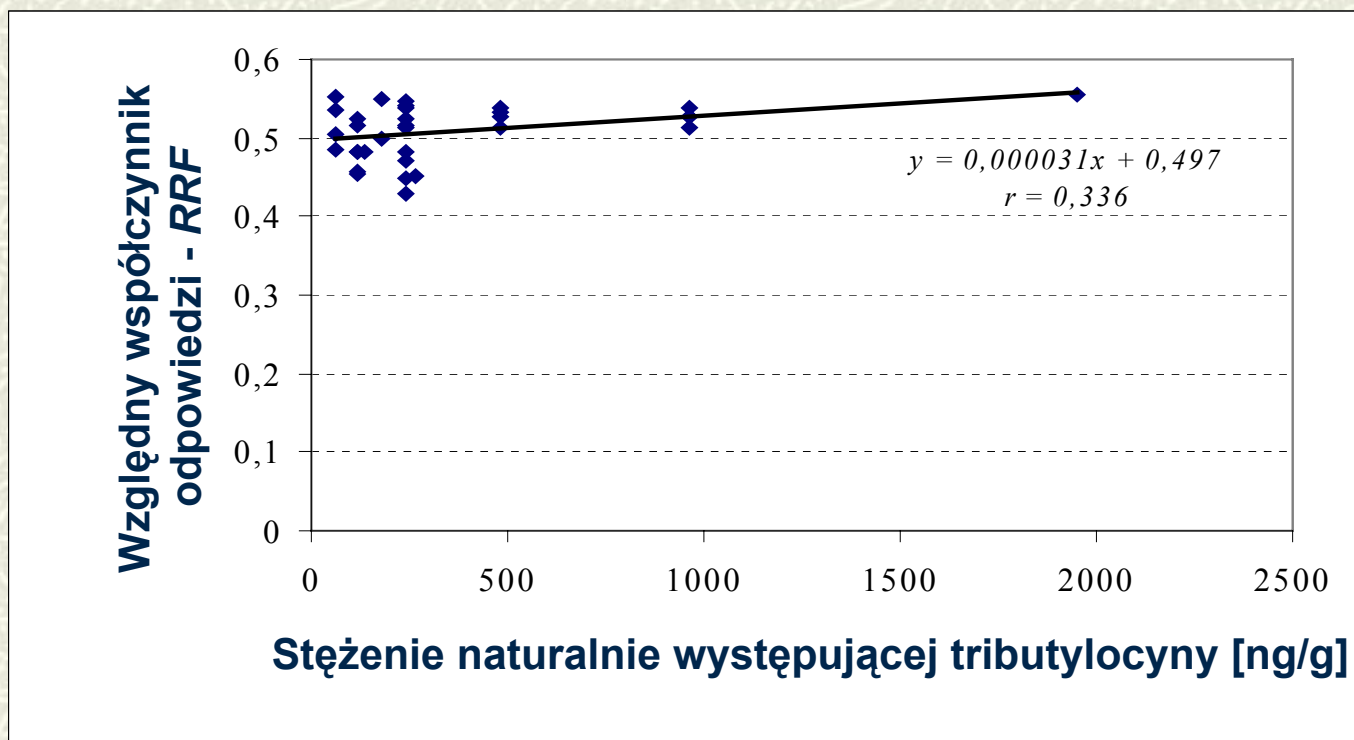
- Analiza uzyskanych wyników dowodzi, iż wartości uzyskane w wyniku zastosowania 4-cyklicznej ekstrakcji nie różnią się w sposób statystycznie istotny od tych uzyskanych w wyniku zastosowania ekstrakcji 8-cyklicznej.
- Także stosowanie dwóch metod kalibracji prowadzi do uzyskiwania wyników nie różniących się statystycznie istotnie.

- **Liniowość**

- W celu wyznaczenia liniowości metodyki analitycznej zestawiono wartości uzyskanych względnych współczynników odpowiedzi - *RRF* w funkcji stężeń TBT.
- Otrzymana zależność powinna być funkcją liniową o współczynniku kierunkowym nieistotnie różnym od zera i wartości wyrazu wolnego nie różniącym się statystycznie istotnie od wartości średniej *RRF*.

# Walidacja metodyki analitycznej

- **Liniowość**



## 2. Granica wykrywalności

- Wartość granicy wykrywalności oszacowano jak trzykrotność wartości sygnału do szumu dla analizy ślepej próby wykorzystując krzywą kalibracyjną.
- Otrzymano wartość 1,5 ng Sn/g próbki osadu dennego.

## 3. Powtarzalność

- Powtarzalność opracowywanej metodyki wyznaczono w oparciu o obliczone wartości odchyłeń standardowych dla 4 serii próbek certyfikowanego materiału odniesienia PACS-2 (TBT w osadzie dennym).
- Każda seria składała się z 6 niezależnie przygotowanych próbek, które analizowano w ciągu jednego dnia.

## 3. Powtarzalność

	<b>Seria 1</b>	<b>Seria 2</b>	<b>Seria 3</b>	<b>Seria 4</b>
zawartość TBT ng Sn/g	1004	1003	970	1052
	1041	996	979	1052
	991	999	979	1027
	1017	1056	978	1075
	1041	992	976	1056
	1041	997	984	1047
średnia	<b>1023</b>	<b>1007</b>	<b>978</b>	<b>1051</b>
odchylenie standardowe	<b>22,0</b>	<b>24,2</b>	<b>4,5</b>	<b>15,3</b>
RSD	<b>2,2</b>	<b>2,4</b>	<b>0,5</b>	<b>1,5</b>

- Powtarzalność wyznaczona jako względne odchylenie standardowe wynosi ok. 2 %.

## 4. Precyzja pośrednia

- Wielkość precyzji pośredniej obliczono jako względne odchylenie standardowe obliczone dla wszystkich wyników (4 serie po 6 wyników) dla których obliczono poszczególne wartości powtarzalności.
- Uzyskano następujące wartości:

Wartość średnia:	1015 ng Sn/g
Odchylenie standardowe:	32 ng Sn/g
RSD:	3,2 %



## 5. Niepewność

- Niepewność obliczono w oparciu o GUM zgodnie z zależnością:

$$U = k \cdot c \cdot \sqrt{u(c_{wz})^2 + u(m)^2 + \frac{(RSD_{RRF})^2}{n_1} + \frac{(RSD_{wyniki})^2}{n_2} + u(c_{LOD})^2}$$

gdzie:

$U$  – całkowita rozszerzona niepewność;

$k$  – współczynnik rozszerzenia (zwykle równy 2);

$c$  – średnie stężenie TBT;

$u(c_{wz})$  – niepewność związana ze stosowanymi wzorcami;

$u(m)$  – niepewność wyznaczenia masy próbki osadu dennego;

$RSD_{RRF}$  – względne odchylenie standardowe względnego współczynnika odpowiedzi;

$n_1$  – liczba niezależnych roztworów wzorcowych wykorzystywanych na etapie kalibracji;

$RSD_{wyniki}$  – względne odchylenie standardowe uzyskanych wyników;

$n_2$  – liczba niezależnych próbek osadu dennego poddana analizie;

$u(c_{LOD})$  – niepewność związana z wyznaczeniem granicy wykrywalności;

## 5. Niepewność

- Uzyskano następujące wartości:

dla materiału odniesienia PACS-2

$$U = 61 \text{ ng Sn/g}$$

dla próbek osadu dennego

$$U = 5,2 \text{ ng Sn/g}$$

## 6. Dokładność

- Dokładność metodyki wyznaczono na podstawie analizy zawartości TBT w próbkach certyfikowanego materiału odniesienia.
- W tym celu uzyskaną wartość średnią porównano z wartością certyfikowaną.

Podana przez producenta wartość certyfikowana wynosiła:

$$c_{\text{cert}} \pm U (k=2) = 980 \pm 130 \text{ ng Sn/g}$$

Uzyskana w wyniku analiz wartość średnia:

$$c \pm U (k=2) = 1015 \pm 61 \text{ ng Sn/g}$$

zawarta jest w przedziale ufności podanym przez producenta.

## WNIOSKI

Opracowana metodyka analityczna charakteryzuje się:

- liniowością w szerokim zakresie stężeń zawartości tributyllocyny – 60-2000 ng Sn/g;
- niską wartością granicy wykrywalności – 1,5 ng Sn/g;
- wysoką powtarzalnością – RSD ok. 2 % i precyzją pośrednią – RSD – 3,2 %;
- niską wartością niepewności – ok. 6 %;
- wysoką dokładnością uzyskiwanych wyników;