

ISSN-1509-4650

ANALITYKA

15
LAT

NAUKA I PRAKTYKA

2
2015



ŁODOWA KRAINA — OBSZAR BADAŃ DLA CHEMIKA ANALITYKA | 62

Antarktyda jest najbardziej odizolowana od pozostałych kontynentów, jednak specyficzna lokalizacja nie chroni tego obszaru przed negatywnym wpływem związanym z różnymi sferami działalności człowieka



NAUKA

- 4 Mechanizm retencji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej
Cz. II – Odwrócony układ faz
- 12 Granica wykrywalności
Cz. II – Historia LOD
- 16 Radiofarmaceutyki w nowoczesnych technikach diagnostyki obrazowej
Cz. II – Synteza i kontrola jakości radiofarmaceutyków do tomografii pozytonowej
- 24 Technika rozcieńczeń izotopowych spektrometrii mas: pół żartem i całkiem serio. – Cz. II

PRAKTYKA

- 28 Chromatografia jonowa – efektywne narzędzie w badaniach analitycznych
- 34 Małe jest piękne, czyli technika SPE w pośrednim badaniu specjacji talu
- 40 Urządzenia do wytwarzania gazowych mieszanin wzorcowych
- 46 Oznaczanie formaldehydu w powietrzu wewnętrznym przy użyciu próbników pasywnych typu PUF

ARCHEOMETRIA


- 52 Identyfikacja naturalnych substancji barwiących obecnych w farbach malarskich pochodzenia historycznego

POLEMIKI, PROBLEMY


- 56 Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku
Cz. II – Pobieranie i przygotowanie próbek do analizy

- 62 Lodowa kraina – obszar badań dla chemika analityka
Cz. II – Wrażliwość ekosystemu Antarktyki na obecność zanieczyszczeń
- 70 Zastosowanie elektronicznego nosa w analizie zanieczyszczeń powietrza

WYDARZENIA

- 78 Zastosowanie sprzężonych i łączonych technik separacyjnych w badaniach metabolomicznych i poszukiwaniu wskaźników chorób nowotworowych
- 80 Nowe narzędzie do oceny właściwości prozdrowotnych żywności funkcjonalnej
- 82 Nagrody Komitetu Chemii Analitycznej PAN (edycja 2015)
- 85 XVII Międzynarodowe Targi Analityki i Techniki Pomiarowych EuroLab 2015 

KONFERENCJE, SPRAWOZDANIA

- 88 IV Konferencja Naukowa „Monitoring i analiza wody. Chromatograficzne metody oznaczania substancji o charakterze jonowym” 
- 90 XVI Europejska Zimowa Konferencja Spektroskopowych Techniki Plazmowych

RECENZJE

- 93 Ocena narażenia na uran pobierany z wodą przeznaczoną do spożycia przez ludzi w Polsce

KONFERENCJE, ZAPROSZENIA

- 94 Kalendarz konferencji, kursów i szkoleń

PORÓWNIANIA MIĘDZYLABORATORYJNE

- 98 Badania biegiłości laboratoriów – analizy środowiskowe 2015/2016
- 99 Rośliny 14
Oznaczanie zawartości pierwiastków śladowych w suszu warzywnym

PRENUMERATA

- 100 Kupon prenumeraty

NOWOŚCI

- 101 Nowości w wyposażeniu laboratoriów





ADAM SAJNÓG



MAGDALENA BELTER



DANUTA BARAŃKIEWICZ

Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie historii pojęcia granicy wykrywalności, mnogości pojęć i definicji proponowanych przez kolejnych badaczy oraz uświadomienie, że tak powszechny i intuicyjny parametr w chemii analitycznej okazywał się bardzo kontrowersyjny.

Granica wykrywalności

CZ. II – HISTORIA LOD

W poprzednim artykule z serii omówione zostały podstawy statystyczne granicy wykrywalności oraz porady praktyczne. Niniejszy artykuł ma na celu przedstawienie historii pojęcia granicy wykrywalności, mnogości pojęć i definicji proponowanych przez kolejnych badaczy oraz uświadomienie, że tak powszechny i intuicyjny parametr w chemii analitycznej okazywał się bardzo kontrowersyjny. Niektóre z przedstawionych tu pojęć mogą nie mieć dziś zastosowania lub okazało się, że bazowały na nieprawidłowych założeniach. Początkowo nie zadawano sobie trudu wyjaśnienia przedstawianych pojęć za pomocą statystyki lub robiono to błędnie. Zdarzało się, że te same terminy opisywały różne zagadnienia, na przykład wykrycie analitu oraz oznaczenie ilościowe analitu.

Na początku XX wieku analiza instrumentalna stała się ważną gałęzią chemii analitycznej. Rozwój definicji i metod szacowania granicy wykrywalności (LOD) był ściśle związany z rozwojem technik instrumentalnych. Pierwsze wzmianki w literaturze o możliwościach wykrycia analitu na niskich poziomach stężeń pochodzą z tego okresu i od tamtego czasu nie ma już żadnych wątpliwości co do istotności szacowania LOD.

W pierwszych latach XX wieku odniesienia do możliwości wykrycia analitu dotyczyły tylko analizy jakościowej substancji obecnej w próbce w niskich stężeniach (testy jakościowe). Ilościowe oznaczenie składników należało ciągle do przyszłości. Pierwsze kroki w kierunku wykrycia analitu na niskich poziomach stężeń postawili L.J. Curtman i P. Rothberg w 1911 roku. Autorzy opisali sposób wyznaczenia „granicy próby” (ang. *limit of the test*) – najmniejszej ilości analitu, która w określonych warunkach da jednoznaczny sygnał. W 1923 roku F. Feigl użył terminu *Erfassungsgrenze*, co z języka niemieckiego można przetłumaczyć jako granica wykrywalności. Mimo że pewne sformułowania były używane w literaturze, to sama metoda szacowania LOD nie była opisana. Istotny wkład w zagadnienie LOD wniósł H. Kaiser w pracach

z 1947 i 1966 roku. Zaproponował, aby wyznaczenie LOD było oparte na statystyce matematycznej. Zaproponowana metoda pozwalała na obliczenie granicy wykrywalności zarówno w dziedzinie stężenia, jak i sygnału na podstawie danych eksperymentalnych. Jednakże nie wspomina nic o teorii testowania hipotez.

Lata sześćdziesiąte: Currie

W latach sześćdziesiątych XX wieku chemicy analitycy zaczęli zwracać większą uwagę na charakterystykę procedury analitycznej. LOD było definiowane między innymi jako „najmniejsza ilość lub stężenie, które może zostać wykryte”. Jednakże, powyższa definicja jest dwuznaczna i może prowadzić do subiektywnych wyników z powodu zastosowania określenia „najmniejsza”. Ponadto, nie było jasne, kiedy decyzja o wykryciu analitu zostaje podjęta przez analityka. Te wątpliwości wskazywały na potrzebę opracowania jednoznacznej definicji LOD, ale równocześnie pojawiały się coraz bardziej zróżnicowane opisy dotyczące możliwości wykrycia i oznaczania analitów na niskich poziomach stężeń. Większość z nich opierała się na obliczeniach odchylenia standardowego wyników uzyskanych dzięki analizie próbek ślepych. W roku 1963 B. Altshuler i B. Pasternack zasugerowali użycie odchylenia standardowego ślepej próby w celu obliczenia „niskiej granicy wykrywalności” (ang. *lower limit of detection*).

W tym czasie pojawiło się więcej metod szacowania LOD. L.A. Currie zwrócił uwagę na problem mnogości definicji i pojęć w pionierskiej pracy z 1968 roku, gdzie zaprezentował przykładowe wartości LOD, uzyskane za pomocą różnych podejść wobec tego samego zestawu danych, które obejmowały aż trzy rzędy wielkości. Oto niektóre z metod w rosnącym szeregu:

- odchylenie standardowe sygnału tła (σ_B),
- 10% sygnału tła,
- $2\sigma_B$,
- $3\sigma_B$,

- $3\sigma_B$ + trzykrotne odchylenie standardowe próbki,
- dwukrotna wartość sygnału tła.

Ponieważ niektóre z przedstawionych metod nie miały żadnych podstaw statystycznych, Currie zaproponował nowe podejście do *LOD*, oparte na teorii testowania hipotez Neymana-Pearsona. Koncepcja ta miała kilka założeń:

- zmienna zależna, czyli wartości sygnału analitycznego, ma rozkład normalny,
- liniowa zależność między wartościami sygnału a wartościami zmiennej niezależnej, czyli stężenia analitu (przybliżenie metodą najmniejszych kwadratów),
- homoskedastyczność, czyli stałość wariancji wartości sygnału wobec wartości stężenia.

Poziom krytyczny (L_C) został zdefiniowany jako odpowiedź instrumentu pomiarowego, powyżej której możliwe jest wiarygodne przypisanie sygnału oznaczającego wykrycie analitu. L_C zależy wyłącznie od prawdopodobieństwa wystąpienia błędu I rodzaju (α). Zależnie od założonego poziomu ufności, wartość współczynnika rozszerzenia k może być różna, stąd gdy $\alpha = 0,05$, to $k = 1,645$ (zakładając rozkład normalny i nieskończoną liczbę stopni swobody), a wzór przyjmuje postać: $L_C = 1,645s_0$, gdzie s_0 – odchylenie standardowe wyników pomiaru sygnału analitycznego pochodzącego od próbki ślepej. Definicja *LOD* według Currie brzmi następująco: „*LOD* jest to prawdziwa wartość sygnału, przy której można się spodziewać wykrycia analitu a priori”. W przeciwieństwie do L_C , *LOD* zależy zarówno od błędów I rodzaju, jak i od błędów II rodzaju (β). Zakładając, że $\alpha = \beta$, to wzór na *LOD* przyjmuje postać $LOD = 2L_C$. Publikacja Currie z 1968 roku miała ogromny wpływ na ukierunkowanie i dalszy rozwój koncepcji *LOD* i możliwości wykrycia i oznaczania analitu na niskich poziomach stężeń. Niestety, dopiero trzy dekady później zostaną podjęte kroki w celu harmonizacji dotychczasowej wiedzy w tej dziedzinie.

Lata 1970–1980

Hubaux i Vos 1970

W artykule z 1970 roku A. Hubaux i G. Vos zaprezentowali metodę opartą na przedziale predykcji (ang. *prediction interval*) krzywej kalibracyjnej. Jej celem jest obliczenie L_C i *LOD*, wykorzystując informacje zawarte w krzywej kalibracyjnej. Autorzy zwracają uwagę, że oszacowane wartości L_C i *LOD* są zależne od takich parametrów eksperymentalnych, jak zakres pomiarowy, liczba wzorców, liczba powtórzeń pomiarów wzorców i badanej próbki. Jednakże, z powodu błędnych założeń metoda Hubaux i Vosa generuje nieprawidłowe wartości. Przeprowadzając serię symulacji Monte Carlo, składających się z dziesiątek milionów niezależnych krzywych kalibracyjnych, E. Voigtman dowiódł w 2008 roku, że wartości *LOD* uzyskane powyższą metodą są systematycznie zaniżane. Zastosowanie przedziałów predykcji w tym modelu skutkuje nieprawidłowo zwiększonym prawdopodobieństwem wystąpienia błędów II rodzaju.

IUPAC 1978

W roku 1978 członkowie IUPAC zdefiniowali *LOD* jako „liczba wyrażona w jednostce stężenia (lub zawartości), opisująca najniższą wartość stężenia (lub zawartości) analitu, która da się określić jako różniąca się statystycznie od wartości próbki ślepej”. Definicja nie precyzuje, co oznacza wyrażenie „różniąca się statystycznie” ani jak ma wyglądać pomiar próbki ślepej. Pozostawienie tej kwestii do wyboru badaczowi może sprawić, że porównywanie wartości *LOD* uzyskanych przez innych badaczy może być obciążone błędem. Wzór służący do obliczeń jest następujący:

$$LOD = \frac{ks}{b}$$

gdzie:

s – odchylenie standardowe,

b – nachylenie krzywej kalibracyjnej.

Podejście IUPAC jest zbliżone do podejścia Kaisera, jednakże w żadnej z metod nie ma wzmianki o teorii testowania hipotez. W modelu IUPAC obliczenia są oparte na współczynniku k , którego wartość nie jest jednoznacznie określona, ale zależy od liczby pomiarów. Stąd, stosując wartość zalecaną przez IUPAC ($k = 3$), wymagana jest odpowiednia liczba powtórzeń, minimalnie 20. Taka wartość współczynnika rozszerzenia odpowiada poziomowi ufności równemu 99,86%. Odchylenie standardowe może być obliczone na kilka sposobów:

■ s_0 ,

■ s_r – standardowy błąd próbki,

■ standardowy błąd przecięcia krzywej kalibracyjnej s_a .

Wzory służące do obliczeń powyższych parametrów są następujące:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I [\bar{y}_i - (a + bx_r)]^2}{I - 2}}$$

$$s_a = \frac{s_r}{I^{1/2}} \sqrt{I + \frac{\sum_{i=1}^I x_i^2}{\sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$x = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I x_i$$

gdzie:

I – liczba roztworów wzorcowych,

\bar{y}_i – średnia wartość sygnału dla i -tego wzorca,

a – punkt przecięcia krzywej kalibracyjnej,

b – nachylenie krzywej kalibracyjnej,

x_r – stężenie i -tego wzorca.

Możliwość wyboru jednego z wielu parametrów prowadzi do uzyskania różnych wartości *LOD*. Stąd istotne jest, aby wraz z oszacowaną wartością *LOD* podać sposób obliczenia odchylenia standardowego w przypadku stosowania omawianej metody IUPAC. To zagadnienie było również poruszone przez J.D. Winefordnera

i G.L. Longa w pracy z 1983 roku. Metoda Kaisera i IUPAC może być postrzegana jako podwaliny współcześnie stosowanej, popularnej metody – trzykrotności odchylenia standardowego próbki ślepej,

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

Podsumowując, obliczenia zgodnie z metodą IUPAC oparte są na danych doświadczalnych i są łatwe do zastosowania. Jednakże należy pamiętać, że wybór sposobu obliczenia odchylenia standardowego może skutkować różnymi wartościami LOD . D. Montville i E. Voigtman w 2003 roku zwrócili uwagę, że to może skutkować w zamierzonym wyborze takiego parametru, który w efekcie pozwoli na uzyskanie mniejszej wartości LOD .

Winefordner i Long 1983

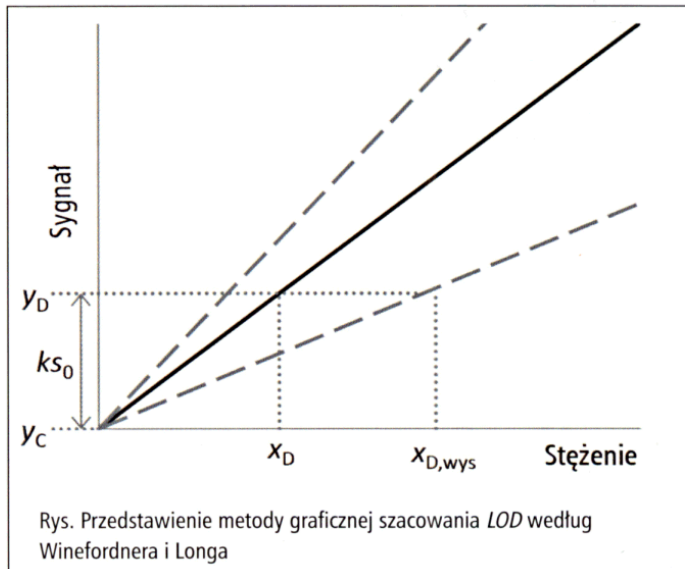
Celem autorów była weryfikacja poprawności statystycznej podejścia według IUPAC. Rozważania zostały zaprezentowane w przystępny i przejrzysty sposób tak, aby również badacze bez szerszej wiedzy statystycznej mogli z nich skorzystać. Sprawdzone zostały trzy metody szacowania LOD . Dla lepszego zobrazowania różnic między nimi użyte zostały przykładowe zestawy danych wobec każdego z omawianych wzorów. Poszczególne dane różniły się istotnie takimi parametrami, jak nachylenie i przecięcie krzywej kalibracyjnej oraz ich odchylenia standardowe. Wiele kwestii związanych z LOD jest poruszonych i wyjaśnionych w szerszym kontekście, na przykład aby stosować współczynnik $k = 3$ zamiast $k = 2$ i aby wartość LOD dała się wyraźnie odróżnić od wartości próbki ślepej. Autorzy zalecają również, by LOD była przedstawiona wraz ze współczynnikiem rozszerzenia, na przykład $LOD_{(k=3)}$. Poza metodą IUPAC omawiana jest również metoda graficzna i metoda propagacji błędów. Każda z metod jest zastosowana wobec czterech różnych zestawów danych. Rysunek przedstawia sposób uzyskania LOD według metody graficznej, a wzór użyty do tego celu sformułowany jest następująco:

$$LOD = \frac{ks_0}{b \pm t_{\alpha} s_b}$$

gdzie:

t_{α} – wartość rozkładu t-studenta dla poziomu ufności α ,
 s_b – odchylenie standardowe nachylenia krzywej.

Na rysunku przedstawiona jest krzywa kalibracyjna wraz z przedziałem ufności (linia przerywana). Symbole y_D oraz x_D odnoszą się do granicy wykrywalności odpowiednio dla wartości sygnału i stężenia. Wartość LOD uzyskiwana jest poprzez rzutowanie poziomej linii prostej z punktu y_D do przecięcia z krzywą kalibracyjną i dolnym przedziałem ufności. W przypadku gdy parametr związany z błędem nachylenia krzywej, $t_{\alpha} s_b$, jest bliski zeru lub gdy $b \gg t_{\alpha} s_b$, to wartość LOD odczytuje się w punkcie x_D . Jednakże, gdy wartość błędu $t_{\alpha} s_b$



rośnie, powoduje zwiększenie x_D tak, że przechodzi ona w $x_{D,wys}$ jak przedstawia rysunek. Uwzględniając wszystkie zależności, powinno się wybierać wyższą wartość – $x_{D,wys}$ – jako prawidłową wartość LOD . Metoda propagacji błędów jest bardziej złożona niż pozostałe dwie metody, gdyż, poza odchyleniem standardowym próbki ślepej i nachyleniem krzywej kalibracyjnej, uwzględnia także punkt przecięcia krzywej i jego odchylenie standardowe, zgodnie z równaniem:

$$LOD = \frac{k \sqrt{s_0^2 + s_a^2 + \left(\frac{a}{b}\right)^2 s_b^2}}{b}$$

Zastosowanie wszystkich powyższych parametrów we wzorze skutkuje zauważalnie większą wartością LOD w porównaniu z pozostałymi dwoma metodami. Jednakże, nie jest to traktowane jako wada tego podejścia, gdyż uwzględnione są wszystkie zmienne mogące mieć istotny wpływ na wiarygodność wyników pomiarów ślepej próbki i wzorców.

Podsumowując, metoda graficzna okazuje się generować największy błąd w szacowaniu wartości LOD spośród trzech omawianych metod i może być używana tylko w celu przybliżenia wartości LOD , ale generalnie nie jest zalecana. Zastosowanie podejścia IUPAC jest wskazane, gdy wartość błędu ślepej próby znacznie przekracza wartość błędu nachylenia krzywej. W przeciwnym wypadku uzyskana wartość LOD będzie sztucznie zaniżona. Metoda propagacji błędów jest uważana przez autorów za najpoprawniejszą, gdyż uwzględnia wartości błędów pomiaru próbek zawierających badany analit w końcowej wartości LOD . Jednakże, należy pamiętać, że uzyskana wartość LOD będzie ściśle zależała od jakości wykonanej krzywej kalibracyjnej.

Adam Sajnog, Magdalena Belter,

Danuta Barańkiewicz

Wydział Chemii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza,
 Poznań