



Univerzita Palackého
v Olomouci

**Validace a verifikace
postupů měření**


© David MILDE, 2019



Univerzita Palackého
v Olomouci


**Volba optimální metody
(optimálního postupu)**

© David MILDE, 2019


 Univerzita Palackého
v Olomouci

„Návod“

1. **Identifikace problému zákazníka + požadovaná informace:**
 - kvalitativní či kvantitativní analýza,
 - požadavek legislativy, existují limity,
 - jaká je měřená veličina.
2. **Identifikace faktorů, které je nutné posuzovat (viz dále).**
3. **Volba metody (postupu měření):**
 - vyhledání vhodných metod v literatuře,
 - vyhledání v normách – vhodný rozsah,
 - modifikace existujících metod v laboratoři.
4. **Provedení validace postupu měření (metody).**
 - volba rozsahu validace – výkonnostní charakteristiky,
 - identifikace a případné odstranění interferencí,
 - vzorkování – volba strategie, množství vzorku, skladování vzorků,
...


 Univerzita Palackého
v Olomouci

Zvažované faktory (ad 2)

- Typ vzorku a jeho množství
- Analyt (měřená veličina) a matrice
- Cena a doba analýzy
- Dostupné laboratorní vybavení
- Rozsah laboratorních operací
- Rozsah validace:
 - Požadovaná mez detekce a mez stanovitelnosti
 - Požadovaná pravdivost a preciznost
 - Pracovní rozsah
 - Selektivita
- Požadavky na bezpečnost práce

- **Př.:** stanovení obsahu Cu v rudě může být provedeno titrací nebo pomocí AAS. Který postup a kdy zvolíte?



Univerzita Palackého
v Olomouci

Validace – úvod

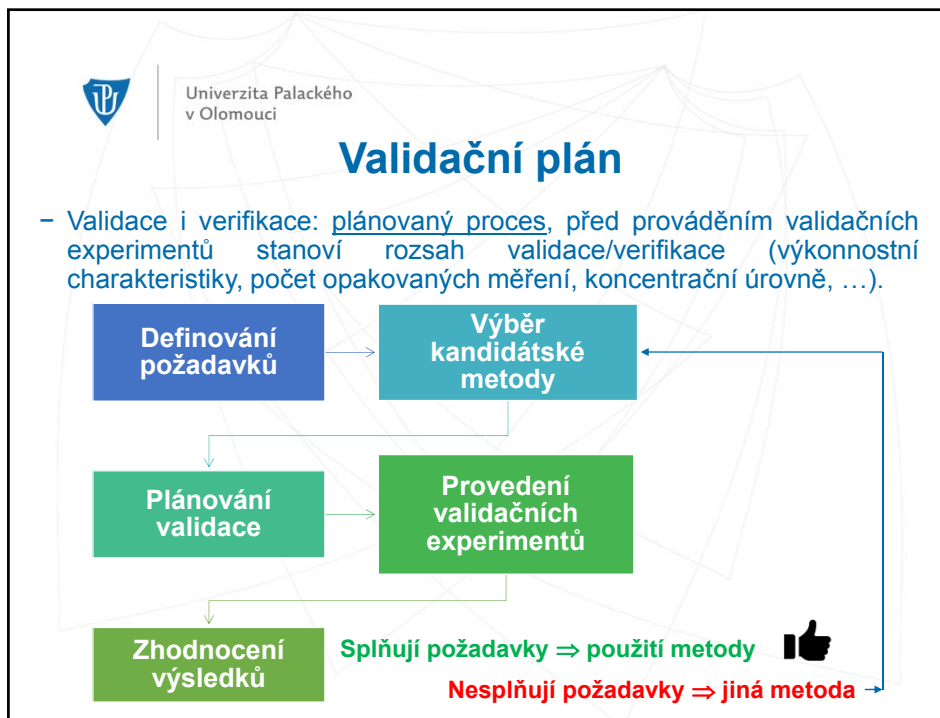
- Laboratoř musí používat vhodné postupy měření, tedy takové, které umožňují zvládnout požadavky, jež jsou na měření stanoveny.
- VALIDACE postupu měření (= metody) prokazuje, že postup je ‚vhodný pro daný účel‘, např. pro stanovení boritanů ve vodě v koncentračním rozsahu od 0,01 mg do 1 mg boru v litru s relativní rozšířenou nejistotou do 10 %.
- ISO/IEC 17025 uvádí: *Laboratoř musí validovat nestandardní metody, laboratorní metody vyvinuté laboratoří a standardní metody používané mimo určený rozsah nebo jinak upravené.*
- Laboratoř může použít validovaný postup měření, který byl např. publikován jako norma – základní validace již provedena, ALE laboratoř musí potvrdit, že je schopna metodu aplikovat – tj. provádí tzv. VERIFIKACI = určité experimenty, které prokáží, že daná metoda funguje v konkrétní laboratoři.

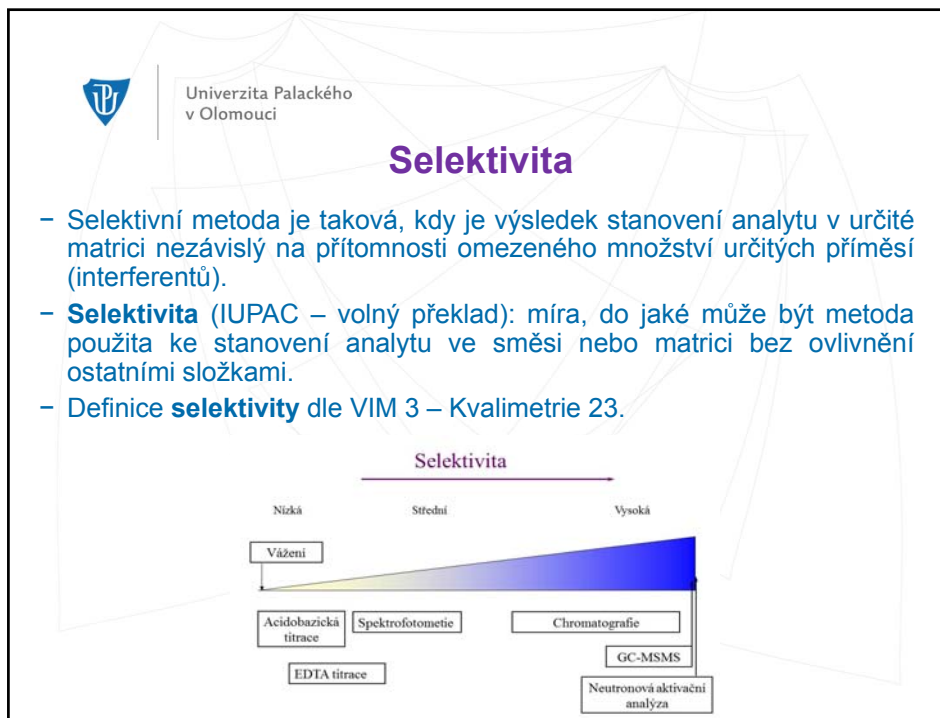
Univerzita Palackého
v Olomouci

Validace – úvod

- Definice **validace** (VIM 3): „Ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.“
 - PŘÍKLAD Postup měření, běžně používaný pro měření hmotnostní koncentrace dusíku ve vodě, smí být také validován pro měření v lidské plazmě.
- Definice **verifikace** (ověření): „Poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky.“
- Oba termíny poukazují na proces ověření výkonnosti zkušební metody, abychom zjistili, zda je schopna poskytovat výsledky vhodné pro konkrétní účel.
- Dva přístupy k validaci:
 - **Mezilaboratorní validace** – založena na mezilaboratorním experimentu = společná studie více laboratoří, používá se pokud má být vyvíjena metoda široké uplatnění (např. jako norma)
 - **Vnitrolaboratorní validace** – měření v jediné laboratoři, která metodu potřebuje.

⇒ pouze touto validací se budeme zabývat







Univerzita Palackého
v Olomouci

Selektivita

- **Selektivitu lze ověřit:**
 - analýzou čistého analytu a vzorku obsahující analyt a možné interferenty:
 - ověřuje se významnost vlivu,
 - může být součástí studia robustnosti.
 - analýzou dobře charakterizovaného materiálu (CRM),
 - studií odezvy přístroje pro různé vzorky.
- **Selektivita metody se mění v závislosti na koncentraci stanovovaného analytu.**
- **K porovnání míry selektivity různých metod lze použít koeficient selektivity.**



Univerzita Palackého
v Olomouci

Selektivita

- **Signál vzorku:**

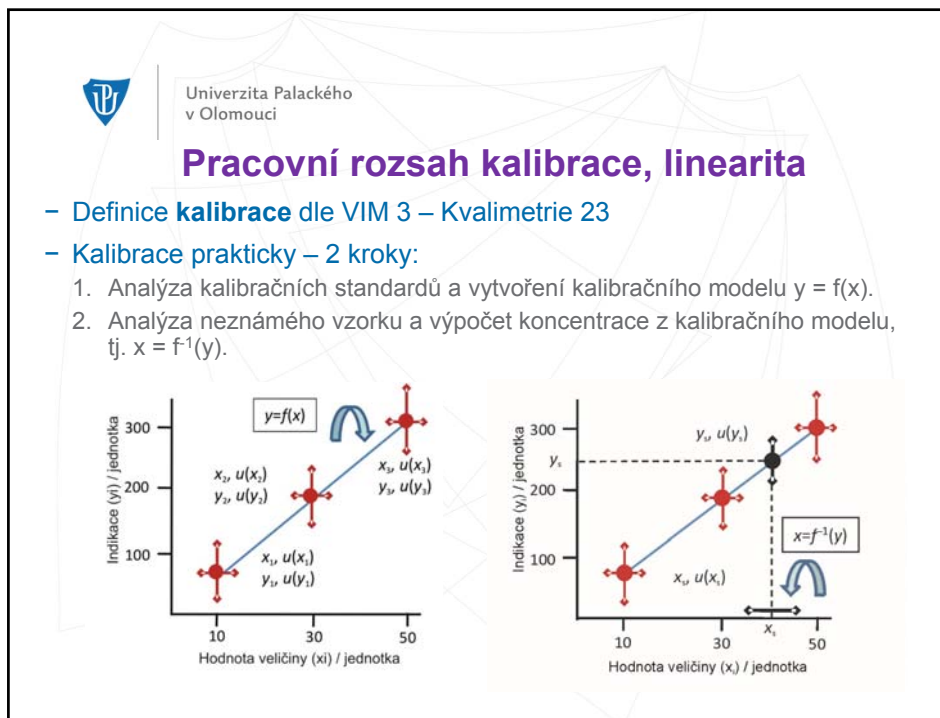
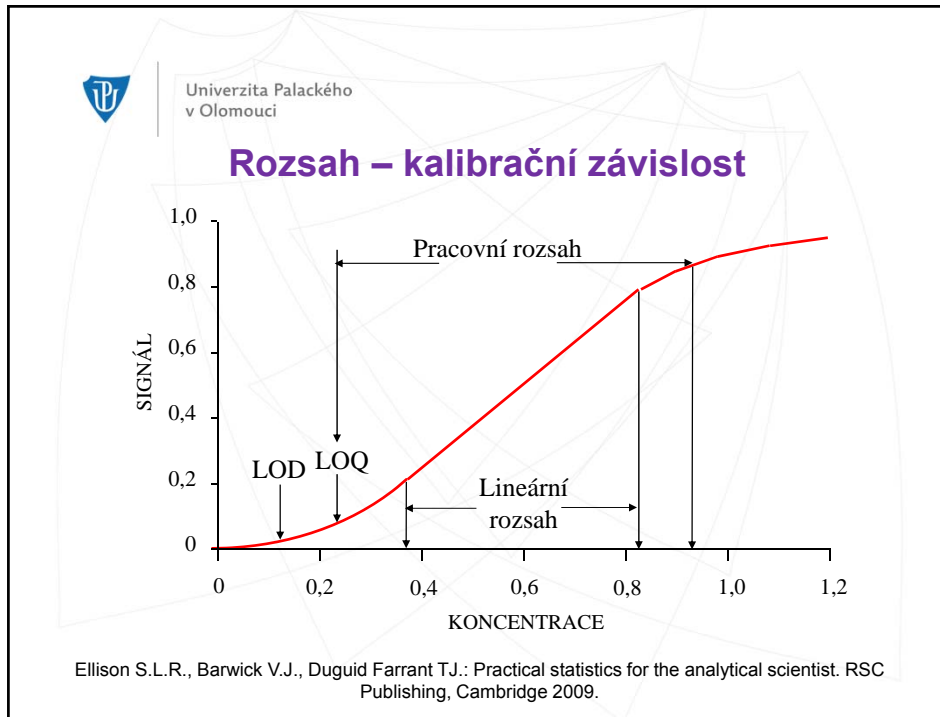
$$S_{\text{vzorek}} = k \cdot c_A - \text{citlivost} \times \text{koncentrace analytu}$$

$$S_{\text{vzorek}} = S_A + S_I = k_A \cdot c_A + k_I \cdot c_I$$

citlivosti a koncentrace Alytu a Interferentu

$$S_{\text{vzorek}} = k_A (c_A + K_{A,I} \cdot c_I)$$
- **Koeficient selektivity ($K_{A,I}$) – míra citlivosti metody na přítomnost interferentu (kladné i záporné hodnoty)**

$$K_{A,I} = k_I/k_A$$
 - Je-li $K_{A,I}$ větší než +1 či menší než -1 je metoda selektivnější k interferentu než analytu.





Univerzita Palackého
v Olomouci

Mez detekce, mez stanovitelnosti

- **Mez detekce (Limit of Detection, LOD):**
 - má metrologickou definici (dle VIM 3) – KVALIMETRIE 23,
 - nejnižší množství analytu ve vzorku, které je možné detekovat (odlišit od slepého pokusu/šumu), ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota.
- **Mez stanovitelnosti (Limit of Quantification, LOQ)**
 - nemá metrologickou definici, dána konvencí,
 - nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou nejistotou.
- Vzhledem k různým používaným konvencím v literatuře a praxi se doporučuje jasně specifikovat, který postup byl pro výpočet LOD a LOQ použit.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Výpočet LOD, LOQ

- Existuje více způsobů výpočtu LOD a LOQ.
- Nejrozšířenější způsob: 6-10× analýza slepého pokusu a výpočet směrodatné odchylky.
- Slepý pokus musí zahrnovat celý postup měření!

Kalibrační rovnice: $y = b_0 + b_1 \times c$

$$y_{LOD} = y_{bl} + 3s_{bl} \rightarrow c(LOD) = (y_{LOD} - b_0) / b_1$$

$$y_{LOQ} = y_{bl} + 10s_{bl} \rightarrow c(LOQ) = (y_{LOQ} - b_0) / b_1$$

y_{bl} = signál slepého pokusu

s_{bl} = směrodatná odchylka signálu blanku



Univerzita Palackého
v Olomouci

Př.: výpočet LOD a LOQ

Vypočtete mez detekce a mez stanovitelnosti pro metodu stanovení Fe pomocí o-fenantrolinu (spektrofotometricky). Opakovaná analýza slepého pokusu poskytla tyto hodnoty absorbance (Abs): 0; 0,002; 0,001; -0,001; 0,003; 0,001; 0,002; -0,002; 0,001; 0.

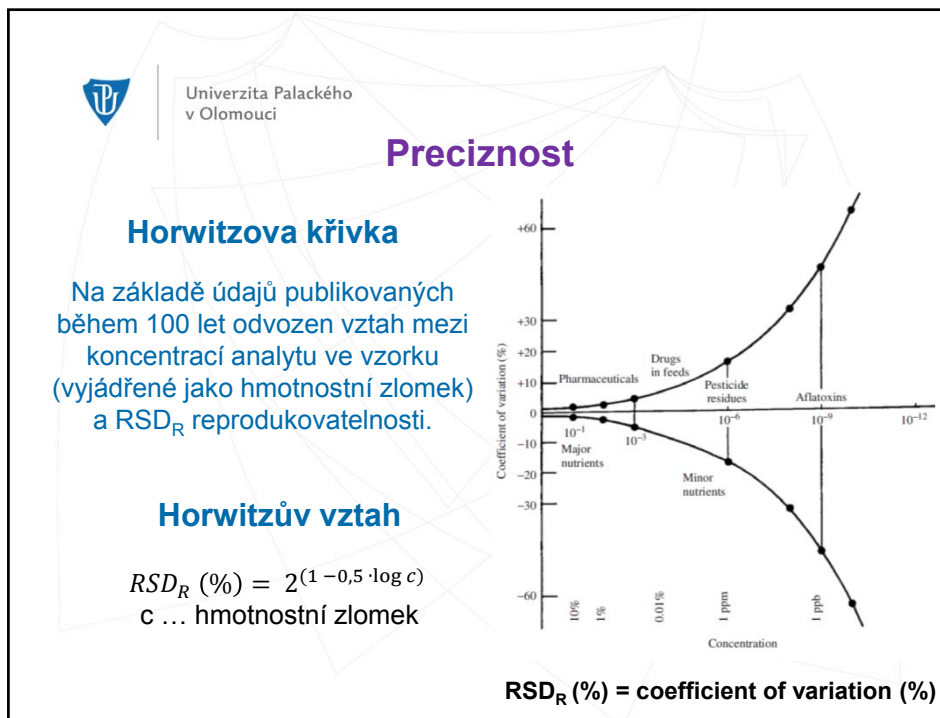
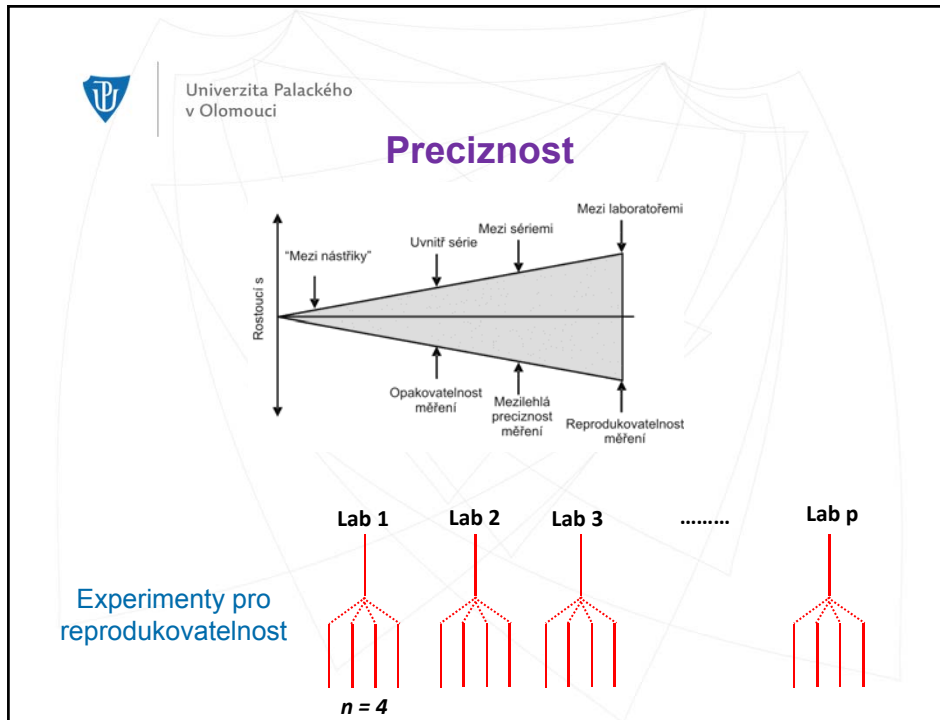
Kalibrační závislost je přímková, prochází počátkem a je popsána rovnicí $Abs = 7,8 \cdot 10^{-3} x$, kde x je hmotnost Fe v μg .



Univerzita Palackého
v Olomouci

Preciznost

- Proveďte se opakované měření (6-15×) CRM, vnitrolaboratorního RM nebo jiného stabilního vzorku a vypočíte se směrodatná odchylka (nebo RSD) obvykle následovně:
 - Stejný analytik, stejný přístroj, stejná laboratoř, krátké časové rozmezí → OPAKOVATELNOST.
 - Různí analytikové, popř. různé přístroje, stejná laboratoř, různé koncentrace, dlouhé časové rozpětí → MEZILEHLÁ PRECIZNOST.
 - Různé laboratoře v režimu mezilaboratorního testu, různé koncentrace → REPRODUKOVATELNOST.
- Preciznost se ověřuje na více koncentračních úrovních!





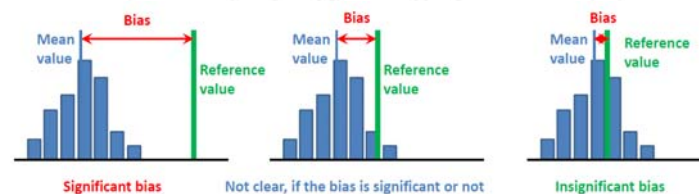
Univerzita Palackého
v Olomouci

Pravdivost – vychýlení

- Pravdivost (ne/přítomnost vychýlení – bias) validujeme:
 - pomocí opakované analýzy CRM (nebo jiného laboratorního etalonu),
 - testováním výtěžnosti,
 - srovnáním výsledků získaných jinou (nezávislou) metodou,
 - z výsledků mezilaboratorního porovnání.
- Vychýlení b lze vyjádřit v absolutním měřítku nebo relativně v %:

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad b (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

- Jde o porovnání průměrné hodnoty výsledků kandidátské metody (\bar{x}) s vhodnou referenční hodnotou x_{ref} .



Univerzita Palackého
v Olomouci

Př.: výpočet vychýlení z analýzy CRM

Certifikovaná hodnota cholesterolu v CRM je $274,7 \pm 9,0$ mg ve 100 g. Opakovaná analýza tohoto CRM v laboratoři poskytla tyto výsledky : 271,4; 266,3; 267,8; 269,6; 268,7; 272,5; 269,5; 270,1; 269,7; 268,6 a 268,4 mg/100 g. Vypočítejte absolutní a relativní hodnotu vychýlení pro použitou metodu stanovení cholesterolu. Vypočítejte také preciznost.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Testování výtěžnosti (pravdivost)

- Výtěžnost je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu či složky a vzorku bez přídavku a přidaného množství. Udává míru schopnosti metody postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku.
- Matematicky je výtěžnost R_f definována jako poměr:

$$R_f = \frac{c_{obs}}{c_{ref}}$$

$$R_f(\%) = \frac{c_{obs}}{c_{ref}} \times 100$$

- c_{obs} odpovídá pozorovanému obsahu (množství, koncentraci),
- c_{ref} odpovídá skutečné hodnotě obsahu (množství, koncentraci)
- Výtěžnost je vhodné ověřovat na několika koncentračních úrovních (alespoň na 2).
- Výtěžnost by měla být 100 % a laboratoř si musí nastavit meze, ve kterých je hodnota výtěžnosti akceptovatelná:
 - běžně v intervalu 80-120 %,
 - u stopové analýzy může být interval širší (např. 60-140 %)
 - u analýzy hlavních složek užší (např. 90-110 %).



Univerzita Palackého
v Olomouci

Př.: test výtěžnosti

1. Vzorek vody bez obsahu léčiv byl spikován standardem léčiva Venlafaxinu o koncentraci 50 ng l⁻¹. Naměřené hodnoty byly následující: 52,7; 52,6; 52,7; 51,6; 52,5; 51,6; 53,5. Jaká je výtěžnost metody stanovení Venlafaxinu.
2. Ověřte výtěžnost stanovení Cl⁻ ve vodě. Do 500 ml baňky bylo odpipetováno 5 ml standardu Cl⁻ o c = 25000 ppm a doplněno vzorkem po rysku. Analýza „spikovaného“ vzorku poskytla výsledek 409 ppm a analýza samotného vzorku 183 ppm.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Porovnání metod (pravdivost)

- Porovnání metod se při validaci používá ve dvou případech:
 - zavádí se nová metoda a srovnává se s používanou (referenční) metodou,
 - hodnocení pravdivosti.
- K vyhodnocení výsledků z porovnání 2 metod se používají grafické a statistické přístupy. Mezi statistické patří Studentovy testy – test shodnosti a párový test a regresní analýza.
- Podrobněji představíme hodnocení s využitím nejistoty měření. (Jedná se o obdobu testu vychýlení používanou u CRM.)
 - Výsledky dvou metod lze považovat za shodné platí-li následující nerovnost:

$$|\bar{x}_A - \bar{x}_B| \leq 2 \cdot \sqrt{u_A^2 + u_B^2},$$

kde \bar{x}_A je průměr z analýz metodou A, u_A je standardní nejistota měření metody A; \bar{x}_B je průměr z analýz metodou B, u_B je standardní nejistota měření metody B.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Př.: porovnání metod (pravdivost)

Koncentrace pesticidu procymidonu ve vzorku vína byla v laboratoři stanovena dvěma metodami, které poskytly následující výsledky. Zjistěte, zda je možné považovat výsledky obou metod za kompatibilní.

Metoda A: $26,9 \pm 2,7 \mu\text{g l}^{-1}$ (rozšířená nejistota, $k = 2$)

Metoda B: $30,7 \pm 4,9 \mu\text{g l}^{-1}$ (rozšířená nejistota, $k = 3$)



Univerzita Palackého
v Olomouci

Robustnost

- **Robustnost** analytického postupu je míra jeho schopnosti zůstat neovlivněným malými změnami v parametrech postupu či složení vzorku.
- **Test robustnosti** – Blackett-Burmanův experiment (vliv 7 parametrů, teoreticky 128 kombinací) – provede se pouze 8 experimentů.
- Kritické parametry měření a jejich tolerance musí být známy pro každý analytický postup (např.: pH, teplota, čistota a stáří činidel, vlhkost). V testu se zkoušejí pozměněné objemy, časy, navážky, vlivy různých šarží činidel apod.

Parametry	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Výsledky měření	s	t	u	v	w	x	y	z



Univerzita Palackého
v Olomouci

Postup testování robustnosti

- Výpočet kontrastů:

$$V_A = 1/4(s + t + u + v) - 1/4(w + x + y + z)$$

$$V_B = 1/4(s + t + w + x) - 1/4(u + v + y + z)$$

$$V_C = 1/4(s + u + w + y) - 1/4(t + v + x + z)$$

$$V_D = 1/4(s + t + y + z) - 1/4(u + v + w + x)$$

$$V_E = 1/4(s + u + x + z) - 1/4(t + v + w + y)$$

$$V_F = 1/4(s + v + w + z) - 1/4(t + u + x + y)$$

$$V_G = 1/4(s + v + x + y) - 1/4(t + u + w + z)$$

- Test robustnosti spočívá v testu hypotézy $H_0: V_i = 0$ předpokládající, že všechny kontrasty jsou nulové oproti $H_1: V_i \neq 0$. Test provedeme výpočtem konfidenčního intervalu (L_{12}) kontrastů:

$$L_{12} = V_i \pm 2,365 \frac{s}{\sqrt{2}}$$

- Obsahuje-li konfidenční interval bod 0, potom je kontrast statisticky nevýznamný a měřicí postup je pro daný parametr robustní.



Univerzita Palackého
v Olomouci

Př.: testování robustnosti

Otestujte robustnost spektrofotometrického stanovení PO_4^{3-} ve vodách, které se provádí vybarvením vzorku vody 5 ml směsného činidla, které se připravuje těsně před stanovením z H_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$, askorbové kyselina a vlnanu antimonylo-draselného. Absorbance se měří při 690 nm. Byly testovány tyto faktory:

označení faktoru	faktor	hladina 1	hladina 2
A/a	množství směs. činidla	5 ml	5,25 ml
B/b	stáří roztoku molybdenanu	čerstvý	3 týdny
C/c	stáří roz. kys. askorbové	čerstvý	3 týdny
D/d	pH vzorku vody	7	2
E/e	interference SiO_2	0 μg	100 μg
F/f	interference NO_2^-	0 μg	20 μg
G/g	interference NO_3^-	0 μg	20 μg



Univerzita Palackého
v Olomouci

Rozsah validace

Parametr	Druh analýzy			
	Kvalitativní	Hlavní složky	Stopová analýza	Fyzikální vlastnosti
Selektivita	✓	✓	✓	✓
Preciznost		✓	✓	✓
Pravdivost / vychýlení		✓	✓	✓
Mez detekce	✓		✓	
Mez stanovitelnosti			✓	
Pracovní rozsah		✓	✓	✓
Robustnost	✓	✓	✓	✓



Univerzita Palackého
v Olomouci

Př.: stanovení Pd v API

– Postup:

1. **Validační protokol:** experimenty, akceptační kritéria
2. Provedení **validačních experimentů**
3. **Validační zpráva:** vyhodnocení, srovnání s kritérii

Charakteristika	Akceptační kritérium	Výsledek
Linearita	$R \geq 0,99$	$R = 0,9998$
Rozsah	$LOQ - 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$	$1,17 - 1000 \mu\text{g.L}^{-1}$
LOD	$\leq 0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$	$0,57 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n = 10)
LOQ	$\leq 1,8 \mu\text{g.L}^{-1}$	$1,17 \mu\text{g.L}^{-1}$ (n = 10)
Pravdivost (recovery)	70 – 150 %	104,7 – 109,5 % (3 levels)
Opakovatelnost	$RSD < 20 \%$	$< 5,2 \%$ (n = 6)
Mezilehlá preciznost	$RSD < 25 \%$	$< 7,9$ (n = 2×6)
Selektivita	výtěžnost 70 – 150 %	92,9 – 115,3 % (^{105}Pd , ^{108}Pd)
Robustnost	výtěžnost 70 – 150 %	107,7 – 119,2 %



Univerzita Palackého
v Olomouci

Validace – shrnutí

- **VALIDACE** metody = potvrzení platnosti vyhodnocením výkonnostních charakteristik.
- **Zlatá pravidla validace:**
 - validovat celou metodu (všechny kroky postupu/metody),
 - validovat celý rozsah koncentrací,
 - validovat v rozsahu všech uvažovaných matic.
- Rozsah validačních charakteristik se liší podle aplikace.
- Validační studii je třeba plánovat a provádět v souladu s požadavky.
- Validace umožní rozhodnout o vhodnosti metody na základě objektivních výsledků.
- **VERIFIKACE** – zavádění/ověření již validované metody do laboratoře.