

**Marek Wiergowski, Katarzyna Galer, Beata Szpiech, Krystyna Reguła**

## Niepewność pomiarowa jako integralna część wyniku pomiarowego oraz narzędzie doskonalenia jakości pracy laboratorium chemiczno-toksykologicznego

### **Uncertainty of measurement as an integral part of the result and an tool of quality of work improvement for the chemical-toxicological laboratory**

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej AM w Gdańsku  
Kierownik: dr hab. Z. Szczerkowska – profesor AM

Niepewność pomiaru jest liczbowo wyrażonym zakresem, w którym z określonym prawdopodobieństwem, spodziewane jest znalezienie prawdziwej wartości pomiarowej. W pracy podjęto próbę oszacowania niepewności typu A i B analizy etanolu metodą enzymatyczną ADH w celu stwierdzenia zasadności ich wykonywania i wykorzystania w praktyce laboratoryjnej. W podanym przykładzie wykazano duży udział procentowy błędu pomiaru dla pipetowania roztworu ADH oraz kwasu nadchlorowego, co daje podstawę do podjęcia dalszych kroków w celu udoskonalenia procedury. Wyniki niepewności pomiarowej uzyskane metodą B są zbliżone do empirycznego wyniku metody A. Ważną zaletą omawianego sposobu wyznaczania niepewności jest oszczędność czasu oraz ograniczenie kosztów analiz.

An uncertainty in measurements is a numericals defined range that is supposed to find a true value with a given level of probability. The purpose of this study was to estimate a type A and B of uncertainty in the analysis of ethanol using the ADH method and prove it to be useful in lab practice. A large percentage of uncertainty was shown for pipetting of the ADH and perchloric acid solutions. This result formed the basis to make an effort in order to improve the procedure. The results of uncertainty of measurements given by method B are similar to the empiric method A results. The reduction of expenses and time saving of the analysis is an important advantage of the described way of uncertainty.

Słowa kluczowe: niepewność pomiarowa, odchylenie standardowe, propagacja błędów, jakość pracy laboratorium chemiczno-toksykologicznego  
Key words: uncertainty of measurement, standard deviation, propagation of errors, quality of work in chemical-toxicological laboratory

#### WSTĘP

Niepewność pomiarowa (ang. *uncertainty*) jest liczbowo wyrażonym zakresem, w którym spodziewane jest, z określonym prawdopodobieństwem, znalezienie prawdziwej wartości pomiarowej. Jest to wartość szacowana, która charakteryzuje wynik pomiarowy a nie metodę analityczną. Szacowanie niepewności pomiarowej polega na stworzeniu kompromisowego modelu statystycznego, w którym przedział niepewności będzie jednocześnie bezpieczny (wartość prawdziwa powinna leżeć wewnątrz przedziału) i realistyczny (przedział nie powinien być zbyt szeroki).

Pierwszym znaczącym dokumentem opisującym całościowo problematykę wyrażania i szacowania

niepewności pomiarowej był przewodnik wydany w 1993 roku i przygotowany wspólnie przez siedem organizacji międzynarodowych metrologicznych (BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP i OIML) pod nazwą „Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement” [9], który został również wydany w polskim tłumaczeniu [4]. W światowych zasobach Internetu dostępnych jest, co najmniej, kilka znaczących przewodników oraz wiele publikacji, które szczegółowo opisują problematykę ilościowego wyrażenia niepewności pomiarowej oraz promują jednolite zasady dobrej praktyki laboratoryjnej [2, 12].

## METODY BADAWCZE

Niepewność pomiarowa obejmuje zarówno błędy przypadkowe jak i błędy systematyczne, przy czym wielkość ta jest traktowana w szerszym aspekcie niż tradycyjnie rozumiana analiza błędów pomiarowego. Wartość liczbowa niepewności może być wyznaczona metodą typu A i typu B [9]. Niepewność otrzymana metodą typu A jest obliczana na podstawie serii powtórzonych obserwacji i wyrażana jest w postaci odchylenia standardowego (niepewność standardowa typu A, ang. *standard uncertainty*). Niepewność typu B jest obliczana z wykorzystaniem dostępnej wiedzy (*a priori*) jako estymata odchylenia standardowego (niepewność standardowa typu B). Trudniejsza w opisanu jest niepewność typu B, gdzie bada się zależności między wielkością mierzoną a parametrami, od których ona zależy. Dlatego początkowym etapem na drodze szacowania niepewności pomiarowej jest jasne zdefiniowanie jednostki pomiarowej (udzielenie odpowiedzi na pytanie „co mierzymy?”) oraz pełny opis procedury analitycznej („co wpływa na wynik końcowy oraz w jakich warunkach dokonujemy pomiaru?”). Następnie dokonuje się opisu możliwych źródeł niepewności pomiarowej i szacuje ich wartości. Szacowanie wartości składowych niepewności i ich korelacji najczęściej pozwala na stworzenie modelu matematycznego dla danej procedury. Dalszym etapem jest zsumowanie poszczególnych składowych niepewności (w postaci estymatów odchyłeń standardowych) stosując najczęściej prawo propagacji błędów statystycznego do wielkości zwanej złożoną niepewnością pomiarową (ang. *combined standard uncertainty*). Końcową wartość niepewności pomiarowej zwaną rozszerzoną niepewnością (ang. *expanded uncertainty*) oblicza się na podstawie założonego szacowanego prawdopodobieństwa oraz współczynnika rozszerzenia  $k$  (ang. *coverage factor*), który przyjmuje

wartości od 2 do 3 w zależności od poziomu prawdopodobieństwa w zakresie 95-99%.

Polskie Centrum Akredytacji, powołując się na międzynarodowe dokumenty akredytacyjne [10,13], wymaga od laboratoriów przestrzegania cech spójności pomiarowej. Do tych cech należy także niepewność pomiaru, której wartość powinna być podana przy poziomie ufności równym 95% oraz współczynnika rozszerzenia  $k$  równym 2. Należy zaznaczyć, iż składowe niepewności typu B mogą pochodzić z wielu różnych źródeł, takich na przykład jak: publikacje i raporty naukowo-badawcze, specyfikacje podane przez producenta dotyczące sprzętu i odczynników, wyniki uzyskane poprzednio w laboratorium w podobnych badaniach czy nawet na podstawie długoletniej udokumentowanej praktyki analitycznej.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

W pracy podjęto próbę oszacowania niepewności typu A i B analizy etanolu metodą enzymatyczną dehydrogenazy alkoholowej (ADH) w celu stwierdzenia zasadności ich wykonywania i wykorzystania w praktyce laboratoryjnej.

Przykład szacowania niepewności typu A wyznaczonej doświadczalnie przeprowadzono dla analizy próbek 0,2‰ i 0,5‰ alkoholu etylowego w wodzie metodą ADH z wykorzystaniem odczynników firmy RANDOX [14]. W pracy zastosowano jednostkę stężenia alkoholu promil (‰), jako zwyczajowo stosowaną jednostkę określającą zawartość alkoholu w płynach biologicznych oraz ze względu na fakt stosowania jej przez ustawodawcę do zdefiniowania stanu nietrzeźwości czy stanu po użyciu alkoholu. Stężenie etanolu w płynach ustrojowych powinno być wyrażane w jednostkach układu SI, dlatego jednostka promil może być łatwo zastąpiona stężeniem masowo-objętościowym  $\text{g/dm}^3$  (1‰ alkoholu jest równy w przybliżeniu  $1 \text{ g/dm}^3$  czy  $1 \text{ mg/ml}$ ) lub niekiedy jest wyrażana w jednostkach  $\text{mmol/l}$  (1‰ alkoholu jest równy w przybliżeniu  $22 \text{ mmol/l}$ ). Przeprowadzono sześć pomiarów spektrofotometrycznych przy długości fali 365 nm próbek wody dejonizowanej z dodatkiem wzorców alkoholu etylowego o stężeniu nominalnym 0,2‰ oraz 0,5‰ (tab. I).

Tab. I. Przykład szacowania niepewności typu A - analiza próbek 0,2‰ i 0,5‰ alkoholu w wodzie metodą ADH  
 Tab. I. Example of uncertainty estimation of type A - sample analysis of 0,2‰ and 0,5‰ of alcohol in water by the ADH method

Absorbancja przy 365 nm (sześć pomiarów) Absorbance at 365 nm (six measurements)						
Stężenie nominalne Nominal concentration	I	II	III	IV	V	VI
0,2‰	0,031	0,030	0,034	0,032	0,036	0,032
0,5‰	0,075	0,077	0,076	0,076	0,073	0,079
Stężenie obliczone, ‰* Calculated concentration, ‰						
0,2‰	0,182	0,175	0,203	0,189	0,217	0,189
0,5‰	0,484	0,498	0,491	0,491	0,470	0,511
Podsumowanie Summary						
	Średnie stężenie Average concentration		Odchylenie standardowe** Standard deviation		Niepewność pomiaru*** Uncertainty	
0,2‰	0,193‰		0,015‰		0,030‰	
0,5‰	0,491‰		0,014‰		0,027‰	

\* – stężenie obliczone na podstawie krzywej kalibracyjnej alkoholu z dnia 1.09.2004 roku

\*\* – odchylenie standardowe dla sześciu pomiarów i przyjętego poziomu prawdopodobieństwa 95%

\*\*\* – niepewność pomiaru typu A równa iloczynowi współczynnika rozszerzenia  $k=2$  (dla poziomu prawdopodobieństwa 95%) oraz odchylenia standardowego

\* – the calculated concentration based on the alcohol calibration curve determined on the 1 September 2004

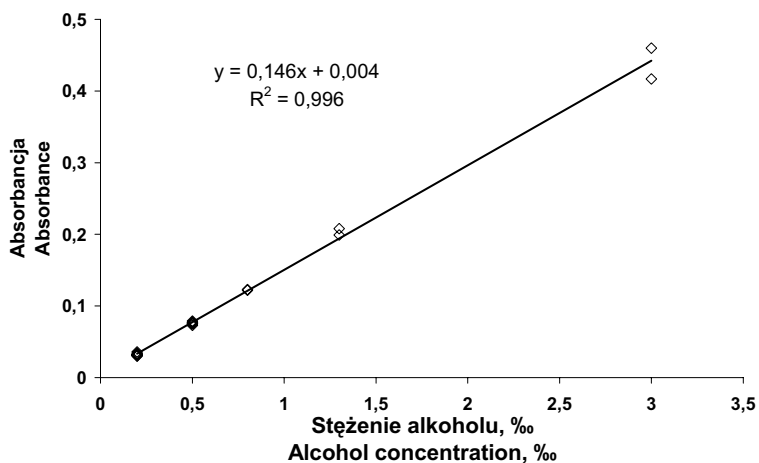
\*\* – the standard deviation for six measurements and the assumed 95% level of probability

\*\*\* – type A of uncertainty of measurements equals product of coverage factor  $k=2$  (for 95% level of probability) and standard deviation

Wartości absorbancji przeliczono na stężenia alkoholu na podstawie krzywej kalibracyjnej wyznaczonej tego samego dnia (ryc. 1).

Ryc. 1. Krzywa kalibracyjna oznaczenia alkoholu metodą ADH wyznaczona w dniu 1.09.2004 roku.

Fig. 1. Calibration curve of alcohol determination using the ADH method on the 1 September, 2004.



W podsumowaniu tabeli I przedstawiono niepewność pomiaru typu A obliczoną z iloczynu współczynnika rozszerzenia oraz wyznaczonego odchylenia standardowego.

Przykład szacowania niepewności typu B przeprowadzono dla uproszczonego układu, w którym

źródło błędów w analizie alkoholu metodą ADH ograniczono do etapów pipetowania (tabela II). Wartości dokładności i precyzji pomiarów zaczerpnięto z charakterystyki pipet dostarczonej przez producentów [3, 5-8, 11].

Tab. II. Przykład szacowania niepewności typu B – analiza alkoholu metodą ADH

Tab. II. Example of type B uncertainty estimation – alcohol analysis using ADH method

Procedura Procedure	Objętość, ml Volume, ml	Precyzja* <, ml Precision <, ml	Dokładność* ± ml Accuracy ± ml
1 Odpipetowanie 1 ml kwasu nadchlorowego	1,0	0,0100	0,0029
2 Odpipetowanie 0,1 ml badanej próbki	0,1	0,0003	0,0003
3 Odpipetowanie 2,1 ml buforu	2,1	0,0040	0,0069
4 Odpipetowanie 0,05 ml odbiałczonej próbki	0,05	0,0002	0,0002
5 Odpipetowanie 0,05 ml NAD	0,05	0,0002	0,0002
6 Odpipetowanie 0,01 ml ADH	0,01	0,0001	0,0003
7 Inkubacja 25 min w 37°C			
8 Odczyt absorbancji przy 365 nm			

\* – precyzja i dokładność odczytana ze specyfikacji producenta pipet [3, 5-8, 11]

\* – precision and accuracy taken from the specification of pipette manufacturer [3, 5-8, 11]

Należy pamiętać, iż pominięte udziały niepewności (możliwość reakcji krzyżowych alkoholi alifatycznych takich jak n-butanol czy propanol-2, wpływ zróżnicowanej lepkości płynów biologicznych na precyzję pipetowania, zmienność warunków temperatury i ciśnienia) są bardzo ważne, jednak mają większe znaczenie w przypadku wyznaczania niepewności pomiaru dla próbek biologicznych. Wykorzystując prawo propagacji błęd statystycznego rozszerzona niepewność pomiaru  $U$  będzie więc równa [2]:

$$U = k \cdot c_{sr} \sqrt{\sum \left( \frac{u_p}{V} \right)^2 + \sum \left( \frac{u_d}{V} \right)^2}$$

gdzie:

$U$  – niepewność rozszerzona typu B,

$k$  – współczynnik rozszerzenia = 2 (prawdopodobieństwo 95 %),

$c_{sr}$  – średnie stężenie alkoholu,

$u_p$  – niepewność związana z precyzją pomiaru,

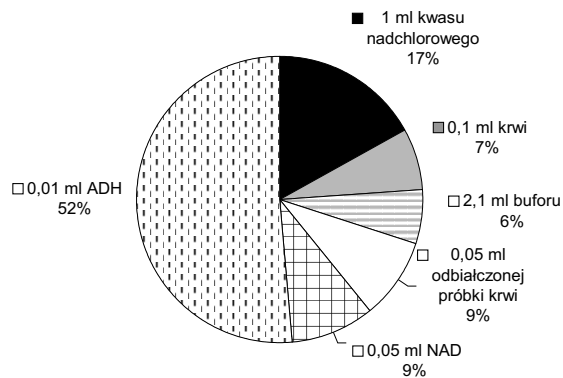
$u_d$  – niepewność związana z dokładnością pomiaru,

$V$  – objętość próbki.

Procentowy udział niepewności etapów pipetowania (precyzji i dokładności) przedstawiono na rysunku 2.

Ryc. 2. Procentowy udział niepewności etapów pipetowania (precyzji i dokładności) w trakcie analizy alkoholu metodą ADH.

Fig. 2. Percentage of uncertainty contribution of pipetting stages (precision and accuracy) during alcohol analysis using ADH method.



Z analizy tego rysunku wynika, iż największe błędy popełniane są w trakcie pipetowania 0,01 ml roztworu dehydrogenazy alkoholowej ADH (52%) oraz 1 ml kwasu nadchlorowego (17%). Zestawienie wyników szacowania niepewności typu A i B dla omawianego przykładu przedstawiono w tabeli III.

Tab. III. Porównanie szacowania niepewności typu A i B dla analizy alkoholu metodą ADH

Tab. III. Comparison of type A and B uncertainty estimation for alcohol analysis using ADH method

Stężenie nominalne Nominal concentration	Średnie stężenie Average concentration	Niepewność pomiaru Uncertainty	
		Typ A Type A	Typ B Type B
0,2‰	0,193‰	0,030‰	0,014‰
0,5‰	0,491‰	0,027‰	0,035‰

Końcową wartość niepewności rozszerzonej powinno się zapisywać tylko w postaci 2 cyfr znaczących, natomiast wynik pomiaru z taką liczbą miejsc dziesiętnych jak wartość tej niepewności [1]. Dla przykładu końcowy zapis wyniku pomiaru dla niepewności pomiarowej typu B podany w tabeli III dla zawartości nominalnej 0,5‰ alkoholu powinien być wyrażony następująco:

$$0,491 \pm 0,035 [\text{‰}]$$

Powyższy zapis wartości stężenia alkoholu może wydawać się za „dokładny”, jednak udowodniony empirycznie (metodą A) oraz teoretycznie (metodą B) błąd pomiaru w zastosowanej procedurze dał podstawy do tego rodzaju zapisu. Tak więc, arbitralnie narzucony sposób zapisu wyników oznaczeń do jednego miejsca po przecinku (w tym przypadku byłoby to 0,5‰) może nie mieć żadnego uzasadnienia statystycznego, a niekiedy może również utrudniać interpretacje wyników w opiniowaniu sądowo-lekarskim (trudność w określeniu fazy metabolizmu alkoholu w organizmie człowieka po zaokrągleniu dwóch wyników pomiaru do 1 miejsca po przecinku, np. 0,46‰ i 0,54‰ zapisane w obu przypadkach do wartości 0,5‰). Każde laboratorium indywidualnie powinno więc podawać wyniki stosownie do wyznaczonej niepewności pomiaru, jednak minimalnym wymaganiem powinno być podawanie tych wyników z co najmniej dwoma cyframi po przecinku dla stężeń do 1‰ alkoholu (ogólnie – do 2 cyfr znaczących dla wszystkich stężeń).

## WNIOSKI

Wyznaczanie niepewności typu B pozwala na skrupulatną analizę etapów procedury analitycznej i wymaga „pogłębienia” wiedzy na temat stosowanej metodyki. W podanym przykładzie duży udział procentowy błędu pomiaru dla pipetowania 0,01 ml roztworu ADH oraz 1 ml kwasu nadchlorowego sprawia, iż można podjąć dalsze kroki w celu udoskonalenia stosowanej rutynowo procedury analitycznej (np. przez zmianę stosowanych objętości odczynników lub zakup bardziej precyzyjnej i dokładnej pipety). Inną zaletą omawianego sposobu wyznaczania błędu pomiaru jest oszczędność czasu i ograniczenie kosztów analiz (szacowanie błędu można dokonać na podstawie dostępnej literatury czy specyfikacji producenta a nie żmudnej i kosztownej pracy w laboratorium). Co równie ważne szacowanie niepewności typu B daje często wyniki zbliżone do empirycznych sposobów wyznaczania niepewności pomiarowej.

Zapewnienie wysokiej jakości pracy laboratorium analitycznego wymaga spełnienia wielu kryteriów, w którym oszacowanie niepewności pomiarowej staje się kluczowym zagadnieniem. Dotyczy to zwłaszcza walidacji stosowanych metod analitycznych, stosowania certyfikowanych materiałów odniesienia, wewnętrznej i zewnętrznej kontroli jakości procedur, uczestnictwa w międzylaboratoryjnych testach porównawczych czy wreszcie akredytacji opartej o międzynarodowe normy [10].

## PIŚMIENNICTWO

1. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiska – CEEAM (2004): Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych, Politechnika Gdańska, Gdańsk.
2. Eurachem/CITAC (2000): Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Second Edition, QUAM: 2000.P1, <http://www.eurachem.ul.pt>.
3. Gilson (2003): Pipeta Distrman 1250µl, cat. no F164110, <http://www.gilson.com>.
4. Główny Urząd Miar (1999): Wyrażanie niepewności pomiaru. Przewodnik, Warszawa, <http://www.gum.gov.pl>.
5. HTL (2002): Pipeta HTL FE 100, cat. no 3666, <http://www.htl.com.pl>.

6. HTL (2002): Pipeta HTL FE 50, cat. no 3667, <http://www.htl.com.pl>.

7. HTL (2002): Pipeta HTL Minilab 100, cat. no 9.005.0000.

8. HTL (2002): Pipeta HTL Minilab 201, cat. no 5924, <http://www.htl.com.pl>.

9. ISO (1993): Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, ISBN 92-67-10188-9, Geneva.

10. ISO (1999): General Requirements for the Competence of Calibration and Testing Laboratories, ISO 17025:1999, Geneva.

11. Medlab Products (2001): Pipeta MLPette-V, Medlab Products, Warszawa.

12. NIST/SEMATECH (2003): e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>.

13. Polskie Centrum Akredytacji (2003): Polityka Polskiego Centrum Akredytacji dotycząca zapewnienia spójności pomiarowej, wydanie 2, PCA DA-06, Warszawa, 12.05.2003, <http://www.pca.gov.pl>.

14. RANDOX (2004): Blood alcohol in blood, serum and urine, cat. no BA106, v.3.

Adres pierwszego autora:

Marek Wiergowski  
Katedra i Zakład Medycyny Sądowej  
Akademii Medycznej w Gdańsku  
ul. Skłodowskiej-Curie 3a  
80-210 Gdańsk