

Editor: Zbyněk Plzák (plzak@iic.cas.cz)

## Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti

*Charakterizace detekční schopnosti analytické měřicí metody je zejména pro stanovení nízkých hodnot významným znakem analytického měřicího systému. Zabýváme se jí v procesu validace a přiřazujeme ji k dané konfiguraci měřicího postupu jako důležitou výkonnostní charakteristiku. Tento metodický list shrnuje metodické přístupy pro zjištění detekčních schopností a způsob jejich výpočtu. Upozorňuje, že v této oblasti se lze setkat i v autoritativních textech jak s odlišnou terminologií tak i odlišnými přístupy. Avšak experimentálně a statisticky správné vyhodnocení detekčních schopností analytického systému je základem pro správnou interpretaci naměřených výsledků.*

Mez detekce daného analytického postupu chápeme tradičně v analytické chemii jako nejmenší hodnotu obsahu (koncentrace) analytu<sup>1</sup> (viz poznámka pod čarou na str. 5) ve vzorku, která může být detekována, ale která nemusí být stanovitelná jako exaktní hodnota. Mez detekce má i obzvláštní význam v oblastech kvalitativní analytiky. Mez detekce je jednou z důležitých metrologických charakteristik analytického stanovení (nebo i důkazu či průkazu), kterou je třeba se zabývat v procesu validace metody. Pro potřebu dvou základních úkolů

- a) posouzení, zdali experimentální výsledek indikuje přítomnost či nepřítomnost analytu a
- b) určení detekčního a kvantifikačního potenciálu chemického měřicího procesu,

byly zaváděny koncepce a terminologie, které se často navzájem lišily. Společným jmenovatelem problémů v této oblasti je skutečnost, že pravděpodobnost pozitivní detekce analytu, se nemění skokem z nuly na jednotku, když je překročena určitá mezní hodnota odezvy. Ve svých doporučeních z poslední doby používají IUPAC a ISO pro definici detekčních a kvantifikačních mezí chemického měřicího procesu statistický aparát testování hypotéz podrobně rozpracovaný pro oblast chemických měření Curriem [1]. Přesto však není možné konstatovat, že by v současné době existoval v praxi uznávaný jednotný způsob uvádění, symboliky a výpočtu detekčních a kvantifikačních mezí. Z uvedeného je zřejmé, že při uvádění meze detekce a ostatních parametrů detekční schopnosti metody je bezpodmínečně nutné, aby laboratoř jasně uvedla, jakou konvenci použila a jak provedla vlastní výpočet hodnot.

*Definice pojmů, experimentální přístup*

**Mez detekce** je definována v článku 4.18 mezinárodního metrologického slovníku (VIM) [2] jako *naměřená hodnota veličiny získaná daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu  $\beta$ , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je  $\alpha$ .*

Poznámka 1 IUPAC doporučuje implicitní hodnoty pro  $\alpha$  a  $\beta$  rovné 0,05.

Poznámka 2 Někdy se používá zkratka LOD.

Poznámka 3 Termín 'citlivost' se nedoporučuje používat pro 'mez detekce'.

**Mezi stanovitelnosti** individuálního analytického postupu chápeme nejnížší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou nejistotou. Je to obvykle nejnížší bod rozsahu měření.

K odhadu hodnoty meze detekce lze využít několika experimentálních přístupů:

1. **Odhad na základě experimentálního vyhodnocení variability měření slepých vzorků (blanků).**
  - a) Variabilita vyjádřená ve formě směrodatné odchylky může být stanovena **přímou metodou z opakovaných měření slepých vzorků nebo vzorků s velmi malým množstvím analytu.**
  - b) Hodnota směrodatné odchylky slepého pokusu (blanku) může být stanovena nepřímou – **extrapolací z dat lineární kalibrační závislosti.**
2. **Mez detekce může být vázána na hodnotu obsahu (koncentraci analytu) ve vzorku, která v použitém detekčním systému vykazuje zvolený poměr signálu k šumu.** Tento postup je běžný u těch detekčních systémů, které umožňují kontinuální registraci nulové linie, jako je tomu například u chromatografických technik.

U všech experimentálních přístupů však platí, že výpočet meze detekce si vyžaduje splnění určitých experimentálních předpokladů při získávání výchozích údajů. Vzorky musí absolvovat všechny kroky analytického postupu (tj. přípravu vzorku i měření) a koncentrační úroveň vzorků (úroveň hodnot obsahu), ze kterých je odvozována hodnota meze detekce, se nesmí od předpokládané hodnoty meze detekce významně lišit. Odvození parametrů detekční schopnosti metody nepřímou z parametrů kalibrační závislosti například předpokládá, že ke kalibraci byly použity standardy stejného matricového složení jako reálné vzorky (odpovídající komutability), což u mnohých kalibrací splněno není. Dalším předpokladem možného využití kalibračních dat ke stanovení meze detekce je, že rozsah kalibrace se dostatečně blíží svou nejnižší použitou hodnotou obsahu, množství (koncentrace) mezi detekce a je tedy oprávněné předpokládat shodnost rozptylů slepého pokusu/blanku a naměřených kalibračních dat. Například v německé normě DIN 32 645 [3] je předpokladem pro využití kalibrační závislosti k nepřímému odhadu meze detekce skutečnost, že poměr hodnoty obsahu (koncentrace) nejvyššího bodu kalibrační přímky a kritické úrovně (viz dále) nepřesahuje 10. Pokud tomu tak není, je možno použít pouze ty body kalibrace, které tento požadavek splňují. Pokud jich není dostatečný počet, je nutné provést dodatečná měření v nižším rozsahu. Splnění těchto předpokladů není často v analytické praxi věnována dostatečná pozornost a proto je třeba údaje o detekčních mezích stanovené extrapolací z kalibračních závislostí hodnotit s nejvyšší opatrností, zejména pokud nejsou ověřeny následným experimentem.

Stanovení meze detekce vycházející ze směrodatné odchylky výsledků měření slepého vzorku/blanku je nejčastěji používaným postupem. Pro výpočet meze detekce  $y_{MD}$  ze směrodatné odchylky měření slepého vzorku/blanku  $s_0$  se v laboratorní praxi často stále užívá konvence rozpracovaná Kaiserem v minulém století a používaná zejména v oblasti spektroskopických metod, tedy:

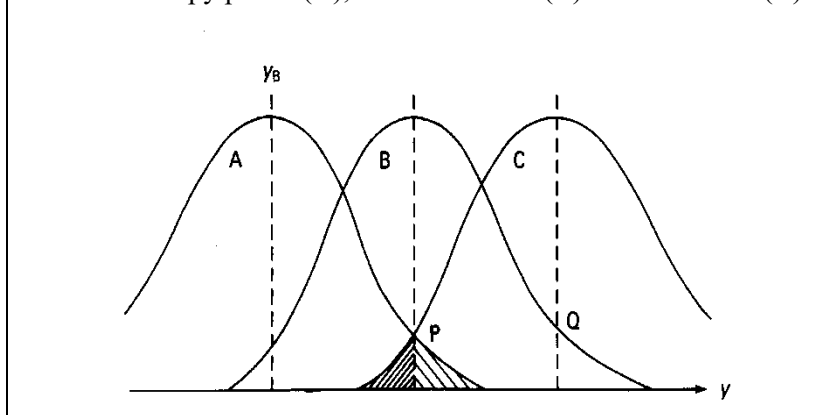
$$y_{MD} = \bar{y}_0 + 3 \cdot s_0$$

Mez detekce je vypočítána jako součet průměrného signálu slepého vzorku ( $\bar{y}_0$ ) a trojnásobku směrodatné odchylky slepého pokusu ( $s_0$ ). Tento způsob zabezpečí pro jednotlivé měření odlišení vzorku od slepého pokusu (blanku) s 99,9% pravděpodobností, avšak jak je zřejmé z rozboru v následujícím odstavci, 50 % výsledků opakovaných měření vzorků se skutečnou hodnotou obsahu (koncentrace analytu) odpovídající  $y_{MD}$  nelze odlišit od slepého vzorku (blanku). Fixní trojnásobek směrodatné odchylky není tedy z mnoha důvodů universální cestou statistického řešení charakterizace detekčních schopností měřicího postupu a v podstatě je metodou nesprávnou. Tento postup je však stále v praxi používán, protože rigorózní výpočet podle statistického modelu uvedeného níže, který ovšem odpovídá nejnovější definici meze detekce podle VIM, je podstatně složitější. V mnohých laboratořích naráží na nedostatečnou erudici v oblasti statistiky a pocit, že takovéto úsilí není adekvátní stupni přesnosti, se kterou je možno hodnoty detekčních schopností měřicího systému v denní praxi reprodukovat.

#### *Odhad detekční schopnosti podle IUPAC a ISO*

Toto pojetí [1,4] vychází ze statistického testování hypotéz rizika chyby I. a II. druhu. Při interpretaci měření je nežádoucí uvádět přítomnost analytu, když ve skutečnosti ve vzorku není (chyba I. druhu s pravděpodobností  $\alpha$ , falešně pozitivní) a rovněž neuvádět negativní výsledek, když vzorek analyt obsahuje (chyba II. druhu s pravděpodobností  $\beta$ , falešně negativní). Obrázek 1 znázorňuje situaci při měření slepého vzorku (blanku) - křivka A a vzorků s hodnotou obsahu (koncentrací) rovnou kritické

Obrázek 1: Slepý pokus (A), kritická úroveň (B) a mez detekce (C)



úrovni  $L_C$  (B) a mezi detekce (C). Je možno zvolit úroveň odezvy (či koncentrace) P, a prohlásit, že s určitou pravděpodobností (zvoleno  $\alpha = 0,05$ ) je signál větší než P považován za odlišný od slepého vzorku (blanku). Avšak pro vzorek s průměrnou odezvou P je 50 % naměřených hodnot pod touto úrovní a pravděpodobnost, že takový vzorek bude považován za slepý, je 50 % (chyba  $\beta$  má pravděpodobnost 0,5). Pro mez detekce je třeba tedy zvolit takovou úroveň odezvy Q, kdy je pravděpodobnost chyby jednoho i druhého druhu přijatelná. Pro data s normálním rozdělením platí, že je-li bod Q zvolen ve vzdálenosti rovné 3,29násobku směrodatné odchylky, je pravděpodobnost vzniku chybných rozhodnutí obou zmíněných typů 5 % ( $p = 0,05$ ). Obdobná je situace při posuzování kalibrační závislosti.

Z těchto představ vycházejí definice jednotlivých parametrů v doporučení IUPAC [1]. **Kritickou úroveň** (hodnotu)  $L_C$  potřebnou pro hodnocení výsledku měření – analyt přítomen nebo nepřítomen – definujeme jako úroveň odezvy či jí odpovídající koncentrace, pro kterou je pravděpodobnost výskytu chyby I. druhu zvolena na určité úrovni (IUPAC doporučuje 5 %;  $p = 0,05$ ). Pro *charakterizaci výkonnosti měřicího procesu* se pak **mezi detekce** nebo alternativním názvem **minimální detekovatelnou** (skutečnou) **hodnotou** označovanou  $L_D$  nazývá úroveň odezvy či jí odpovídající hodnoty obsahu, množství (koncentrace), pro niž je pravděpodobnost chyby II. druhu  $\beta$  zvolena na určité úrovni (IUPAC opět doporučuje  $p = 0,05$ ) při dané hodnotě  $L_C$  určené zvolenou úrovní  $\alpha$  (doporučeno IUPAC  $\alpha = 0,05$ ). Jednotlivé úrovně pravděpodobnosti  $\alpha$  a  $\beta$  je možné definovat se zřetelem na účel využití výsledků měření a charakter stanovení. Nejjednodušším případem je, je-li hodnota směrodatné odchylky slepého pokusu/blanku známa a data vykazují normální rozdělení a konstantní rozptyl. Při zvolené stejné úrovni pravděpodobnosti

$\alpha = \beta = 0,05$  platí jednoduché vztahy:

pro kritickou úroveň	$L_C = 1,645 \sigma_0$
a pro mez detekce	$L_D = 3,29 \sigma_0$

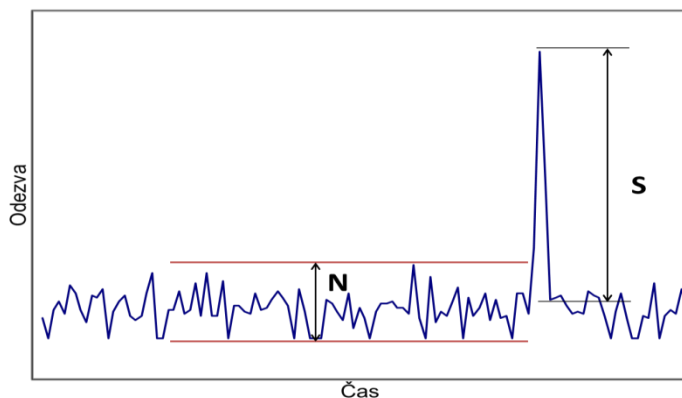
V tomto vztahu je  $\sigma_0$  rovno přímo experimentální hodnotě směrodatné odchylky slepého pokusu  $\sigma_B$ , známé z předchozích měření, nebo hodnotě  $\sigma_B \sqrt{2}$  v případě párových měření (analyt *minus* blank) vzorků s dodanou minimální úrovní analytu. V takovém případě bude tedy mez detekce rovna 4,65násobku směrodatné odchylky slepého pokusu (blanku)  $\sigma_B$ . V praxi chemických měření však hodnotu směrodatné odchylky málokdy známe. Její hodnota se často mění vlivem např. změny technického stavu použité instrumentace. Odhad směrodatné odchylky jsme schopni zjistit vyhodnocením opakovaného počtu (doporučováno nejméně sedm, nejčastěji deset i více) měření blanku/slepého vzorku. Odvození hodnot meze detekce z měření blanku/slepých vzorků předpokládá, že slepé vzorky zahrnují všechny kroky analytického postupu (tj. přípravu vzorku i měření) a že statistická distribuce hodnot blanku/slepého pokusu a vzorků při nízkých hodnotách obsahu (koncentracích) se významně neliší a je normální. Způsob výpočtu hodnot kritické úrovně a meze detekce je v těchto případech složitější a musí zahrnovat některá zjednodušení jak u přímé metody stanovení, tak i nepřímé metody z kalibrační závislosti. Nutný matematicko-statistický aparát je pro oba tyto výpočty součástí dokumentu IUPAC [1]. Terminologii a statistickým aparátem pro výpočet charakteristik detekční schopnosti na základě statistického testování hypotéz se též zabývá řada norem ISO [4]. Používá však zcela odlišnou terminologii a pro mnohou běžnou analytickou i klinickou

laboratoř je to materiál těžko srozumitelný a nepřehledný. Jedním z nejnovějších doporučení v rámci tohoto pojetí vyhodnocování detekčních schopností je doporučení Clinical Laboratory Standard Institute [5]. Jedná se o materiál srozumitelně napsaný s mnohými názornými příklady a zejména počítající i s eventualitou, že distribuce dat v okolí meze detekce nemusí odpovídat předpokladu Gaussova rozdělení, který je u nízkých koncentrací přinejmenším sporný. Pro kritickou úroveň používá výstižný termín *mez slepého pokusu (limit of blank)* vyjadřující nejvyšší výsledek, který ještě indikuje nepřítomnost analytu. Materiál lze doporučit pro použití jak v klinických tak i analytických laboratořích, bohužel je dostupný, jak to u standardizačních institucí bývá, jen nákupem.

Výpočet detekčních schopností podle IUPAC a ISO demonstrujeme na příkladu převzatém z normy DIN 32 645 [3] a to pro metodu výpočtu z hodnot měření slepých vzorků (blanků) a uvádíme jej na konci toho Metodického listu. Příklad na postup výpočtu z dat kalibrační závislosti lze nalézt v téže normě nebo v normě ČSN ISO 11843-2 [4].

#### *Mez detekce ve vztahu k poměru signálu k šumu*

Jak jsme již uvedli, u instrumentálních technik, u kterých je kontinuálně registrována nulová linie jako například u chromatografie, může být detekční schopnost odvozena od koncentrace (nebo množství) analytu v dávkovaném vzorku, který v použitém detekčním systému vykazuje zvolený poměr signálu k šumu. Používá se hodnota poměru 2 až 5, nejčastěji 3. Šumem rozumíme amplitudu výchylek základní linie, jejíž frekvence je podobná frekvenci eluovaných píků a je vyhodnocena ze záznamu trvajících několik šířek píku jak to znázorňuje obr. 2. Příkladem použití takového postupu je norma ČSN P ISO/TS 13530 [6]. Většina softwarového vybavení chromatografických systémů je schopna poměr S/N u každého píku automaticky vyhodnotit.



Obrázek 2. Vyhodnocení poměru signálu k šumu S/N u chromatografické analýzy

Odlíšný postup je třeba zvolit pro stanovení meze detekce v kvalitativní analýze. Pro kvalitativní měření existuje mezní koncentrace, pod kterou je specifičnost analýzy nespolehlivá. Ze série měření slepých vzorků/blanků s dodanou stoupající úrovní (každý vzorek měřen desetkrát v náhodně zvoleném pořadí) lze vyhodnotit křivku závislosti podílu pozitivních (nebo negativních) výsledků měření na hodnotách obsahu (koncentraci) a z ní pak určit mezní hodnotu obsahu (koncentraci), při které se zkouška se stává nespolehlivou.

#### *Kvantifikační mez*

Pro potřeby kvantitativní analýzy definujeme *mez stanovitelnosti*  $L_Q$  jako parametr určující obvykle počátek pracovního rozsahu metody. Není definována statisticky, ale konvenčně jako hodnota obsahu složky (koncentrace analytu), při které je nejistota stanovení vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka rovna předem určené hodnotě (doporučení IUPAC 10 %). Pak platí  $L_Q = k_Q \cdot \sigma_Q$ , kde  $L_Q$  je mez stanovitelnosti,  $k_Q$  je koeficient, jehož převrácená hodnota je rovna zvolené hodnotě relativní směrodatné odchylky tedy nejčastěji  $k_Q = 10$  a  $\sigma_Q$  je směrodatná odchylka v bodě meze stanovitelnosti. Pro data s normální distribucí a s konstantním rozptylem je směrodatná odchylka v bodě meze stanovitelnosti rovna směrodatné odchylce slepého pokusu  $\sigma_Q = \sigma_B$  a hodnota meze stanovitelnosti je pak zhruba trojnásobkem hodnoty meze detekce.

## PŘÍKLAD

### Výpočet detekčních mezí z výsledků měření slepého vzorku/blanku podle [3]

Stanovení celkového uhlíku ve vodě poskytlo tyto hodnoty slepého pokusu (udáno jako plocha):  
2003, 1901, 2212, 1976, 2279, 1853, 2165, 2108, 2368, 1943.

Z dat byla vypočtena průměrná hodnota  $\bar{y}_B = 2\,081$  a hodnota směrodatné odchylky  $s_B$

$$s_B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{B,i} - \bar{y}_B)^2}{n-1}} = 172 \quad (n = 10)$$

Kritická úroveň  $y_c$  je dána vztahem

$$y_c = \bar{y}_B + s_B \cdot t \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} \quad (n-1 \text{ stupňů volnosti})$$

kde  $n$  je počet měření slepého pokusu,  $m$  počet hodnocených stanovení vzorku (obvykle 1) a  $t$  příslušná kritická hodnota Studentova rozdělení pro jednostranný test. Pro  $\alpha = 0,05$  je tato hodnota  $t_{9;0,05} = 1,833$ . Po dosazení

$$y_c = 2\,412$$

Z kalibračních údajů je známa hodnota směrnice kalibrační přímky  $b = 9\,662$  (jednotek plochy·l/mg). Kritická úroveň koncentrace uhlíku je dána vztahem

$$x_c = \frac{s_B}{b} \cdot t \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n}} \quad (n-1 \text{ stupňů volnosti})$$

$$x_c = \mathbf{0,034 \text{ mg/l}}$$

Pro případ, kdy  $\alpha = \beta = 0,05$ , je hodnota meze detekce  $x_D$  dvojnásobkem hodnoty kritické úrovně  $x_D = \mathbf{0,068 \text{ mg/l}}$ .

Mez stanovitelnosti  $x_Q = k_Q \cdot s_B / b = 10 \cdot 172 / 9662 = \mathbf{0,18 \text{ mg/l}}$ .

---

Zpracovali: Z. Plzák a  
D. Milde

*Znění Metodického listu prošlo v roce 2018 revizí. Verze z roku 2011 je nadále platná, byl aktualizován jen odkaz 5.*

## Literatura

1. Currie, L. A.: Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). Pure Appl. Chem. **67** (10) 1699 (1995).
2. TNI 01 0115:2009 Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
3. DIN 32645:2008. Chemical analysis - Decision limit, detection limit and determination limit under repeatability conditions - Terms, methods, evaluation.
4. ČSN ISO 11843-1 až 4: 1998, 2001, 2004, 2005. Detekční schopnost - Část 1-4.
5. EP17-A Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. 2nd Edition. Clinical Laboratory Standard Institute (USA) 2012, <http://www.clsi.org>.
6. ČSN P ISO/TS 13530:2010. Jakost vod - Návod na řízení kvality chemického a fyzikálně-chemického rozboru vod.

## Doporučená literatura

- a) Brüggemann L., Morgenstern P. a Wennrich R.: Comparison of international standards concerning the capability of detection for analytical methods. Accred. Qual. Assur. **15**, (2), 99 (2010).
- b) 2002/657/ES: ROZHODNUTÍ KOMISE ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků.
- c) Funk W., Dammann V., Donnevert G.: Quality assurance in analytical chemistry. Str. 29-37. Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2007. ISBN 978-3-527-31114-9.

---

<sup>i</sup> přesněji řečeno měřenou veličinou je vlastnost složky ve vzorku, pojem *analyt* má z hlediska měření charakter laboratorního slangu. Pro zjednodušení je používán v tomto textu zažitý termín *analyt* a prezentované úvahy se vztahují i na případy, kdy to, co se měří, je definováno použitou metodou (odkaz 2, článek. 2.3, poznámka 4).