

# Meetoodikate valideerimine

## Valideerimise kohta:

- HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLELABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS, IUPAC, 2002. Saadaval tasuta aadressilt: <http://www.iupac.org/publications/pac/2002/pdf/7405x0835.pdf>

- The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, Eurachem, 1998. Saadaval tasuta: <http://www.eurachem.org/>

1.10.2014

1

## Valideerimine

- **Valideerimine** (*validation*) on protsess, mille eesmärk on välja selgitada, kas meetoodika vastab eesmärgile (*fitness for purpose*), st. kas ta kõljab analüüsiks, milleks teda soovitakse kasutada
  - Eesmärgile vastavus määratletakse meetoodika headust iseloomustavate parameetrite (*figures of merit*) kaudu
- Valideerimise olulisteks vahenditeks on
  - referentsmaterjalid
  - laboritevahelised võrdlusmõttmised

1.10.2014

2

## Eesmärgile vastavus

- Olgu analüüsiülesandeks kaadmiumi määramine joogivees
- Lubatud piirkontsentratsiooniks vastavalt joogivee kvaliteedinõuete määrusele on **5 ug/kg**
- Millised on nõuded meetoodikale? Vastavalt samale määrusele:
  - Avastamispiir: **0.5 ug/kg**
  - Korduvus: **0.25 ug/kg**
  - Tõesus: **0.5 ug/kg**
- Valideerimisel tuleb demonstreerida, et need nõuded on täidetud

1.10.2014

3

## Valideerimise mõiste

- Eeskätt:
  - Tegevuste kogum, mille eesmärk on välja selgitada, **kas meetoodika vastab oma eesmärgile** (*fitness for purpose*), st. kas ta kõljab analüüsiks, milleks teda soovitakse kasutada, kas vastab esitatud nõuetele
- Sellega seotult:
  - protsess, mille käigus määratakse **meetoodika karakteristikud** ja piirangud ning selgitatakse välja, millised mõjurid võivad neid muuta ja mil määral

1.10.2014

4

## Analüüsimeetod ja -meetoodika

- **Analüüsimeetod** (*analysis method*) on üldine analüüsimeetodi viisi põhimõte või tehniline lahendus
  - Näiteks tiitrimine, fotomeetria, AAS
- **Analüüsimeetoodika** (*analysis procedure*) on konkreetne analüüsi läbiviimise eeskiri
  - Näiteks üldleelisuse määramine happe-aluse tiitrimise teel
  - Meetoodika võib olla vägagi detailne
- Valideeritakse **meetoodikat**, mitte meetodit

1.10.2014

5

## Valideerimise mõiste

- Tehakse vahet
  - Meetoodika valideerimine
  - Personali valideerimine
  - Seadmete valideerimine
  - Keskkonnatingimuste valideerimine
  - Tarkvara valideerimine
- Meie vaatleme **meetoodikate valideerimist**
  - ja vähesel määral ka seadmete valideerimist

1.10.2014

6

## Valideerimine ja meetodika arendamine

- **Metoodika valideerimine on sageli eristamatu meetodika arendamisest**
- Sageli on raske öelda, kus üks lõpeb ja teine algab

1.10.2014

7

## Metoodika rakendusala

- **Metoodika rakendusala** (*scope of application*) määrab:
  - milliseid analüüte
  - millistes maatriksites
  - millises kontsentratsioonide (sisalduste) vahemikusmetoodika võimaldab määrata

1.10.2014

8

## Metoodika rakendusala

- Metoodika valideerimine on tihedalt seotud meetodika rakendusala
- **Valideerida tuleb põhimõtteliselt kogu rakendusala ulatuses**
  - Sageli on siiski vaja minna kompromissidele, sest rangelt kogu rakendusala ulatuses valideerimine võib osutuda liiga töömahukaks

1.10.2014

9

## Ühe-labori valideerimine ja laboritevaheline valideerimine

- Valideerimist saab teostada **ühes laboris...**
  - Võrdlus sertifitseeritud referentsmaterjalidega
  - Võrdlus sõltumatute meetodite tulemustega
- ... või **laboritevahelise võrdlusemõõtmisena**
- Siin käsitleme põhiliselt ühe-labori valideerimist

1.10.2014

10

## Metoodikat iseloomustavad karakteristikud ehk valideeritavad parameetrid

- selektiivsus, spetsiifilisus, analüüdi identiteet
- avastamispiir, määramispiir, otsustuspiir, avastamisvõime
- lineaarsus, lineaarne ala
- tundlikkus
- täpsus, kordustäpsus
- tõesus (õigsus), saagis (*recovery*)
- (mõõtemääramatus)
- kapriisus/(mittekapriisus=robustus)

1.10.2014

11

## Valideeritavad parameetrid ja mõõtemääramatus

- Valideerimisel saadud andmed annavad suurepärase võimaluse hinnata **mõõtemääramatust**

1.10.2014

12

## Metoodika karakteristikud

- Valideerimine on peaaegu alati selektiivne st ei määrata kõiki võimalikke karakteristikuid
- Valideerimise põhiline eesmärk ei ole mitte nende karakteristikute määramine vaid **kinnituse saamine, et metoodika toimib nii, nagu ta on ette nähtud toimima!**
- **... ja kui ei toimi, siis informatsiooni saamine, millisel moel metoodikat muuta, et ta hakkaks toimima, nagu vaja!**

1.10.2014

13

## Valideerimise vahendid

- Null-proovid
  - Puhtad reagentid
  - Maatriks analüüdit
- Rikastatud (spaitud) proovid
  - (Elus)rikastatud: tihti peetakse siin all silmas seda, et analüüdid on viidud maatriksisse selliselt nagu need on seal reaalse proovi korral
  - Spaitud: analüüt on kunstlikult lihtsalt juurde lisatud
- Teise meetodiga analüüsitud proovid
- Laboritevahelised võrdlusmõõtmised
- (Sertifitseeritud) referentsmaterjalid

1.10.2014

14

## Valideerimise kasulikkus

- Kinnitab, et metoodika **sobib kasutamiseks**
- Annab andmeid **määramatuse hindamiseks**
- On hädavajalik **jälgitavuse saavutamiseks**

1.10.2014

15

## Valideerimise ulatus

Metoodika tüüp	Vajalik valideerimise aste
Laboritevaheliselt kontrollitud <b>standardmetoodikad</b> nende rakendusala piires	Vaid sobivus meie laboris
Laboritevaheliselt kontrollitud <b>standardmetoodikad</b> väljaspool nende rakendusala piire	Mitmed parameetreid, sõltuvalt metoodikast
Meetoodikad <b>teaduskirjandusest</b>	Palju parameetreid, sõltuvalt saadaval olevast infost ja metoodikast
<b>Ise välja töötatud</b> metoodikad	Palju parameetreid, sõltuvalt saadaval olevast infost ja metoodikast

1.10.2014

16

## Metoodika karakteristikud, nende määramine ja väljendamine

1.10.2014

17

## Selektiivsus, spetsiifilisus

Selektiivsus

- Et üldse mingit mõistlikku tulemust saada, tuleb analüüdi **identiteet** usaldusväärselt kindlaks teha:
  - Tuleb demonstreerida, et analüütiline signaal on just nimelt analüüdi poolt põhjustatud!
  - ... ja ei ole põhjustatud mingite muude proovis sisalduvate ainete poolt
  - ... ja need muud proovis sisalduvad ained ei avalda signaali suurusele olulist mõju
    - Kui mõju on võrreldes oodatava mõõtemääramatusega väike, siis võib lugeda, et see mõju pole oluline

1.10.2014

18

## Selektiivsus, spetsiifilisus

Selektiivsus

- **Selektiivsus** iseloomustab, mil määral meetodika suudab määrata proovis analüüti ilma, et määramist segaksid (*interfere*) proovi teised komponendid
- Proovi teisi komponente, mis segavad analüüdi määramist, nimetatakse **segajateks** (*interferent*)
- **Spetsiifilisus** on 100% selektiivsus
  - Meetodid on harva täielikult spetsiifilised
  - Meetodikad oma kitsas rakendusalas võivad seda olla

Definitsioonid:

*Selectivity in Analytical Chemistry (IUPAC Recommendations 2001)*, IUPAC, 2001.

Saadaval tasuta: <http://www.iupac.org/>

1.10.2014

19

## Selektiivsus, spetsiifilisus

Selektiivsus

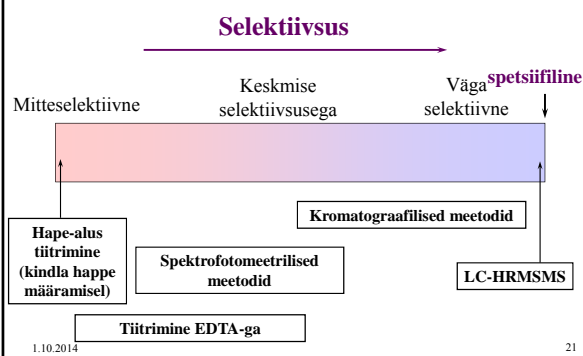
- **Selektiivsus on ilmselt tähtsaim meetodikat iseloomustav karakteristik**
- Selektiivsust on raske hinnata
  - Lõputu hulk potentsiaalseid segavaid faktoreid
  - Kontrollitavate segajate valik tuleb teha vastavalt haridusele ja kogemusele

1.10.2014

20

## Erinevate meetodite selektiivsus

Selektiivsus



## Selektiivsuse olulisus

Selektiivsus

- Selektiivsus on valideeritavatest parameetritest ilmselt olulisim
- Teistel parameetritel – täpsus, avastamispiir jne – puudub igasugune mõte, kui määratakse vale ainet
- Üks olulisimaid erinevusi keemiliste ja füüsikaliste mõõtmiste vahel ongi see selektiivsuse probleem

1.10.2014

22

## Spetsiifilisus üldises ja kitsamas mõttes

Selektiivsus

- Kuigi meetodikad on harva **üldises mõttes spetsiifilised**, on enamasti vaja, et nad oleksid **spetsiifilised oma kitsas rakendusalas**
- Ja see on sageli saavutatav

1.10.2014

23

## Segajate tüübid (1)

Selektiivsus

- Analüüdiga sarnaselt käituvad segajad
  - Vask segab tsingi määramist EDTA-ga tiitrimisel (kui pole maskeeritud)
  - Kromatograafias elueerub analüüdiga samal ajal segav komponent
  - Proovis leiduvad lenduvad komponendid segavad niiskusesisalduse määramist kuivatuskao meetodil
  - Igasugune hägu segab spektrofotomeetriat põhjustades kõrgendatud neelduvuse väärtusi
- Sellistel juhtudel saadakse **kõrgendatud tulemused**

1.10.2014

24

## Segajate tüübid (2)

Selektiivsus

- Meetodika toimimist segavad segajad
  - Värvilised ained segavad tiitrimise lõpp-punkti määramist
  - Oksiidid ja fosfaadid segavad teatud elementide leek-AAS määramist, viies alandatud tulemustele
  - Metallide fotomeetrist määramist võivad segada teised metallid, rikkudes kompleksimoodustamistasakaalusid
- Selliste segajate korral võivad tulemused olla kas kõrgendatud või alandatud

1.10.2014

25

## Spetsiifilisus üldises ja kitsamas mõttes

Selektiivsus

- Võtmerolli mängib see, milliseid aineid võib proov tulenevalt oma olemusest ja päritolust sisaldada
- Näide:
  - Bensoehappe lisandi määramine bensaldehüüdis happe-aluse tiitrimise teel
  - Happe-aluse tiitrimine pole üldse selektiivne bensoehappe suhtes
  - Samas, keemilistel põhjustel bensaldehüüdis praktiliselt puuduvad muud happed
  - See võimaldab kasutada madala üldise selektiivsusega meetodit, kuid saavutada konkreetse rakenduse juures kõrge selektiivsus

1.10.2014

26

## Spetsiifilisuse saavutamine

Selektiivsus

- Spetsiifilisuse saavutamine võib olla väga tülikas
- Seetõttu sellest sageli hoidutakse ja see hoidumine toimub **analüüsiülesande püstitamise faasis**
  - St, see ei ole analüüsiteostaja otsustada

1.10.2014

27

## Kuidas selektiivsust kvantitatiivselt väljendada?

Selektiivsus

- Ei ole ühtset viisi
  - Kromatograafias kasutatakse lahutusksiteeriumit  $R_s$
  - Vahel täpsustatakse potentsiaalsete segajate kohta, **millise kontsentratsioonini nad ei sega**
    - Või: kuni millise kontsentratsioonide suhteni analüüdi suhtes nad ei sega
  - Vahel täpsustatakse potentsiaalsete segajate kohta, **kui palju kõrgem või madalam on tulemus mingi kindla analüüdi ja segaja kontsentratsiooni juures**
- Sageli väljendatakse selektiivsust kvalitatiivselt

1.10.2014

28

## Selektiivsuse väljendamine

Selektiivsus

- Üsna tavaline on väljendada selektiivsust selliselt:
- “Lisand B ei sega analüüsi, kui tema sisaldus proovis on alla  $X$  mg/kg”
- või
- “Lisand B ei sega analüüsi, kui tema sisaldus ei ületa analüüdi sisaldust rohkem kui 100 korda”

1.10.2014

29

## Selektiivsuse väljendamine: $\text{NH}_4^+$ spektrofotomeetiline määramine vastavalt ISO 7150:1984

Interferent, B	$C_B$ (mg/l)	Influence of B on $C_N$ (mg/l) at the following $C_N$ (mg/l) values:		
		0.000	0.200	0.500
$\text{Cl}^-$	1000	+0.002	+0.013	+0.033
$\text{CN}^-$	5	+0.002	+0.019	+0.016
$\text{PO}_4^{3-}$	100	0.000	-0.001	-0.015
Ethanolamine	1	+0.16	+0.11	—

1.10.2014

30

**Selektiivsus**

## Selektiivsuse määramine

- Selektiivsust saab sageli määrata kunstlikult kokku segatud proovide abil
  - Analüüdi sisaldus hoida sama, potentsiaalset segajat lisada erinevates hulkades juurde
- **Väga oluline on hinnata, milliste ainete suhtes tuleb selektiivsust uurida ja milliste suhtes mitte**
- See ainete valik tuleneb:
  - meetodika omadustest
  - proovide kohta olemas olevast infost
  - standardmetoodika korral sõltub sellest, kui täpselt ollakse rakendusallas

1.10.201431

**Selektiivsus**

## Milliste ainete suhtes tuleb selektiivsust uurida?

- Selektiivsust tuleb uurida ainete suhtes, mille esinemine proovides on tõenäoline
- Üldisi suuniseid anda on väga raske
- Mõned siiski:
  - Ained, mida on proovis suures koguses
    - Mineraalid: Si, Al, ...
    - Terased: Fe, C, ...
    - Ravimid: suures koguses leiduvad komponendid (tselluloos, laktoos, tärklis, ...)

1.10.201432

**Selektiivsus**

## Milliste ainete suhtes selektiivsust uurida?

- Elementide määramisel:
  - Levinumad elemendid (Si, Fe, Ca, Na, ...)
  - Lähedased elemendid (Ni korral Co ja Fe)
  - Elemendid, mis võiksid proovis sees olla
    - Terases leegerivate lisandite määramisel: Fe, C, Ni, Mn, ...
- Anioonide määramisel:
  - Teised ioonid (Näiteks loodusliku vee korral:  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , ...)

1.10.201433

**Selektiivsus**

## Milliste ainete suhtes tuleb selektiivsust uurida?

- Orgaaniliste ainete määramisel:
  - Analüüdi laguproduktid
    - oksüdatsiooniproduktid, hüdrolyüsiproduktid
  - Analüüdi tootmise lähteained
  - Sugulasühendid e. lähedaste omadustega ühendid
    - Mõne orgaanilise happe määramisel teised happed
    - Mõne pestitsiidi määramisel teised pestitsiidid

1.10.201434

## Avastamispäär, Määramispäär

- **Avastamispäär** (ka detekteerimispäär) (*limit of detection, LoD*) on vähim analüüdi sisaldus proovis, mida on antud meetodikaga veel võimalik usaldusväärselt detekteerida ja identifitseerida
  - Tuleb teha vahet: meetodika avastamispäär (MDL) ja instrumendi avastamispäär (IDL)
- **Määramispäär** (ka kvantiseerimispäär) (*limit of quantitation, LoQ*) on madalaim analüüdi sisaldus proovis, mida antud meetodika võimaldab usaldusväärselt kvantitatiivselt määrata.
  - Vahel defineeritakse määramispäär kui madalaima kontsentratsiooniga punkt kalibreerimisgraafikul

1.10.2014Avastamispäär, määramispäär

## Avastamispäär, Määramispäär

- Avastamispäär on oluline eeskätt madalate sisalduste määramise meetodikatele
- Iseäranis neile, millega määratakse mõne “keelatud” või “ebasoovitava” lisandi leidumist
  - kemikaalijäägid toidus
  - saasteained mullas
  - ebasoovitavad lisandid tooraines
  - dopingukontroll

1.10.2014Avastamispäär, määramispäär

## Avastamiskiiri hindamine

- Avastamiskiiri on väga tundlik analüüsi tingimuste muutustele
- Seetõttu
  - avastamiskiiri on enamasti küllaltki ebatäpne
  - on kohane rääkida avastamiskiiri **hindamisest**
  - Avastamiskiiri tuleks oma labori tingimustes hinnata ka standardmetoodikate korral, kui on tegemist jälgede määramisega

1.10.2014

Avastamiskiiri, määramiskiiri

## Avastamiskiiri hindamine

- Võimalusi avastamiskiiri hindamiseks on palju
  - Erinevused kuni 10 korda
- Meie vaatame ICH juhendis toodud lähenemist, mis on küllaltki lihtne ja paljude olukordade jaoks piisav
- Mõnikord defineeritakse avastamiskiiri meetodika iseärasusest tulenevalt kuidagi teistmoodi
  - Näiteks tiitrimismetoodikatel sageli tilkade kaudu

1.10.2014

Avastamiskiiri, määramiskiiri

## Avastamiskiiri ja määramiskiiri leidmine

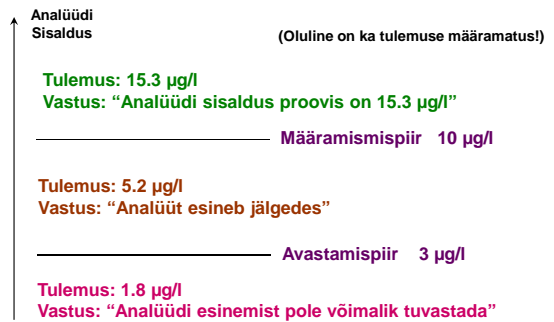
$$LoD = 3.3 \times \frac{S}{b} \quad LoQ = 10 \times \frac{S}{b}$$

- $b$  on kalibreerimisgraafiku tõus avastamiskiiri lähedal
- $S$  on kalibreerimisgraafiku jääkliikmete (residuaalide) standardhälve
  - Punktid LoD ja LoQ lähedal

ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonization, Step 4, 2005. Saadaval: [www.ich.org](http://www.ich.org)

39

## Tulemuse esitamine



1.10.2014

Avastamiskiiri, määramiskiiri

## Otsustuskiiri ja avastamisvõime

- Uuemat ajal on need tõusnud avastamiskiiri kõrvale olulisteks karakteristikuteks
- Sageli on nad seadusandluses nõutud
  - Nt valitsuse määrus RT I 2004, 13, 88, "Analüüsimeetodid saasteainete sisalduse määramiseks loomses toidutoormes ja toidus"

1.10.2014

Otsustuskiiri, avastamisvõime

## $\alpha$ ja $\beta$ viga: tuletoorjearm

	Tuli on	Tuld pole
Alarm käivitub	Viga ei ole	$\alpha$ viga
Alarm ei käivitu	$\beta$ viga	Viga ei ole

Otsustuskiiri, avastamisvõime

42

## $\alpha$ ja $\beta$ viga: saasteaine detekteerimine

	Saasteaine on	Saasteainet pole	
Metoodika detekteerib	Viga ei ole	$\alpha$ viga	Valepositiivne tulemus
Metoodika ei detekteeri	$\beta$ viga	Viga ei ole	Valenegatiivne tulemus

Otsustuspiir, avastamisvõime

43

## Metoodika otsustuspiir, $CC_\alpha$ (decision limit)

- Vastab küsimusele:

Alates millisest tulemuse väärtusest võime öelda, et valepositiivse tulemuse tõenäosus on  $\alpha$  või vähem?

ehk

Alates millisest tulemuse väärtusest võime öelda, et proovi nõuetele mittevastavuse tõenäosus on üle  $1-\alpha$ ?

- Vastavalt määrusele on  $\alpha$  tõenäosused 0.01 ja 0.05 olenevalt analüüdist

Otsustuspiir, avastamisvõime

44

## Metoodika avastamisvõime, $CC_\beta$ (detection capability)

- Vastab küsimusele:

Alates millisest analüüdi sisaldusest proovis võime öelda, et valenegatiivse tulemuse tõenäosus on  $\beta$  või vähem?

ehk

Alates millisest analüüdi sisaldusest proovis võime öelda, et analüüdi avastamise tõenäosus on üle  $1-\beta$ ?

- Vastavalt määrusele on  $\beta$  tõenäosus 0.05  
– St  $1 - \beta = 0.95$  (ehk 95%)

Otsustuspiir, avastamisvõime

45

## Eeldused

- Normaaljaotus kehtib
  - St paralleele tuleb teha üsna palju
- Korratavus on  $CC_\alpha$  ja  $CC_\beta$  tasemetel sama
- Korratavuste määramistel peab olema tagatud proovides analüüdi sisalduse konstantsus
  - Määrus annab juhiseid, kuidas korratavust määrata
- Süsteematilised efektid on arves

1.10.2014

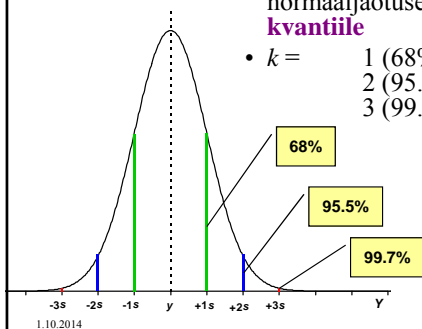
Otsustuspiir, avastamisvõime

## Normaaljaotus

Otsustuspiir, avastamisvõime

- Laiendmääramatuse leidmisel kasutatakse  $k$  väärtustena normaaljaotuse kahepoolseid kvantiile

- $k =$ 
  - 1 (68%),
  - 2 (95.5%),
  - 3 (99.7%)



1.10.2014

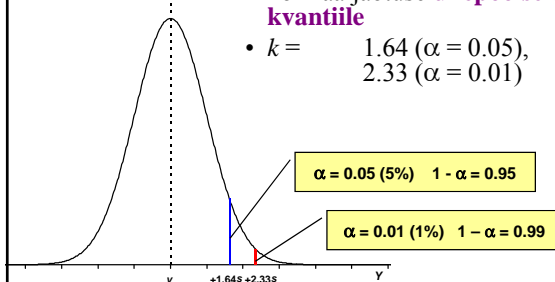
47

## Normaaljaotus

Otsustuspiir, avastamisvõime

- Otsustuspiiri ja avastamisvõime leidmisel kasutatakse  $k$  väärtustena normaaljaotuse ühepoolseid kvantiile

- $k =$ 
  - 1.64 ( $\alpha = 0.05$ ),
  - 2.33 ( $\alpha = 0.01$ )

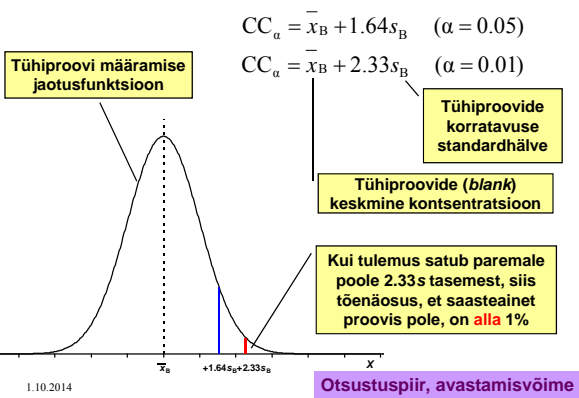


1.10.2014

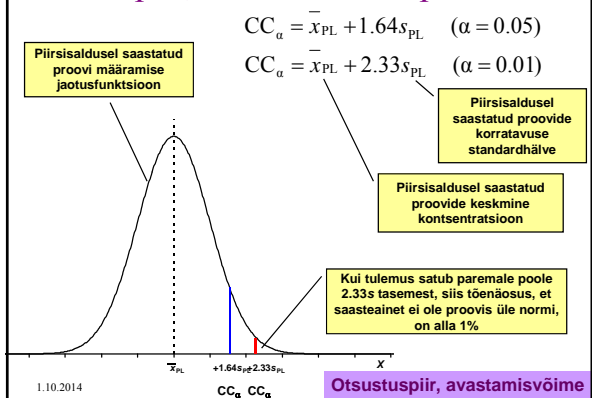
48



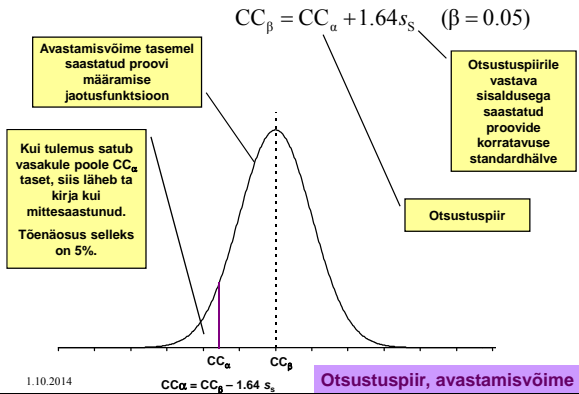
### Otsustuspiir, kui pole lubatud piirsaldust



### Otsustuspiir, kui on lubatud piirsaldus



### Avastamisvõime



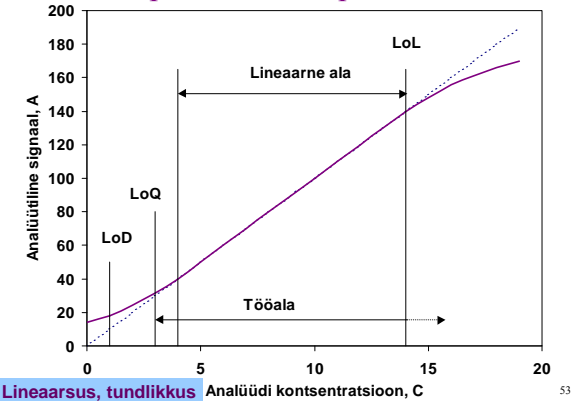
### Arvutusnäide

- Kuidas leida LoD, LoQ, CCa ja CCb konkreetsetest andmetest?
- Lähtefail: <http://tera.chem.ut.ee/~ivo/metro/Naited/LoD.xls>

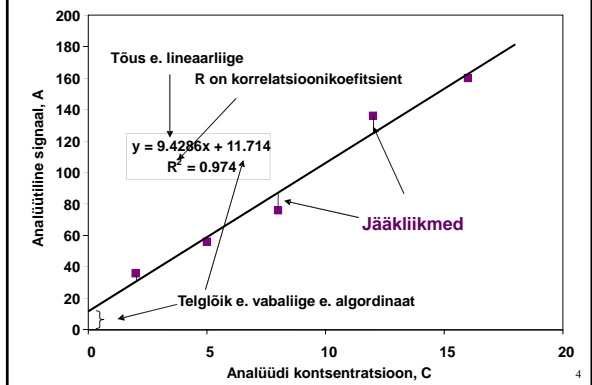
1.10.2014

52

### Avastamispiir, määramispiir, lineaarne ala



### Lineaarsus



## Lineaarsus

Lineaarsus, tundlikkus

- Lineaarsuse hindamise parimaks mooduseks on jääkliikmete (residuaalid) jälgimine
- Jääkliikmed:

$$\epsilon_i = A_i - A_i'$$

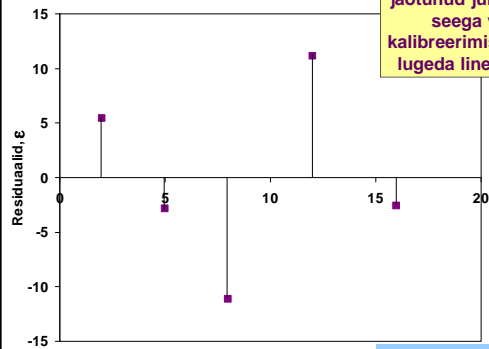
- $A_i$ : standardlahuse i eksperimentaalselt määratud analüütiline signaal
- $A_i'$ : standardlahuse i kontsentratsiooni  $C_i$  järgi kalibreerimisringelt leitav analüütilise signaali väärtus
- $\epsilon_i$ : jääkliige

1.10.2014

55

## Jääkliikmete graafik

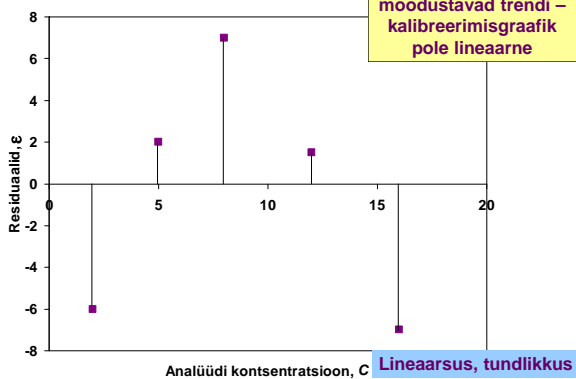
Jääkliikmed on jaotunud juhuslikult, seega võib kalibreerimisgraafiku lugeda lineaarseks



Lineaarsus, tundlikkus

## Jääkliikmed graafik

Jääkliikmed moodustavad trendi – kalibreerimisgraafik pole lineaarne



Lineaarsus, tundlikkus

## Lineaarsus

Lineaarsus, tundlikkus

- Kui graafik formaalselt ka pole lineaarne, siis sageli on lineaarse mudeli rakendamine ikkagi kohane
- See sõltub sellest, kui suur panus mudeli ja reaalsuse lahknevusest tulemuse määramatusele lisa annab
  - Seda saab hinnata, viies läbi määramatuse arvutuse ja võttes suurima residuaali väärtuse maksimaalseks mittelineaarsusest tingitud määramatuse panuseks

1.10.2014

58

## Tundlikkus

Lineaarsus, tundlikkus

- **Tundlikkus** on analüütilise signaali muutus jagatud läbi vastava muutusega analüüdi sisalduses
- Tundlikkust väljendatakse **kalibreerimisgraafiku tõusuna**
- Mõistet tundlikkus ei ole korrektne kasutada avastamis- või määramispiiri asemel!
  - Samas, hea tundlikkus on eelduseks madalate avastamispiiride saavutamisele

1.10.2014

59

## Tundlikkus: näited

Lineaarsus, tundlikkus

- **pH mõõtmine:**
  - Tõus alla 95% kuid üle 90% teoreetilisest → kontrolli elektroode!
  - Tõus alla 90% teoreetilisest → elektroodid ei ole korras!
- **Spektrofotomeetriselised mõõtmised:**
  - Kalibreerimisgraafiku tõus on üllatavalt madal
  - → Lainepikkus ei ole sobilik
  - → Fotomeetiline reaktiiv on saastunud/degradeerunud
- **Lahustunud hapniku mõõtmine:**
  - Sensori signaali tõus on madal → Sensori siselahus vajab vahetamist ja tööelektrood puhastamist

1.10.2014

60

## Täpsus

Täpsuskarakteristikud

- Terminit täpsus kasutatakse kahes tähenduses:
- täpsus **kordustäpsuse** (*precision*) mõistes: korduvmõõtmiste tulemuste omavahelist kokkulangevust iseloomustav suurus
  - Iseloomustab juhuslikku viga
- **täpsus** summaarse täpsuse (*accuracy*) mõistes: Sisaldab endas nii kordustäpsust kui ka tõesust
  - Sellise täpsuse väljendajaks on mõõtemääramatus

1.10.2014

61

## Tõesus (Õigsus)

Täpsuskarakteristikud

- **Tõesus** (*trueness*) on meetodika omadus anda tulemusi, mis on lähedased **tõelisele väärtusele** (*true value*)
- Meetodika tõesus iseloomustab meetodika **süsteematilist viga** (*systematic error*)
- Kogu viga koosneb süsteemaatilisest (*systematic error*) ja juhuslikust (*random error*) veast

1.10.2014

62

## Tõesus (Õigsus)

Täpsuskarakteristikud

- Kuna tõeline väärtus on enamasti teadmata, siis rangelt võttes on meetodika tõesus abstraktne mõiste
- Siiski on sageli võimalik tõesusele omistada sisu:
  - Kui on olemas vastava analüüsi jaoks sertifitseeritud referentsmaterjal
  - Kui on võimalik laboris koostada proov, mis reaalselt proovi piisavalt imiteerib
  - Kui on olemas kõrgetasemeliste võrdlusmõõtmiste tulemused
- Neil juhtudel saame rääkida **tõesuse hinnangutest**

1.10.2014

63

## Kordustäpsus

Täpsuskarakteristikud

- Kui korduvmõõtmised on tehtud lühikese ajavahemiku jooksul samas laboris sama inimese poolt samades tingimustes, räägitakse **korduvusest** (*repeatability*)
  - Selliseid tingimusi nimetatakse korduvuse tingimusteks
- Kui pikema ajaperioodi jooksul või eri laborites või eri töötajate poolt või muul moel erinevatel tingimustel, räägitakse **korratavusest** (*reproducibility*)
- Kordustäpsus kajastab meetodika “juhuslikku viga” ehk juhuslikke määramatuse komponente

1.10.2014

64

## Kordustäpsus: korduvus

Täpsuskarakteristikud

- Kui mõõteseeria viiakse läbi **samades tingimustes**, siis saadavate tulemuste hajuvus iseloomustab mõõtmise **korduvust**

VIM – International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, ISO, 1993

1.10.2014

65

## Kordustäpsus: korratavus

Täpsuskarakteristikud

- Kui mõõteseeria viiakse läbi **erinevates tingimustes** siis tulemuse hajuvus iseloomustab mõõtmise **korratavust**
- Erinevused võivad olla:
  - Teine labor
  - **Analüüsi aeg, samas laboris, sama meetodikaga,  $s_{RW}$  laborisisene (pikaajaline) korratavus**
    - *within-lab (long-term) reproducibility, intermediate precision*
  - Analüüsi sooritav isik samas laboris
  - ...
- Erinevused tuleb korratavuse andmete juures spetsifitseerida!

1.10.2014

66

## Korduvus, Korratavus

Täpsuskarakteristikud

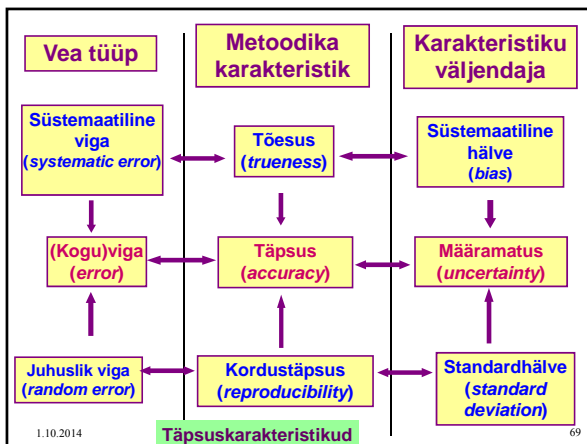
- Praktilised näpunäited:
  - Kordused tuleb teha sedasi, et iga kordus hõlmab kogu meetodikat, sh proovi ettevalmistust
  - Tuleks läbi viia kontsentratsioonide tasemel, kus on oodatavad tulemused
  - Analüüs ei tohiks olla sooritatud hoolikamalt kui igapäeva töö
  - Paralleelkatsete arv võiks olla optimaalselt 3-7 (vastavalt standardhälbele korrigeerida)

8/1/2013 67

## Kordustäpsus, tõesus, (summaarne) täpsus

Olukord	Kordustäpsus? <i>precise?</i>	Tõene? <i>true?</i>	Täpne? <i>accurate?</i>
	Ei	Ei	Ei
	Ei	Jah	Ei
	Jah	Ei	Ei
	Jah	Jah	Jah

1.10.2014 Täpsuskarakteristikud 68



## Korduvuse ja korratavuse standardhälve

- Korduvuse tingimustes leitud standardhälvet tähistatakse  $s_r$
- Laborisisese korratavuse tingimustes leitud standardhälvet tähistatakse  $s_{RW}$
- Alati peab kehtima:  $s_{RW} \geq s_r$ 
  - Kui ei kehti, siis on midagi valesti!
- Ja peab kehtima:
 
$$u_c \geq s_{RW} \geq s_r$$
  - Vajalik on piisav arv paralleelmõõtmisi!
  - Kui piisava arvu paralleelmõõtmiste korral ei kehti, siis on midagi valesti!

1.10.2014 Täpsuskarakteristikud 70

## Kogutud standardhälve

- Kasulik on korduvust ja korratavust hinnata pika aja jooksul saadud andmetest
  - kogutud standardhälbe abil või
  - kontrollkaardi abil
- Olenevalt eksperimendi püstitusest, saab kogutud standardhälbe abil hinnata nii korduvust kui ka korratavust
  - Korraga pole vaja palju paralleelkatsete teha

Täpsuskarakteristikud 71

## Absoluutne ja suhteline standardhälve

- Üldtõded valemite järgi arvutatud standardhälvet nimetatakse ka **absoluutseks standardhälbeks**
  - absoluutne standardhälve on väljendatud samades ühikutes kui mõõdetav suurus
- Sageli on sisukam **suhteline standardhälve**:
 
$$s_{rel}(x) \equiv RSD(x) = \frac{s(x)}{x}$$
- Suhteline standardhälve on ühikuta suurus!
  - Võib olla väljendatud ka protsentides
  - Protsentides väljendatuna nimetatakse sageli **variatsioonikoefitsiendiks** (*coefficient of variation*) tähistus: **CV**

1.10.2014 Täpsuskarakteristikud

## Korduvuse piir

- **Korduvuse piir** (*repeatability limit*): Väärtus, millest korduvuse tingimustes teostatud kahe katse tulemuste absoluutne erinevus on 95% tõenäosusega väiksem

$$r = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_r$$

- $r$  Korduvuse piir
- $t_{\infty}$  Studenti koefitsent 95% usaldusnivool (1.96)
- $s_r$  korduvuse standardhälve

1.10.2014

Täpsuskarakteristikud

## Korratavuse piir

- **Korratavuse piir** (*reproducibility limit*): Väärtus, millest korratavuse tingimustes teostatud kahe katse tulemuste absoluutne erinevus on 95% tõenäosusega väiksem

$$R = t_{\infty} \times \sqrt{2} \times s_R$$

- $R$  Korratavuse piir
- $t_{\infty}$  Studenti koefitsent 95% usaldusnivool
- $s_R$  korratavuse standardhälve

1.10.2014

Täpsuskarakteristikud

## Tõesuse määramine

- Vaja on **tõelise väärtuse** hinnangut
- Kasutatakse
  - Sertifitseeritud referentsmaterjale
  - Proovide kunstlikku valmistamist
  - Proovide rikastamist (*spiking*)
  - Võrdlust sõltumatute meetodite tulemustega
  - Laboritevahelisi võrdlusmõõtmisi
- Oluline on piisava arvu paralleelkatsete tegemine
  - Tehes liiga vähe paralleelkatseid ei eristu süstemaatiline viga (mida tõesus hindab) juhuslikult veast

Tõesus

75

## Tõesuse väljendamine

- Kolm põhilist võimalust:
- Saadud väärtuse ja referentsväärtuse **hällbena** (*bias*)
  - Võib olla väljendatud absoluutse või suhtelise hällbena
- Võrdlus kahe tulemuse vahel vormistatuna mõneks matemaatiliseks kriteeriumiks, nt  $E_n$  arv
- **Saagise** (*recovery*)  $R$  kujul
- See, millist neist kasutada, sõltub sellest, mida me tõesuse hinnanguga teha soovime

Tõesus

76

## Mõõtemääramatus

Mõõtemääramatus

- **Mõõtemääramatus** (**e. määramatus**) on mõõtetulemusega seotud parameeter, mis iseloomustab mõõdetavale omistamiseks mõistlike väärtuste jaotust
- määramatus on põhimõtteliselt vaadeldav ühe valideerimisparameetrina
- Mõnevõrra loogilisem on ta siiski eraldi jätta, sest määramatuse hindamiseks saadakse infot suuresti just valideerimisest
  - See on üks oluline aspekt, miks valideerimist vaja on

Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, ISO: Geneva, 1993.

Eesti keeles: *Mõõtemääramatuse väljendamise juhend*. Inglise keelest tõlkinud Viktor Vabson. Riigi Metroloogiakeskus, Tartu, 1996.

77

## Mõõtemääramatus

Mõõtemääramatus

- Kui meetodikale peale valideerimist leitakse määramatuse hinnang (või määramatuste vahemik), siis see peab olema vastavuses saadud täpsuse ja tõesuse parameetritega:
  - Määramatus peab endas hõlmama nii juhuslikud kui ka süstemaatilised efektid
  - Peab kehtima:

$$u_c > s_r$$
$$u_c \geq s_{RW}$$

$u_c$  on **liitstandardmääramatus**

$s_{RW}$  on **laborisene pikaajaline korratavus**

1.10.2014

78

## Metoodika saagis

Saagis

- Saagis  $R$  (*recovery*) näitab seda, millise osa proovis olevast analüüdist metoodika on võimeline ära mõõtma

$$R = \frac{C_{\text{metoodika, korreerimata}}}{C_{\text{tõeline}}}$$

- Saagise väärtused on sageli alla 1, mis on tingitud sellest, et mitmesugustel põhjustel jääb osa analüüti määramata

1.10.2014

79

## Metoodika saagis

Saagis

- Saagis on alla 1 sageli selle tõttu, et ta võtab arvesse kadusid, mis tulenevad **proovi ettevalmistamisest**
- Saagis võib olla ka üle 1, see tuleneb ebapiisavast selektiivsusest või proovi saastumisest

1.10.2014

80

## Sertifitseeritud referentsmaterjali (CRM) kasutamine saagise määramiseks

Saagis

- CRM abil saagise määramisel on  $C_{\text{tõeline}}$  rollis analüüdi sisaldus CRM-is
- Saagise väärtuse arvutamine on lihtne:

$$R = \frac{C_{\text{leitud}}}{C_{\text{CRM}}}$$

- **Selline saagise määramine on adekvaatne vaid siis, kui CRM maatriks vastab proovi maatriksile!**

1.10.2014

81

## Saagis rikastamiskatsetest

Saagis

- **Rikastamiskatsed** (*spiking*, spaikimine) on levinud võtte saagise määramiseks
- Analüüs tehakse kahte moodi:
  - Prooviga, selliselt, nagu see on: saadakse tulemus  $m_0$  (analüüdi mass proovis) või  $C_0$  (analüüdi sisaldus proovis)
  - Prooviga, olles lisanud sellele mingi koguse  $\Delta m$  (või  $\Delta C$ ) analüüti: saadakse tulemus  $m_1$  (või  $C_1$ )
    - See kogus võiks olla ca 50-150% eesjärgest sees olevast kogusest
- Saagis leitakse:

$$R = \frac{m_1 - m_0}{\Delta m} \quad R = \frac{C_1 - C_0}{\Delta C}$$

1.10.2014

82

## Saagis rikastamiskatsetest

Saagis

- Olulised asjad:
  - Analüüt tuleb rikastamisel sisestada proovi selliselt, et ta saaks sinna dispergeeritud seal juba olevale analüüdile võimalikult sarnaselt
  - Eelmise slaidi valemid eeldavad, et mõlemad analüüsid tehti täpselt sama massiga/ruumalaga proovidest
    - kui ei, siis tuleb korreerida
  - Millises proovi ettevalmistamise etapis lisada analüüti

1.10.2014

83

## Saagisega korreerimine

Saagis

- Korreerimine:

$$C_{\text{korreeritud}} = \frac{C_{\text{korreerimata}}}{R}$$

8/1/2013

84

## Millal korrigeerida?

Saagis

- Peavad olema täidetud neli tingimust:
  - R on 1-st piisavalt erinev
  - Põhjus, miks R erineb 1-st on leitav
  - R on piisavalt usaldusväärselt määratav **kõnealuse analüüt-maatriks kombinatsiooni jaoks**
  - Tulemuse liitstandardmääramatus alaneb
- Ei tohi unustada, et korrigeerimine tuleb lisada ka määramatuse arvutusse.

8/1/2013

85

## Robustsus, kapriissus

- **Kapriissus** iseloomustab meetoodika abil saadavate tulemuste tundlikkust meetoodika parameetrite väikeste muutuste suhtes
- **Robustsus** (*robustness*, tähistab mittekapriissust) iseloomustab saadavate tulemuste tundetust meetoodika parameetrite väikeste muutuste suhtes
- Mida robustsem (vähem kapriisne) on meetoodika, seda usaldusväärsem ta on

1.10.2014

Kapriissus, Robustsus

## Robustsus, kapriissus

- Uuritakse nii, et tehakse meetoodika tingimustesse väikesi muudatusi
- Muudetavate parameetrite näited:
  - Muudetakse happe kontsentratsiooni - happega tuhastamisel
  - Muudetakse reaktsioonitingimusi derivatiseerimisel
  - Muudetakse pH või maskeeriva reagenti kontsentratsiooni EDTA-ga tiitrimisel
  - Fotomeetrilise reagenti hulga muutmine fotomeetrias
  - Mobiilfaasi koostise muutmine vedelik-kromatograafias
  - Reagentide ja lahuste vanandamine
- See, mida uurida, on väga sõltuv konkreetsest meetoodikast

1.10.2014

Kapriissus, Robustsus

## Stabiilsus

- Analüüdi või proovimatriksi osade ebapiisav stabiilsus proovi säilitamisel või analüüsimisel võib põhjustada olulisi hälbeid analüüsitulemustes
- Viiakse läbi stabiilsuse uuring nii standardlahustele kui ka proovidele (võib olla spaigitud)
- Varieerida on võimalik:
  - aega (päevad, nädalad jne)
  - temperatuuri (+20°C, +4°C, -20°C)
  - valgust (pimedas vms)

8/1/2013

Kapriissus, Robustsus

## Milliseid parameetreid valideerimisel määrata?

- Sõltub analüüsi eesmärgist ja meetoodikale esitatavatest nõuetest
- Näide 1: **Kolesterool vereseerumis**
  - LoD pole oluline
    - Veres on alati kolesterooli
  - Selektiivsus/identiteet: oluline, kuid pole väga raske saavutada, sest pole jälgede määramine
  - Täpsus (*accuracy*) on väga oluline
    - Vahe normaalse ja kõrge sisalduse vahel on väga väike

1.10.2014

89

## Milliseid parameetreid valideerimisel määrata?

- Näide 2: **Dopingukontroll**
  - LoD on väga oluline
    - Paljud ained on keelatud mistahes sisalduses
  - Selektiivsus/identiteet on kriitiliselt oluline
    - Ja on raske saavutada, sest on jälgede määramine
  - Kvantitatiivne täpsus on harva oluline
    - Sest tulemus antakse "JAH või EI"

1.10.2014

90

## Milliseid parameetreid valideerimisel määrata?

- Näide 3: **Taimedele omastatava P sisalduse määramine mullas**
  - LoD ei ole eriti oluline
    - P on makroelement
  - Selektiivsus/identiteet on oluline
    - Selektiivsus P suhtes ei ole väga raske saavutada, sest pole jälgede analüüs
    - Kuid peab olema hoolas, et tulemus kajastaks tõesti just omastatavat P-d (lahustamine peab olema kontrollitud)
  - Kvantitatiivne täpsus on oluline
    - Sageli tehakse järeldusi lahustuva P sisalduse suurenemise/vähennemise põhjal

1.10.2014

91

## Tiitrimismetoodikate valideerimine

1.10.2014

92

## Selektiivsus

- **Tiitrimise selektiivsus on üldiselt madal**
  - Selektiivsust õnnestub sageli parandada
    - tiitrimistingimuste valimisega
    - **maskeerimisega**
    - eelneva **eraldamisega** (analüüt või segaja)
  - Tiitrimismetoodikaid on väga palju selliseid, kus **hoidutakse selektiivsuse saavutamisest**

1.10.2014

93

## Näide: maskeerimine

- Näide: määrata proovis eraldi Cu ja Zn kasutades EDTA-ga tiitrimist
- Sarnased stabiilsuskoeffitsendid EDTA-ga:
  - $\log K_f(\text{Cu}) = 18.8$ ,  $\log K_f(\text{Zn}) = 16.5$
- EDTA ei ole selektiivne reagent
  - Cu ja Zn käituvad teineteise suhtes segajatena!
  - pH muutmine ei aita.
- Lahendus: **maskeerimine**
  - $\text{Cu}^{2+}$  annab tiosulfaataniooniga stabiilse kompleksi
  - $\text{Zn}^{2+}$  ei reageeri tiosulfaadiga

1.10.2014

94

## Näide: maskeerimine

- Tiitritakse kaks korda
  - Üks kord ilma maskeeriva reagentita (saadakse summaarne sisaldus)
  - Teine kord maskeeriva reagentiga (saadakse Zn sisaldus)
- Mida silmas pidada:
  - **Need võtted on aga väga maatriksitundlikud!**
    - Näiteks nikli vastu see maskeerimine ei aita!
    - Oksüdeerijad ja hape lagundavad tiosulfaadi
      - Oluline on, et keskkonnas poleks oksüdeerijaid ja et enne tiosulfaadi lisamist oleks pH viidud piisavalt kõrgeks
  - **Alati tuleb maatriksi muutudes uuesti valideerida!**

1.10.2014

95

## Selektiivsuse/spetsiifilisuse saavutamisest hoidumine

- Sageli polegi vaja sarnaste omadustega analüütide vahel vahet teha
- See kehtib siis, kui määratakse nn **üldiseid näitajaid**
- Näited:
  - Üldine happelisus
    - leitud happe-aluse tiitrimise teel, kasutades fenoolftaleiini indikaatorina
    - määrab kõigi hapete summaarse sisalduse
  - Permanganaatne oksüdeeritavus (KHT)
    - määrab kõigi oksüdeerivate ainete summaarse sisalduse

1.10.2014

96



## Selektiivsuse/spetsiifilisuse saavutamisest hoidumine

- Sageli on selline olukord:
  - määratakse konkreetset analüüti, mitte üldist näitajat
  - meetodika ebapiisava selektiivsusega, kuid
    - lähedaste ainete hõlmamine eriti ei sega
- Näide:
  - Võis võihappe sisalduse määramine
  - Määratakse happe-aluse tiitrimisega
  - Seal on ka teisi happeid, kuid nende kaasamääramine ei ole probleem
  - Tulemus antakse “võihappe kohta”

1.10.2014

97

## Täpsus ja õigsus

- Tiitrimise kordustäpsus võib olla väga kõrge
- Tiitrimise õigsus on põhiliselt määratud järgmiste asjaolude poolt:
  - selektiivsus
  - lõpp-punkti ja stöhhiomeetriapunkti kokkulangevus
    - Kas indikaator “pöörduv” õigel hetkel?
    - Ebapiisav selektiivsus võib avalduda ka lõpp-punkti “ujumises”

1.10.2014

98

## Tiitrimise avastamispiir

- Tiitrimine pole jälgede määramise meetod
- Tiitrimise **avastamispiiri** on ülaltoodud lähenemisega veidi keerukas määrata
  - Kui meetodika on korras, pöörduv indikaator 1-2 tilga jooksul
- Mõistlik on tiitrimise juures lugeda avastamispiiriks analüüdi kogus, mis vastab 3-6 tilgale titrandile
  - Mitu tilka võtta, sõltub sellest, kui terav on lõpp-punkt
- **Kriitiline on seejuures, et peab olema kindel, et see pole mõni segav aine, mis nende tilkadega reageerib**

1.10.2014

99

## Tiitrimise lineaarsus

- Tiitrimise korral võib **lineaarsuse** üldiselt lugeda ideaalseks, kui
  - Tiitrimisreaktsiooni stöhhiomeetria on paigas
  - Ei esine segavaid mõjusid

1.10.2014

100

## Tiitrimise tööala

- Tööala sõltub büretist
- 50 ml büreti korral alates ca 1-3 ml kuni ca 40 ml
- Madala titrandi kulu korral on titrandi koguse mõõtmine ebatäpne
  - Kui titrandi kulu on madal, tuleb võtta väiksema ruumalaga bürett
- Kõrge titrandi kulu korral võtab tiitrimine kaua aega, võivad hakata toimuma kõrvalised protsessid
  - Võib võtta vähem proovi
- Tiitrimise **määramispiiri** võib lugeda samaks tööala algusega

1.10.2014

101

## Tiitrimise kapriissus (1)

- Tiitrimismetoodikate kapriissus on väga erinev
- Näited asjaoludest, mida silmas pidada:
  - **Värvilised/hägused lisandid muudavad lõpp-punkti halvasti määratavaks**
    - ➔ Võimalusel vältida tiitrimine (kasvõi pisteliselt) läbi potentsiomeetriliselt
  - **Tiitrimise tulemus on väga tundlik keskkonna pH suhtes**
    - ➔ Võimalusel kontrollida pH-d reaalse mõõtmisega, mitte toetuda ainult meetodikas toodud kogustele, proovi ettevalmistamise tulemusel võib pH olenevalt proovi omadustest olla küllaltki erinev

1.10.2014

102

## Tiitrimise kapriissus (2)

- Näited:
  - **Kasutatakse analüüdi viimist mingisse vormi, näiteks oküdeerimine, ja see töötab halvasti**
    - Põhjus võib olla selles, et proovi maatriks sisaldab palju reduseerivaid lisandeid, mis tarvitavad oksüdeerija ära. Kas see maatriksitüüp on ikka meetoodika rakendusallas?
  - **Titraatoriga tiitrides on tulemuse kordustäpsus halb**
    - Kontrollida lekkeid titraatoris
    - Kas eelmine titrant on titraatorist välja pestud?
    - Võibolla on titraator pikalt kasutuseta seisnud?

1.10.2014

103

## Mida kapriissuse uurimisel varieerida?

- Titrandi vanus
  - Kuiõrd muutub tulemus, kui kasutada pikka aega seisnud titranti?
- Tiitrimiskeskond
  - Kuiõrd muutub tulemus, kui tiitrimiskeskond (pH, lisatud reaktiivide kogused, ...) erineb mõnevõrra meetoodikas toodust?
- Indikaatori vanus
  - Kuiõrd muutub tulemus, kui kasutada pikka aega seisnud indikaatori lahust?
- Indikaatori kogus
- Segamise intensiivsus
- ...

1.10.2014

104