



UNIwersytet  
Warszawski

# Kalibrowanie w pomiarach chemicznych: możliwości i wyzwania.

Jakub Karasiński



17/12/2024



UNIwersytet  
Warszawski

- 1. Dlaczego kalibracja jest istotna?**
- 2. Charakterystyka krzywej kalibracyjnej.**
- 3. Inne metody kalibracji.**
- 4. Kalibracja i walidacja metod.**



UNIwersytet  
Warszawski

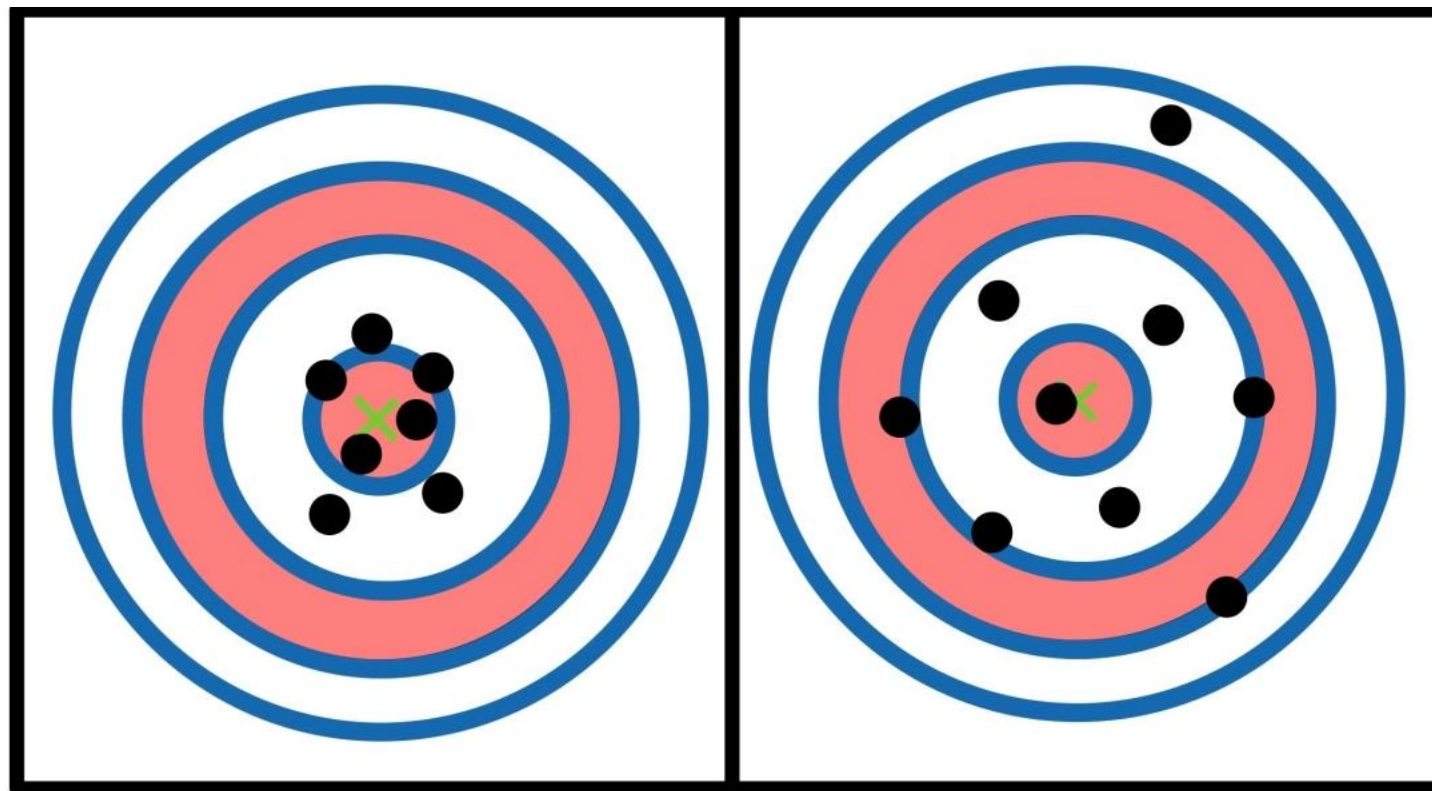
## Dlaczego kalibracja jest kluczowa w chemii analitycznej?

- Kalibracja pozwala **skorelować** sygnał analityczny (np. absorbancję, liczbę zliczeń) z rzeczywistą wielkością analityczną (np. stężeniem).
- Kalibracja pozwala zapewnić **spójność pomiarową** wyników, porównanie ich do odpowiednich wzorców.
- Zapewnić **dokładność i ważność** wyników; bez prawidłowej kalibracji wyniki mogą być obarczone np. błędem systematycznym, co prowadzi do błędnych interpretacji.



UNIwersytet  
Warszawski

# Precyzja



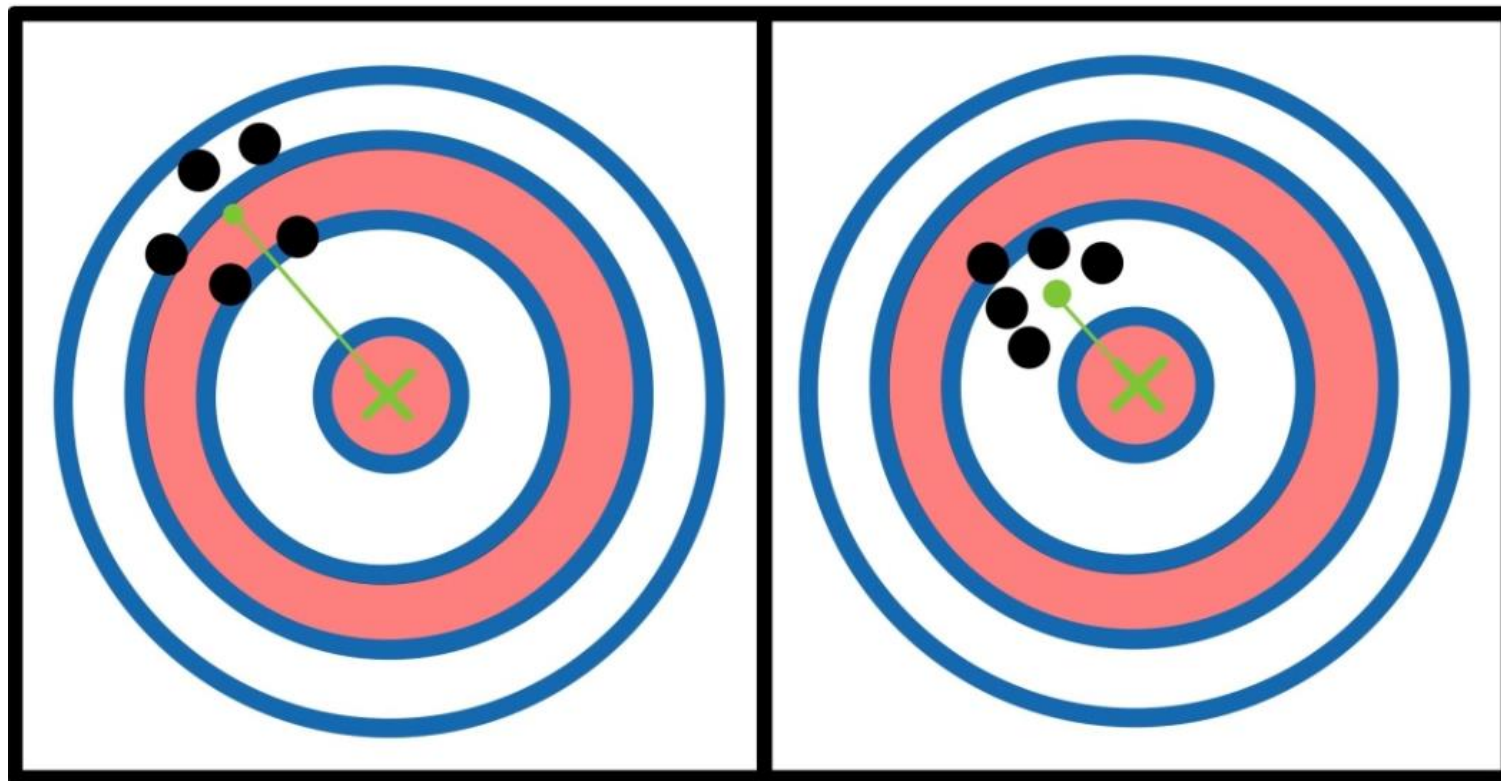
*High precision (left) and low precision (right)*

Do oceny precyzji nie jest konieczna znajomość wartości oczekiwanej



UNIwersytet  
Warszawski

# Prawdziwość



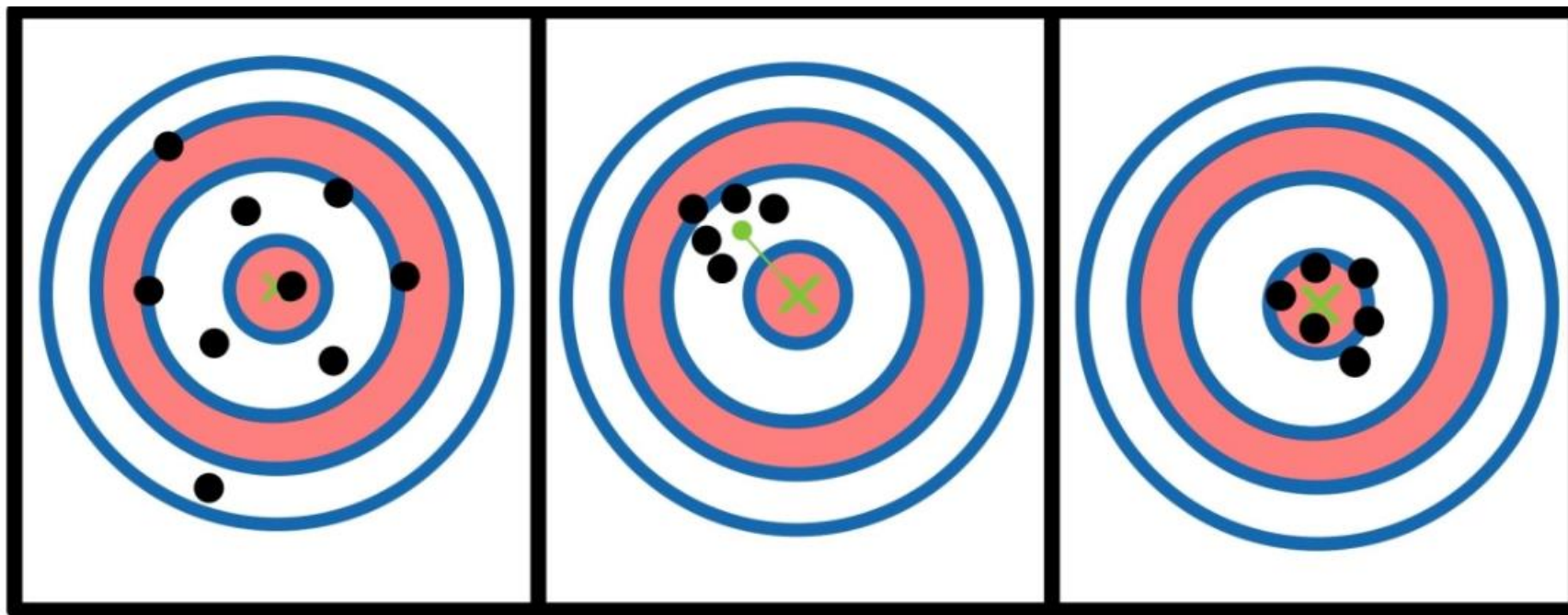
*Low trueness (left) and higher trueness (right)*

Zgodność z wartością oczekiwaną



UNIwersytet  
Warszawski

# Dokładność



*Low accuracy due to low precision (left); low accuracy due to low trueness (middle); high accuracy due to high precision and trueness (right)*

Każdy dokładny wynik musi być jednocześnie precyzyjny



UNIwersytet  
Warszawski

## 2. Wiarygodność i spójność wyników pomiarów

- Kalibracja **umożliwia** zachowanie spójności pomiarowej, powtarzalności i porównywalności wyników w różnych laboratoriach i warunkach pomiarowych.
- Dzięki regularnej kalibracji przyrządów można weryfikować czy urządzenia działają zgodnie z wymaganiami i nie wprowadzają błędów instrumentalnych.



UNIwersytet  
Warszawski

### 3. Redukcja błędów

- Kalibracja pozwala zidentyfikować i skorygować:
  - **Błędy instrumentalne** (np. dryf przyrządu).
  - Wykrywanie degradacji sprzętu (współ. kierunkowy)
- Regularne kalibrowanie minimalizuje wpływ czynników, które mogą zaburzyć wynik.



UNIwersytet  
Warszawski

#### **4. Wymóg standardów regulacyjnych i jakościowych**

- Wiele norm i systemów zarządzania jakością (np. ISO 17025, GLP, GMP) wymaga regularnej kalibracji sprzętu i metod analitycznych.
- Brak kalibracji może prowadzić do odrzucenia wyników przez organy regulacyjne/akredytujące.



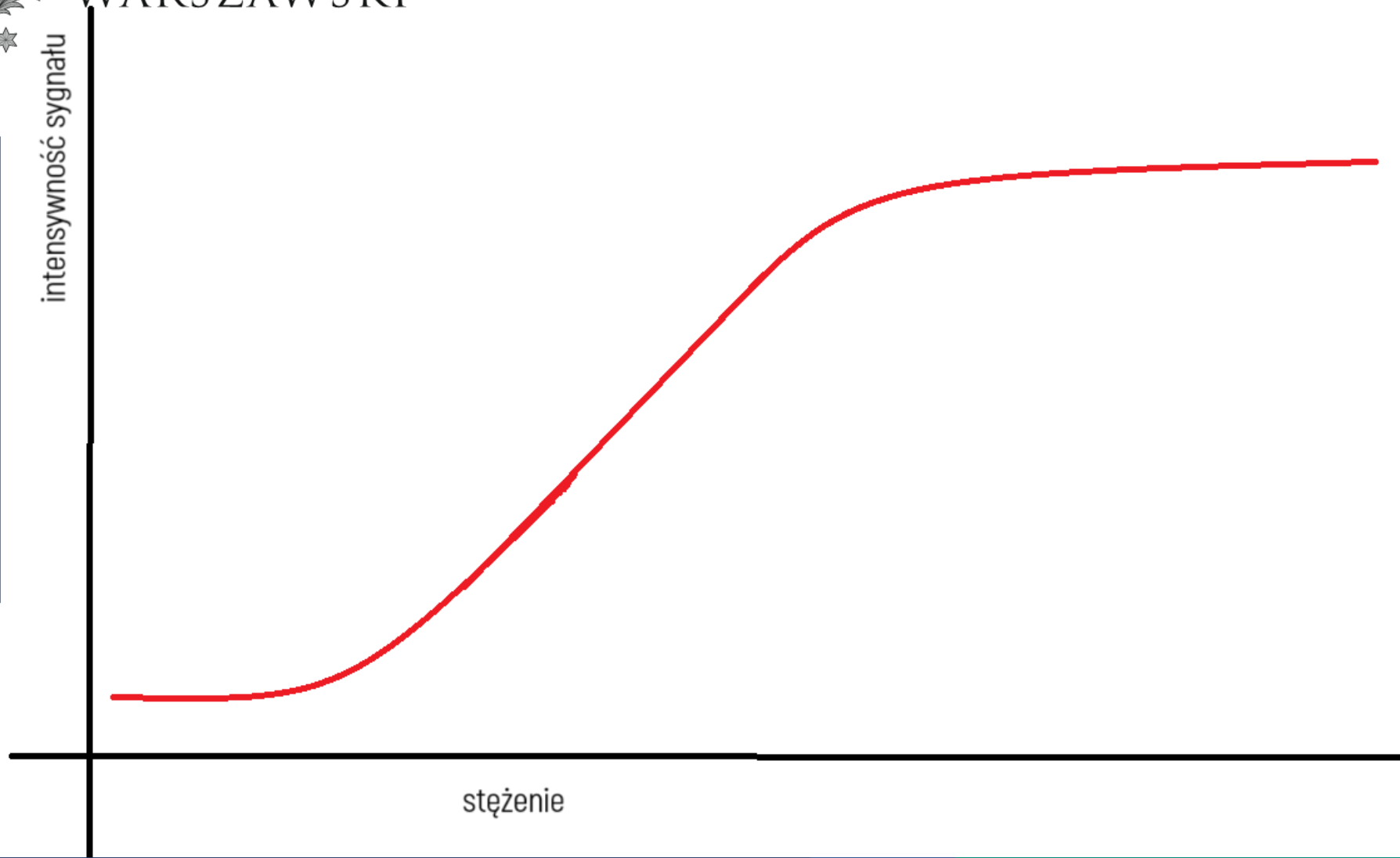
UNIwersytet  
Warszawski

## 5. Kalibracja jako podstawa walidacji metod

- Walidacja metod analitycznych wymaga przeprowadzenia kalibracji w celu poznania zakresu liniowości, oszacowania jednorodności wariancji.
- Kalibracja jest integralnym elementem budowy metod o wysokiej jakości.



UNIwersytet  
Warszawski





UNIwersytet  
Warszawski





UNIwersytet  
Warszawski

# Dlaczego zależność kalibracyjna ma być „prosta“?

Nie musi, ale tak jest **wygodniej**; prosty aparat matematyczny i duża popularność

Normy/opracowania/przewodniki

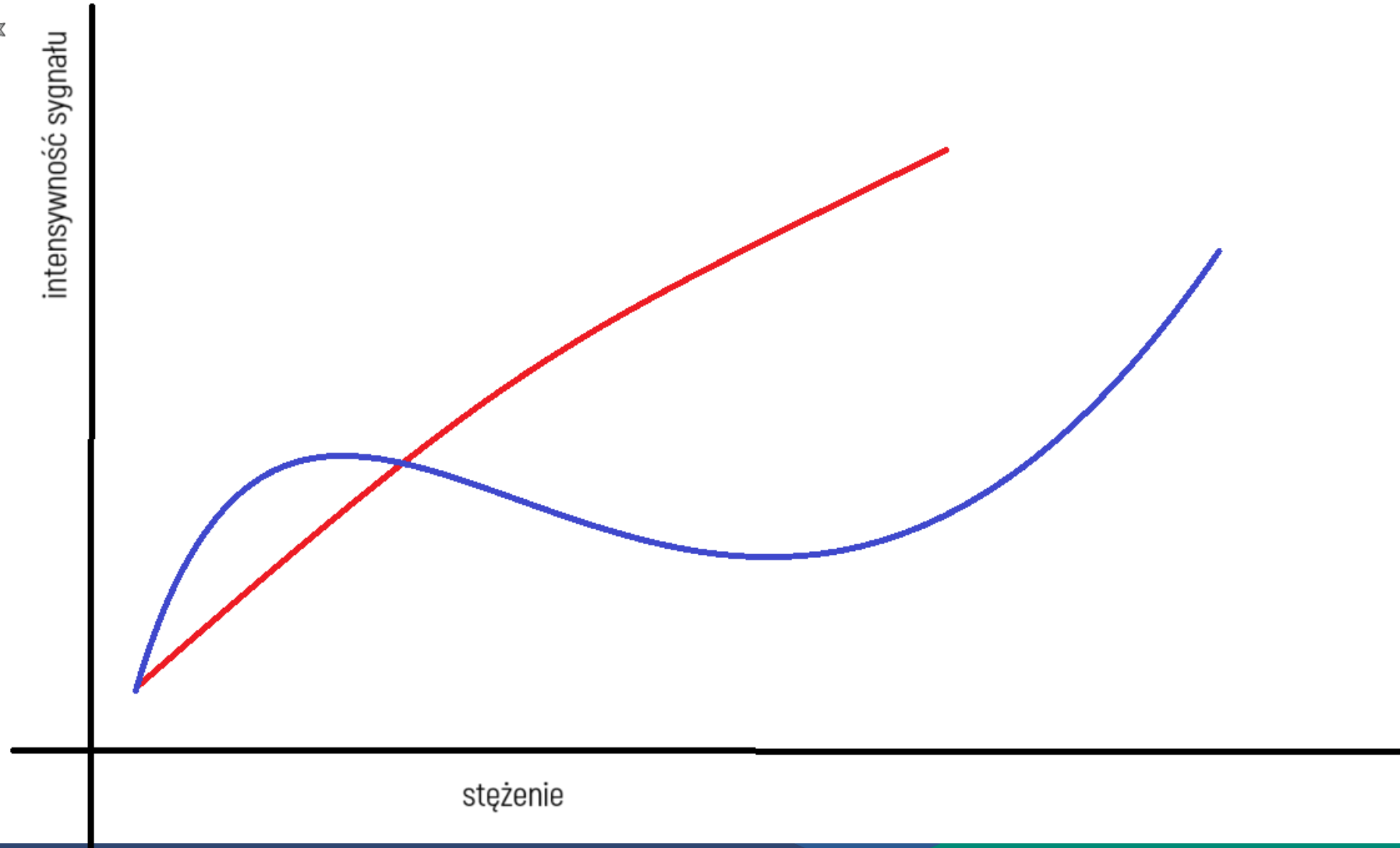
Jednakowa/zbliżona czułość w zakresie kalibracyjnym

Funkcja kalibracyjna musi być **różnowartościowa**



UNIwersytet  
Warszawski

# Różnowartościowość

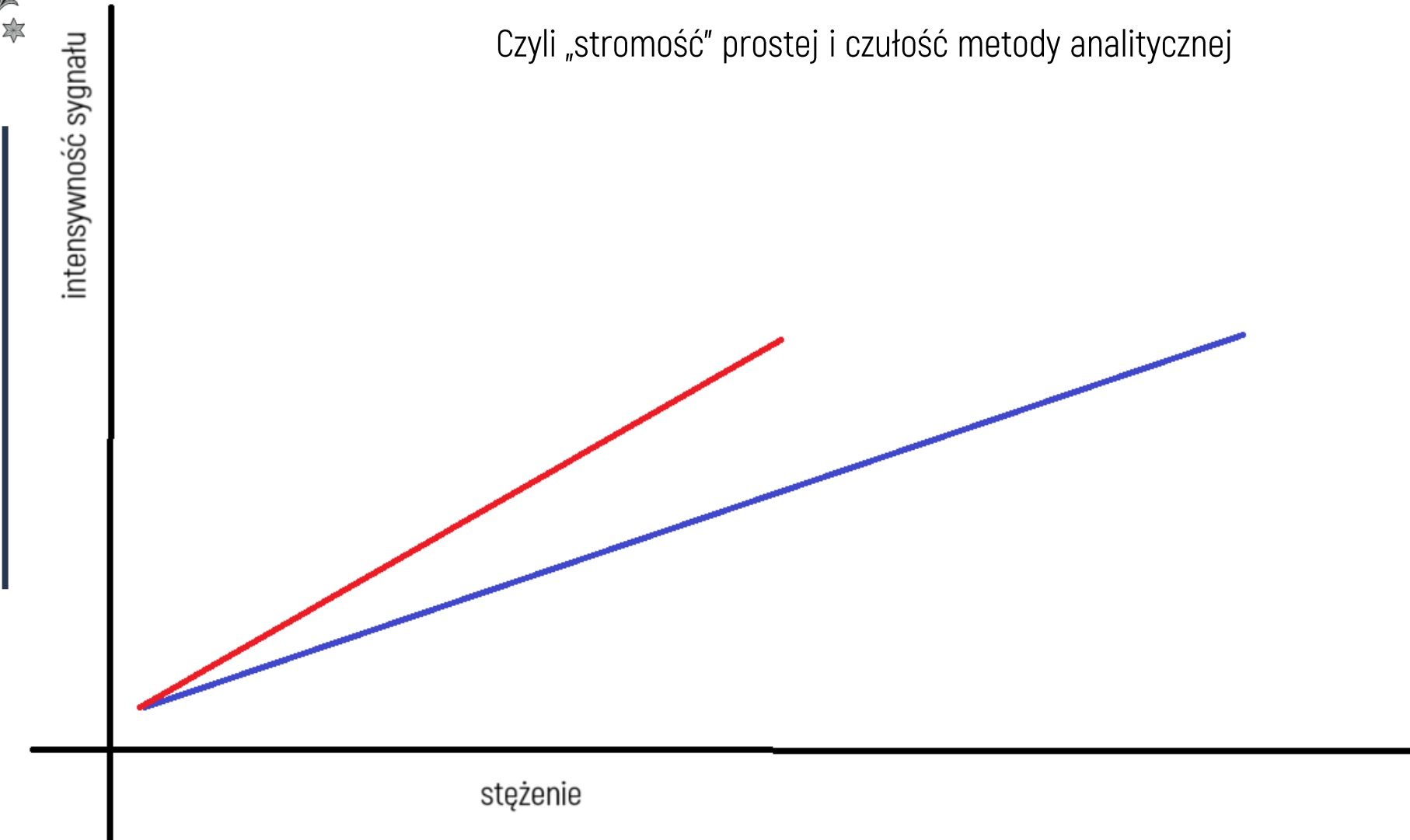




UNIwersytet  
Warszawski

# Współczynnik kierunkowy

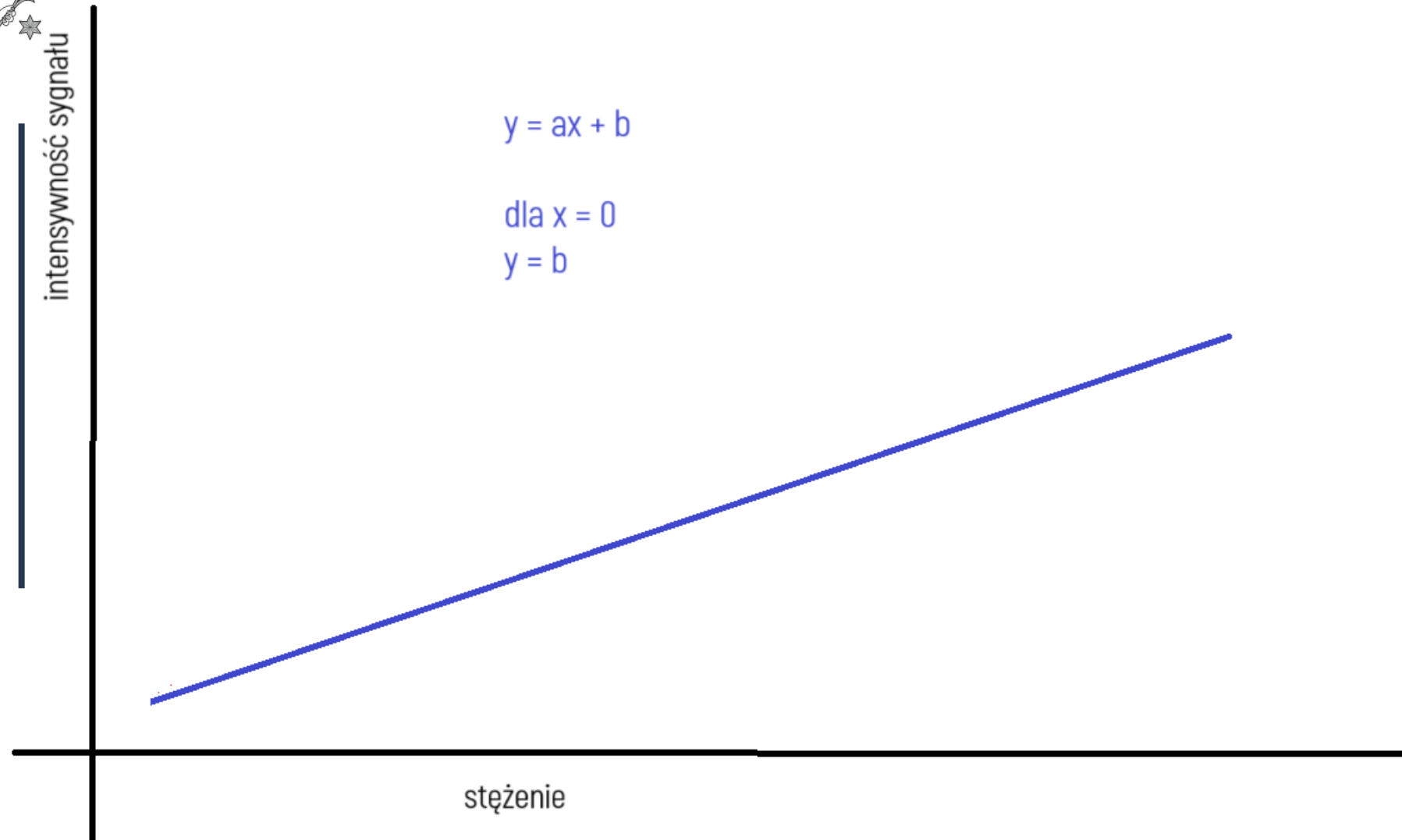
Czyli „stromość” prostej i czułość metody analitycznej





UNIwersytet  
Warszawski

## Narzędzia statystyczne w kalibracji



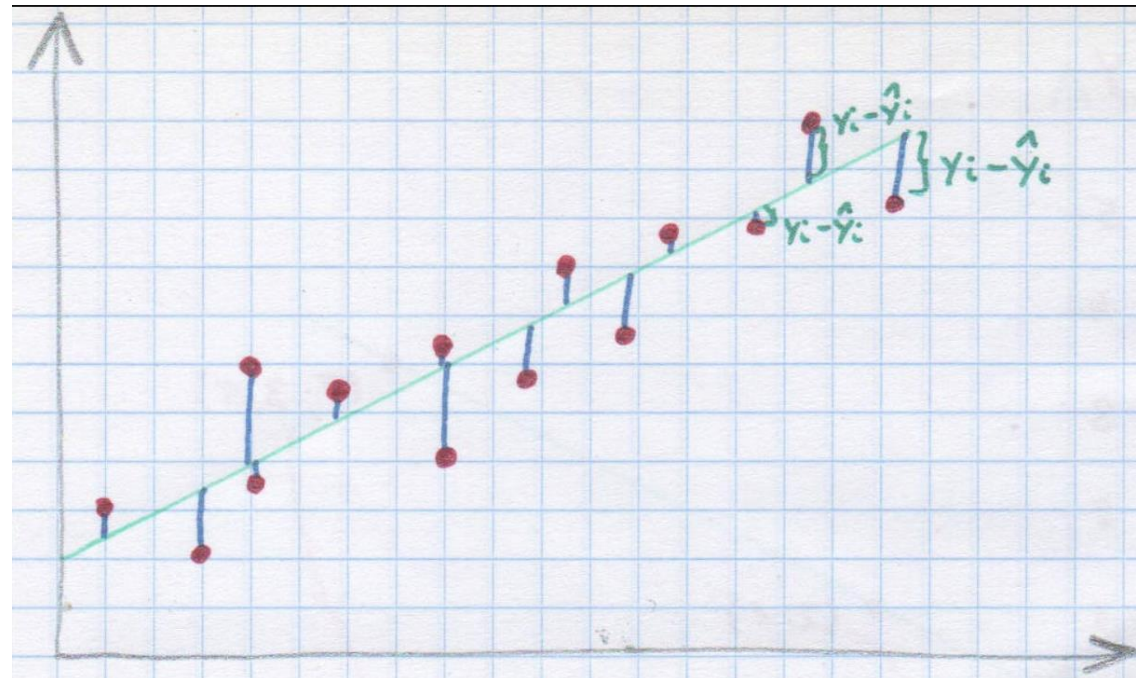


UNIwersytet  
Warszawski

## Narzędzia statystyczne w kalibracji

Jak wyznaczana jest zależność kalibracyjna:

1. Pomiar sygnału dla wzorców.
2. Metoda najmniejszych kwadratów:



Źródło rysunku: [statystyczny.pl](http://statystyczny.pl)



## Metoda najmniejszych kwadratów

1. Kwadraty błędów „**karzą**” większe błędy bardziej niż mniejsze, dzięki czemu metoda jest bardziej czuła na obserwacje znacząco odbiegające od przewidywań.
2. Efektywne: metoda najmniejszych kwadratów daje najmniejsze możliwe odchylenie standardowe (największa precyzja) w klasie estymatorów liniowych.
3. Funkcja kwadratowa jest intuicyjna: traktuje błędy jako odległości i sumuje ich kwadraty.
4. Jest to historycznie powszechne podejście, co ułatwia porównanie wyników z literaturą i innymi metodami analizy.



UNIwersytet  
Warszawski

## Metoda najmniejszych kwadratów

### Dlaczego nie inne funkcje?

- Suma błędów:  
Problem: dodatnie i ujemne błędy mogą się wzajemnie znosić, dając wynik bliski 0, nawet jeśli model nie jest dobry.
- Moduł błędów:  
Minimalizacja funkcji wartości bezwzględnej prowadzi do problemów w obliczeniach  
Metoda ta jest bardziej wrażliwa na małe zmiany w danych, ale mniej czuła na duże błędy.
- Inne potęgi:  
Dla  $p > 2$ : duże błędy są nadmiernie karane.  
Dla  $p < 2$ : duże błędy mają zbyt mały wpływ.



UNIwersytet  
Warszawski

## Narzędzia statystyczne w kalibracji

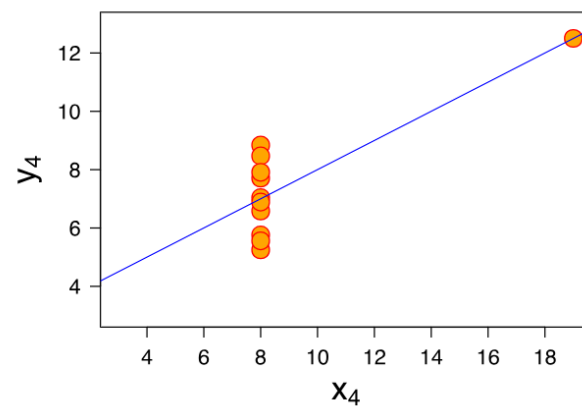
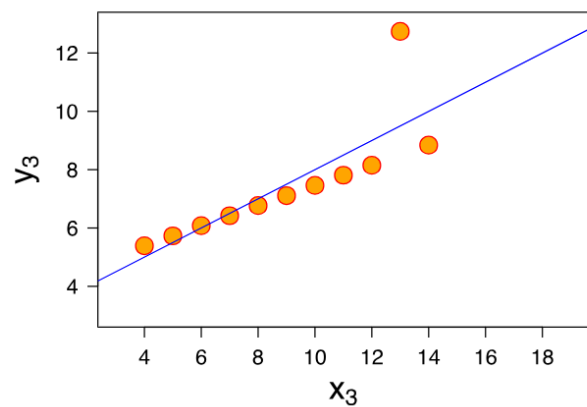
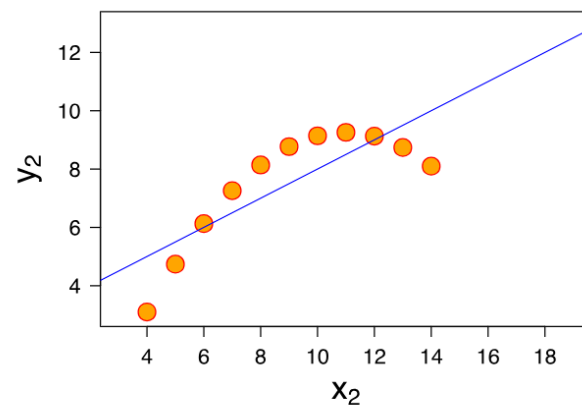
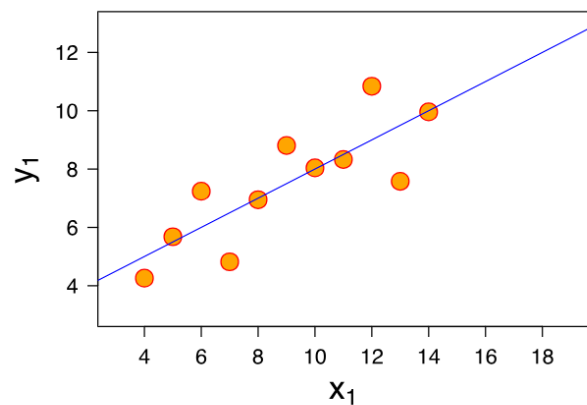
Jak wyznaczana jest zależność kalibracyjna:

1. Pomiar sygnału dla wzorców.
2. Metoda najmniejszych kwadratów.
3. Współczynnik korelacji ( $r$ ) i determinacji ( $R^2$ )



UNIwersytet  
Warszawski

Kwadrat Anscombe'a. Czyli obejrzyj swoją zależność kalibracyjną.





# UNIwersytet Warszawski

Cecha	Współczynnik korelacji ( $r$ )	Współczynnik determinacji ( $R^2$ )
Definicja	Miara siły i kierunku liniowej zależności między dwiema zmiennymi.	Miara proporcji zmienności zmiennej zależnej wyjaśnionej przez model regresji.
Zakres wartości	$-1 \leq r \leq 1$ : - $r = 1$ : doskonała pozytywna korelacja - $r = -1$ : doskonała negatywna korelacja - $r = 0$ : brak korelacji	$0 \leq R^2 \leq 1$ : - $R^2 = 1$ : idealne dopasowanie modelu - $R^2 = 0$ : model nie wyjaśnia zmienności $y$

## Podsumowanie różnic

Kryterium	Współczynnik korelacji ( $r$ )	Współczynnik determinacji ( $R^2$ )
Miara	Siła i kierunek związku liniowego	Jakość dopasowania modelu
Wartość ujemna?	Tak (ujemna korelacja)	Nie (zawsze $\geq 0$ )
Zastosowanie	Związek między dwiema zmiennymi	Dopasowanie modelu regresji
Złożoność modelu	Tylko dwie zmienne	Może obejmować wiele zmiennych niezależnych



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

W przypadku regresji liniowej z jedną zmienną niezależną współczynnik determinacji to po prostu kwadrat współczynnika korelacji, ponieważ oba opisują liniową zależność



## UNIwersytet Warszawski

### Ocena dopasowania modelu

Do oceny jakości dopasowania modelu proponuję wykorzystać następujące miary:

#### • $R^2$ (współczynnik determinacji):

- Pokazuje, jaka część zmienności sygnału analitycznego  $y$  jest wyjaśniana przez zmienność stężenia wzorca  $x$ .
- Dąży do wartości bliskiej 1 w przypadku dobrego dopasowania.

#### • Odchylenie standardowe składnika resztowego $\sigma_{\text{res}}$ :

- Informuje o typowym błędzie przewidywań (różnicach między wartościami rzeczywistymi  $y$  a przewidywanymi)
- Powinno być małe w porównaniu do zakresu danych.

#### • Analiza reszt (błędów):

- Należy sprawdzić, czy reszty są rozłożone losowo wokół zera. Brak wzorców w resztach wskazuje, że model jest odpowiedni.

### Interpretacja:

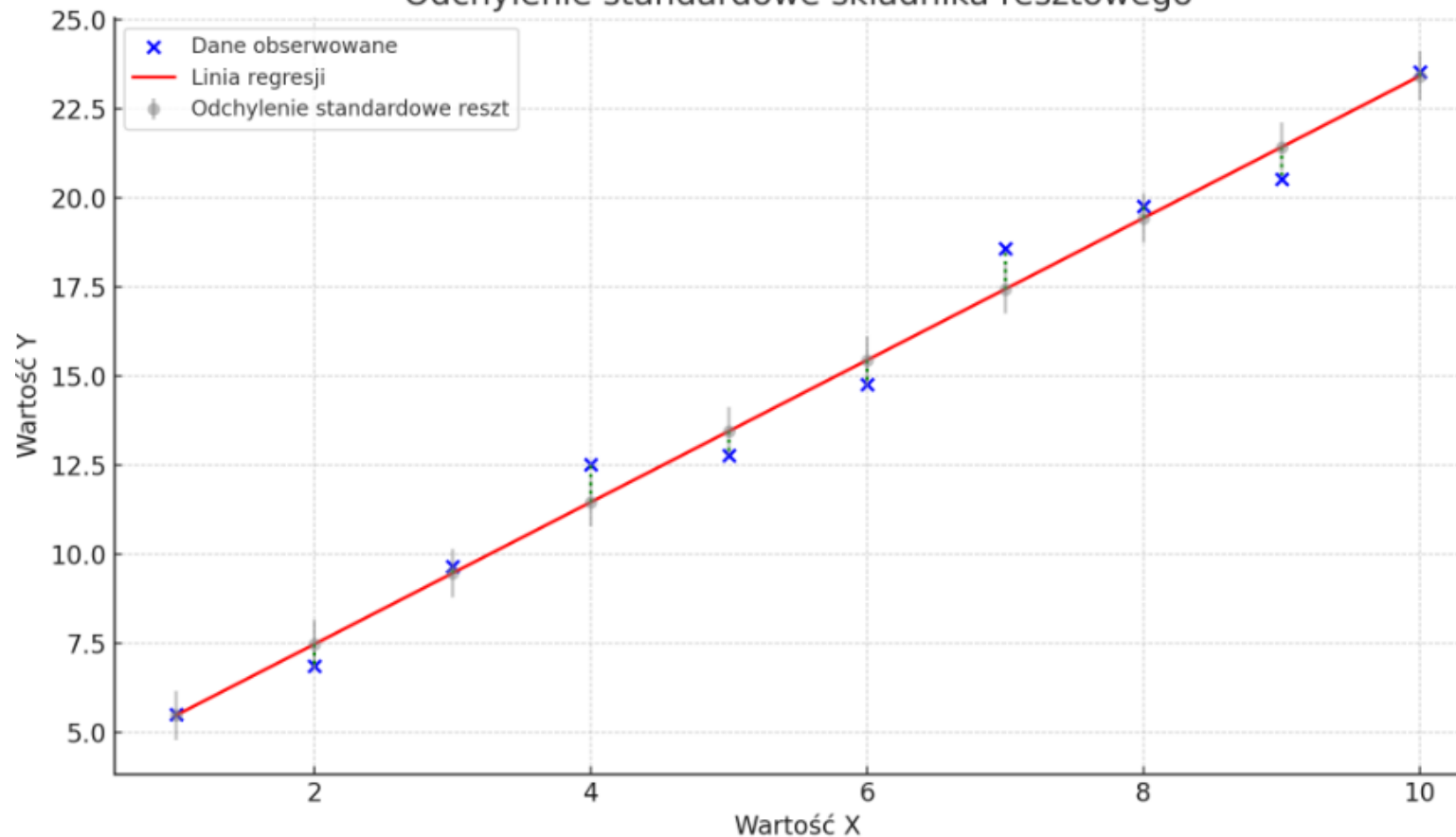
Wysokie  $R^2$  i małe  $\sigma_{\text{res}}$  sugerują dobre dopasowanie.

Uwaga: Dobrze dopasowany model może być nieliniowy, o ile jest zgodny z danymi.



UNIwersytet  
Warszawski

Odchylenie standardowe składnika resztowego



Reszty, to różnice pomiędzy zmierzoną wartością a wartością obliczoną z krzywej kalibracyjnej.  
Do ich analizy niezbędna jest znajomość równania kalibracyjnej.



UNIwersytet  
Warszawski

## 8. Protokół wyznaczania liniowości w chemii analitycznej

W praktyce laboratoria stosują kombinację metod:

1. Regresję liniową i  $R^2$
2. Test reszt (brak systematycznych trendów).
3. Wykres kalibracyjny z naniesionymi punktami pomiarowymi.
4. Analiza odchylenia standardowego składnika resztowego.



UNIwersytet  
Warszawski

## Ile punktów na krzywej?

Większa liczba punktów: Zwiększa precyzję oszacowania współczynników regresji (nachylenia i wyrazu wolnego), ponieważ model opiera się na większej ilości informacji

Niepewność wyznaczenia współczynników regresji jest odwrotnie proporcjonalna do liczby punktów.



UNIwersytet  
Warszawski

## Ile punktów na krzywej?

Optymalizacja liczby punktów:

W chemii analitycznej istnieje kompromis między liczbą punktów a czasem i kosztami:

Za mało punktów (np. 3–4): Wysoka niepewność regresji i trudność w wykrywaniu nieliniowości.

Za dużo punktów: Zwiększa czas i koszty analizy, ale zyski w precyzji są ograniczone po przekroczeniu pewnej liczby.



UNIWERSYTET  
WARSZAWSKI

**Przed czym „nie chroni” zależność kalibracyjna?**

Dryf przyrządu

Efekty matrycowe

Źle przygotowany wzorzec (błąd systematyczny)



UNIwersytet  
Warszawski

## Czy kalibracja to zawsze krzywa kalibracyjna? Nie.

1. Metoda wielokrotnego dodatku wzorca:  
indywidualna „kalibracja w matrycy” próbki.

Bardzo korzystne cechy analityczne:  
Duży potencjał korekcji wpływów matrycowych

Minus:

Pracochłonność, w konsekwencji koszty.  
Z każdej próbki trzeba zrobić min. 4 próbki.



UNIwersytet  
Warszawski

## Czy kalibracja to zawsze krzywa kalibracyjna? Nie.

2. Metoda porównawcza:

Opis:

Porównuje sygnał analityczny próbki do sygnału próbki odniesienia (o znanym stężeniu analitu).

Zalety:

Prosta do zastosowania.

Wymaga minimalnego przygotowania próbki.

Nie wymaga przygotowywania wzorców.

Wady:

Konieczność dopasowania matryc próbek.

Efekty matrycowe powodują błędy systematyczne.



UNIwersytet  
Warszawski

## Czy kalibracja to zawsze krzywa kalibracyjna? Nie.

### 3. Kalibracja „do punktu”.

Dopasowanie intensywności sygnału analitu w próbce i wzorcu.

Wrażliwa na dryf instrumentu i efekty matrycowe.

Kłopotliwa w analizie wielu analitów w jednej próbce.



UNIwersytet  
Warszawski

**Czy kalibracja to zawsze krzywa kalibracyjna? Nie.**

4. Kalibrowanie naprzemienne (ang. Standard Sample Bracketing)

Wrażliwe na efekty matrycowe

Kłopotliwa w analizie wielu analitów w jednej próbce.

Intensywności sygnałów muszą być podobne (pewność liniowej zależności).



UNIwersytet  
Warszawski

## Kiedy kalibrowanie naprzemienne i do punktu?

- Potwierdzanie zgodności
- Potwierdzanie przekroczenia, nieprzekroczenia limitu
- Certyfikacja
- Wstępna analiza ilościowa

Plusy:

Czas – nie potrzeba serii wzorców

Niepewność – właściwie zerowe odchylenie składnika resztowego

Prosty aparat matematyczny



UNIwersytet  
Warszawski

### ...a kiedy nie?

- Nieznane, trudne do kontrolowania efekty matrycowe,
- Wiele analitów na różnym poziomie i w różnych matrycach, czyli bardzo duże zróżnicowanie próbek i celów analizy.

Głównymi **zaletami krzywej kalibracyjnej** są:

- uniwersalność,
- popularność,
- względna prostota.

Ale możliwości jest znacznie więcej...



UNIwersytet  
Warszawski

## Metoda rozcieńczeń izotopowych (ang. Isotope Dilution Method)

- Duży potencjał korekcji efektów matrycowych.
- Najwyższa metrologiczna jakość („automatyczna” spójność pomiarowa wyników)
- Właściwie pomijalny błąd pomiaru.
- Odporna na niedoskonałości w przygotowaniu próbki.

ale,

- Trzeba dysponować spektrometrem mas.
- Analit musi mieć izotopy (As).
- Czasochłonna.
- Wzorce izotopowe są drogie, trudnodostępne i bywają źle scharakteryzowane.



UNIwersytet  
Warszawski

## Metoda rozcieńczeń izotopowych (ang. Isotope Dilution Method)

- Stosowana na etapie walidacji, jako metoda odniesienia, metoda definitywna.
- Stosowana w certyfikacji, wytwarzaniu materiałów odniesienia.



UNIwersytet  
Warszawski

## Kalibracja i walidacja

Liniowość: Ocena dopasowania modelu do danych. Wskaźniki: współczynnik determinacji ( $R^2$ ), analiza reszt.

Zakres roboczy: Przedział stężeń, w którym krzywa kalibracyjna jest ważna.

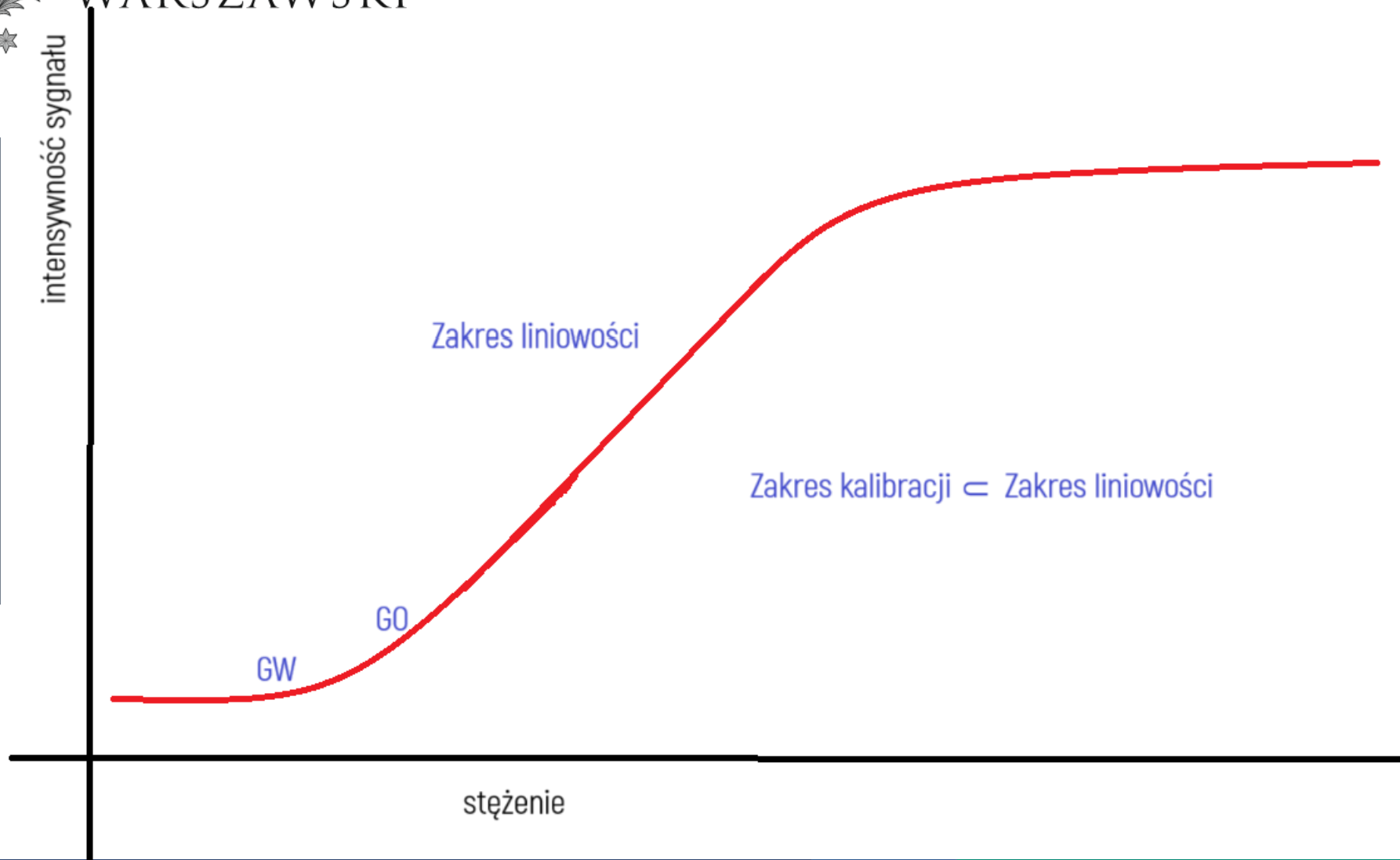
Czułość: Nachylenie krzywej (im wyższe, tym metoda bardziej czuła).

Granica wykrywalności (GW) i granica oznaczalności (GO): GW: Najmniejsze wykrywalne stężenie.  
GO: Najmniejsze oznaczalne stężenie z akceptowalną **dokładnością**.

Dokładność: Zgodność wyników z rzeczywistą wartością.



UNIwersytet  
Warszawski





UNIwersytet  
Warszawski

## Kalibracja i walidacja

Granica wykrywalności (GW) i granica oznaczalności (GO): Najmniejsze wykrywalne stężenie.  
Najmniejsze oznaczalne stężenie z **akceptowalną precyzją i prawdziwością**.

**Ważność** krzywej kalibracyjnej.

Jednorodność wariancji w zakresie krzywej kalibracyjnej



- Jak wybrać zakres kalibracji?
- Jak zapewnić ważność?
- Czy walidować GO i GW?
- Czy warto mieć niskie GO?





UNIwersytet  
Warszawski

## Badanie odzysku lub CRM:

Oszacowanie efektów matrycowych; czy jest zgodność pomiędzy przebiegiem dla wzorców i próbek?

Walidacja granicy oznaczalności

Szacowanie niepewności: Zgodność wyników z rzeczywistą wartością.

Powtarzalność wyników pomiaru.



UNIwersytet  
Warszawski

## Ważność zależności kalibracyjnej:

Wysoka wartość  $R^2$  (wysoka liniowość i dobre dopasowanie do modelu).

Niska wartość  $s_y$  (odchylenie standardowe składnika resztowego)

Jednorodność wariancji: test F-Snedecora

Co zrobić jeżeli te założenia nie są spełnione?



UNIwersytet  
Warszawski

Dziękuję za uwagę.

Dr hab. Jakub Karasiński  
Centrum Nauk Biologiczno Chemicznych  
Analityczne Centrum Eksperymentalne; [jkarasinski@cncb.uw.edu.pl](mailto:jkarasinski@cncb.uw.edu.pl)