

ISSN-1509-4650

ANALITYKA

15
LAT

NAUKA I PRAKTYKA

1
2015

ZASTOSOWANIE OLFAKTOMETRII | 34

Olfaktometria pełni istotną rolę w ocenie substancji zapachowych wprowadzanych do środowiska. Jest wykorzystywana do oceny stopnia uciążliwości, częstotliwości występowania oraz wpływu zapachów na komfort życia mieszkańców danego terenu.



ANALITYKA 1 2015

NAUKA

- 4 Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami. Cz. II – Zastosowania
- 12 Mechanizm retencji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Cz. I – Chromatografia cieczowa w normalnym układzie faz
- 16 Zastosowanie nanocząstek materiałów wykazujących właściwości magnetyczne w ekstrakcji do fazy stałej (MSPE)
- 22 Granica wykrywalności. Cz. I – Możliwości detekcji metody analitycznej
- 28 Technika rozcieńczeń izotopowych spektrometrii mas: pół żarzem i całkiem serio. Cz. I

PRAKTYKA

- 34 Zastosowanie olfaktometrii w badaniach środowiskowych
- 44 Radiofarmaceutyki w nowoczesnych technikach diagnostyki obrazowej. Cz. I – Obrazowanie medyczne
- 50 Ekstrakcja w punkcie zmętnienia – alternatywne podejście do przygotowania próbek
- 56 Techniki przygotowania próbek – nowoczesne rozwiązania
- 60 Dobór sorbentów do wzbogacania analitów w próbkach powietrza pobieranych na stanowiskach pracy

POLEMIKI, PROBLEMY


- 65 Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku. Cz. I – Źródła występowania i wyzwania analityczne

70 Lodowa kraina – obszar badań dla chemika analityka. Cz. I – Badania z zakresu chemii analitycznej prowadzone na terenie Antarktyki

78 Rozterki laboranta, czyli jak spełnić wymagania i przeżyć


82 Czy badania biegłości „cierpią” z powodu wymagań Polskiego Centrum Akredytacji

KONFERENCJE, SPRAWOZDANIA

84 XXIII Ogólnopolskie Sympozjum Bromatologiczne 

90 IX Konferencja Chromatograficzna

92 Międzynarodowy Kongres Młodych Chemików YoungChem 2014 

94 X Seminarium Analityczne 

96 XIV Seminarium „Analiza chemiczna w ochronie zabytków”

KONFERENCJE, ZAPROSZENIA

98 Kalendarz konferencji, kursów i szkoleń

PORÓWNIANIA MIĘDZYLABORATORYJNE

104 Badania biegłości laboratoriów – Analizy środowiskowe 2015/2016

104 Environ – Pobieranie próbek kompostu

104 Osady ściekowe Enviromental SS-5-15, Gleby rolne Enviromental SR-3-15

105 Gleby przemysłowe Enviromental SI-4-15, Odpady Enviromental WM-6-15

105 Construction – Mrozoodporność w obecności soli

PRENUMERATA

106 Kupon prenumeraty

NOWOŚCI

107 Nowości w wyposażeniu laboratoriów





ADAM SAJNÓG



MAGDALENA BELTER



DANUTA BARAŃKIEWICZ

Znaczenie tego parametru i jego zrozumienie nie budzi wątpliwości, natomiast samo oznaczanie jego bywa problematyczne z powodów mnogości definicji i trudności natury praktycznej.

Granica wykrywalności

CZ. I – MOŻLIWOŚCI DETEKcji METODY ANALITYCZNEJ

Ogromny postęp technologiczny ubiegłego wieku pozwolił na rozwój technik instrumentalnych w chemii analitycznej. Powstawały kolejne generacje aparatów odznaczające się lepszą czułością, precyzją i dokładnością. Naukowcy uzyskali atrakcyjne narzędzia do badania coraz mniejszych ilości analitu, co rozwinęło analizę śladową i ultraśladową. Pozwoliło to na uzyskanie nieosiągalnej do tej pory wiedzy o składzie chemicznym i procesach zachodzących w otaczającym nas świecie. Naukowcy zauważyli, że sposób, w jaki planowany jest eksperyment i jak przetwarzane są dane doświadczalne, ma ogromny wpływ na końcowy wynik i wnioski z niego płynące. W drugiej połowie XX wieku zaczęto zwracać uwagę na konieczność normalizacji i ujednoczenia praktyk laboratoryjnych, co dało początek metrologii chemicznej, która w tej chwili jest solidnie skonstruowaną i udokumentowaną gałęzią chemii analitycznej. Jednym z filarów metrologii jest walidacja metody analitycznej, która, w dużym skrócie, jest sprawdzeniem i potwierdzeniem użyteczności metody do danego celu. Wśród parametrów walidacyjnych znajdują się granice wykrywalności (*LOD*) i oznaczalności (*LOQ*), które charakteryzują zdolność metody do detekcji

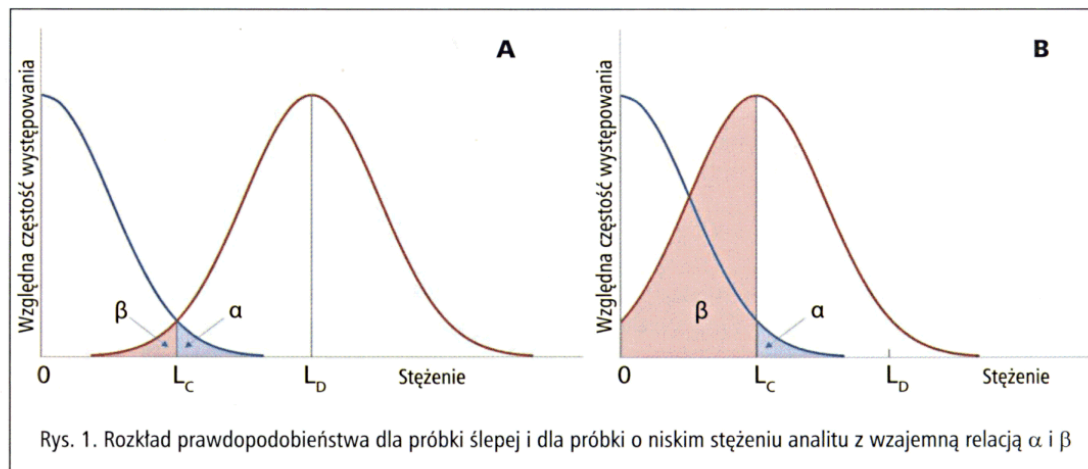
i oznaczania analitów w próbce o możliwie najniższych stężeniach. *LOD* jest bardzo istotnym parametrem w przypadku, gdy znaczenie ma informacja już o samej obecności analitu, szczególnie gdy wymagają tego akty prawne, na przykład przy kontroli dopingowej u sportowców lub zawartości zanieczyszczeń w środowisku. Wartość *LOD* jest również istotna przy ocenie ilości wskaźników nowotworowych oraz zanieczyszczeń w analizowanej próbce. Istnieją sytuacje, które nie wymagają uwzględnienia parametru *LOD* w procesie walidacji, ponieważ badany analit występuje w próbce w wysokim stężeniu, na przykład potas lub glukoza we krwi. Pierwsze wzmianki o możliwościach detekcji układów pomiarowych w chemii sięgają początków XX wieku. Do burzliwego rozwoju tego pojęcia przyczynili się między innymi Heinrich Kaiser i Lloyd A. Currie w latach sześćdziesiątych XX wieku. Wtedy też zaczęto zwracać uwagę na istniejącą w literaturze różnorodność terminów, skrótów i definicji, niekiedy sprzecznych ze sobą, a opisujących zasadniczo to samo pojęcie. Przykłady terminów związanych z detekcją i oznaczaniem analitu podane są w tabeli 1. Granicę wykrywalności najczęściej przedstawia się w postaci skrótu *LOD*, jednakże w literaturze można spotkać również alternatywne formy: L_D , G_W , x_D , C_L . Natomiast dla granicy oznaczalności, poza popularnym zapisem *LOQ*, stosuje się również czasami następujące skróty: L_Q , G_O , x_Q . Seria artykułów, które ukażą się w kolejnych numerach „Analityki”, będzie dotyczyła:

- możliwości detekcji metody analitycznej,
- historii *LOD*,
- trendów w podejściach do szacowania granicy wykrywalności.

Istotne zagadnienia związane z *LOD*

Próbka ślepa (ang. *blank*). Przy określaniu parametrów detekcji metody analitycznej ogromny wpływ ma próbka ślepa. Wartość średnia i odchylenie standardowe uzyskane podczas analizy próbki ślepej są podstawą praktycznie każdej metody szacowania L_C , *LOD* i *LOQ* i należy zwró-

Tabela 1. Terminy związane z detekcją i oznaczaniem analitu	
Zastosowany termin	Znaczenie
Limit of Blank Critical level Critical limit Decision limit	Wartość krytyczna (L_C)
Limit of detection Detection limit Minimum detectable value Lower limit of detection Limit of the test Detection sensitivity	Granica wykrywalności (<i>LOD</i>)
Limit of quantification Quantification limit Determination limit Minimum working concentration	Granica oznaczalności (<i>LOQ</i>)



cić szczególną uwagę przy jej przygotowywaniu. Idealny roztwór próbki ślepej powinien mieć matrycę identyczną z matrycą właściwych próbek, zbliżone ilości czynników przeszkadzających i być wolnym od analitu. Czynności i procedury związane z przygotowaniem próbek, na przykład mineralizacja, ekstrakcja, sączenie, powinny być przeprowadzane równoległe z próbką ślepą. Wiele czynników ma wpływ na kształt i poziom sygnału generowanego podczas analizy próbki ślepej, między innymi szumy aparatury, zmiany sygnału w czasie dłuższego pomiaru, niehomogeniczność roztworu. Próbka ślepa może pełnić także inne funkcje, w zależności od specyfiki instrumentu lub procedury analitycznej. Przykłady takich zastosowań to kalibracja instrumentu, ustalenie linii bazowej czy wymywanie próbek z przewodów i naczyń instrumentu. Z reguły w takich przypadkach wystarczy użycie czystego rozpuszczalnika i nie ma konieczności przeprowadzania próbki ślepej przez wszystkie etapy związane z przygotowaniem próbki (ślepa próba).

Aspekty statystyczne

Zgodnie z zasadami metrologii chemicznej, aby otrzymany wynik był wiarygodny, należy przeprowadzić pomiar wielokrotnie. Wiele operacji i wnioskowań statystycznych również wymaga odpowiedniej liczby powtórzeń. Generalnie, im więcej powtórzeń dla jednej próbki, tym większa moc testu hipotezy statystycznej. Dodatkowo, przy większej liczbie powtórzeń łatwiej jest wskazać ewentualne błędy grube. Oczywiście wielokrotne powtarzanie pomiaru może znacznie wydłużyć analizę, dlatego należy znaleźć warunki optymalne zarówno dla badacza, jak i dla metody. Przy wnioskowaniu statystycznym istotne jest rozróżnienie dwóch pojęć: parametry populacji to teoretyczne wartości, które praktycznie nigdy nie są znane (oznaczane symbolami m – średnia, σ – odchylenie standardowe), oraz parametry próby, czyli przybliżenie prawdziwych parametrów na podstawie pomiarów fragmentu populacji (symbole używane w tym przypadku to x – średnia, s – odchylenie standardowe). Pomiar analitu w analizie chemicznej opiera się zawsze na próbce pobranej tak, aby była jak najbardziej reprezen-

tatywna względem całego obiektu, z którego ta próbka pochodzi. Uzyskany wynik, który jest tylko przybliżeniem nieznannej wartości prawdziwej, oszacowany jest przy zachowaniu pewnych założeń dotyczących rozkładu zmiennych. Najczęściej spotykanym rozkładem jest rozkład normalny, czyli Gaussa, któremu podlega większość obserwowanych w przyrodzie i nauce zjawisk. Oznacza to, że najbardziej prawdopodobne jest uzyskanie wyniku znajdującego się w maksimum krzywej rozkładu normalnego. Prawdopodobieństwo to szybko maleje wraz z oddalaniem się od wartości maksymalnej, symetrycznie w obu kierunkach.

Zgodnie z definicją, LOD opiera się na wynikach pomiaru sygnału analitycznego pochodzącego od próbki ślepej oraz wartości prawdopodobieństwa wystąpienia błędów I i II rodzaju, oznaczane symbolami odpowiednio α i β . Podstawą teoretyczną takiego podejścia jest statystyczna teoria testowania hipotez Neymana – Pearsona, polegająca na podjęciu decyzji wyboru jednej z dwóch hipotez na podstawie obserwacji zmiennych z danych doświadczalnych. Hipoteza zerowa oznacza, że analit jest obecny, natomiast hipoteza alternatywna zakłada brak analitu. Teoria ta wykorzystuje relacje między założonymi wartościami odpowiadającymi prawdopodobieństwu wystąpienia błędów I i II rodzaju i skupia się na minimalizowaniu tych błędów. Wartości czynników ryzyka α i β mogą być dowolne, jednak najczęściej spotykane to 0,01 oraz 0,05, które są zalecane przez IUPAC; liczby te odpowiadają poziomom ufności 99% i 95%. Zastosowanie $\alpha = 0,05$ oznacza, że 5% próbek wolnych od analitu zostanie błędnie zakwalifikowanych jako zawierające analit. Wybór odpowiedniej wartości jest swoistym kompromisem, gdyż większy poziom ufności skutkować będzie niższym prawdopodobieństwem popełnienia błędów I i II rodzaju, ale także wyższą wartością LOD. Ponadto, mniejsza wartość α oznacza mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia błędu typu I, ale jednocześnie wzrasta ryzyko popełnienia błędu typu II.

Poziom krytyczny

Decyzję o wykryciu analitu podejmuje się, porównując wynik doświadczalny z L_C , czyli najmniejszą wartością,

kóra da się odróżnić od sygnału analitycznego pochodzącego od próbki ślepej, z założonym prawdopodobieństwem równym α . Jest to granica stężeń, której przekroczenie może wskazywać na obecność analitu w badanej próbce. Wartość L_C obliczana jest na podstawie wielokrotnych pomiarów sygnału analitycznego pochodzącego od próbki ślepej, co jest dokładniej omówione w dalszej części artykułu. Na rysunku 1 przedstawione są dwa przypadki rozkładu prawdopodobieństwa wartości uzyskanych w wyniku analizy próbki ślepej i próbki zawierającej analit o niskim stężeniu. Stężenie próbki ślepej ustalone jest jako równe zero. Krzywa na rysunku 1A jest rozkładem wartości dla analitu o stężeniu równym LOD , na rysunku 1B krzywa reprezentuje rozkład wartości dla analitu o stężeniu niższym od LOD , a równym L_C . W pierwszym przypadku sygnał próbki można dobrze odróżnić od sygnału próbki ślepej, a prawdopodobieństwo popełnienia błędów I i II rodzaju wynosi $\alpha = \beta = 5\%$. Natomiast w drugim przypadku α się nie zmieniło, ale wartość β wynosi 50%. Oznacza to, że oznaczając analit na poziomie stężeń równym L_C , ryzyko podjęcia błędnej decyzji o obecności analitu wynosi 50%.

Granica wykrywalności, LOD w praktyce

Idea granicy wykrywalności jest dobrze rozumiana wśród naukowców. Już sama nazwa tego parametru jest intuicyjna i sugeruje, że omawia on możliwości metody wobec próbek o niskich stężeniach/zawartościach analitu. Znaczenie tego parametru i jego zrozumienie nie budzi wątpliwości, natomiast samo oznaczanie jego bywa problematyczne z powodów mnogości definicji i trudności natury praktycznej.

Jak przedstawiać wyniki pomiaru? W tabeli 2 przedstawione zostały przykładowe wartości pomiarowe, z których część znajduje się poniżej LOD metody wraz z obliczonymi wartościami średnimi i odchyleniami standardowymi. Każdy wers reprezentuje te same pomiary, jednakże zapis wartości poniżej LOD jest różny.

Po przeanalizowaniu tabeli 2 nasuwają się wnioski, że każde przekształcenie wyniku pomiaru, którego wartość jest niższa od LOD , wywiera wpływ na wnioskowanie statystyczne lub nawet uniemożliwia je, tak jak w przypadku przedstawienia wyniku $<LOD$ jako „ND”. LOD jest parametrem metody analitycznej, a nie własnością wyniku. W związku z tym nie zaleca się raportowania wyniku doświadczalnego, którego wartość jest mniejsza od LOD jako „ $<LOD$ ”, „0” lub „ND” (ang. *non-detect* – nie wykryto). Zalecanym przez IUPAC sposobem przedstawienia wyniku jest wartość liczbowa z niepewnością, opcjonalnie z zaznaczeniem, że wynik ten znajduje się poniżej LOD metody. Takie rozwiązanie umożliwia wyciągnięcie większej liczby wniosków z uzyskanych wartości doświadczalnych, nie powoduje utraty informacji oraz nie wpływa na obliczenia i parametry statystyczne, takie jak odchylenie standardowe czy średnia. Aby umożliwić porównywanie wartości LOD , powinno się podawać informację o metodzie, zgodnie z którą została ona oszacowana, a także wartości zmiennych

Tabela 2. Przykłady zapisu wyniku poniżej LOD oraz wpływ na wartości parametrów statystycznych

Sposób przedstawienia wyniku poniżej LOD	Wyniki pomiarów dla 5 powtórzeń (zakładając wartość LOD równą 10)					Wartość średnia	Odchylenie standardowe
Zero	13	0	11	15	0	7,8	7,3
Nie wykryto (ND)	13	ND	11	15	ND	-	-
$<LOD$	13	<10	11	15	<10	13	-
Wartość liczbowa	13	7	11	15	9	11	3,2

użyte do obliczeń, to jest ilości powtórzeń, założone poziomy ufności czy liczba stopni swobody.

Najpopularniejsza metoda: $3s_0$

Najczęściej wybierana metoda szacowania LOD jest równocześnie jedną z najprostszych i wywodzi się z metody IUPAC, a sformułowana jest jako trzykrotna wartość odchylenia standardowego sygnału analitycznego próbki ślepej (s_0). Metoda ta jest szeroko stosowana w nauce i w praktyce i na dobre zdomowała się wśród badaczy, jednakże warto wiedzieć, jakie są jej podstawy statystyczne, możliwości i ograniczenia. Aby oszacowana LOD była jak najbardziej prawidłowa, powinny być spełnione następujące kryteria:

- homoskedastyczność,
- rozkład normalny,
- konstrukcja krzywej kalibracyjnej metodą najmniejszych kwadratów.

Kompleksowe rozwiązania z zakresu zarządzania jakością w laboratorium



LGC Standards dostarcza produkty i usługi pozwalające na doskonalenie pomiarów i kontroli jakości.

- Certyfikowane materiały odniesienia i materiały odniesienia
- Wzorce zanieczyszczeń substancji farmaceutycznych
- Wzorce narkotyków
- Materiały biologiczne z kolekcji ATCC
- Badania biegłości.

Dlaczego warto wybrać LGC?

- Najszersza oferta materiałów odniesienia
- Dostęp do ponad 40 programów badania biegłości
- Wsparcie techniczne
- Dostęp do wiedzy o wymaganiach i regulacjach prawnych.



LGC Quality - ISO Guide 34 • GMP/GLP • ISO 9001 • ISO/IEC 17025 • ISO/IEC 17043

Więcej informacji na www.lgcstandards.com

LGC Standards Sp. z o.o., ul. M. Konopnickiej 1, Dziekanów Leśny, 05-092 Lomianki
Tel.: 22 751 31 40 Faks: 22 751 58 45 E-mail: pl@lgcstandards.com

@LGCStandards

© LGC Limited, 2014. All rights reserved. LGC Standards is part of the LGC Group

4248/CB/0118

Jest to proces dwuetapowy, polegający na obliczeniu L_C na podstawie s_0 i następnie na oszacowaniu LOD z uwzględnieniem wartości L_C . Metoda wykorzystuje w obliczeniach również wartości prawdopodobieństwa α i β , dla których dobrym wyznacznikiem jest parametr t-studenta, którego wartość dla $\alpha = 0,05$ oraz $v = \infty$ wynosi 1,645.

Wzór na obliczenie L_C jest następujący:

$$L_C = t_{1-\alpha, v} \cdot s_0$$

gdzie $t_{1-\alpha, v}$ to parametr t-studenta o v stopniach swobody.

Po podstawieniu wartości parametru t-studenta do wzoru otrzymuje się:

$$L_C = 1,645s_0$$

Wyrażenie na LOD przyjmuje postać:

$$LOD = L_C + t_{1-\beta, v} \cdot s_0$$

Przy założeniu homoskedastyczności w zakresie stężeń od 0 do LOD oraz $\alpha = \beta$ wzór redukuje się do postaci:

$$LOD = 2L_C$$

Po podstawieniu wyrażenia na L_C otrzymuje się:

$$LOD = 3,29s_0$$

Tradycyjnie spotykany współczynnik „3” we wzorze na LOD jest w rzeczywistości zaokrągleniem liczby 3,29. Jak zostało wykazane wyżej, wartość 3,29 jest konsekwencją zastosowanych reguł statystycznych, dlatego nie powinno się wybierać dowolnej liczby jako współczynnika we wzorze na LOD , na przykład 2, 3, 6. Należy mieć na uwadze, że uproszczony wzór w postaci $3s_0$, uzyskany zgodnie z powyższym wyprowadzeniem, pomija wartość średnią próbki ślepej, jak również wszystkie parametry związane z krzywą kalibracyjną, to jest liczbę stopni swobody, liczbę powtórzeń, liczbę wzorców i ich stężenia. Wartość średnia w takim wypadku jest ustalona jako równa zero, co może występować w przypadku automatycznego zerowania sygnału dla próbki ślepej przez instrument pomiarowy. Jednakże, jeżeli w wyniku wielokrotnego pomiaru próbek ślepych uzyskuje się wartości większe niż zero, należy je uwzględnić jako wartość uśrednioną zgodnie z poniższym wzorem:

$$LOD = x_{sr} + 3,29s_0$$

LOD wyrażona w ten sposób nazywana jest też instrumentalną granicą wykrywalności, gdyż największy wpływ na jej wartość mają szумы aparatury, a także efekty matrycowe i dryf linii bazowej.

Istnieją prace, w których zalecane jest zastąpienie próbki ślepej próbką o znanej, ale bardzo niskiej zawartości

analitu, na poziomie przewidywanej wartości LOD . Taka praktyka pozwala na odwzorowanie faktycznego zachowania się instrumentu wobec analitu o minimalnym stężeniu, a nie opiera się wyłącznie na s_0 . Można więc przypuszczać, że LOD uzyskane w ten sposób będzie bardziej wiarygodne. Jeżeli LOD oszacowana na podstawie wyniku analizy próbek ślepych z dodatkiem analitu nie pokrywa się z przewidywaną wartością LOD , należy zmodyfikować ilość dodanego analitu i powtórzyć pomiary.

Nie istnieje jedno uniwersalne podejście szacowania LOD . Opracowanych zostało wiele metod, odpowiednich do konkretnych zastosowań, których wybór powinien być dobrze przemyślany. Wybór metody powinien być uzasadniony statystycznie, to znaczy oparty na rozkładzie uzyskanych wyników, zmienności precyzji wyników i sposobie wyznaczania krzywej kalibracyjnej, których znajomość jest podstawą do podjęcia decyzji o sposobie szacowania LOD .

Adam Sajnog, Magdalena Belter,
Danuta Baralkiewicz

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
Poznań

SŁOWNIK POJĘĆ STOSOWANYCH W ARTYKULE

Błąd I rodzaju, α – przyjęcie hipotezy alternatywnej (analit jest obecny), podczas gdy analit nie występuje; inaczej – odrzucenie słusznej hipotezy.

Błąd II rodzaju, β – przyjęcie hipotezy zerowej (brak analitu) przy faktycznej obecności analitu; wartość zalecana przez IUPAC to $\alpha = \beta = 0,05$ (co odpowiada poziomowi ufności równemu 95%).

Wartość krytyczna, L_C – najmniejsza ilość analitu, wyrażona w jednostkach sygnału lub zawartości/stężenia, dająca się odróżnić od poziomu tła i pozwalająca na podjęcie decyzji o obecności analitu w próbce z prawdopodobieństwem równym α .

Granica wykrywalności, LOD – parametr charakteryzujący metodę. Jest to najmniejsza ilość analitu, wyrażona w jednostkach sygnału lub zawartości/stężenia, dla której prawdopodobieństwo popełnienia błędu II rodzaju wynosi β , przy ustalonej L_C . LOD metody oznacza taki sygnał odpowiadający stężeniu analitu, przy którym można założyć a priori obecność analitu z ustalonym prawdopodobieństwem.

Granica oznaczalności, LOQ – parametr charakteryzujący metodę. Jest ilość analitu, wyrażona w jednostkach sygnału lub zawartości/stężenia, która osiągnie założoną wcześniej precyzję, wyrażoną przez wartość względnego odchylenia standardowego (RSD), wartość zalecana przez IUPAC to $RSD = 0,1$.

Homoskedastyczność – własność danych doświadczalnych, oznaczająca stałość wariancji dla wyników z danego zakresu stężeń.

Heteroskedastyczność – przeciwieństwo homoskedastyczności, objawiające się zmienną wariancją wyników dla próbek z danego zakresu stężeń.