

# Φαρμακευτική Ανάλυση

Συγγραφέας: David G. Watson



Επίβλεψη μαθήματος: Επίκουρη καθ. Αικ. Μαρκοπούλου  
email: [amarkopo@pharm.auth.gr](mailto:amarkopo@pharm.auth.gr)  
Επικοινωνία με τους φοιτητές στο γραφείο μου κάθε Τετάρτη

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2013

## Εφαρμογές Φαρμακευτικής Ανάλυσης

### Έλεγχοι

- Τη συγκέντρωση του φαρμάκου σε δείγμα ιστού ή βιολογικού υγρού
- Το ρυθμό απελευθέρωσης του φαρμάκου από το σκεύασμα
- Έλεγχο ταυτότητας και καθαρότητας της πρώτης ύλης και των εκδόχων( βάση προδιαγραφών) για την παρασκευή του σκευάσματος
- Τις συγκεντρώσεις καθορισμένων προσμίξεων στη καθαρή πρώτη ύλη του φαρμάκου
- Την ταυτότητα φαρμάκου (δραστική) στο μορφοποιημένο προϊόν (σκεύασμα)
- Το % ποσοστό της δηλούμενης περιεκτικότητας
- Την ύπαρξη ή μη ξένων προσμίξεων
- Την σταθερότητα του φαρμάκου στο σκεύασμα (χρόνο ζωής του προϊόντος)

## International Conference Harmonization (ICH) Διεθνή Διάσκεψη Εναρμόνισης Τεχνικών Απαιτήσεων

### Σκοπός

Σκοπός της η τυποποίηση της επικύρωσης των αναλυτικών διαδικασιών (Βρυξέλες το1990)

### Αναλυτική Διαδικασία

Παρέχει ακριβή περιγραφή (στάδια) μιας ανάλυσης

- Την ποιότητα και προέλευση του προτύπου αναφοράς (standard)
- Την ποιότητα αντιδραστηρίων και διαλυτών
- Την πορεία παρασκευής των προτύπων διαλυμάτων
- Την οργανολογία
- Την μεθοδολογία

## *Έλεγχος Αξιοπιστίας Μεθόδου*

- Πιστότητα /επιαναληπτικότητα (precision)
- Ακρίβεια (Accuracy)

## ➤ Πιστότητα ή επαναληπτικότητα ή διακύμανση

Εκφράζει την εγγύτητα συμφωνίας μια σειράς αναλύσεων

### Είδη:

- Επαναληψιμότητα (Repeatability or intra assay)  
Ίδιο άτομο, όργανο και συνθήκες, σε βραχύ διάστημα
- Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision)  
Ενδοεργαστηριακή διακύμανση
- Αναπαραγωγιμότητα (Reproducibility)  
Σε διαφορετικά εργαστήρια

### Εκφράζεται

Η τυπική (σταθερή) απόκλιση (s) (standard deviation) για μικρό αριθμό μετρήσεων ορίζεται από τη σχέση:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

όπου η ποσότητα  $N - 1$  ονομάζεται βαθμοί ελευθερίας.

Όμως, για μεγάλο αριθμό μετρήσεων ( $N > 20$ ) η μέση τιμή πλησιάζει την πραγματική τιμή και η παραπάνω σχέση γράφεται ως

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$

-Τέλος υπάρχει και η τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ή τυπικό σφάλμα (standard error)

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

## Έλεγχος Σφαλμάτων Μεθόδου



Είδη: α) Χονδρικό σφάλμα (gross)  
β) Συστηματικό (systematic) ή καθορισμένο  
γ) Τυχαίο (random)

### Συστηματικό ή καθορισμένο Σφάλμα

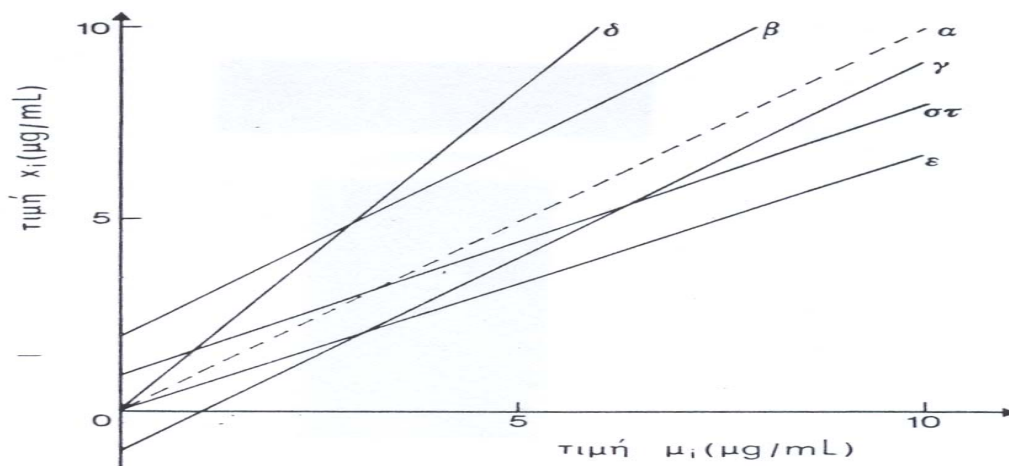
(μονοκατευθυνόμενο)

Είδη: 1) Σταθερά  
2) Αναλογικά  
3) Σύνθετα

$$x_i = \alpha \cdot \mu_i + \beta$$

Όπου: το  $\beta$  δηλώνει το καθορισμένο σφάλμα

το  $(\alpha - 1) \times 100$  δηλώνει το % σχετικό αναλογικό σφάλμα.



## Αιτίες Συστηματικού σφάλματος

### ■ Σφάλματα μεθόδου

(ελλιπής αντίδραση, απώλεια δραστηκής κατά τον καθαρισμό ή εκχύλιση, συγκαθίζηση προσμίξεων με την ουσία, η μη ταύτιση αλλαγής του χρώματος με το ισοδύναμο σημείο σε μια ογκομετρική αντίδραση)

### ■ Σφάλματα οργάνων

(μη σωστή ή έλλειψη βαθμονόμηση σκευών: ζυγού, πεχαμέτρων)

### ■ Προσωπικά σφάλματα

(αχρωματοψία αναλυτή, ζύγιση θερμού χωνευτηρίου, θέση μηνίσκου προχοίδας)

## Τυχαία Σφάλματα

### Εκτίμηση

Διασπορά  $S^2(\%)$

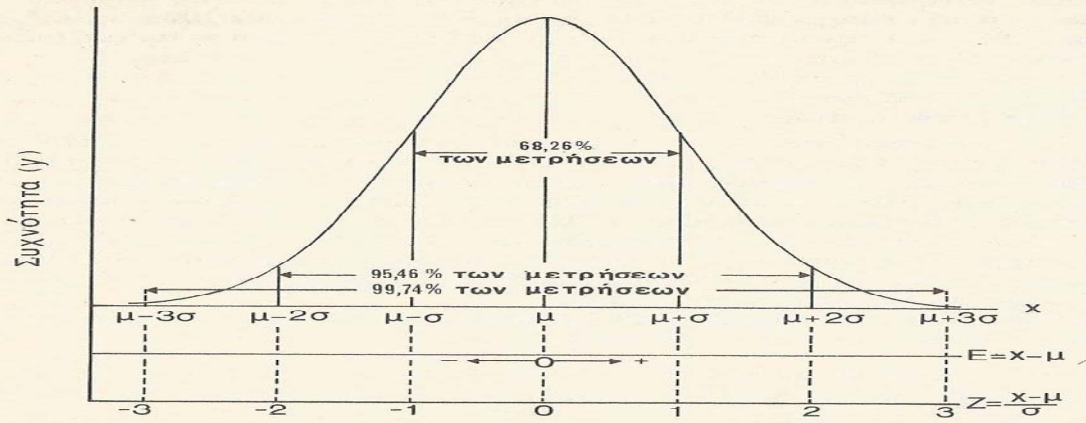
Σχετική τυπική απόκλιση %RSD

### Συνδυασμένα Τυχαία Σφάλματα

$$S_y = \sqrt{S_a^2 + S_b^2 + S_c^2 \dots} \quad \%$$

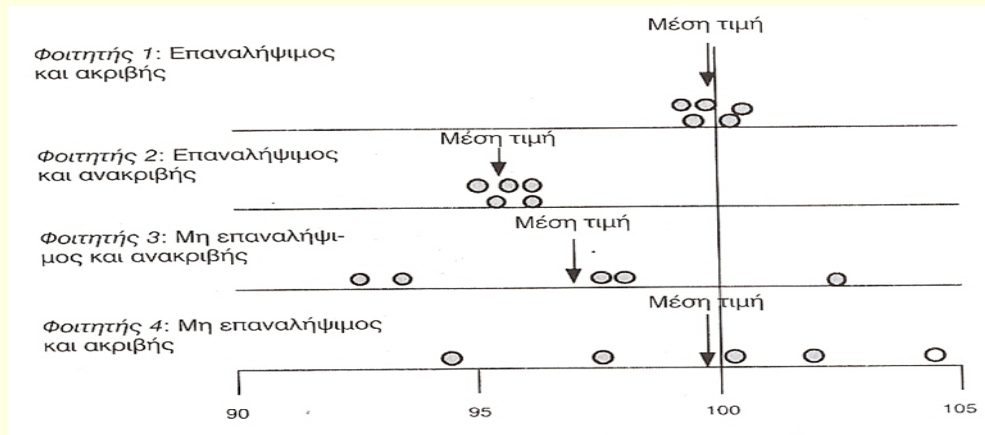
$$S_y = \sqrt{RSD_a^2 + RSD_b^2 + RSD_c^2 \dots}$$

## Διασπορά των αποτελεσμάτων Ανάλυσης



Σχήμα 2-3. Καμπύλη κανονικής κατανομής.

## Σχηματική απεικόνιση της Ακρίβειας και Επαναληπτικότητας, των Τυχαίων και Συστηματικών Σφαλμάτων



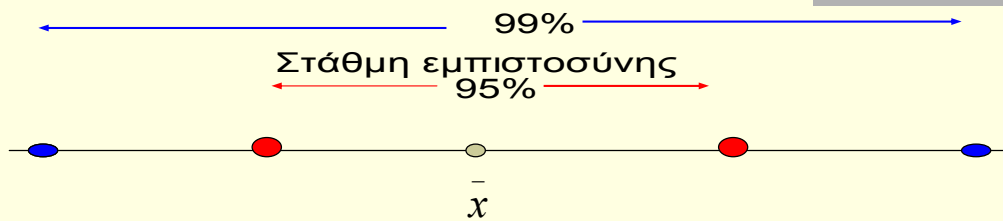
**Φοιτητής 1: 99.5%, 99.9%, 100.2%, 99.4%, 100.5%**

**Φοιτητής 2: 95.6%, 96.1%, 95.2%, 95.1%, 96.1%**

**Φοιτητής 3: 93.5%, 98.3%, 102.5%, 102.5%, 97.6%**

**Φοιτητής 4: 94.4%, 100.2%, 104.5%, 97.4%, 102.1%**

## Όρια και περιοχή εμπιστοσύνης



$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}}$$

Πίνακας 2-1. Τιμές του t ως συνάρτηση των βαθμών ελευθερίας και της στάθμης εμπιστοσύνης

Στάθμη εμπιστ. % $v = N - 1$	50	90	95	99	99,9
1	1,000	6,314	12,706	63,657	636,619
2	0,816	2,920	4,303	9,925	31,598
3	0,765	2,353	3,182	5,841	12,941
4	0,741	2,132	2,776	4,604	8,610
5	0,727	2,015	2,571	4,032	6,859
6	0,718	1,943	2,447	3,707	5,959
7	0,711	1,895	2,365	3,500	5,405
8	0,706	1,860	2,306	3,355	5,041
9	0,703	1,833	2,262	3,250	4,781
10	0,700	1,812	2,228	3,169	4,587
11	0,697	1,796	2,201	3,106	4,437
12	0,695	1,782	2,179	3,055	4,318

## Πιθανότητα σφάλματος

$$P = (100 - \text{στάθμη εμπιστοσύνης}) / 100$$

Π.χ 95% στάθμη εμπιστοσύνης ισοδυναμεί με:

$$P = (100 - 95) / 100 = 0.05 \text{ Πιθανότητα σφάλματος}$$



## Δοκιμασία student ή t (t-test)

Σύγκριση πειραματικής μέσης τιμής με τη πραγματική

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \Rightarrow t_{\text{πειραμ}} = \frac{|\mu - \chi| \sqrt{N}}{s}$$

$t_{\text{πειραμ}} > t_{\text{θεωρ}} \Rightarrow$  υπάρχει σημαντική ή διαφορά

$t_{\text{πειραμ}} < t_{\text{θεωρ}} \Rightarrow$  δεν υπάρχει σημαντική ή διαφορά

Υπαρξη ή μη καθορισμένου ή τυχαίου σφάλματος  
(N-1 βαθμοί ελευθερίας)

## Δοκιμασία ή t (t-test)

$$t_{\text{πειραμ}} = \frac{|\mu - \chi| \sqrt{N}}{s}$$

Σύγκριση δύο μέσω πειραματικών τιμών

$$t_{\text{πειραμ}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}}$$

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

1)  $t_{\text{πειραμ}} > t_{\text{θεωρ}}$

2)  $t_{\text{πειραμ}} < t_{\text{θεωρ}}$

Μηδενική υπόθεση (N<sub>1</sub>+N<sub>2</sub>-2 βαθμοί ελευθερίας)

## Δοκιμασία t για παρατηρήσεις κατάζεύγη (paired t-test)

$$t_{\text{πειραμ}} = \frac{|\mu - \chi| \sqrt{N}}{s}$$

$$t_{\text{πειραμ}} = \frac{\bar{d} \sqrt{N}}{s_d}$$

Όπου: d τιμών των ζευγών

N αριθμός των ζευγών

$s_d$  η τυπική απόκλιση των διαφορών

$$1) t_{\text{πειραμ}} > t_{\text{θεωρ}}$$

$$2) t_{\text{πειραμ}} < t_{\text{θεωρ}}$$

Μηδενική υπόθεση (N-1 βαθμοί ελευθερίας)

## Απόρριψη αμφίβολης τιμής

$$Q_{\text{πειρ}} = \frac{\chi_{\text{αμφ}} - \chi_{\text{πλησ}}}{\chi_{\text{μεγ}} - \chi_{\text{ελαχ}}}$$

ΣΟΣ: Στους βαθμούς ελευθερίας βάζουμε τον αριθμό των μετρήσεων

### Παράδειγμα:

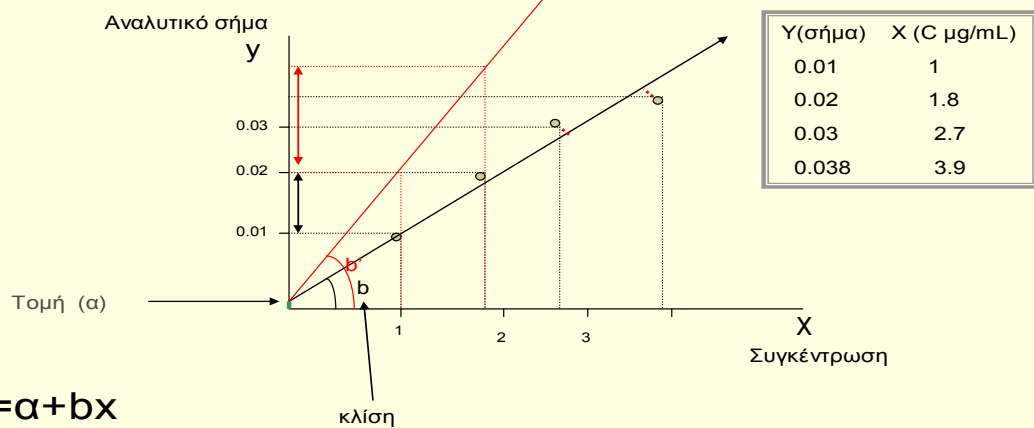
Τιμές 0.60, 0.57, 0.57, 0.58, 0.59, 0.74, 0.59 (Για 90% στάθμη εμπιστοσύνης  $Q_{\text{θεωρ}}=0.51$ )

$$Q_{\text{πειρ}} = \frac{0,74 - 0,60}{0,74 - 0,57} = 0,82$$

# Χαρακτηριστικά ποιότητας ενόργανων μεθόδων ανάλυσης

- Ισχύς μεθόδου
- Αξιοπιστία μεθόδου
- Αναλυτικό λευκό (Blank)
- Διακρίβωση/ Βαθμονόμηση (Calibration)
- Όριο ανίχνευσης, LOD (Limit of Detection)
  - ⇒  $X - X_b = 3S_b$
- Όριο ανίχνευσης, LOQ (Limit of Quantitation)
  - ⇒  $X - X_b = 10S_b$
- Ανθεκτικότητα (Robustness)
- Εκλεκτικότητα (Selectivity)
- Αναλυτική περιοχή συγκεντρώσεων (Range)
- Ευαισθησία μεθόδου

## Καμπύλη αναφοράς



$$y = \alpha + bx$$

Όπου το  $\alpha$  δηλώνει το σφάλμα της μεθόδου

Το  $b$  δηλώνει την ευαισθησία

# Χαρακτηριστικά καμπύλης αναφοράς

$$y = \alpha + bx$$

**Κλίση:** 
$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Υ(σήμα)	X (C μg/mL)
0.01	1
0.02	1.8
0.03	2.7
0.038	3.9

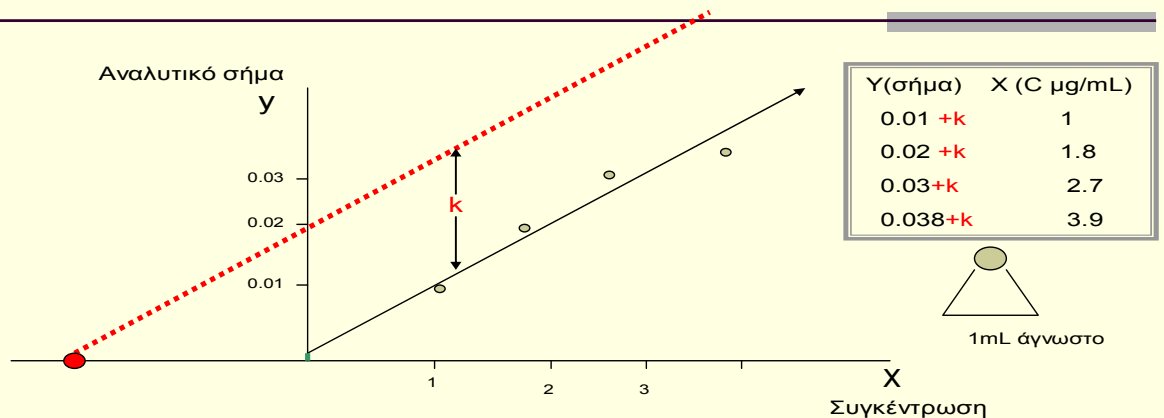
**Τομή:**  $\alpha = y - bx$  Επιθυμητή η ελάχιστη τιμή

**Συντελεστής  
συσχέτισης**

$$r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i [(x_i - \bar{x})^2] \sum_i [(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Τείνει στη 1

# Προσθετική μέθοδος



$y = \alpha + bx$  (κανονική καμπύλη αναφοράς που περιέχει το σφάλμα μεθόδου)

$y = k + \alpha + bx$  (καμπύλη προσθετικής που περιέχει και το σφάλμα της μεθόδου)

$y = k + bx$  (καμπύλη προσθετικής δίχως το σφάλμα) για  $y = 0$  έχουμε  $0 = k + bx$  ή  $x = -k/b$

## Μονάδες μέτρησης

- %v/v, 30:70 (mL)
- %w/w 30:70 (gA/100g B)  
π.χ  $10\text{mg/g} = 0.01\text{g/g} = 1\text{g}/100\text{g} = 1\%w/w$
- %w/v (g/100mL)
- ppm 1 μέρος A/1000000 μέρη B  
π.χ  $2\mu\text{g}/3\text{g} = 2\mu\text{g}/3000000\mu\text{g} = 2/3\mu\text{g} / 1000000\mu\text{g} = 2/3\text{ppm}$
- Molarity Molar, M MBg/L  
mMolar, mM MBmg/L  
μMolar, μM MBμg/L

## Πηγές προσμίξεων δραστικής

- Επιμόλυνση στις πρώτες ύλες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση
- Υπολείμματα χημικών ενδιάμεσων σύνθεσης
- Αντιδραστήρια, καταλύτες, διαλύτες
- Επιμόλυνση από περιέκτες

### Διαδικασίες που απαιτούν επικύρωση

- Δοκιμασίες ταυτοποίησης
- Ποσοτικές δοκιμασίες για προσμίξεις
- Δοκιμασίες ορίων για τον έλεγχο προσμίξεων
- Ποσοτικές δοκιμασίες του δραστικού συστατικού
- Έλεγχος Αξιοπιστίας της μεθόδου

## Σημειώσεις από το βιβλίο Ενόργανης Ανάλυσης των κ. Χατζηιωάννου, Κουπάρη

### 2-2. ΜΕΤΡΑ ΑΞΙΟΠΙΣΤΙΑΣ - ΟΡΙΣΜΟΙ

Η "αληθινή ή πραγματική" τιμή ( $\mu$ ) του μετρούμενου μεγέθους σπάνια είναι γνωστή και αντ' αυτής χρησιμοποιείται μία "παραδεκτή" τιμή, προς την οποία μπορούν να συγκριθούν όλες οι πειραματικές τιμές. Μετά την εκτέλεση αριθμού ( $N$ ) επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του μεγέθους και τη λήψη των αριθμητικών τιμών  $x_i$ , ως αντιπροσωπευτικότερη τιμή της ( $\mu$ ) προτείνεται ο *αριθμητικός μέσος όρος* ή *μέση τιμή* (mean) ( $\bar{x}$ ) των πειραματικών μετρήσεων:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_N}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} = \frac{\Sigma x_i}{N} \quad (2-1)$$

Μερικές φορές ως αντιπροσωπευτικότερη τιμή της  $\mu$  χρησιμοποιείται η *διάμεση τιμή* (ή *κεντρική τιμή*) (median), ( $M$ ), που ορίζεται ως η μεσαία κατά μέγεθος τιμή (για  $N$  περιττό) ή το ημιάθροισμα των δύο μεσαίων (για  $N$  άρτιο). Για την εύρεσή της αρκεί να καταταγούν οι τιμές κατά αυξανόμενο μέγεθος.

Η *ακρίβεια* (accuracy) ενός αναλυτικού αποτελέσματος χαρακτηρίζει την εγγύτητα της πειραματικής τιμής προς την "αληθινή ή παραδεκτή τιμή"  $\mu$  και συνήθως εκφράζεται με το *απόλυτο σφάλμα* ( $E$ ), δηλαδή τη διαφορά μεταξύ της αντιπροσωπευτικής πειραματικής τιμής  $x$  (μεμονωμένης μετρήσεως  $x_i$ , μέσης τιμής  $\bar{x}$  ή διάμεσης τιμής  $M$ ) και της  $\mu$

$$E = x - \mu \quad (2-2)$$

Όσο μικρότερο είναι το σφάλμα, τόσο μεγαλύτερη είναι η ακρίβεια. Σε μία ποσοτική ανάλυση η "αληθινή" τιμή της μετρούμενης ποσότητας παραμένει στην πραγματικότητα άγνωστη και δεν υπάρχει τρόπος να προσδιορίσουμε την ακρίβεια του αποτελέσματος της αναλύσεως. Είναι όμως δυνατός ο έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου με την ανάλυση "γνωστού" πρότυπου δείγματος, παρόμοιας κατά το δυνατόν συστάσεως με το άγνωστο δείγμα. Ο έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου επιβάλλεται τόσο κατά το στάδιο της αναπτύξεώς της, όσο και περιοδικά κατά την εφαρμογή της.

Η επαναληπτικότητα (precision) μιάς σειράς μετρήσεων χαρακτηρίζει τη συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ τους, δηλαδή δείχνει πόσο κοντά μεταξύ τους βρίσκονται τα αποτελέσματα. Η επαναληπτικότητα είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο μικρότερη είναι η διασπορά των αποτελεσμάτων. Ως μέτρα επαναληπτικότητας μιάς σειράς μετρήσεων χρησιμοποιούνται κυρίως η μέση απόκλιση, η τυπική απόκλιση και το εύρος.

Η απόκλιση μιάς τιμής ( $d_i$ ) ορίζεται ως η διαφορά της μέσης τιμής από την τιμή αυτή:

$$d_i = x_i - \bar{x} \quad (2-3)$$

Η μέση απόκλιση ( $\bar{d}$ ) ορίζεται από τη σχέση

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^N |x_i - \bar{x}|}{N} \quad (2-4)$$

Η τυπική (σταθερή) απόκλιση (standard deviation) για μικρό αριθμό μετρήσεων ( $s$ ), ορίζεται από τη σχέση

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (2-5)$$

Η ποσότητα  $N - 1$  καλείται και βαθμοί ελευθερίας.

Η ποσότητα  $s^2$  καλείται διασπορά (ή μεταβλητότητα ή διακύμανση). Για τον ταχύτερο υπολογισμό της διασποράς (και της  $s$ ) με τη βοήθεια αριθμομηχανής χρησιμοποιείται η σχέση:

$$s^2 = \frac{\sum x_i^2 - N\bar{x}^2}{N-1} = \frac{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N}}{N-1} \quad (2-6)$$

Για πολύ μεγάλο αριθμό μετρήσεων ( $N > 20$ ), η τιμή  $\bar{x}$  πλησιάζει πολύ την τιμή  $\mu$  και η τυπική απόκλιση  $s$  την τιμή της τυπικής αποκλίσεως του πληθυσμού ( $\sigma$ ), που δίνεται από τη σχέση:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}} \quad (2-7)$$

Η τυπική απόκλιση  $s$  στην πραγματικότητα είναι η τυπική απόκλιση μιάς μεμονωμένης μετρήσεως, και, επειδή αναλυτικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η μέση τιμή ( $\bar{x}$ ) των μετρήσεων, είναι επιθυμητή η γνώση της επαναληπτικότητας της μέσης τιμής. Αυτή εκφράζεται με την τυπική απόκλιση της μέσης τιμής ( $s_{\bar{x}}$ ), που δίνεται από τη σχέση:

*Standard error (τυπικό σφάλμα)*

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}} \quad (2-8)$$

Τονίζεται ότι πάντοτε είναι  $s > s_{\bar{x}}$ . Η παράμετρος  $s_{\bar{x}}$  καλείται επίσης και τυπικό σφάλμα (standard error).

Ένα χρήσιμο μέτρο επαναληπτικότητας για μικρό αριθμό μετρήσεων είναι το εύρος ή δειγματική διακύμανση (range), ( $R$ ), που ορίζεται, ως η διαφορά της ελάχιστης από τη μέγιστη τιμή, δηλαδή

$$R = x_{\text{μεγ}} - x_{\text{ελαχ}} \quad (2-9)$$

Αντί για τις απόλυτες τιμές του σφάλματος, των αποκλίσεων και του εύρους, που δίνονται στις ίδιες μονάδες με το μετρούμενο μέγεθος, πολλές φορές είναι χρησιμότερη η σχετική τιμή τους, ως προς το μετρούμενο μέγεθος. Έτσι έχουμε

$$\text{Σχετικό σφάλμα} \quad E_r = E / \mu \quad (2-10)$$

$$\text{Σχετική μέση απόκλιση} \quad \bar{d}_r = \bar{d} / \bar{x} \quad (2-11)$$

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση} \quad s_r = s / \bar{x} \quad (2-12)$$

$$\text{Σχετικό εύρος} \quad R_r = R / \bar{x} \quad (2-13)$$

Όπως προκύπτει από τον ορισμό τους, τα παραπάνω σχετικά μεγέθη είναι καθαροί αριθμοί. Όταν αυτά τα σχετικά μεγέθη πολλαπλασια-



στούν επί 100,  $10^3$  ή  $10^6$ , εκφράζονται στα εκατό (%), στα χίλια (‰ ή μέρη ανά χίλια, ppt) και σε μέρη ανά εκατομμύριο (ppm), αντίστοιχα. Η % σχετική τυπική απόκλιση,  $(s/\bar{x})100$ , που συμβολίζεται συνήθως ως RSD%, είναι γνωστή και ως *συντελεστής μεταβλητότητας* (coefficient of variation), CV.

Η ακρίβεια και η επαναληπτικότητα αποτελούν το μέτρο της αξιοπιστίας ενός αναλυτικού αποτελέσματος ή γενικότερα μιάς αναλυτικής μεθόδου. Για μεν την έκφραση της ακρίβειας χρησιμοποιούνται το σφάλμα και το σχετικό σφάλμα, ενώ για την έκφραση της επαναληπτικότητας το εύρος (για πολύ μικρό αριθμό μετρήσεων) και κυρίως η τυπική απόκλιση (ή η διασπορά) και η σχετική τυπική απόκλιση. Καλή επαναληπτικότητα δεν συνεπάγεται αναγκαστικά και καλή ακρίβεια, γιατί είναι δυνατόν να υπεισέρχεται στις μετρήσεις ένα καθορισμένο σφάλμα (σελ. 18), που να επηρεάζει εξ ίσου όλες τις μετρήσεις, χωρίς να βλάπτει με αυτόν τον τρόπο την επαναληπτικότητά τους. Κακή επαναληπτικότητα συνήθως συνεπάγεται κακή ακρίβεια, που μπορεί να βελτιωθεί με εκτέλεση μεγάλου αριθμού μετρήσεων, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει καθορισμένο σφάλμα. Καλή ακρίβεια προϋποθέτει συνήθως και καλή επαναληπτικότητα.

Στο σχήμα 2-1 δίνονται οι διάφορες περιπτώσεις, σχετικά με την ακρίβεια και την επαναληπτικότητα. Η περίπτωση 3 είναι σπάνια και συνήθως υποδηλώνει την ύπαρξη καθορισμένου σφάλματος, που δεν έχει διαπιστωθεί, ώστε να μπορεί να γίνει η κατάλληλη διόρθωση.



Σχήμα 2-1. Ακρίβεια και επαναληπτικότητα.

**Παράδειγμα 2-1.** Κατά τον έλεγχο μιάς αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό ασκορβικού οξέος, ένα "γνωστό" πρότυπο διάλυμα περιεκτικότητας 2,000 mg/mL αναλύθηκε πέντε φορές και πάρθηκαν τα εξής αποτελέσματα (mg/mL): 1,986, 2,013, 2,007, 1,973 και 1,981. Να υπολογισθούν η μέση τιμή, η διάμεση τιμή, το εύρος, το σχετικό εύρος, η μέση απόκλιση, η σχετική μέση απόκλιση (%), η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση (% RSD), το σφάλμα και το σχετικό σφάλμα (%).

### Λύση

$$\text{Μέση τιμή: } \bar{x} = \frac{1,986 + 2,013 + 2,007 + 1,973 + 1,981}{5} = 1,992 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Διάμεση τιμή: } M = 1,986 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Εύρος: } R = 2,013 - 1,973 = 0,040 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Σχετικό εύρος (%): } R_r(\%) = (0,040/1,992) \times 100 = 2,0\%$$

$$\text{Μέση απόκλιση: } \bar{d} = \frac{0,006 + 0,021 + 0,015 + 0,019 + 0,011}{5} = 0,014 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Σχετική μέση απόκλιση (%): } \bar{d}_r(\%) = (0,014/1,992) \times 100 = 0,7\%$$

$$\text{Τυπική απόκλιση: } s = \sqrt{\frac{(0,006)^2 + (0,021)^2 + (0,015)^2 + (0,019)^2 + (0,011)^2}{5-1}} = 0,017 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Σχετική τυπική απόκλιση (%): } RSD(\%) = (0,017/1,992) \times 100 = 0,9\%$$

$$\text{Σφάλμα: } E = 1,992 - 2,000 = -0,008 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Σχετικό σφάλμα (%): } E_r(\%) = (-0,008/2,000) \times 100 = -0,4\%$$

## 2-3. ΣΦΑΛΜΑΤΑ ΣΤΗΝ ΠΟΣΟΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Τα σφάλματα ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με την προέλευσή τους: τα καθορισμένα ή συστηματικά σφάλματα, που μπορούν να αποδοθούν σε συγκεκριμένες αιτίες, και τα τυχαία σφάλματα, που οφείλονται σε μη ελεγχόμενες και μη μόνιμες αιτίες.

### Α. Καθορισμένα σφάλματα

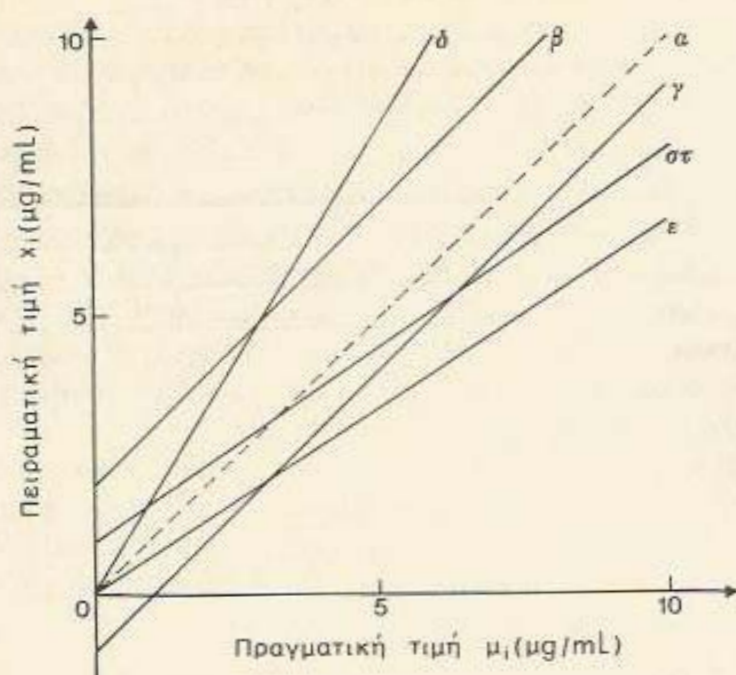
Τα σφάλματα αυτά είναι μονοκατευθυνόμενα, δηλαδή επιδρούν στο αποτέλεσμα μιάς μετρήσεως πάντοτε κατά την ίδια φορά (μόνο θετικά ή

μόνο αρνητικά), όσες φορές και εάν επαναληφθεί η μέτρηση, και παραμένουν σταθερά για μία σειρά μετρήσεων, που διεξάγονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Κατά κανόνα, είναι δυνατή η εύρεση των καθορισμένων σφαλμάτων και ο προσδιορισμός τους, και κατά συνέπεια ο παρατηρητής μπορεί να τα ελέγχει και να τα εξουδετερώνει μερικώς ή ολικώς. Τα καθορισμένα σφάλματα μπορούν να είναι είτε σταθερά, όταν το απόλυτο μέγεθος του σφάλματος  $E$  είναι το ίδιο σε όλα τα δείγματα ανεξάρτητα από την ποσότητα του προσδιοριζόμενου συστατικού, είτε αναλογικά, όταν το απόλυτο σφάλμα είναι ανάλογο προς την ποσότητα του συστατικού, ενώ το σχετικό σφάλμα ( $E/\mu$ ) είναι σταθερό. Υπάρχουν και σύνθετα συστηματικά σφάλματα, που είναι συνδυασμός σταθερών και αναλογικών σφαλμάτων.

Ο καθορισμός του είδους και του μεγέθους ενός πιθανού καθορισμένου σφάλματος μιάς αναλυτικής μεθόδου πετυχαίνεται με τον προσδιορισμό γνωστών πρότυπων δειγμάτων μεταβαλλόμενης περιεκτικότητας ( $\mu$ ). Η γραφική παράσταση των πειραματικών τιμών  $x_i$  ως προς  $\mu_i$  ή ο υπολογισμός της εξισώσεως

$$x_i = a\mu_i + \theta \quad (2-14)$$

με τη μέθοδο των ελάχιστων τετραγώνων (σελ. 37), καθορίζει το είδος και το μέγεθος του καθορισμένου σφάλματος. Ο όρος  $\theta$  της σχέσεως (2-14) ισούται με το σταθερό καθορισμένο σφάλμα, ενώ το μέγεθος  $(a-1) \times 100$  ισούται με το % σχετικό αναλογικό σφάλμα. Στο σχήμα 2-2 δίνονται αντιπροσωπευτικά διαγράμματα των διαφόρων τύπων συστηματικών σφαλμάτων κατά τον έλεγχο έξι διαφορετικών μεθόδων για τον προσδιορισμό ενός συστατικού σε σειρά γνωστών πρότυπων δειγμάτων.



**Σχήμα 2-2.** Συσχέτιση μεταξύ πειραματικών και πραγματικών τιμών με διάφορους τύπους καθορισμένων σφαλμάτων: α) Ιδανική μέθοδος, απουσία καθορισμένου σφάλματος, β) μέθοδος με σταθερό θετικό καθορισμένο σφάλμα  $+2,0 \mu\text{g/mL}$ , γ) μέθοδος με σταθερό αρνητικό καθορισμένο σφάλμα  $-1,0 \mu\text{g/mL}$ , δ) μέθοδος με αναλογικό θετικό σφάλμα  $+66,7\%$ , ε) μέθοδος με αναλογικό αρνητικό σφάλμα  $-33,3\%$  και στ) μέθοδος με σύνθετο καθορισμένο σφάλμα (σταθερό θετικό ίσο με  $+1,0 \mu\text{g/mL}$ , αναλογικό αρνητικό  $-30\%$ ).

Τα συστηματικά σφάλματα, από την άποψη της αιτίας που τα προκαλεί, διακρίνονται σε σφάλματα μεθόδου, σφάλματα οργάνων και προσωπικά σφάλματα.

**Σφάλματα μεθόδου.** Τα σφάλματα αυτά ενυπάρχουν στη μέθοδο και δεν είναι δυνατόν να μειωθούν, εκτός εάν μεταβληθούν οι πειραματικές συνθήκες. Τυπικά παραδείγματα σφαλμάτων μεθόδου είναι η μη συμπλήρωση της αναλυτικής αντιδράσεως σε ποσοστό 100% (π.χ. ατελής καθίζηση, μη πλήρης σχηματισμός έγχρωμου συμπλόκου), η απώλεια ιζήματος κατά την έκπλυσή του, η διάσπαση ενός ιζήματος κατά την πύρωση, η μη αντιστρεπτή προσρόφηση μιάς ουσίας σε χρωματογραφική στήλη, η συγκαθίζηση προσμείξεων με την προσδιοριζόμενη ουσία, η μη σύμπτωση αλλαγής του χρώματος του δείκτη σε μία ογκομετρική ανάλυση με το ισοδύναμο σημείο (σφάλμα δείκτη), η παράλληλη αντίδραση με προσμείξεις των αντιδραστηρίων, διαλυτών και δεινιά-

*Σφάλματα οργάνων.* Η χρησιμοποίηση μη ορθά βαθμονομημένων οργάνων και σκευών (ζυγών, προχοϊδών, φασματοφωτομέτρων, πεχαμέτρων κλπ.) είναι δυνατόν να προκαλέσει συστηματικό σφάλμα. Για παράδειγμα, εάν λόγω φθοράς των κυκλωμάτων ενός κουλομέτρου η ένταση του ρεύματος, που διαρρέει το ηλεκτρολυτικό στοιχείο, δε συμπίπτει μ' αυτή, που δείχνει ο αντίστοιχος επιλογέας, θα προκληθεί αναλογικό σφάλμα στις κουλομετρικές ογκομετρήσεις, που θα γίνουν με το όργανο αυτό. Επίσης, εάν το ηλεκτρόδιο υάλου ενός πεχαμέτρου έχει κλίση μικρότερη της θεωρητικής και ρυθμίστηκε με ένα μόνο πρότυπο σε pH 4,01, για κάθε μονάδα pH εκατέρωθεν της τιμής 4,01 θα υπάρχει αναλογικό σφάλμα (σελ. 19). Λανθασμένα σταθμά ζυγών και βαθμονομημένα υάλινα σκεύη με μόνιμες παραμορφώσεις προκαλούν επίσης συστηματικά σφάλματα.

*Προσωπικά σφάλματα.* Φυσικές αδυναμίες του αναλυτή, π.χ. αχρωματοψία, αμέλεια να επιφέρει κατάλληλες διορθώσεις (π.χ. λόγω διαφορών θερμοκρασίας κατά την τιτλοδότηση ενός πρότυπου διαλύματος και τη χρησιμοποίησή του), κακή εκτέλεση του πειράματος (π.χ. απώλεια διαλύματος κατά την εξάτμιση, ζύγιση θερμού χωνευτηρίου, μη προφύλαξη υγροσκοπικών ουσιών, κακή δειγματοληψία), κ.ά. προκαλούν καθορισμένα σφάλματα. Πηγή συστηματικού σφάλματος είναι επίσης η προκατάληψη (bias) του αναλυτή κατά την ανάγνωση διαφόρων μεγεθών, π.χ. θέσεως βελόνας σ' ένα όργανο, θέσεως μηνίσκου σε μία προχοΐδα, κατά τις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις όμοιας ποσότητας δείγματος.

Καθορισμένα σφάλματα μπορεί να οφείλονται και στα αντιδραστήρια, διότι αυτά είναι δυνατόν, είτε να περιέχουν προσμίξεις παρόμοιες προς τα προσδιοριζόμενα στοιχεία ή ουσίες, είτε να προσβάλλουν τα χρησιμοποιούμενα σκεύη, με αποτέλεσμα τη μόλυνση του δείγματος.

## B. Τυχαία σφάλματα

Τα τυχαία σφάλματα συνοδεύουν κάθε μέτρηση, προέρχονται από μη μόνιμες αιτίες (παρασιτικές διαταραχές, που παρενοχλούν τη μέτρηση, διακυμάνσεις εξωτερικών επιδράσεων, ατέλειες των αισθητήριων οργάνων και πλήθος άλλων αστάθμητων και μη ελεγχόμενων παραγόντων) και είναι δικατευθυνόμενα (θετικά και αρνητικά), γι' αυτό και επιδρούν ακανόνιστα στο αποτέλεσμα. Τα τυχαία σφάλματα εξουδετερώνονται, κατά ένα μέρος, με αύξηση του αριθμού των μετρήσεων, χωρίς όμως να είναι δυνατή η πλήρης εξάλειψή τους, εφόσον γι' αυτό θα χρειαζόντουσαν άπειρες μετρήσεις.

Η κατανομή των τυχαίων σφαλμάτων ακολουθεί το νόμο της κανονικής κατανομής του Gauss, δηλαδή

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-(x-\mu)^2/2\sigma^2} \quad (2-15)$$

όπου

$y$  = συχνότητα εμφάνισης μίας ορισμένης αποκλίσεως

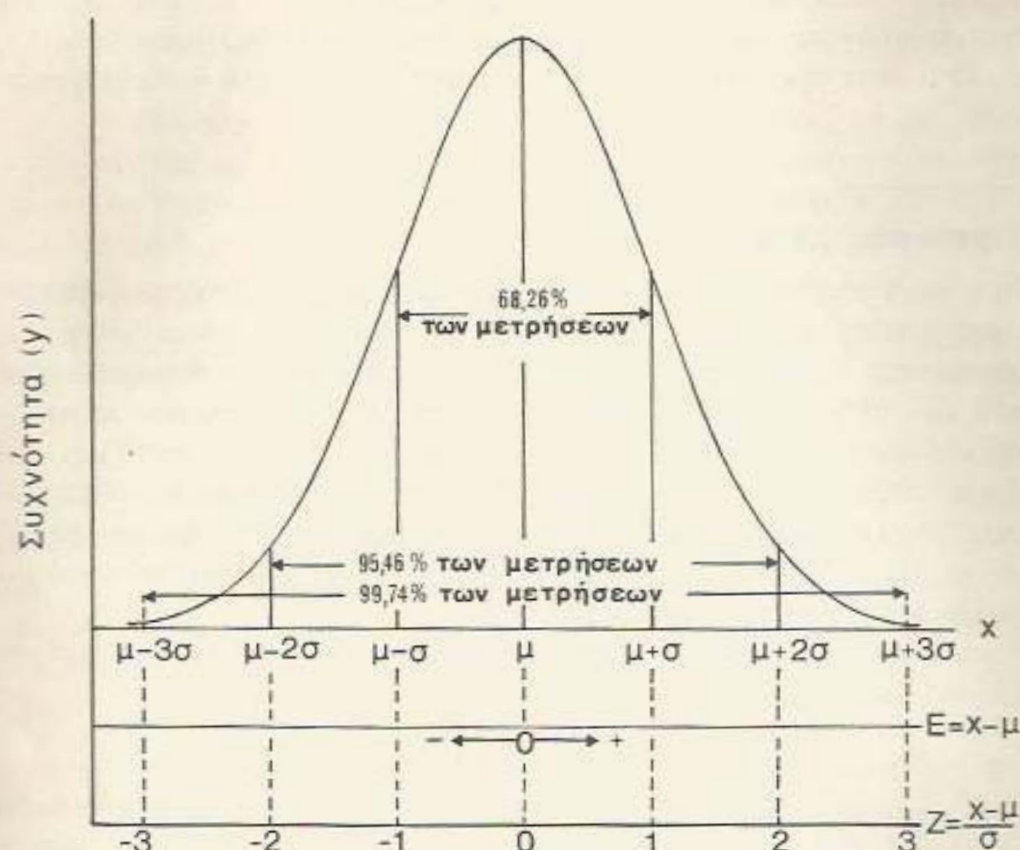
$x - \mu$  = διαφορά μεταξύ μίας τιμής  $x$  και της αληθινής τιμής  $\mu$  (σφάλμα)

$\sigma$  = τυπική απόκλιση (εξισ. 2-7)

$e$  = 2,7183 (βάση φυσικών λογαρίθμων)

$\pi$  = 3,14159

Η καμπύλη κανονικής κατανομής (κώδωνας του Gauss) αποδίδεται με το σχήμα 2-3. Το πλάτος της καμπύλης δηλώνει την επαναληπτικότητα των μετρήσεων και είναι τόσο μικρότερο, όσο καλύτερη είναι η επαναληπτικότητα. Όπως φαίνεται στο σχήμα 2-3, η αληθινή τιμή  $\mu$  αντιστοιχεί στο μέγιστο της καμπύλης. Γραφικώς η τυπική απόκλιση μπορεί να παρασταθεί, ως η οριζόντια απόσταση από την τιμή  $\mu$  προς κάποιο από τα δύο σημεία καμπής (μέγιστης κλίσεως) της καμπύλης. Περίπου 68% του πλήθους των μετρήσεων  $x$  βρίσκονται στην περιοχή  $\mu \pm \sigma$ , περίπου 95% στην περιοχή  $\mu \pm 2\sigma$  και περίπου 99% στην περιοχή  $\mu \pm 3\sigma$ .



Σχήμα 2-3. Καμπύλη κανονικής κατανομής.

Το τυχαίο σφάλμα μιάς αναλύσεως αποδίδεται με την τυπική απόκλιση  $s$  των αποτελεσμάτων. Μία τυπική αναλυτική μέθοδος περιλαμβάνει διάφορα στάδια, όπως δειγματοληψία, κατεργασία του δείγματος, μέτρηση κάποιας παραμέτρου, τελική επεξεργασία των μετρήσεων κλπ. Η διασπορά  $s^2$  (και επομένως το τυχαίο σφάλμα) θα είναι το αθροιστικό αποτέλεσμα των αποκλίσεων των διαφόρων σταδίων:

$$s_{(\text{αναλύσεως})}^2 = s_{(\text{δειγματοληψίας})}^2 + s_{(\text{κατεργασίας})}^2 + s_{(\text{μετρήσεως})}^2 + \dots \quad (2-16)$$

#### 2-4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟ ΑΡΙΘΜΟ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η στατιστική χρησιμοποιείται για την ποσοτική μελέτη των τυχαίων σφαλμάτων και με τη βοήθειά της μπορούν να δοθούν απαντήσεις σε

ερωτήματα, που ανακύπτουν κατά την αξιολόγηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων σειράς μετρήσεων. Παρακάτω δίνονται χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών.

**Όρια και περιοχή εμπιστοσύνης.** Ως όρια εμπιστοσύνης (ή αξιοπιστίας) του μέσου όρου ορίζονται δύο τιμές, που βρίσκονται αριστερά και δεξιά της  $\bar{x}$  και καθορίζουν το διάστημα εμπιστοσύνης (confidence interval), δηλαδή την περιοχή τιμών μέσα στην οποία προβλέπεται με ορισμένη πιθανότητα ότι βρίσκεται η  $\mu$  (δηλαδή το διάστημα μέσα στο οποίο μπορεί να τοποθετηθεί η  $\mu$  με προκαθορισμένο βαθμό εμπιστοσύνης). Η πιθανότητα αυτή εκφράζεται συνήθως στα εκατό και καλείται *στάθμη εμπιστοσύνης* (confidence level).

Για  $N$  μετρήσεις και  $\sigma$  γνωστό, τα όρια εμπιστοσύνης υπολογίζονται από τη σχέση

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{z\sigma}{\sqrt{N}} \quad (2-17)$$

όπου  $z$  είναι μεταβλητή, που παρέχει την απόκλιση της  $\bar{x}$  από τη  $\mu$  σε μονάδες τυπικής αποκλίσεως  $\sigma$ , δηλαδή  $z = (\bar{x} - \mu)/\sigma$ . Εάν η  $\sigma$  είναι άγνωστη, τα όρια εμπιστοσύνης υπολογίζονται από τη σχέση

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{N}} \quad (2-18)$$

Πίνακας 2-1. Τιμές του  $t$  ως συνάρτηση των βαθμών ελευθερίας και της στάθμης εμπιστοσύνης

Στάθμη εμπιστ. % $v = N - 1$	50	90	95	99	99.9
1	1,000	6,314	12,706	63,657	636,619
2	0,816	2,920	4,303	9,925	31,598
3	0,765	2,353	3,182	5,841	12,941
4	0,741	2,132	2,776	4,604	8,610
5	0,727	2,015	2,571	4,032	6,859
6	0,718	1,943	2,447	3,707	5,959
7	0,711	1,895	2,365	3,500	5,405
8	0,706	1,860	2,306	3,355	5,041
9	0,703	1,833	2,262	3,250	4,781
10	0,700	1,812	2,228	3,169	4,587
11	0,697	1,796	2,201	3,106	4,437
12	0,695	1,782	2,179	3,055	4,318
13	0,694	1,771	2,160	3,012	4,221
14	0,692	1,761	2,145	2,977	4,140
15	0,691	1,753	2,131	2,947	4,073
20	0,687	1,725	2,086	2,845	3,850
25	0,684	1,708	2,060	2,787	3,725
30	0,683	1,697	2,042	2,750	3,646
$\infty^a$	<b>0,674</b>	<b>1,645</b>	<b>1,960</b>	<b>2,576</b>	<b>3,291</b>



όπου  $t$  είναι μεταβλητή, που αυξάνεται, όταν αυξάνεται η στάθμη εμπιστοσύνης και όταν ελαττώνονται οι βαθμοί ελευθερίας  $\nu$  ( $\nu = N-1$ ) (πίνακας 2-1).

Για ορισμένη σειρά δεδομένων, το μέγεθος του διαστήματος εμπιστοσύνης αυξάνεται, όταν αυξάνεται η στάθμη εμπιστοσύνης. Συνήθως αρκούμαστε σε στάθμη εμπιστοσύνης 99% ή 95% και μερικές φορές και σε 90%. Η διαφορά ( $100 -$  στάθμη εμπιστοσύνης) <sup>100</sup>καλείται πιθανότητα σφάλματος (%) και παρέχει την πιθανότητα ( $P$ ), με την οποία η  $\mu$  βρίσκεται έξω από το διάστημα εμπιστοσύνης.

$\sum_{i=1}^n 10^0$

**Παράδειγμα 2-3.** Να υπολογισθούν τα όρια εμπιστοσύνης για  $P = 0,05$  και  $P = 0,01$  του παραδείγματος 2-1.

**Λύση.** Για  $P = 0,05$  και επομένως στάθμη εμπιστοσύνης 95%, και 4 βαθμούς ελευθερίας (5-1), βρίσκουμε από τον πίνακα 2-1 ότι  $t = 2,776$ , ενώ για  $P = 0,01$  (στάθμη εμπιστοσύνης 99%),  $t = 4,604$ . Επομένως τα όρια εμπιστοσύνης ( $P=0,05$ ) είναι  $1,992 \pm 2,776 \cdot 0,017/\sqrt{5} = 1,992 \pm 0,021$  mg/mL και ( $P=0,01$ )  $1,992 \pm 4,604 \cdot 0,017/\sqrt{5} = 1,992 \pm 0,035$  mg/mL.

**Παράδειγμα 2-4.** Κατά τον έλεγχο ομοιομορφίας του περιεχομένου δισκίων διγοξίνης 0,25 mg, αναλύθηκαν ξεχωριστά 10 δισκία με ανοσοχημική μέθοδο και πάρθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα: 0,241, 0,247, 0,259, 0,250, 0,232, 0,257, 0,240, 0,235, 0,262 και 0,247 mg. Να υπολογισθεί ο μέσος όρος περιεκτικότητας των δισκίων και η περιοχή εμπιστοσύνης για στάθμη εμπιστοσύνης 99%.

**Λύση.**

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N} = \frac{2,470}{10} = 0,247 \text{ mg}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{0,000932}{9}} = 0,0102 \text{ mg}$$

Για στάθμη εμπιστοσύνης 99% και  $N = 10$  από τον πίνακα 2-1 βρίσκουμε ότι  $t = 3,250$ . Επομένως έχουμε

$$\mu = 0,247 \pm (3,250 \cdot 0,0102/\sqrt{10}) = 0,247 \pm 0,010 \text{ και περιοχή εμπι-}$$

**Δοκιμασία Student ή δοκιμασία t (t - test).** Σύγκριση πειραματικής μέσης τιμής  $\bar{x}$  με την αληθινή τιμή  $\mu$ . Ο έλεγχος μιάς μεθόδου αναλύσεως συνήθως γίνεται με τη χρησιμοποίησή της σε σειρά αναλύσεων πρότυπου δείγματος και τη σύγκριση της τιμής  $\bar{x}$  προς τη  $\mu$ . Εάν  $|\bar{x} - \mu| \geq z\sigma/\sqrt{N}$  (εξισ. 2-17) ή  $|\bar{x} - \mu| \geq ts/\sqrt{N}$  (εξισ. 2-18), θεωρείται, ότι η  $\bar{x}$  είναι σημαντικά διαφορετική από τη  $\mu$ , για προκαθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Αντίθετα, εάν  $|\bar{x} - \mu| < z\sigma/\sqrt{N}$  ή  $|\bar{x} - \mu| < ts/\sqrt{N}$ , θεωρείται, ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ  $\bar{x}$  και  $\mu$ , χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι η  $\bar{x}$  είναι ίση με τη  $\mu$ . (Το νόημα της σημαντικής διαφοράς είναι, ότι η διαφορά μεταξύ των αναλυτικών αποτελεσμάτων, σε δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης, δεν προκαλείται από τυχαία σφάλματα, αλλά από καθορισμένα σφάλματα, που πρέπει να εντοπισθούν για να γίνουν οι αναγκαίες διορθώσεις, σελ. 21). Η  $\bar{x}$  είναι "ίση" με τη  $\mu$  μέσα στα ευρέα όρια του πίνακα 2-1, δηλαδή η  $\bar{x}$  μπορεί να είναι αρκετά διαφορετική της  $\mu$  και παρ' όλα αυτά να μην κρίνεται σημαντικά διαφορετική της  $\mu$ .

Η σύγκριση της  $\bar{x}$  με τη  $\mu$  μπορεί να γίνει και ως εξής: Υπολογίζεται η τιμή του t με τη σχέση

$$t = \frac{|\mu - \bar{x}| \sqrt{N}}{s} \quad (2-18a)$$

και συγκρίνεται με τη θεωρητική τιμή του t, που υπολογίζεται στατιστικά (πιν. 2-1). Η σύγκριση γίνεται για προκαθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Εάν  $t_{\text{πειρ}} > t_{\text{θεωρ}}$ , συμπεραίνεται, ότι υπάρχει σημαντική διαφορά (συστηματικό σφάλμα) μεταξύ  $\bar{x}$  και  $\mu$ . Αντίθετα, εάν  $t_{\text{πειρ}} < t_{\text{θεωρ}}$ , η διαφορά  $|\bar{x} - \mu|$  θεωρείται μηδαμινή και αποδίδεται σε τυχαία σφάλματα.

**Παράδειγμα 2-5.** Κατά τον έλεγχο μιάς νέας μεθόδου αναλύσεως δισκίων συνδυασμού θεοφυλλίνης - υδροχλωρικής εφεδρίνης - φαινοβαρβιτάλης, που γίνεται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης, πάρθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα κατά την ανάλυση "πρότυπων δισκίων":

Δραστικό συστατικό	Αριθμός αναλύσεων N	Μέση τιμή, mg/δισκίο	Σχετική τυπική απόκλιση, %	Τιμές προτύπων, mg/δισκίο
α) Θεοφυλλίνη	6	44,1	4,1	50,0
β) Υδροχ. εφεδρίνη	7	4,87	3,2	5,00
γ) Φαινοβαρβιτάλη	8	10,8	6,2	10,0

**Σύγκριση δύο μέσων πειραματικών τιμών  $\bar{x}_1$  και  $\bar{x}_2$  (δοκιμασία t).** Η σύγκριση αποτελεσμάτων, που λαμβάνονται με δύο διαφορετικές μεθόδους ή από δύο άτομα ή από το ίδιο άτομο, αλλά με δύο διαφορετικές συνθήκες ή τεχνικές, είναι πολλές φορές απαραίτητη στην Αναλυτική Χημεία και τη Φαρμακευτική Ανάλυση. Για παράδειγμα, είναι χρήσιμο να γνωρίζουμε, εάν μία νέα χρωματογραφική μέθοδος δίνει τα ίδια αποτελέσματα με την επίσημη (της φαρμακοποιίας) φασματοφωτομετρική μέθοδο. Επίσης, μπορεί να αναλύσουμε δύο παρτίδες κοκκίων (granules) ενός φαρμάκου και να πρέπει να αποφασίσουμε, εάν περιέχουν την ίδια ποσότητα φαρμάκου. Παρόμοια σύγκριση γίνεται επίσης για να καθορισθεί, εάν δύο ουσίες ταυτίζονται ή διαφέρουν μεταξύ τους. Η επίλυση τέτοιων προβλημάτων γίνεται με δοκιμασία σημαντικότητας, δηλαδή την απόφαση της ύπαρξης ή μη σημαντικής διαφοράς μεταξύ των δύο πειραματικών τιμών.

Στη στατιστική αυτό πετυχαίνεται με τη *μηδενική υπόθεση* (null hypothesis), δηλαδή τη δοκιμαστική υπόθεση, ότι δεν υπάρχει διαφορά μεταξύ των δύο αποτελεσμάτων και τον έλεγχο αυτής της υποθέσεως. Για το σκοπό αυτό συγκρίνονται οι δύο πειραματικές τιμές  $\bar{x}_1$  και  $\bar{x}_2$  με τη βοήθεια της δοκιμασίας t. Ο υπολογισμός του  $t_{\text{πειρ}}$  γίνεται με τη σχέση

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \sqrt{\frac{N_1 N_2}{N_1 + N_2}} \quad (2-19)$$

όπου  $s_{1-2}$  είναι η τυπική απόκλιση οποιασδήποτε τιμής σε καθεμιά από τις δύο σειρές δεδομένων, που υπολογίζεται με τη σχέση

$$s_{1-2} = \sqrt{\frac{\Sigma(x_{i1} - \bar{x}_1)^2 + \Sigma(x_{i2} - \bar{x}_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}} = \sqrt{\frac{S_1^2(N_1 - 1) + S_2^2(N_2 - 1)}{N_1 + N_2 - 2}} \quad (2-20)$$

(παραδ. 2-6). Στην ειδική περίπτωση όπου  $N_1 = N_2 = N$ , η εξίσωση (2-19) απλοποιείται προς την

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_{1-2}} \sqrt{\frac{N}{2}} \quad (2-21)$$

και η (2-20) προς την (2-20α)

$$s_{1-2} = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{2}} \quad (2-20\alpha)$$

αυτή τίθεται η στάθμη εμπιστοσύνης και μετά την εξαγωγή του συμπεράσματος πρέπει να αποφασισθεί, εάν απαιτείται ή όχι βελτίωση των αποτελεσμάτων με επί πλέον πειραματική εργασία.

**Δοκιμασία t για παρατηρήσεις κατά ζεύγη ή κατά ζεύγη δοκιμασία t (paired t - test).** Συχνά στην πράξη η ανάλυση δειγμάτων γίνεται με δύο διαφορετικές μεθόδους, που πρόκειται να συγκριθούν για την ισοδυναμία τους. Στην περίπτωση αυτή, οι παρατηρήσεις των δύο συγκρινόμενων ομάδων εμφανίζουν ατομική αντιστοιχία και οι συγκρίσεις μπορούν να γίνουν ανά ζεύγη, ενώ η τιμή του  $t_{\text{πειρ}}$  υπολογίζεται από τη σχέση

$$t_{\text{πειρ}} = \frac{|\bar{x}_A - \bar{x}_B|}{s_d} \sqrt{\frac{N(N-1)}{\sum (d_i - \bar{d})^2}} = \frac{\bar{d}\sqrt{N}}{s_d} \quad (2-22a) \quad (2-22b)$$

όπου  $\bar{x}_A$  και  $\bar{x}_B$  είναι η μέση τιμή των αναλύσεων των δειγμάτων, που αναλύθηκαν με τη μέθοδο A και B, αντίστοιχα, N ο αριθμός των ζευγών των αναλύσεων (και επομένως των δειγμάτων),  $d_i$  η θετική ή αρνητική τιμή των διαφορών  $x_{iA} - x_{iB}$ ,  $\bar{d}$  ο μέσος όρος όλων των διαφορών  $d_i$  και  $s_d$  η τυπική απόκλιση μιάς διαφοράς τιμών.

**Καθορισμός ορίων ανιχνεύσεως (detection limits).** Η ελάχιστη συγκέντρωση ή ποσότητα ενός συστατικού δείγματος, που μπορεί να ανιχνευθεί "αξιόπιστα" με μία αναλυτική μέθοδο, ονομάζεται *όριο ανιχνεύσεως* της μεθόδου. Σχεδόν σε κάθε αναλυτική μέθοδο μία απόκριση ή σήμα μπορεί να μετρηθεί ακόμα και όταν απουσιάζει το μετρούμενο συστατικό (εννοείται ότι όλα τα άλλα αντιδραστήρια και οι συνθήκες είναι ακριβώς οι ίδιες). Αυτή η απόκριση ονομάζεται *τυφλό* ή *σήμα υποβάθρου* ή *θόρυβος* (blank, back-ground, noise). Με πολλαπλή μέτρηση της αποκρίσεως του τυφλού, μπορεί να υπολογισθούν ο μέσος όρος του  $\bar{x}_b$  και η τυπική απόκλιση του μέσου όρου  $s_b$  (εξισ. 2-8). Ως όριο ανιχνεύσεως θεωρείται εκείνη η συγκέντρωση ή ποσότητα συστατικού, για την οποία η απόκριση της μεθόδου μπορεί να διακριθεί από το τυφλό ή το θόρυβο, δηλαδή ο μέσος όρος της αποκρίσεως  $\bar{x}$  για το όριο ανιχνεύσεως να είναι αρκετά μεγαλύτερη του  $\bar{x}_b$ . Θεωρώντας ότι η  $s_x$  είναι ίση περίπου με την  $s_b$ , μπορεί να χρησιμοποιηθεί η δοκιμασία t για τον καθορισμό της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς του  $\bar{x}$  από το  $\bar{x}_b$ . Συνήθως χρησιμοποιείται  $t=3$ , οπότε  $\bar{x} - \bar{x}_b = 3s_b$ . Έτσι μπορούμε να ορίσουμε ότι όριο ανιχνεύσεως ενός συστατικού με μία μέθοδο είναι εκείνη η συγκέντρωση ή ποσότητα του συστατικού, για την οποία η απόκριση της μεθόδου διαφέρει από την απόκριση του τυφλού κατά το τριπλάσιο της τυπικής αποκρίσεως του μέσου όρου του τυφλού. (ωπκ)

**Απόρριψη αμφίβολης τιμής σε μία σειρά πειραματικών δεδομένων.** Όταν σε μία σειρά πειραματικών δεδομένων μία τιμή διαφέρει ουσιαστικά από τις υπόλοιπες τιμές, η απόρριψη ή μη της αμφισβητήσιμης (ύποπτης) τιμής μπορεί να αποφασισθεί με βάση στατιστικά κριτήρια. Είναι προφανές, ότι, όταν είναι γνωστό ότι έγινε λάθος κατά τη μέτρηση της ύποπτης τιμής, αυτή απορρίπτεται προκαταβολικά.

Από τα διάφορα κριτήρια απορρίψεως αμφίβολων τιμών, αυτό που χρησιμοποιείται συχνότερα, είναι το κριτήριο  $Q$ . Κατά τη χρησιμοποίησή του, η διαφορά της αμφισβητήσιμης τιμής από την πλησιέστερη γειτονική τιμή διαιρείται με το εύρος των τιμών και η τιμή, που υπολογίζεται με αυτόν τον τρόπο,  $Q_{\text{πειρ}}$ , συγκρίνεται με θεωρητικές τιμές απορρίψεως,  $Q_{\text{θεωρ}}$ , που δίνονται σε στατιστικούς πίνακες (πίνακας 2-2). Εάν  $Q_{\text{πειρ}} > Q_{\text{θεωρ}}$ , το αμφισβητήσιμο αποτέλεσμα απορρίπτεται. Εάν οι αμφισβητήσιμες τιμές είναι περισσότερες από μία, οι τιμές αναγράφονται κατά αυξανόμενο μέγεθος,  $x_1, x_2, \dots, x_{N-1}, x_N$ , ελέγχεται η ελάχιστη τιμή  $x_1$ , έπειτα η μέγιστη  $x_N$ , και είναι πάντοτε  $Q_{\text{πειρ}} < 1$ . Εάν η αμφισβητήσιμη τιμή δεν απορρίπτεται με βάση το κριτήριο  $Q$ , συχνά είναι προτιμότερο να ληφθεί η διάμεση τιμή  $M$  αντί της μέσης τιμής  $\bar{x}$ , γιατί η  $M$  επηρεάζεται μεν από την ύπαρξη της αμφισβητήσιμης τιμής, όχι όμως από το μέγεθος της αποκλίσεως της αμφισβητήσιμης τιμής από τις άλλες τιμές. Αντίθετα, η  $\bar{x}$  επηρεάζεται πολύ από μία αμφισβητήσιμη τιμή και μάλιστα τόσο περισσότερο, όσο το  $N$  είναι μικρότερο.

Πίνακας 2-2. Τιμές του  $Q$  ως συνάρτηση του αριθμού των μετρήσεων και της στάθμης εμπιστοσύνης

N:	3	4	5	6	7	8	9	10
$Q_{0,90}$	0,94	0,76	0,64	0,56	0,51	0,47	0,44	0,41
$Q_{0,95}$	0,98	0,85	0,73	0,64	0,59	0,54	0,51	0,48
$Q_{0,99}$	0,99	0,93	0,82	0,74	0,68	0,63	0,60	0,57

**Παράδειγμα 2-7.** Κατά τον προσδιορισμό του συντελεστή επιβραδύνσεως  $R_f$  του φαρμάκου σουλφαμεραζίνη σε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας πάρθηκαν οι τιμές  $R_f = 0,60, 0,57, 0,57, 0,58, 0,59, 0,74, 0,59$ . Να χρησιμοποιηθεί το κριτήριο  $Q_{0,90}$  για να καθορισθεί, εάν οποιοδήποτε από τα παραπάνω αποτελέσματα πρέπει να απορριφθεί.

**Λύση.** Προφανώς η ύποπτη τιμή είναι η 0,74. Υπολογίζουμε το  $Q_{\text{πειρ}}$  και το συγκρίνουμε με το  $Q_{\text{θεωρ}}$  που από τον πίνακα 2-2 βρίσκεται για  $N=7, Q_{0,90} = 0,51$ . Έχουμε

2-5. ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΨΗΦΙΑ

$$Q_{\text{πειρ}} = \frac{x_{\text{αμφ}} - x_{\text{πλησιέστερη}}}{x_{\text{μεγ}} - x_{\text{ελαχ}}} = \frac{0,74 - 0,60}{0,74 - 0,57} = 0,82$$

Επειδή  $Q_{\text{πειρ}} = 0,82 > 0,51 = Q_{\text{θεωρ}}$ , η αμφισβητούμενη τιμή 0,74 πρέπει να απορριφθεί.

## Παράδειγμα

**Παράδειγμα 2-5.** Κατά τον έλεγχο μίας νέας μεθόδου αναλύσεως δισκίων συνδυασμού θεοφυλλίνης - υδροχλωρικής εφεδρίνης - φαινοβαρβιτάλης, που γίνεται με φασματοφωτομετρία υπεριώδους μετά από διαχωρισμό με χρωματογραφία στήλης, πάρθηκαν τα παρακάτω αποτελέσματα κατά την ανάλυση "πρότυπων δισκίων":

Δραστικό συστατικό	Αριθμός αναλύσεων N	Μέση τιμή, mg/δισκίο	Σχετική τυπική απόκλιση, %	Τιμές προτύπων, mg/δισκίο
α) Θεοφυλλίνη	6	<u>44,1</u>	4,1	<u>50,0</u>

Υπάρχει καθορισμένο σφάλμα για 95% στάθμη εμπιστοσύνης;

$$t_{\text{πειραμ}} = \frac{|\mu - \chi| \sqrt{N}}{S}$$

$$\%RSD = \frac{S}{\bar{x}} \cdot 100$$

Στάθμη εμπιστ. % v = N-1	50	90	95	99	99,9
1	1,000	6,314	12,706	63,657	636,619
2	0,816	2,920	4,303	9,925	31,598
3	0,765	2,353	3,182	5,841	12,941
4	0,741	2,132	<u>2,776</u>	4,604	8,610
5	0,727	2,015	<u>2,571</u>	4,032	6,859
6	0,718	1,943	2,447	3,707	5,959
7	0,711	1,895	2,365	3,500	5,405
8	0,706	1,860	2,306	3,355	5,041
9	0,703	1,833	2,262	3,250	4,781
10	0,700	1,812	2,228	3,169	4,587
11	0,697	1,796	2,201	3,106	4,437
12	0,695	1,782	2,179	3,055	4,318