ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ (ACCURACY)

1) Ανάλυση 1 δείγματος (Πιστοποιημένο Υλικό Αναφοράς (CRM), εμπορικό δείγμα ελέγχου (control sample), υπόλειμμα διεργαστηριακού) με γνωστή τιμή αναφοράς (μ).

Αναλύεται το δείγμα με την υπό αξιολόγηση μέθοδο Ν φορές και βρίσκεται η μέση τιμή X_{mean} και η τυπική απόκλιση S.

Εφαρμόζεται η δοκιμασία t (t-student test) για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ X_{mean} και τιμής αναφοράς μ:

$$t_{\exp} = \frac{|\mu - x_{mean}|\sqrt{N}}{S} \quad (1)$$

Η τιμή t_{exp} συγκρίνεται με t_{theor} από πίνακα για στάθμη εμπιστοσύνης 95% και βαθμούς ελευθερίας ν = Ν-1.

Παράδειγμα:

Υλικό αναφοράς CRM με τιμή αναφοράς μ = 150 μg/g αναλύεται με την υπό αξιολόγηση εις 5-πλουν (Ν = 5) και βρέθηκε μέσος όρος X_{mean} = 158 μg/g και τυπική απόκλιση S = 7,8 μg/g. Να αξιολογηθεί η ακρίβεια της μεθόδου.

$$t_{\exp} = \frac{|150 - 158|\sqrt{5}}{7{,}8} = 2{,}293 \quad (2)$$

Επειδή t_{exp} = 2,293 < 2,776 (95% ν=5-1) συμπεραίνεται ότι η μέθοδος στερείται συστηματικού σφάλματος και το παρατηρούμενο σφάλμα [(158-150)/150] x 100 = 5,3% είναι τυχαίο, ίδιας τάξης μεγέθους με τη %RSD = (7,8 / 158) x 100 = 4,9%.

2) Ανάλυση 1 δείγματος με τιμή αναφοράς $X_{\alpha\nu\alpha\varphi}$ που συνοδεύεται από τυπική απόκλιση ($S_{\alpha\nu\alpha\varphi}$) που προέκυψε από $N_{\alpha\nu\alpha\varphi}$ αναλύσεις (δείγμα που έχει αναλυθεί με μια άλλη πρότυπη μέθοδο).

Αναλύεται το δείγμα με την υπό αξιολόγηση μέθοδο $N_{\mu\varepsilon\theta}$ φορές και βρίσκεται η μέση τιμή X_{mean} και η τυπική απόκλιση $S_{\mu\varepsilon\theta.}$

Εφαρμόζεται η δοκιμασία t (t-student test) για τον έλεγχο ύπαρξης στατιστικά σημαντικής διαφοράς μεταξύ X_{mean} και τιμής αναφοράς $X_{\alpha\nu\alpha\varphi}$:

$$t_{\exp} = \frac{\left| X_{\alpha\nu\alpha\phi} - X_{mean} \right|}{S_{1-2}} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}} \quad (3)$$

όπου S_{1-2} η συνδυασμένη τυπική απόκλιση ίση με

$$S_{1-2} = \sqrt{\frac{S_1^2 (N_1 - 1) + S_2^2 (N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (4)$$

Παράδειγμα:

Δείγμα με τιμή αναφοράς $X_{\alpha\nu\alpha\varphi}$ = 216 ng/g και τυπική απόκλιση $S_{\alpha\nu\alpha\varphi}$ = 6,4 ($N_{\alpha\nu\alpha\varphi}$ = 5) αναλύεται με την υπό αξιολόγηση εις 7-πλουν (N_2 = 7) και βρέθηκε μέσος όρος X_{mean} = 196 ng/g και τυπική απόκλιση S = 5,8 ng/g. Να αξιολογηθεί η ακρίβεια της μεθόδου.

Υπολογίζεται η συνδυασμένη τυπική απόκλιση:

$$S_{1\ 2} = \sqrt{\frac{40{,}9(4) + 33{,}6(6)}{5 + 7 - 2}} = 6{,}0$$

Με αντικατάσταση σην εξίσωση (3) έχουμε: t_{exp} = 5,66 .

Επειδή t_{exp} = 5,66 > t_{theor} = 2,228 (95% ν = 5+7-2=10) συνεπάγεται ότι η διαφορά δεν είναι τυχαία και υπάρχει συστηματικό σφάλμα ίσο με [(196-216)/216] x 100 = -9,2% που είναι μεγαλύτερο από την %RSD = (5,8/196) x 100 = 3,0%.

Σημείωση: Πριν γίνει η ανωτέρω αξιολόγηση εκτελείται δοκιμασία F :

$$F = S^2_1 / S^2_2 = 6{,}4^2 / 5{,}8^2 = 1{,}218 < 6{,}16$$
$$(95\%, \nu_1 = 7\text{-}1, \nu_2 = 5\text{-}1)$$

για να συγκριθούν οι επαναληψιμότητες των δύο μεθόδων. Επειδή $F_{test} < F_{theor}$ συνεπάγεται ότι οι δύο επαναληψιμότητες είναι παρόμοιες και η ανωτέρω δοκιμασία t είναι έγκυρη.

3) Ανάλυση σειράς προτύπων δειγμάτων γνωστής περιεκτικότητας μ_i (εμβολιασμένα δείγματα (spiked samples) ή αναλυμένα με μέθοδο αναφοράς) ευρείας περιοχής συγκεντρώσεων.

Αναλύονται τα δείγματα όπως ακριβώς απαιτεί η μέθοδος και υπολογίζονται οι πειραματικές τιμές X_i. Κατασκευάζεται με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων το διάγραμμα

$$X_\iota = a\,(\pm S_a) + b(\pm S_b)\,\mu_i$$

$$S_{y/x} = \#\#\#\#\ ,\ r = \#\#\#\#\#$$

Από τις τιμές των παραμέτρων της εξισώσεως αξιολογείται η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου.

Παραδείγματα

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου παρασκευάσθηκε σειρά εμβολιασμένων δειγμάτων σε λευκό μητρικό υλικό και αναλύθηκε εις απλούν με την υπό αξιολόγηση μέθοδο. Να γίνει αξιολόγηση της μεθόδου από τα αποτελέσματα των πινάκων:

Παράδειγμα Α

Α/Α	Γνωστή συγκέντρωση μ_i (mg/dL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση X_i (mg/dL)
1	15,0	14,9
2	25,0	25,2
3	50,0	49,0
4	75,0	76,9
5	100	99,2
6	150	154

Εξίσωση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων:

$$X_i = -1{,}06 \pm (1{,}2) + 1{,}025 \pm (0{,}014)\ \mu_i$$
$$S_{y/x} = 1{,}58,\ r = 0{,}9996$$

Έλεγχος γραμμικότητας: Εξαιρετική r = 0,9996

Έλεγχος σημαντικής διαφοράς τομής από μηδέν:

$t_{exp} = |-1{,}06\ | / 1{,}2 = 0{,}883 < 2{,}776 = t_{theor}$ (95%, ν = 6-2=4)
Επομένως η τομή είναι πρακτικά μηδέν και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα.

Έλεγχος σημαντικής διαφοράς κλίσεως από μονάδα:
$t_{exp} = |1{,}0255-1{,}000\ | / 0{,}014 = 1{,}821 < 2{,}776 = t_{theor}$ (95%, ν =6-2=4)
Επομένως η κλίση είναι πρακτικά ίση με τη μονάδα και δεν υπάρχει αναλογικό συστηματικό σφάλμα.

Υπάρχει μόνο ένα μικρό τυχαίο σφάλμα ίσο με $S_{y/x}$ = 1,6 mg/dL.

Παράδειγμα Β:

Α/Α	Γνωστή συγκέντρωση μ_i (mg/dL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση X_i (mg/dL)
1	15,0	13,7
	25,0	22,0
	50,0	45,2
	75,0	66,4
	100	90,5
	150	135,3

Εξίσωση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων:

$$X_i = -0{,}29 \pm (0{,}48) + 0{,}9032 \pm (0{,}0058)\mu_i$$
$$S_{y/x} = 0{,}656,\ r = 0{,}99992$$

Έλεγχος γραμμικότητας: Εξαιρετική r = 0,99992

Έλεγχος σημαντικής διαφοράς τομής από μηδέν:

$t_{exp} = |-0{,}29| / 0{,}48 = 0{,}604 < 2{,}776 = t_{theor}$ (95%, ν = 6-2=4)
Επομένως η τομή είναι πρακτικά μηδέν και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα.

Έλεγχος σημαντικής διαφοράς κλίσεως από μονάδα:
$t_{exp} = |0{,}9032-1{,}000| / 0{,}0058 = 16{,}7 > 2{,}776 = t_{theor}$ (95%, ν = 6-2=4)
Επομένως η κλίση είναι σημαντικά διαφορετική από τη μονάδα και υπάρχει αναλογικό συστηματικό σφάλμα, ίσο με (0,9032-1,000) x 100 = -9,7%

Υπάρχει μόνο ένα μικρό τυχαίο σφάλμα ίσο με $S_{y/x}$ = 0,66 mg/dL.

Παράδειγμα Γ:

Α/Α	Γνωστή συγκέντρωση μ_i (mg/dL)	Ευρεθείσα συγκέντρωση X_i (mg/dL)
1	15,0	24,6
2	25,0	35,9
3	50,0	59,7
4	75,0	85,3
5	100	109,8
6	150	160.3

Εξίσωση παλινδρόμησης ελαχίστων τετραγώνων:

$$X_i = 10{,}05 \pm (0{,}40) + 1{,}0006 \pm (0{,}0049)\ \mu_i$$
$$S_{y/x} = 0{,}551,\ r = 0{,}99995$$

Έλεγχος γραμμικότητας: Εξαιρετική r = 0,99995

Έλεγχος σημαντικής διαφοράς τομής από μηδέν:

$t_{exp} = |10{,}05| / 0{,}40 = 25{,}1 > 2{,}776 = t_{theor}$ (95%, ν =6-2= 4)
Επομένως η τομή είναι σημαντικά διάφορη του μηδενός και άρα υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα, ίσο με +10,0 mg/dL.

Έλεγχος σημαντικής διαφοράς κλίσεως από μονάδα:
$t_{exp} = |1{,}0006-1{,}0000| / 0{,}0049 = 0{,}122 < 2{,}776 = t_{theor}$ (95%, ν = 6-2=4)
Επομένως η κλίση είναι πρακτικά ίση με τη μονάδα και δεν υπάρχει αναλογικό συστηματικό σφάλμα.

Υπάρχει επίσης ένα μικρό τυχαίο σφάλμα ίσο με $S_{y/x}$ = 0,55 mg/dL.

4. Μέθοδος προσθήκης γνωστής ποσότητας σε άγνωστο θετικό δείγμα και υπολογισμός ανάκτησης.

Αναλύεται άγνωστο δείγμα και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του C_0. Στο δείγμα γίνεται προσθήκη (χωρίς μεταβολή όγκου) γνωστής ποσότητας του αναλύτη και επαναπροσδιορίζεται η συγκέντρωση C_1 του ενισχυμένου δείγματος. Η ανάκτηση (Recovery, R) ως μέτρο της ακρίβειας δίνεται από τη σχέση:

$$\%R = \frac{C_1 \quad C_0}{\Delta C} \times 100 \qquad \text{(αυστηρός τύπος) (5)}$$

ή

$$\%R = \frac{C_1}{C_0 + \Delta C} x100 \quad \text{(ελαστικός τύπος) (6)}$$

<u>Παράδειγμα Α:</u> Άγνωστο δείγμα αναλύθηκε με την υπό αξιολόγηση μέθοδο και βρέθηκε C_0 = 106 ng / mL. Στο δείγμα έγινε προσθήκη γνωστής ποσότητας του αναλύτη ΔC = 100 ng/mL ΧΩΡΙΣ ΑΡΑΙΩΣΗ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ. Κατά τον επαναπροσδιορισμό βρέθηκε συγκέντρωση C_1 = 195 ng/mL. Να υπολογισθεί η %ανάκτηση:

Χρησιμοποιώντας τον τύπο (5) έχουμε

$$\%R = \frac{195 \quad -106}{100} \times 100 = 89\%$$

Χρησιμοποιώντας τον τύπο (6) έχουμε

$$\%R = \frac{195}{106 + 100} x100 = 94{,}7\%$$

<u>Παράδειγμα Β</u>: Κατά την αξιολόγηση μεθόδου Κλινικού Εργαστηρίου αναλύθηκε ορός ασθενούς και έδωσε τιμή μιας

παραμέτρου C_0 = 150 mg/dL. Το δείγμα αναμείχθηκε σε αναλογία 1:1 με ορό ελέγχου με τιμή αναφοράς για τη παράμετρο 250 mg/dL. Το μείγμα αναλύθηκε και έδωσε τιμή μέτρησης 207 mg/dL. Να υπολογισθεί η ανάκτηση της μεθόδου:

Χρησιμοποιώντας τροποποιημένη μορφή της εξισώσεως (6) έχουμε:

$$\%R = \frac{207}{(150/2) + (250/2)} x100 = 103{,}5\%$$

5. Με προσδιορισμό μεγάλου αριθμού (N) αγνώστων δειγμάτων με την υπό αξιολόγηση μέθοδο και με μια μέθοδο αναφοράς και αξιολόγηση των διαφορών με κατά ζεύγη δοκιμασία t.

Χρησιμοποείται ο τύπος:

$$t_{\exp} = \frac{\bar{d}\sqrt{N}}{S_d} \qquad (7)$$

όπου $\bar{d}$ η μέση τιμή των διαφορών (με χρήση προσήμου +/-) και S_d η τυπική απόκλιση των διαφορών.

Παράδειγμα:

Για την αξιολόγηση μιας αναλυτικής μεθόδου αναλύθηκαν 20 άγνωστα δείγματα με την υπό αξιολόγηση μέθοδο και μια μέθοδο αναφοράς αυξημένης αξιοπιστίας. Από τα αποτελέσματα του πίνακα αξιολογείστε την ακρίβεια της μεθόδου:

Α/Α	Αξιολογούμενη Μέθοδος mg/L	Μέθοδος Αναφοράς mg/L	Διαφορά Ελεγχόμενης - Αναφοράς
1	316	320	-4
2	426	460	-34
3	528	520	8
4	156	160	-4
5	368	378	-10
6	780	790	-10
7	990	1032	-42
8	256	248	8
9	678	687	-9
10	758	789	-31
11	1200	1189	11
12	907	926	-19
13	456	478	-22
14	357	367	-10
15	268	276	-8
16	789	770	19
17	215	225	-10
18	467	445	22
19	678	680	-2
20	895	903	-8
	ΜΕΣΗ ΔΙΑΦΟΡΑ $\bar{d}$		- 7,25
	ΤΥΠΙΚΗ ΑΠΟΚΛΙΣΗ S_d		10,8

$$t_{exp} = \frac{7{,}25\sqrt{20}}{10{,}8} = 3{,}00$$

Η τιμή t_{ther} για ν=20-1 95% είναι ίση με 2,10 < t_{exp} και επομένως υπάρχει σημαντική διαφορά των δύο μεθόδων και η ελεγχόμενη μέθοδος δεν είναι ισοδύναμη με τη μέθοδο αναφοράς.