# ΠΡΟΣ ΕΝΑ ΓΕΝΙΚΕΥΜΕΝΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΩΝ ΓΙΑ ΑΝΑΛΥΤΙΚΟΥΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥΣ

**Ηλίας Κακουλίδης[1], Βασιλική Σχοινά[1], Ιωάννης Γαρδίκης[2] και Ευγενία Λαμπή[3]**
**[1]Χ.Υ. Μετρολογίας, [2]Α΄ Χ.Υ. Αθηνών, [3]Β΄ Χ.Υ. Αθηνών**
**Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, 11521 Αθήνα**
**e-mail: i.kakoulidis@gcsl.gr**

## Περίληψη

Στην εργασία που παρουσιάζεται επιχειρείται να δοθεί ένα γενικευμένο μαθηματικό μοντέλο στο οποίο περιλαμβάνονται οι παράμετροι που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα των αναλυτικών προσδιορισμών, ιδιαίτερα όσων αφορούν σε μεθόδους ισοτοπικής αραίωσης. Στις παραμέτρους που εντάσσονται στο μοντέλο, διακρίνονται η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (της αναλυτικής διάταξης και του προσωπικού), η ανάκτηση της μεθόδου, ο τρόπος βαθμονόμησης του εξοπλισμού και τα χαρακτηριστικά της δειγματοληψίας και της κατεργασίας του δείγματος. Υιοθετώντας σχεδιασμούς ιεράρχησης, εξάγουμε χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τη συνεισφορά των παραγόντων που υπεισέρχονται στην αναλυτική διαδικασία. Αναλυτικά δεδομένα επικύρωσης από τη διαδικασία επικύρωσης των προσδιορισμών επιμολυντών σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης χρησιμοποιούνται ως παραδείγματα για την κατάστρωση των ισοζυγίων αβεβαιότητας.

*Λέξεις-Κλειδιά: ποσότητα της ουσίας, αναλυτικοί προσδιορισμοί, αβεβαιότητα.*

## Summary

A generalized model for the expression of measurement uncertainty for analytical determinations is the subject of the present study, trying to incorporate all the parameters that affect the validation process of isotopic dilution determinations. The parameters introduced in the model can be broken down into method reproducibility and recovery, instrument calibration, sampling characteristics and sample treatment. A 4-level nested experimental design is employed, in order to derive useful information about the parameters that affect the validation process. Validation data obtained from in-house method development for the determination of contamintants in foodstuffs of animal origin serve as examples for the development of analytical uncertainty budgets.

*Keywords: amount of substance, analytical determinations, uncertainty.*

## 1. Εισαγωγή

Η επικύρωση αναλυτικών μεθόδων αποτελεί πλέον μια καθιερωμένη διαδικασία στα αναλυτικά εργαστήρια (ICH 2005, Magnusson and Örnemark, 2014). Σκοπός της διαδικασίας είναι ο προσδιορισμός και η καταγραφή των χαρακτηριστικών της μεθόδου που τεκμηριώνουν ότι είναι κατάλληλη για την εφαρμογή για την οποία προορίζεται και χαρτογραφούν τα ποιοτικά της χαρακτηριστικά. Πρόσφατα, σε εφαρμογές σχεδιασμού και ανάπτυξης προϊόντων προτείνονται διεργασίες που επιδιώκουν την ποιότητα μέσω του σχεδιασμού (*quality by design*) (Barket 2005, Rathore and Winkle, 2009). Αντίστοιχες

προσεγγίσεις προτείνονται και για συναφείς αναλυτικούς προσδιορισμούς (Wieling et al. 2006, Rozer et al. 2015). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η συνεισφορά των παραγόντων που εισάγουν συστηματικά σφάλματα στους προσδιορισμούς είναι εύκολο να διακριθεί και ποσοτικοποιηθεί. Σε αντίθεση, η συνεισφορά των παραγόντων εκείνων που εισάγουν τυχαία σφάλματα στις πειραματικές διαδικασίες απαιτεί ιδιαίτερο σχεδιασμό για να προσδιοριστεί.

Προϋποθέτει την εφαρμογή ιδιαίτερων πειραματικών σχεδιασμών (Montgomery, 2008), ώστε μέσω τεχνικών ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) να καταστεί δυνατή η ανάλυση των παραγόντων σε διακριτούς παράγοντες, οι οποίοι συνήθως «κρύβονται» ο ένας μέσα στον άλλο. Κατάλληλα σχέδια είναι οι σχεδιασμοί ιεράρχησης (*nested designs*) (Sahai and Ageel 2000, Sahai and Ojeda 2004), τεχνικές με τις οποίες σταθεροί (*fixed*) και τυχαίοι (*random*) παράγοντες μπορούν να συνδυαστούν με συγκεκριμένο, ιεραρχημένο τρόπο ώστε να αποκαλυφθεί η διακριτή συνεισφορά του καθενός στη διαδικασία. Με τον τρόπο αυτό, η διακύμανση του καθενός μπορεί στη συνέχεια να εισαχθεί σε ένα κατάλληλο αναλυτικό μοντέλο, το οποίο θα δίνει τη δυνατότητα έκφρασης της αβεβαιότητας της επιλεγόμενης αναλυτικής μεθοδολογίας. Ανάλογες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των χαρακτηριστικών ανθεκτικότητας (robustness/ruggedness) αναλυτικών μεθόδων (van der Hayden et al. 2009).

Όπως επισημαίνουν και άλλοι ερευνητές (Κωστάκης και συνεργάτες, 2014), η διαδικασία επικύρωσης είναι χρονοβόρες και απαιτούν την πραγματοποίηση αρκετών πειραμάτων, οπότε συνήθως η διαδικασία πραγματοποιείται συνοπτικά με σκοπό την εξοικονόμηση πόρων. Σε ορισμένες όμως περιπτώσεις, όπως είναι ο προσδιορισμός υπολειμμάτων σε τρόφιμα και νωπά προϊόντα, έχουν θεσμοθετηθεί αυστηρές διαδικασίες όπως εκείνες που προβλέπονται στην Απόφαση 657/2002/ΕΚ. Εφόσον η διαδικασία σχεδιαστεί προσεκτικά από την αρχή, υπάρχει η δυνατότητα της εφαρμογής ενός πλαισίου QbD, έτσι ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα που θα μας βοηθήσουν στο να αποκαλύψουμε τη συνεισφορά των διακριτών παραγόντων, αναλύοντας κατάλληλα τα δεδομένα και αντλώντας χρήσιμες πληροφορίες από τη διαδικασία επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου.

Στο κείμενο που ακολουθεί παρουσιάζεται ένας τρόπος εργασίας κατά την διαδικασία επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων που θα επιτρέπει τη διάκριση της συνεισφοράς των τυχαίων παραγόντων, ενώ ταυτόχρονα θα επιτρέπει τον υπολογισμό των χαρακτηριστικών ποιότητας των αναλυτικών προσδιορισμών. Παράλληλα, αναπτύσσει ένα γενικό μαθηματικό πρότυπο στο οποίο διακρίνονται οι πειραματικές διεργασίες και επιτρέπει τον υπολογισμό της αβεβαιότητας της αναλυτικής διαδικασίας.

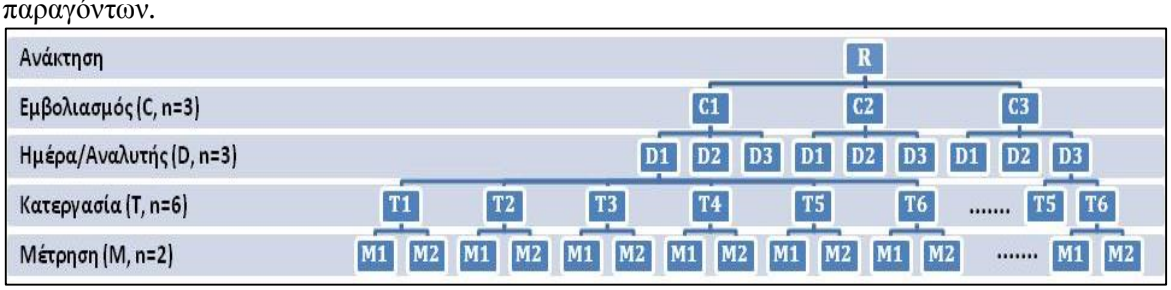
## 2. Μεθοδολογία

### 2.1 Σχεδιασμός πειραμάτων

Εξετάζοντας μια αναλυτική διαδικασία, είναι πλέον αποδεκτό ότι οι κύριοι παράγοντες που την επηρεάζουν είναι η αναπαραγωγιμότητα και η βαθμονόμηση της αναλυτικής διάταξης, ο τρόπος κατεργασίας του δείγματος που ουσιαστικά καθορίζει και την ανάκτηση της μεθόδου, τα χαρακτηριστικά της δειγματοληψίας και της ομοιογένειας του δείγματος και του προσωπικού. Για να αποκαλύψουμε τη συνεισφορά κάθε παράγοντα στη διαδικασία επικύρωσης, μπορούμε να εκφράσουμε την ανάκτηση (η οποία με τη σειρά της αποτελεί μέτρο της ορθότητας της μεθόδου) ως συνάρτηση τεσσάρων ιεραρχημένων παραγόντων: του δείγματος, του επιπέδου επικύρωσης (*C*), των χαρακτηριστικών αναπαραγωγιμότητας

(*D*), της κατεργασίας (*T*) και της τελικής μέτρησης (*M*). Σχηματικά μπορούμε να δώσουμε την πειραματική διαδικασία στο Σχήμα που ακολουθεί:

Σχήμα 1: Η ιεράρχηση των πειραμάτων κατά τη διαδικασία επικύρωσης. Παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο κάθε παράγοντας είναι ιεραρχημένος σε κάθε διαφορετικό επίπεδο των υπό μελέτη παραγόντων.




Πλέον, το γενικό γραμμικό μοντέλο θα είναι:

$$R_{ijklm} = \bar{\bar{R}} + C_i + D_{j(i)} + T_{k(ij)} + M_{l(ijk)} + \epsilon_{m(ijkl)}$$

όπου $\bar{\bar{R}}$ είναι η μέση τιμή της ανάκτησης, *C, D, T* και *M* οι παράγοντες του μοντέλου και $\epsilon$ το σφάλμα του.

Θεωρούμε ότι όλοι οι παράγοντες (*effects*) είναι τυχαίοι (*randrom*), καθώς επιλέγονται από ένα άπειρο σύνολο δυνατών επιλογών. Πρόκειται λοιπόν για ένα ιεραρχημένο μοντέλο τυχαίων παραγόντων που πραγματοποιείται σε τέσσερα επίπεδα, στα οποία ο ένας παράγοντας «φωλιάζει» μέσα στον άλλο. Σύμφωνα με τη θεωρία της ανάλυσης διακύμανσης (Searle et al., 1992), είναι δυνατόν να διακρίνουμε τη διακύμανση κάθε ενός παράγοντα, από τα μέσα τετράγωνα (*mean squares*):

$$\hat{\sigma}_\epsilon^2 = MS_E \qquad \hat{\sigma}_M^2 = \frac{MS_{M(T)} - MS_E}{n} \qquad \hat{\sigma}_T^2 = \frac{MS_{T(D)} - MS_{M(T)}}{cn}$$

$$\hat{\sigma}_D^2 = \frac{MS_{D(C)} - MS_{T(D)}}{b\,c\,n} \qquad \hat{\sigma}_C^2 = \frac{MS_C - MS_{D(C)}}{a\,b\,c\,n}$$

Εφόσον το επιθυμούμε, μπορούμε επίσης να εξετάσουμε ανεξάρτητα το κάθε επίπεδο εμβολιασμού (*C*), διασπώντας τον σχεδιασμό τεσσάρων παραγόντων σε τρεις σχεδιασμούς των υπόλοιπων τριών (*D*, *T* και *M*). Αντίστοιχα, το μοντέλο που θα δίνει την εκτίμηση της ανάκτησης για κάθε ένα διακριτό επίπεδο εμβολιασμού ($C_i$), θα δίνεται από τη σχέση:

$$R_{C,jkl} = \bar{\bar{R}}_{C_i} + D_j + T_{k(j)} + M_{l(jk)} + \epsilon_{m(jkl)}$$

Προφανώς, οι διακυμάνσεις των τριών παραγόντων δίνονται από αντίστοιχες μαθηματικές σχέσεις. Με τον τρόπο αυτό μπορούμε να διαχωρίσουμε σε τρεις διαφορετικές συνιστώσες τη συνολική διακύμανση: σε εκείνη που οφείλεται στην ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα, εκείνη που οφείλεται στην κατεργασία του δείγματος, και σε εκείνη που αποδίδεται στην αναπαραγωγιμότητα της αναλυτικής διάταξης. Η πρώτη αποτελεί εκτιμητή του τυχαίου σφάλματος, η δεύτερη της ανάκτησης και η τρίτη της εκάστοτε μέτρησης. Επομένως, μπορούμε να τις διακρίνουμε και να τις εισάγουμε στο μοντέλο εκτίμησης της αβεβαιότητας του αναλυτικού προσδιορισμού, εφόσον αυτό είναι καλά ορισμένο.

## 2.2 Αναλυτική διαδικασία

Επιλέξαμε να αναφερθούμε στη διαδικασία επικύρωσης φαινυλοβουταζόνης (PBZ) από νωπό κρέας, η οποία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πορεία που προβλέπεται από την Απόφαση 657/2002/ΕΚ. Η βαθμονόμηση του εξοπλισμού πραγματοποιείται σε πέντε ισαπέχοντα επίπεδα με πρότυπα σε εκχύλισμα μήτρας (*matrix matched sta*ndards). Πραγματοποιήθηκε εκτίμηση της ανάκτησης φαινυλοβουταζόνης με εμβολιασμό λευκών δειγμάτων κρέατος σε τρία επίπεδα 2,5 μg/kg, 5 μg/kg και 7,5 μg/kg για τις μη επιτρεπόμενες ουσίες, επίπεδα τα οποία συμπίπτουν με τρία από τα επίπεδα επικύρωσης. Όσο αφορά στην αναλυτική πρακτική, τα δείγματα εκχυλίζονται με ακετονιτρίλιο και μετά από εκχύλιση στερεής φάσης αναλύονται σε διάταξη υγρής χρωματογραφίας με διαδοχική φασματομετρία μαζών. Η επεξεργασία των αναλυτικών δεδομένων πραγματοποιείται με το πρόγραμμα MINITAB.

### 2.3 Μαθηματικό πρότυπο

Στα σημεία βαθμονόμησης (*cal*), ο λόγος της ποσότητας της ουσίας ($\dot{m}$) του αναλύτη (*d*) προς εκείνη του εσωτερικού προτύπου (*is*) είναι ανάλογος του λόγου $R_{cal}$ των εμβαδών των αντίστοιχων αποκρίσεων (*E*):

$$\frac{\dot{m}_{d,\mathrm{cal}}}{\dot{m}_{is,\mathrm{cal}}} = k\frac{E_{d,\mathrm{cal}}}{E_{is,\mathrm{cal}}} = kR_{\mathrm{cal}} \tag{1}$$

οπότε:

$$\frac{\dfrac{V_{d,\mathrm{cal}}\,C_{d,\mathrm{cal}}}{mw_d}}{\dfrac{V_{is,\mathrm{cal}}\,C_{is,\mathrm{cal}}}{mw_{is}}} = k\frac{E_{d,\mathrm{cal}}}{E_{is,\mathrm{cal}}} = k_{cal}R_{\mathrm{cal}} \tag{2}$$

όπου *V* ο όγκος και *C* η συγκέντρωση των διαλυμάτων του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και *mw* τα μοριακά τους βάρη.

Αντίστοιχα, στα υπό ανάλυση δείγματα (*smp*) ισχύει ότι:

$$\frac{\dot{m}_{d,\mathrm{smp}}}{\dot{m}_{is,\mathrm{smp}}} = \frac{\dfrac{m_{\mathrm{smp}}\,C_{d,\mathrm{smp}}}{mw_d}}{\dfrac{V_{is,\mathrm{smp}}\,C_{is,\mathrm{smp}}}{mw_{is}}} = k\frac{E_{d,\mathrm{smp}}}{E_{is,\mathrm{smp}}} = k_{smp}R_{\mathrm{smp}} \tag{3}$$

Διαιρώντας κατά μέλη τις εξισώσεις (2) και (3):

$$\frac{\dfrac{\dfrac{m_{\mathrm{smp}}\,C_{d,\mathrm{smp}}}{mw_d}}{\dfrac{V_{is,\mathrm{smp}}\,C_{is,\mathrm{smp}}}{mw_{is}}}}{\dfrac{\dfrac{V_{d,\mathrm{cal}}\,C_{d,\mathrm{cal}}}{mw_d}}{\dfrac{V_{is,\mathrm{cal}}\,C_{is,\mathrm{cal}}}{mw_{is}}}} = \frac{k_{\mathrm{smp}}}{k_{\mathrm{cal}}}\frac{R_{\mathrm{smp}}}{R_{\mathrm{cal}}} \tag{4}$$

και λύνοντας για τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα:

$$C_{d,\mathrm{smp}} = \frac{k_{\mathrm{smp}}}{k_{\mathrm{cal}}} \times \frac{V_{is,\mathrm{smp}}\, C_{is,\mathrm{smp}}}{m_{\mathrm{smp}}} \times \frac{V_{d,\mathrm{cal}}\, C_{d,\mathrm{cal}}}{V_{is,\mathrm{cal}}\, C_{is,\mathrm{cal}}} \times \frac{R_{\mathrm{smp}}}{R_{\mathrm{cal}}} \qquad (5)$$

Ακόμη, η ανάκτηση (*Rec*) ανά επίπεδο επικύρωσης ισούται με το λόγο της πειραματικά υπολογιζόμενης μάζας του αναλύτη στο εκάστοτε επίπεδο επικύρωσης ( $\overline{m}_{d,\mathrm{obs}}$) προς την ποσότητα που πραγματικά ενέθηκε στο δείγμα ($m_{d,\mathrm{spk}}$):

$$Rec = \frac{\overline{m}_{d,\mathrm{obs}}}{m_{d,\mathrm{spk}}} = \frac{\left(\frac{\overline{R}_{smp} - b}{a}\right) C_{is,rec} V_{is,spk}}{V_{d,\mathrm{spk}} C_{d,\mathrm{spk}}} = \frac{k_{\mathrm{smp}}}{k_{\mathrm{cal}}} \qquad (6)$$

όπου $\overline{R}_{smp}$ ο μέσος λόγος των αποκρίσεων στα επίπεδα επικύρωσης, *a* και *b* η κλίση και η αποτέμνουσα της σχετικής καμπύλης αναφοράς, $C_{\mathrm{is}}$ η συγκέντρωση του εσωτερικού πρότυπου στα διαλύματα βαθμονόμησης, $V_{\mathrm{ext}}$, ο όγκος εκχύλισης, $V_{\mathrm{d,spk}}$ ο όγκος εμβολιασμού του υποστρώματος και $C_{\mathrm{d,spk}}$ η συγκέντρωση του αναλύτη στο διάλυμα εμβολιασμού.

Άρα, η τελική διαμόρφωση της εξίσωσης υπολογισμού της συγκέντρωσης, έχει ως εξής:

$$C_{d,\mathrm{smp}} = \frac{1}{Rec} \times \frac{V_{is,\mathrm{smp}}\, C_{is,\mathrm{smp}}}{m_{d,\mathrm{smp}}} \times \frac{V_{d,\mathrm{cal}}\, C_{d,\mathrm{cal}}}{V_{is,\mathrm{cal}}\, C_{is,\mathrm{cal}}} \times \frac{R_{\mathrm{smp}}}{R_{\mathrm{cal}}} \qquad (7)$$

και αντικαθιστώντας στην εξ. (7) την εξ. (6), καταλήγουμε στον τύπο:

$$C_{d,\mathrm{smp}} = \frac{\alpha\ V_{d,\mathrm{spk}} C_{d,\mathrm{spk}}}{\left(\overline{R}_{smp} - b\right) C_{is,spk}\, V_{is,spk}} \times \frac{V_{is,\mathrm{smp}}\, C_{is,\mathrm{smp}}}{m_{\mathrm{smp}}} \times \frac{V_{d,\mathrm{cal}}\, C_{d,\mathrm{cal}}}{V_{is,\mathrm{cal}}\, C_{is,\mathrm{cal}}} \times \frac{R_{\mathrm{smp}}}{R_{\mathrm{cal}}} \qquad (8)$$

Η εξίσωση για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας προκύπτει διαφορίζοντας την εξ. (8) και είναι :

$$\Delta(C_{\mathrm{d,smp}}) = \sqrt{{C_d}^2 \frac{{RSD_R}^2}{n} + \sum_{i=1}^{m} \left(\frac{\partial C_d}{\partial x_i} \Delta_{x_i}\right)^2} \qquad \text{εξ. (9)}$$

όπου $RSD_R$ είναι η σχετική τυπική απόκλιση σε συνθήκες αναπαραγωγιμότητας και n ο αριθμός των πειραμάτων στο κάθε επίπεδο επικύρωσης, ενώ $C_i$ οι συντελεστές ευαισθησίας που σχετίζονται με κάθε ένα παράγοντα αβεβαιότητας $x_i$ της εξίσωσης (εξ. 9), που υπολογίζονται ως οι μερικές παράγωγοι της συνάρτησης (εξ. 8) για κάθε διακριτό της όρο. Ο υπολογισμός της διευρυμένης τυπικής αβεβαιότητας σε επίπεδο εμπιστοσύνης (1-α)% δίνεται από το γινόμενο κατάλληλου συντελεστή κάλυψης *k* και της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας. Κατά κανόνα, ως *k* λαμβάνεται η τιμή 2. Γνωρίζοντας πλέον τους επιμέρους βαθμούς ελευθερίας κάθε συνιστώσας που μετέχει στο ισοζύγιο αβεβαιοτήτων, ο συντελεστής κάλυψης υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης των *Welch-Satterthwaite* για την προσέγγιση των πραγματικών (*effective*) βαθμών ελευθερίας (BIPM, 2008).

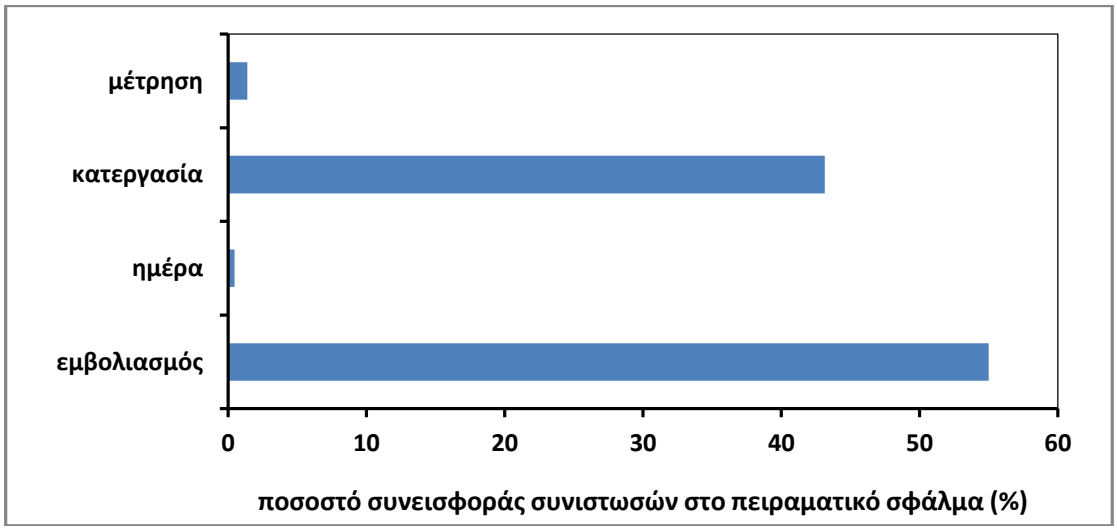
## 3. Συμπεράσματα – Πρόταση

Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα αποτελέσματα από την εφαρμογή ανάλυσης διακύμανσης για τον προσδιορισμό PBZ, ενώ στο Σχήμα 2 αποδίδεται διαγραμματικά η συνεισφορά των τεσσάρων συνιστωσών στην αναλυτική διαδικασία.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης της ανάκτησης για όλα τα επίπεδα εμβολιασμού (df: βαθμοί ελευθερίας, SS: άθροισμα τετραγώνων, MS: μέσα τετράγωνα, F: λόγος F, p: στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, sd: τυπική αποκλιση).

| παράγοντας | df | SS | MS | F | p | συνεισφορά (%) | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| εμβολιασμός | 2 | 0,4605 | 0,2303 | 22,262 | 0,002 | 55,00 | 0,078 |
| ημέρα/αναλυτής | 6 | 0,0621 | 0,0103 | 1,062 | 0,399 | 0,45 | 0,007 |
| κατεργασία | 45 | 0,4383 | 0,0097 | 62,907 | 0,000 | 43,15 | 0,069 |
| μέτρηση | 54 | 0,0084 | 0,0002 | | | 1,39 | 0,012 |
| σύνολο | 107 | 0,9692 | | | | | 0,105 |

Από το διάγραμμα γίνεται άμεσα αντιληπτό ότι οι παράγοντες που επηρεάζουν ιδιαίτερα την ανάκτηση της PBZ είναι το επίπεδο εμβολισμού των λευκών δειγμάτων και ο τρόπος κατεργασίας τους. Η αναπαραγωγιμότητα του αναλυτικού εξοπλισμού δεν φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά σε σχέση με τους άλλους δύο παράγοντες, γεγονός αναμενόμενο καθώς η μετρητική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε είναι εξαιρετικά σταθερή. Παραδόξως, η διεξαγωγή των αναλύσεων σε διαφορετικές συνθήκες δεν φαίνεται να συνεισφέρει σημαντικά στη διακύμανση της ανάκτησης και κυμαίνεται στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας.



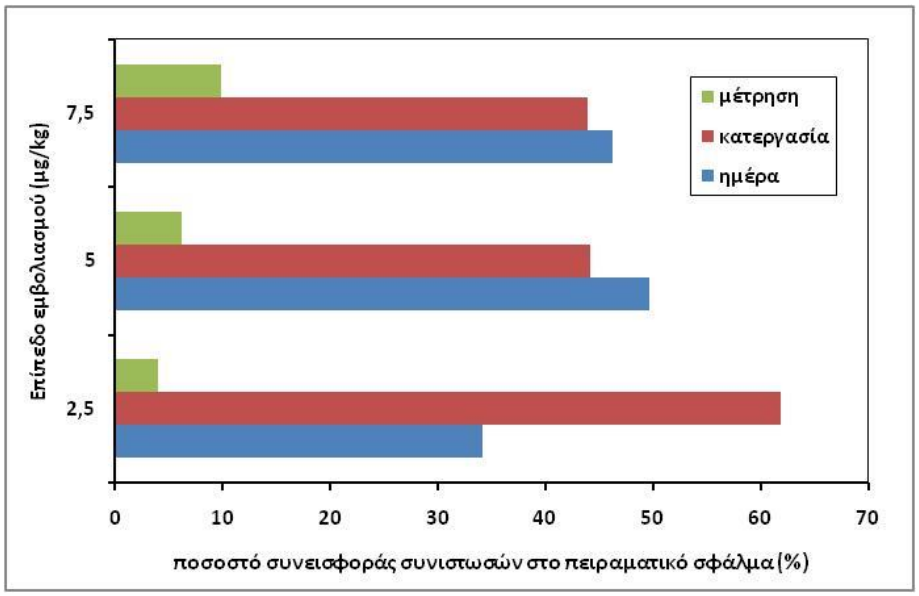

Σχήμα 2: Η συνεισφορά των παραγόντων σχεδιασμού στη συνολική διακύμανση της ανάκτησης για όλα τα επίπεδα εμβολιασμού.

Εξετάζοντας όμως κάθε επίπεδο εμβολιασμού της μήτρας ξεχωριστά, διαπιστώνουμε ότι κάτι τέτοιο δεν αληθεύει. Όπως φαίνεται τόσο από τον Πίνακα 2 και απεικονίζεται με στο Σχήμα 3, η διαφοροποίηση των συνθηκών ανάλυσης παίζει εξίσου σημαντικό ρόλο με την

κατεργασία στην ανάκτηση της φαινυλοβουταζόνης. Φαίνεται μάλιστα ότι στο μέσο και στο υψηλό σημείο εμβολιασμού επηρεάζει ισοδύναμα την ανάκτηση του φαρμάκου από το κρέας, ενώ στο χαμηλό επίπεδο επικύρωσης η κατεργασία φαίνεται να έχει τον κυρίαρχο ρόλο. Φυσιολογικά, η διαδικασία μέτρησης έχει σαφώς υποδεέστερο ρόλο σε σχέση με τους άλλους δύο παράγοντες.

Πίνακας 2: Αποτελέσματα ανάλυσης διακύμανσης της ανάκτησης για κάθε επίπεδο εμβολιασμού (df: βαθμοί ελευθερίας, SS: άθροισμα τετραγώνων, MS: μέσα τετράγωνα, F: λόγος F, p: στατιστική σημαντικότητα σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, sd: τυπική αποκλιση).

| παράγοντας | df | SS | MS | F | p | συνεισφορά (%) | SD |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| επίπεδο εμβολιασμού 2,5 μg/kg | | | | | | | |
| ημέρα/αναλυτής | 2 | 0,0698 | 0,0349 | 4,209 | 0,035 | 34,14 | 0,047 |
| κατεργασία | 15 | 0,1243 | 0,0083 | 31,441 | 0,000 | 61,80 | 0,063 |
| μέτρηση | 18 | 0,0047 | 0,0003 | | | 4,06 | 0,016 |
| σύνολο | 35 | 0,1988 | | | | | 0,081 |
| επίπεδο εμβολιασμού 5 μg/kg | | | | | | | |
| κατεργασία | 5 | 0,0628 | 0,0126 | 3,513 | 0,035 | 44,18 | 0,039 |
| ημέρα/αναλυτής | 12 | 0,0429 | 0,0036 | 17,078 | 0,000 | 49,65 | 0,041 |
| μέτρηση | 18 | 0,0038 | 0,0002 | | | 6,18 | 0,014 |
| σύνολο | 35 | 0,1094 | | | | | 0,058 |
| επίπεδο εμβολιασμού 7,5 μg/kg | | | | | | | |
| ημέρα/αναλυτής | 2 | 0,0383 | 0,0191 | 6,667 | 0,008 | 46,18 | 0,037 |
| κατεργασία | 15 | 0,0430 | 0,0029 | 9,919 | 0,000 | 43,96 | 0,036 |
| μέτρηση | 18 | 0,0052 | 0,0003 | | | 9,86 | 0,017 |
| σύνολο | 35 | 0,0865 | | | | | 0,054 |




Σχήμα 3: Το ποσοστό συνεισφοράς των παραμέτρων στην ανάκτηση PBZ από δείγματα κρέατος.

Η εξέταση της σημασίας της διαφοροποίησης των αναλυτών και της ημέρας πραγματοποίησης των πειραμάτων φανερώνει ότι όταν το σύστημα θεωρείται σε όλο το φάσμα των συγκεντρώσεων, η επίδραση του επιπέδου εμβολιασμού των δειγμάτων την αποκρύπτει, καθώς η διαφοροποίηση της ανάκτησης σε κάθε επίπεδο είναι αξιοσημείωτη (101,2, 98,2 και 92,9% στα 2,5, 5 και 7,5 ppb). Όταν όμως εξετάσουμε κάθε επίπεδο εμβολιασμού ξεχωριστά, η εικόνα διαφοροποιείται δραματικά. Μάλιστα, σε δύο από τα επίπεδα σχεδιασμού απαιτήθηκε να διαφοροποιηθεί η σειρά ιεράρχησης, ώστε να αναδειχθεί η εν λόγω συνεισφορά.

Η ανάκτηση αποτελεί βασικό μέτρο εκτίμησης της ορθότητας κάθε αναλυτικής μεθόδου (Barwick and Ellison 1999, Morata et al, 1999, 2001a, 2001b) και η αβεβαιότητά της πρέπει να περιλαμβάνεται στη συνδυασμένη αβεβαιότητα, είτε υπάρχει, είτε όχι στατιστικά σημαντικό συστηματικό σφάλμα. Από το σχεδιασμό των πειραμάτων επικύρωσης, μπορεί πλέον να αποδώσει κανείς τιμές στην αβεβαιότητα της αναλυτικής διαδικασίας. Η αβεβαιότητα τύπου Α προκύπτει από το τυπικό σφάλμα του μέσου και τη συνεισφορά διαφορετικών συνθηκών ανάλυσης (αναλυτών/ημερας). Η αβεβαιότητα των λόγων των εσωτερικών προτύπων στα διαλύματα στους βαθμονομητές είναι διαθέσιμα από τη διαδικασία βαθμονόμησης. Στην πειραματική τιμή του αντίστοιχου λόγου που προκύπτει από την ανάλυση του άγνωστου δείγματος, μπορούμε να αποδώσουμε ως αβεβαιότητα την τυπική απόκλιση των επαναλήψεων υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας. Στην αβεβαιότητα της ανάκτησης, μπορεί να αποδώσει κανείς την των τυπική απόκλιση που οφείλεται στην κατεργασία των δειγμάτων κατά τη διαδικασία επικύρωσης, η οποία ενσωματώνει και την παράμετρο δειγματοληψία. Οι τυπικές αβεβαιότητες της κλίσης και της αποτέμνουσας της καμπύλης βαθμονόμησης υπολογίζονται από τη διαδικασία παλινδρόμησης. Τέλος, η εκτίμηση των αβεβαιοτήτων των υπόλοιπων παραγόντων τύπου Β (συγκεντρώσεις, όγκοι, μάζες) πραγματοποιείται κατά τα γνωστά.

Πίνακας 3: Ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για το μεσαίο επίπεδο επικύρωσης (5 μg/kg).

| σύμβολο | συνιστώσα αβεβαιότητας ($xi$) | τιμή | μονάδα | τυπική αβεβ. ($\Delta x_i$) | σχετική αβεβ. ($\varepsilon x_i$) |
|---|---|---|---|---|---|
| | τυπικό σφάλμα | 5,002 | μg/kg | 0,0353 | 0,0071 |
| | συνθήκες αναπαραγωγιμότητας | 5,002 | μg/kg | 0,2051 | 0,0410 |
| Rsmp | αναλογία εμβαδών αναλύτη/εσωτερικού πρότυπου στο δείγμα | 0,500 | - | 0,0070 | 0,0140 |
| Rcal | αναλογία εμβαδών αναλύτη/εσ.προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης | 0,496 | - | 0,0052 | 0,0105 |
| Vd,cal | όγκος διαλύματος αναλύτη στον βαθμονομητή | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Cd,cal | συγκέντρωση διαλύματος αναλύτη στον βαθμονομητή | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| Vis,cal | όγκος διαλύματος εσωτερικού προτύπου στον βαθμονομητή | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Cis,cal | συγκέντρωση διαλύματος εσ.προτύπου στον βαθμονομητή | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| Vis,smp | όγκος διαλύματος εσωτερικού προτύπου στο δείγμα | 100 | μL | 0,2182 | 0,0022 |
| Cis,smp | συγκέντρωση διαλύματος εσ.προτύπου στο δείγμα | 0,250 | mg/L | 0,0022 | 0,0089 |
| Rvld | μέση αναλογία εμβαδών αναλύτη/εσ.πρότυπου στο επίπεδο επικύρωσης | 0,480 | - | 0,0187 | 0,0390 |
| a | η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης | 0,547 | - | 0,0198 | 0,0362 |
| b | η αποτέμνουσα της καμπύλης βαθμονόμησης | -0,072 | - | 0,0037 | 0,0520 |
| Vd,spk | όγκος διαλύματος αναλύτη στο διάλυμα εμβολιασμού | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Cd,spk | συγκέντρωση διαλύματος αναλύτη στο διάλυμα εμβολιασμού | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| Cis,spk | όγκος διαλύματος εσ.προτύπου στο διάλυμα εμβολιασμού | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Vis,spk | συγκέντρωση διαλύματος εσ.προτύπου στο διάλυμα εμβολιασμού | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| m | η πόσότητα του δείγματος | 5 | g | 0,0080 | 0,0016 |
| Cd,smp | συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα | 5,002 | μg/kg | | |
| | συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα | 0,343 | μg/kg | | |
| | σχετική αβεβαιότητα | 6,851 | (%) | | |
| | αποτελεσματικοί βαθμοί ελευθερίας | 34,7 | | | |
| | k (για 95% επίπεδο εμπιστοσύνης | 2,032 | | | |
| | διευρυμένη αβεβαιότητα | 0,696 | μg/kg | | |

Καταλήγοντας, διαπιστώνουμε ότι μέσα από μια προσεκτικά σχεδιασμένη διαδικασία επικύρωσης, κάθε χημικό εργαστήριο έχει πλήρη εικόνα των παραμέτρων που υπεισέρχονται στον αναλυτικό προσδιορισμό και να τις ενσωματώσει στο ισοζύγιο αβεβαιοτήτων.

Πίνακας 4: Ισοζύγιο αβεβαιοτήτων για όλο το φάσμα των επιπέδων επικύρωσης.

| σύμβολο | συνιστώσα αβεβαιότητας ($xi$) | τιμή | μονάδα | τυπική αβεβ. ($\Delta x_i$) | σχετική αβεβ. ($\varepsilon x_i$) |
|---|---|---|---|---|---|
| | τυπικό σφάλμα | 5,002 | μg/kg | 0,0353 | 0,0071 |
| Rsmp | αναλογία εμβαδών αναλύτη/εσωτερικού πρότυπου στο δείγμα | 0,500 | - | 0,0060 | 0,0120 |
| Rcal | αναλογία εμβαδών αναλύτη/εσ.προτύπου στο διάλυμα βαθμονόμησης | 0,496 | - | 0,0052 | 0,0105 |
| Vd,cal | όγκος διαλύματος αναλύτη στον βαθμονομητή | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Cd,cal | συγκέντρωση διαλύματος αναλύτη στον βαθμονομητή | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| Vis,cal | όγκος διαλύματος εσωτερικού προτύπου στον βαθμονομητή | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Cis,cal | συγκέντρωση διαλύματος εσ.προτύπου στον βαθμονομητή | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| Vis,smp | όγκος διαλύματος εσωτερικού προτύπου στο δείγμα | 100 | μL | 0,0500 | 0,0005 |
| Cis,smp | συγκέντρωση διαλύματος εσ.προτύπου στο δείγμα | 0,250 | mg/L | 0,0022 | 0,0089 |
| Rvld | μέση αναλογία εμβαδών αναλύτη/εσ.πρότυπου στο επίπεδο επικύρωσης | 0,480 | - | 0,0500 | 0,1044 |
| a | η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης | 0,547 | - | 0,0198 | 0,0362 |
| b | η αποτέμνουσα της καμπύλης βαθμονόμησης | -0,072 | - | 0,0037 | 0,0520 |
| Vd,spk | όγκος διαλύματος αναλύτη στο διάλυμα εμβολιασμού | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Cd,spk | συγκέντρωση διαλύματος αναλύτη στο διάλυμα εμβολιασμού | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| Cis,spk | όγκος διαλύματος εσ.προτύπου στο διάλυμα εμβολιασμού | 50 | μL | 0,1091 | 0,0022 |
| Vis,spk | συγκέντρωση διαλύματος εσ.προτύπου στο διάλυμα εμβολιασμού | 5 | mg/L | 0,0165 | 0,0033 |
| m | η πόσότητα του δείγματος | 5 | g | 0,0080 | 0,0016 |
| Cd,smp | συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα | 5,002 | μg/kg | | |
| | συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα | 0,501 | μg/kg | | |
| | σχετική αβεβαιότητα | 10,022 | (%) | | |
| | αποτελεσματικοί βαθμοί ελευθερίας | 61,4 | | | |
| | k (για 95% επίπεδο εμπιστοσύνης) | 2,000 | | | |
| | διευρυμένη αβεβαιότητα | 1,002 | μg/kg | | |

Παράλληλα, η προσεκτική ανάλυση των αναλυτικών δεδομένων για κάθε χημική ένωση που αναλύεται με παρόμοιο τρόπο, μπορεί να οδηγήσει τα εργαστήρια σε πολύ χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά. Η μεθοδολογία είναι απλή και μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιαδήποτε αναλυτική μέθοδο. Αποφέρει πληροφορίες που τροφοδοτούν την εκτίμηση της αβεβαιότητας και προσφέρουν μια βαθύτερη εικόνα σχετικά με τους παράγοντες που συνεισφέρουν στο σχετικό ισοζύγιο. Τέλος, αν και η μελέτη περισσότερων παραγόντων είναι πάντα δυνατή με την ενσωμάτωση περισσότερων επιπέδων στο ιεραρχημένο μοντέλο, είναι αμφίβολο κατά πόσο κατορθώνει να αναδείξει πλήρως το ρόλο τους στον αναλυτικό προσδιορισμό.

## 4. Βιβλιογραφία

Ελληνική

Κωστάκης Μ. Γ., Θωμαΐδης Ν. Σ., Ευσταθίου Κ. Η. και Κουππάρης Μ. Α., "*Εναλλακτικοί τρόποι εκτίμησης της αβεβαιότητας του συστηματικού σφάλματος μέσω εμβολιασμένων δειγμάτων*", 5ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, 2014, Αθήνα

Ξενόγλωση

Barket T.H., "*Quality by Experimental Design"*, 3rd ed., 2005, CRC Press, Boc Raton, FL.
Barwick V.J. and Ellison, S.L.R., "*Measurement uncertainty: Approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery*", Analyst, 124, 981–990, 1999.
BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, "*Evaluation of Measurement Data - Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*". Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM 100,BIPM: Paris, 2008
ICH, "*International Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*", ICH, Geneva, 2005.
Magnusson B. and Örnemark U. (eds.), "*The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*." 2nd ed., EURACHEM: Austria, 2014.
Maroto A., Riu J., Boque R.A., Rius F.X., "*Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process.*" Anal. Chim. Acta, 391, 173-185, 1999
Maroto A., Boqué, R., Riu, J., Rius, F.X., "*Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays*", Anal. Chim. Acta, 440, 171–184, 2001.
Maroto A., Boqué, R., Riu, J., Rius, F.X., "*Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples*", Anal. Chim. Acta446 133–145, 2001.
Montgomery, D.C., "*Design and Analysis of Experiments*", 8th ed., Wiley, New York, 2013
Rathore A.S. and Winkle H., "*Quality by design for biopharmaceuticals*", Nature Biotechnol, 27, 1 ., 2009
Rozet E., Lebrun P., Michiels J.-F., Sondag P., Scherder, T., Boulanger B., "*Analytical Procedure Validation and the Quality by Design Paradigm*", J. Biopharm. Stat., 25(2), 260-8, 2015.
van der Heyden Y. Huis A, Verbeke J.S., Van de Ginste B.G., Massart D.L., "*Guidance for robustness/ruggedness test in method validation*". J. Pharm. Biomed. Anal., 24, 23-53, 2009.
Wieling J, Hendriks G, Tamminga WJ, Hempenius J, Mensink CK, Oosterhuis B, "*Rational experimental design for bioanalytical methods validation. Illustration using an assay method for total captopril in plasma*", J. Chromatogr.,730, 381-94, 2006.
Sahai H. and Ageel, M.I., "*Analysis of Variance: Fixed, Random, and Mixed models*." Springer, New York, 2004.
Sahai H. and Ojeda M., "*Analysis of Variance for Random Models*". Vol.1&2, Birhauser Boston, 2004.
Searle S.R., Casella G., McCulloch C.E., "*Variance componen*ts", Wiley, New York, 1992.