



Kvalita a spolehlivost analytických dat, management kvality

Pavel Janoš



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Způsobilost analytických laboratoří

Systemy jakosti (kvality) v analytických laboratořích



Základní pojmy z oblasti jakosti

- **JAKOST/KVALITA** – stupeň splnění požadavků souborem inherentních znaků. (ISO 9000:2000)
- **JAKOST/KVALITA** - celkový souhrn vlastností a znaků výrobku nebo služby, které mu/ji dávají schopnost uspokojovat předem stanovené nebo předpokládané potřeby. (ISO 8402)
 - "fitness for use" - způsobilost k užití (Juran)
 - "Preiswertigkeit" - hodnota odpovídající ceně (Gubeaux)

Nezaměňovat s pojmem TŘÍDA.



Jak dosáhnout kvalitních produktů?

Kontrola jednotlivých produktů

vs.

zavedení systému jakosti



Systemy jakosti (v souvislosti s laboratořemi)

- normy ISO 9000
- norma ČSN EN ISO/IEC 17 025
- GLP (SLP) – správná laboratorní praxe

GLP - Good Laboratory Practice

GLP - Give me a Lot of Paper



AKREDITACE

- postup, na jehož základě vystavuje ústřední orgán oficiální uznání, že organizace nebo osoba jsou způsobilé k vykonávání určitých činností
- oficiální uznání, že zkušební laboratoř je způsobilá provádět určité zkoušky nebo určité druhy zkoušek
- Národním akreditačním orgánem je **Český institut pro akreditaci (ČIA)**



AUTORIZACE

- pověření zkušební laboratoře státním orgánem pro činnost v regulované oblasti
- „nadstavba“ akreditace
- udělují různé orgány, např. ministerstva



CERTIFIKACE

- činnost třetí strany prokazující shodu vlastností certifikovaného výrobku (služby, ...) s určenými normami, technickými dokumenty, právními předpisy. Postup, kterým poskytuje třetí strana písemné ujištění ...
 - certifikace výrobků
 - certifikace systému jakosti
 - certifikace osob



SPRÁVNÁ LABORATORNÍ PRAXE

- systém pro zabezpečení vysoké jakosti a věrohodnosti výsledků laboratorních studií stanovením podmínek, za nichž jsou laboratorní studie plánovány, řízeny, prováděny, zaznamenávány, dokumentovány a archivovány.
- - regulovaná oblast, testování léčiv ... U nás v souvislosti se zákonem o chemických látkách a přípravcích.



Porovnání systémů jakosti z hlediska využití v analytických laboratořích

- ✓ **ISO 9000:** Systémy jakosti zaváděné především ve výrobních podnicích. Mohou zahrnovat i fázi výzkumu a vývoje. Pro účely analytických laboratoří příliš obecné.
- ✓ **ČSN EN ISO/IEC 17 025:** Typické pro laboratoře provádějící rutinní zkoušky. Nejrozšířenější v analytických laboratořích. Akreditace se provádí prakticky výlučně podle této normy. „Výstupem“ akreditované laboratoře je protokol s výsledky zkoušek (někdy se ovšem používají i jiné názvy). Systém jakosti podle ISO/IEC 17 025 je kompatibilní se systémy jakosti podle ISO 9000



GLP (SLP)

System zabezpečování jakosti zaměřený na určitou studii - původně testování léčiv, postupně se rozšiřuje do oblastí studia bezpečnosti látek a přípravků, testování chemických látek, vlivu na zdraví a životní prostředí ... Rozdíl oproti akreditované laboratoři (ISO/IEC 17 025) - nejedná se (většinou) o opakované, sériové zkoušky. Prvky systému jakosti jsou podobné, jako u laboratoří akreditovaných podle ISO/IEC 17 025. Pracuje se podle předem daných směrnic (SOP - Standardní operační procedury). „Výstupem“ je tedy studie (výzkumná zpráva, ...).



Prvky systému jakosti (managementu systému kvality)

- ZABEZPEČOVÁNÍ JAKOSTI - QUALITY ASSURANCE (QA)
(Zabezpečování důvěry v jakost, prokazování jakosti) - všechny plánované a systematické činnosti nutné pro dosažení přiměřené důvěry, že výrobek nebo služba uspokojí dané požadavky na jakost.
- OPERATIVNÍ ŘÍZENÍ JAKOSTI - QUALITY CONTROL (QC) -
operativní metody a činnosti používané ke splnění požadavků na jakost.



QA/QC

QA

- vhodné laboratorní prostředí
- vzdělání, vycvičení a kvalifikovaní pracovníci
- kalibrace a údržba zařízení
- dokumentace a validace pracovních (zkušebních) postupů
- preventivní opatření a opatření k nápravě
- interní audity a přezkoumání
- postupy pro řešení stížností, zpětná vazba od zákazníků apod.

QC

- analýza referenčních materiálů
- analýza anonymních vzorků
- kontrolní vzorky a vyhodnocení kontrolních analýz, regulační diagramy
- analýza slepých vzorků
- analýza vzorků s přidavkem (spiked)
- analýza duplicitních vzorků
- zkoušení způsobilosti



Dokumentace systému jakosti

- Příručka kvality (jakosti)
- Organizační aj. směrnice, metrologický řád apod.
- Pracovní postupy, SOP
- Pomocná dokumentace, formuláře apod.

Dělat jen to, co je psáno - vše co dělám, zapsat



Nejistota měření

Nejistota se vyjadřuje ve formě intervalu, o němž můžeme s dostatečně vysokou pravděpodobností předpokládat, že v něm leží správná hodnota. (Obdoba intervalu spolehlivosti.)

Např.:

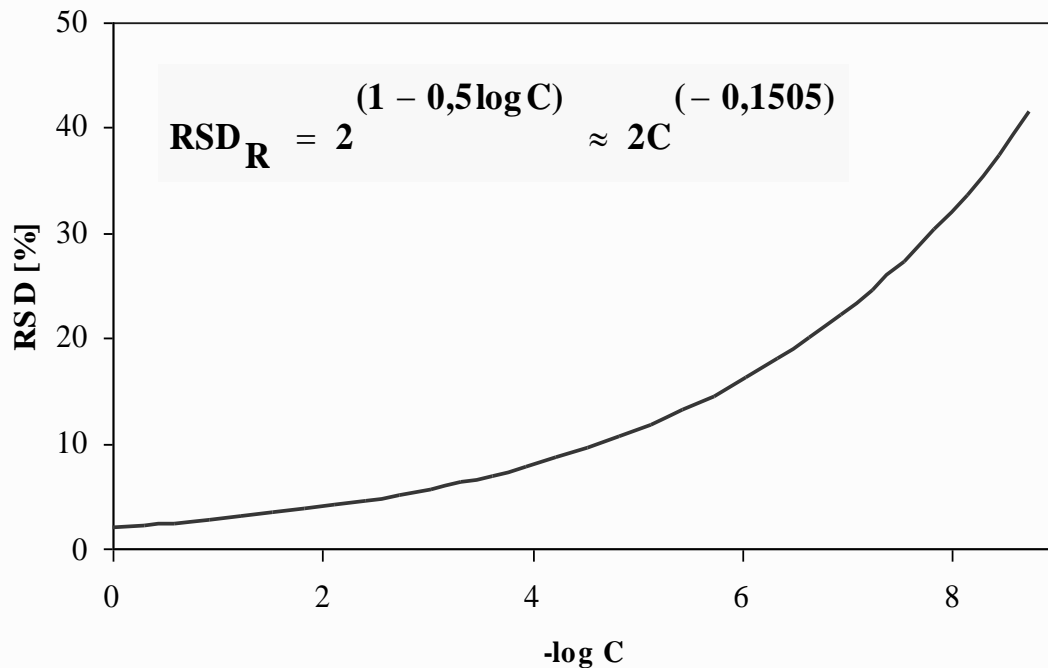
$$c(\text{NO}_3^-) = (48,6 \pm 0,7) \text{ mg/l}$$

Celková nejistota se skládá z mnoha dílčích příspěvků



Vztah mezi přesností (nejistotou) stanovení a koncentrací analytu

Horwitzova křivka



Validací rozumíme

získání důkazu ve formě dokumentace, který poskytuje vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci

- experiment
- dokumentované údaje
- rozhodnutí, že metoda je vhodná pro daný účel



Validace analytické metody/postupu

- Plánovaný a dokumentovaný postup pro stanovení výkonnostních charakteristik (validačních parametrů) s cílem posouzení vhodnosti pro daný účel.
- Souvislost s vyhodnocením nejistoty – jeden z prostředků pro odhad nejistoty (ovšem nejistota je parametr přidružený k výsledku)



Charakteristiky chemického měřicího procesu (výkonnostní charakteristiky ověřované při validaci/verifikaci)

(Podle EURACHEM Guide 2014)

- **pravdivost (bias)**
- **preciznost** (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- **pracovní rozsah** (linearita)
- **mez detekce**
- **mez stanovitelnosti**
- **selektivita** (specifičnost)
- **citlivost**
- **robustnost**
- (nejistota)

Výběr v závislosti na kategorii metody



Standardizované (normalizované) vs. nenormalizované metody a validace

Obecný požadavek ČSN EN ISO/IEC (čl. 5.4.2):

Laboratoř musí používat takových metod ..., které splňují potřeby zákazníka a které jsou vhodné pro zkoušky, které laboratoř provádí.

Přednostně se musí použít metody, které jsou vydány jako mezinárodní, regionální nebo národní normy.



Normy v analytické laboratoři

- Systém managementu kvality (ČSN EN ISO/IEC 17025)
- Uvádějíci postup při analýze a souvisejících činnostech
- Stanovující požadavky na zkoušený materiál

Normy mezinárodní (ISO, IEC), evropské (EN), národní (ČSN, DIN, GOST).

Normy jsou nezávazné. Závaznými se mohou stát např. na pokyn ministerstva.

Normy mj. umožňují vyvázat se ze zodpovědnosti za produkt (službu)



Standardní metoda

„Standard method means a method developed by a standardization body or other well established organizations whose methods are generally accepted by the technical sector in question“

ILAC G18 2000



ISO 17025

... Pokud zákazník nespecifikuje metodu ..., pak musí laboratoř zvolit vhodné metody, které byly publikovány buď jako mezinárodní, regionální nebo národní normy, nebo které byly zveřejněny uznávanými odbornými organizacemi, nebo které byly publikovány ve významných vědeckých publikacích nebo časopisech, nebo které byly specifikovány výrobcem zařízení. ...



Normám podobné předpisy

- [AOAC Official Methods of Analysis - AOAC International](#)
- Pharmacopedia
- Český lékopis 2017
- Podnikové, oborové, koncernové aj.



Požadavky ISO 17025 (volně)

... Pokud je nezbytné použít metody neuvedené v normách ... po dohodě se zákazníkem ... metody vyvinuté v laboratoři.

... Smí být používány též vlastní metody laboratoře, nebo metody laboratoří převzaté, pokud jsou pro zamýšlené použití vhodné a pokud jsou validovány.

...Vyvinuté metody musí být před použitím odpovídajícím způsobem validovány.

Normalizované metody validovány být nemusí

ALE

... Před zahájením provádění zkoušek musí laboratoř potvrdit, že je schopna normalizované metody řádně používat



Požadavky ISO 17025 (shrnutí)

Laboratoř musí validovat

- Metody neuvedené v normách
 - Laboratoři navržené/vyvinuté metody
 - Normalizované (standardizované) metody modifikované anebo rozšířené (mimo zamýšlený rozsah)
-
- Validace musí být tak rozsáhlá, jak je to nezbytné pro dané použití
 - Laboratoř musí zaznamenat získané výsledky, postup a vyjádření, zda je metoda vhodná pro zamýšlenému použití



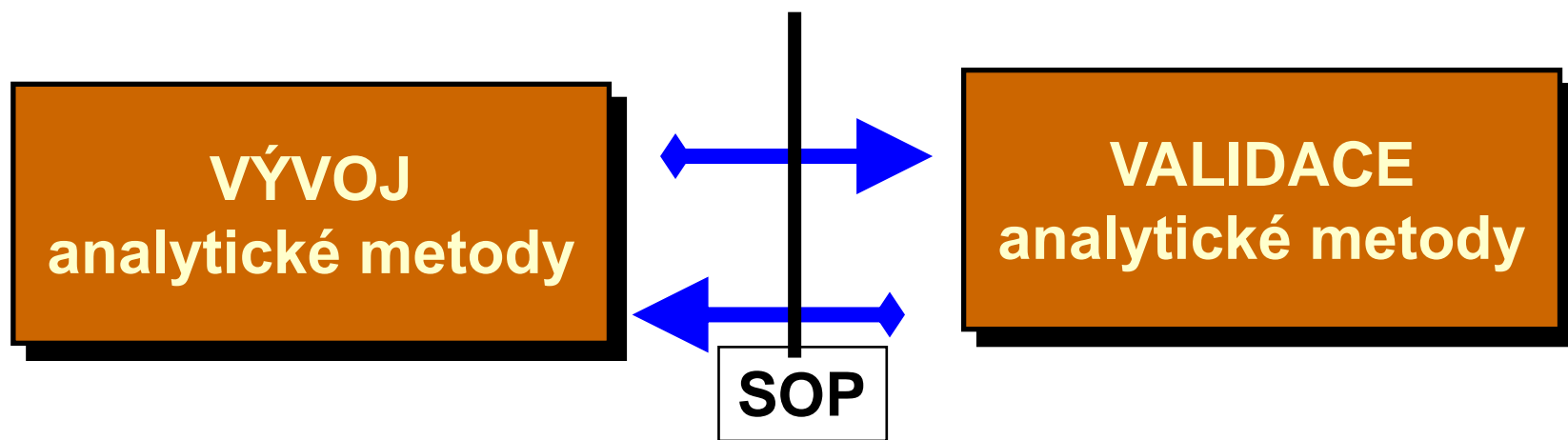
Pro koho je validace:

- pro zákazníky
laboratoře
- pro vedení laboratoře

K čemu je validace:

- jednání se zákazníky
- přezkoumání zakázek
- odhad nejistoty
- návrh QC
- návrh způsobu kalibrace
- atd.





Zlatá pravidla validace

- validovat celou metodu
- validovat celý rozsah koncentrací
- validovat v rozsahu všech uvažovaných matic

Analýza
rizik

mezilaboratorní validace - vnitřní validace

- **Kdo provádí validaci metody?**
 - odpovědnost laboratoře
 - problémy mezilaboratorního experimentu
- **Validace standardních, oficiálních metod**
 - určitý stupeň validace je vždy třeba **OVĚŘENÍ**
 - zda laboratoř je schopna dosáhnout deklarovanou výkonnost metody
 - prokázat způsobilost analytika
 - prokázat způsobilost zařízení a prostředí
- **Revalidace**
 - změna postupu vedoucí k změně parametru přesahující rozsah
 - změna matrice vzorku
 - změna typu instrumentace
 - řízení kvality indikuje, že systém se dostává mimo kontrolu



Mezilaboratorní validace

- **Zajišťuje tvůrce standardizovaného postupu**
- **Kriteria pro výběr metody (příklad, rezidua pesticidů, Codex Alimentarius):**
 - publikace v knihách, manuálech, uznávaných časopisech
 - dostupnost výsledků mezilaboratorního porovnání nebo validace ve velkém počtu laboratoří
 - schopnost stanovení více než jednoho analytu
 - schopnost stanovení analytu na požadované úrovni (LOQ) pro co největší počet komodit
 - použitelnost v oficiálních laboratořích provádějících rutinní analýzy

Klasifikace metod z hlediska požadavků na validaci

(příklad z oblasti stanovení reziduí pesticidů, FAO, 1998)

- **I. Definitivní (definující) metody**
- **II. Referenční metody**
- **III. Alternativní schválené metody**
- **IV. Prozatímní metody (např. semikvantitativní, screeningové)**

U metod třídy I. – III. se stanovuje reprodukovatelnost pomocí mezilaboratorní studie. Ta obvykle zahrnuje nejméně 5 typů vzorků, studie se má zúčastnit nejméně 8 laboratoří.

Podobný přístup aplikuje AOAC. V požadavcích ISO 17025 se tento přístup neprojevuje.



Organizace mezilaboratorní studie

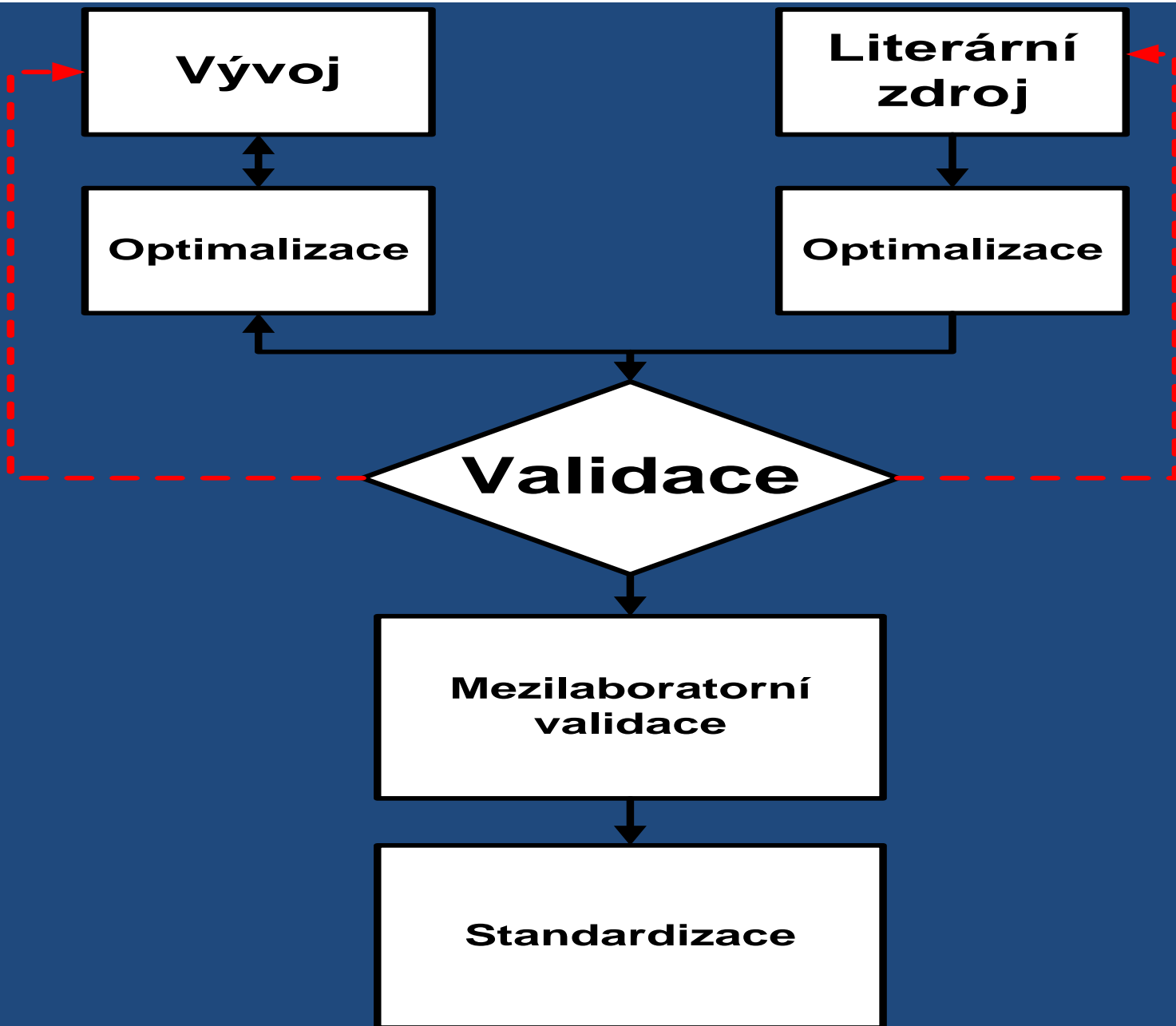
(viz např. ČSN ISO 5725-2)

- a) **Předběžné úvahy**
- b) **Příprava experimentu, formuláře, záznamy, ...**
- c) **Získávání laboratoří**
- d) **Příprava materiálů**
- e) **Distribuce materiálů**
- f) **Shromáždění výsledků**
- g) **Statistická analýza**
- h) **Vypracování zprávy (rozhodnutí, zveřejnění, ...)**

Výsledkem studie jsou zejména hodnoty reprodukovatelnosti a opakovatelnosti (opakovatelnost jako vlastnost metody), bývají zveřejněny jako přílohy norem.



Vývoj a standardizace metody (postupu)



Jaké charakteristiky lze získat z normy?

(z publikovaných pracovních postupů)

- **Typicky údaje o reprodukovatelnosti**
(takové údaje získá samotná laboratoř jiným způsobem jen obtížně)
- **Běžně též údaje o opakovatelnosti**
(opakovatelnost jako vlastnost metody vs. opakovatelnost jako charakteristika laboratoře)

Obecně lze některé charakteristiky chápat jako vlastnosti metody (a lze je tedy převzít z literatury, z jiné laboratoře, ...) a jiné charakteristiky jsou více vázány na danou laboratoř (a je nutno je stanovit).

Např.: Specifičnost/selektivita je dána principem metody a je na laboratoři více méně nezávislá (za předpokladu, že jsou striktně dodrženy podmínky/předpoklady použití normy). Opakovatelnost/mezilehlá preciznost souvisí spíše s podmínkami v laboratoři, citlivost/mez detekce jsou dány použitým zařízením



Zodpovědnost laboratoře při volbě metod

- ❑ ... Laboratoř musí používat takových ... metod, které splňují potřeby zákazníka a které jsou vhodné pro zkoušky, které laboratoř provádí. (požadavek normy)
- ❑ Laboratoř zodpovídá za to, že je metoda odpovídajícím způsobem validována
- ❑ Používáním standardizovaných postupů se laboratoř části zodpovědnosti zbavuje. Musí zjistit údaje o výkonnosti (charakteristikách) metody a prokázat, že je schopna dosáhnout srovnatelných výkonnostních charakteristik.
- ❑ Mezi normalizovanou a nenormalizovanou metodou nemusí být v praxi vždy výrazný rozdíl z hlediska požadavků na validaci.



Validace vs. verifikace (určení rozsahu validace)

Standardní metody není třeba validovat.

Žádná chemická laboratoř nezačne používat pracovní postup, aniž by si ověřila „jak to chodí“.

Potvrzení, že může laboratoř standardní postup řádně používat (že „to chodí“) = **verifikace**/ověření.

Verifikace je určitou podmnožinou validace.

Při určování rozsahu validace/verifikace má dojít k určité rovnováze mezi ekonomikou, riziky a technickými možnostmi



Určení rozsahu verifikace

(příručka AOAC reflektující evropský přístup)

- ❑ Při verifikaci se požaduje, aby laboratoř prokázala, že je schopna dosahovat jistých specifických výkonnostních charakteristik/parametrů, které byly stanoveny v průběhu validační studie.
- ❑ Studie musí zahrnovat všechny relevantní výkonnostní charakteristiky.

Které to jsou?



Čím se liší „chemické“ zkušební metody od jiných?

- Chemici se (většinou) domnívají, že jejich metody mají racionální základ.
- Chemické metody jsou dosti složité a pracovní návody nemohou být „úplné“
- Předpokládá se vysoká kvalifikace pracovníků provádějících zkoušky
- Zkušební postupy bývají často používány mimo oblast jejich původního určení
- Rozhodnutí o tom, zda je metoda použitelná pro daný účel nemusí být triviální



Metody validace a stanovení jednotlivých validačních charakteristik

Stručný přehled

Podrobné návody („kuchařka“) např.:

Kvalimetrie 9: Vhodnost analytických metod pro daný účel

EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd Edition, 2014

příklady též v: Guidance for the Validation of Analytical Methodology United Nation Office on Drugs and Crime, 2009



Metody validace (ISO/IEC 17 025)

- použití referenčních materiálů
- porovnání s jinými metodami
- mezilaboratorní porovnání
- systematické posouzení faktorů ovlivňujících výsledek
- využití teoretických principů a praktických zkušeností



Selektivita/specifičnost, potvrzení identity

- analýza referenčních materiálů
- analýza obohacených vzorků
- využití jiných analytických metod (nezávislých)
- využití konfirmačních technik
- studium potenciálních interferencí



Mez detekce

(3 s)

- opakovaná analýza slepého vzorku
- opakovaná analýza slepého vzorku s malým přídavkem analytu
- (odhad z kalibrační závislosti)
- odhad přímo ze záznamu analýzy (např. z chromatogramu)



Mez stanovitelnosti

- obdobně jako mez detekce, 10 s
- (nejnižší bod kalibrační závislosti)

Obecná poznámka:

- o Meze detekce a stanovitelnosti závisí na matrici a proto odhady založené na opakovaném měření „čistých“ (kalibračních) roztoků jsou málo hodnotné
- o Meze detekce a stanovitelnosti obvykle závisí silně na podmínkách, instrumentaci apod. Proto nelze nekriticky přejímat údaje z literatury či údaje výrobců přístrojů



Linearita, pracovní rozsah

- RM nebo obohacený slepý vzorek o různých koncentracích, vizuální posouzení

Citlivost – sklon křivky odezvy (směrnice kalibrační závislosti)

- určí se z kalibrační závislosti



Volba pracovního rozsahu a způsobu kalibrace

- Pracovní rozsah může být širší než oblast lineární odezvy
- Je možné pracovat s nelineární kalibrační závislostí
- Je možné rozdělit pracovní rozsah do několika oblastí, kde lze použít lineární závislosti
- Obvykle by kalibrační závislost měla obsahovat alespoň 6 bodů, je však možná i jednobodová kalibrace
- Směrnice a průběh kalibrační závislosti mohou být ovlivněny matricí (možnosti a omezení metody standardního přídatku)



Pravdivost (vs. vychýlení, bias)

- analýza referenčních materiálů
- porovnání s nezávislou (primární) metodou



Metodický list 2: EURACHEM-ČR 2009

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

- **PRECISION = PRECIZNOST** (těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo na podobných objektech za specifikovaných podmínek)
- **Measurement trueness = pravdivost měření** (těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnotou veličiny)
- **Measurement accuracy = přesnost měření** (těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a pravou hodnotou veličiny)



Nalezená hodnota

Skutečná hodnota

Celková odchylka



Odchylka laboratoře

Odchylka metody



Opakovatelnost, reprodukovatelnost

- určí se pomocí mezilaboratorní studie, bývají součástí norem
- opakovatelnost lze stanovit v laboratoři
- často jsou k dispozici informace o mezilehlé preciznosti



Opakovatelnost, mezilehlá preciznost

- Opakovaná analýza RM, $n=10$
- Opakovaná analýza reálných vzorků
- Stanovit pro celý pracovní postup (!!!)
- Stanovit pro různé koncentrační úrovně, případně určit závislost s na koncentraci analytu
- Využití údajů z QC (regulačních diagramů)



Odhad z duplikátních analýz:

u_r – rel směrodatná odch.

a, b – výsledky paralelních stanovení

x – průměr paralelních stanovení

d – počet dvojic stanovení

$$u_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^d \left[\frac{(a_i - b_i)}{x_i} \right]^2}{2d}}$$

Robustnost

- identifikovat proměnné, které mohou mít vliv na výkonnost metody a které se mohou měnit
- studovat vliv změn na výkonnost metody



Výtěžnost

- certifikované referenční materiály
- matricové slepé vzorky s přídavkem
- vzorky s přídavkem



Použití referenčních materiálů (RM, CRM):

- Matrice musí odpovídat reálným vzorkům
- Obsah analytu musí odpovídat reálným vzorkům
- Důležitá je i fyzikální forma materiálu



Obohacené (spiked) vzorky:

- Reálné vzorky (matrice)
- Problém, v jaké formě, v jaké fázi analytického procesu přidat přídavek
- Způsob vazby přídavku na matrici nemusí být stejný, jako v reálném vzorku



Využití nezávislých analytických metod:

- „Referenční metoda“ má být standardizovaná (validovaná) pro daný typ analýzy
- Měla by být založena na odlišném principu měření



Využití konfirmačních technik:

Příklady:

- Identifikace látek v chromatografii nejen pomocí retenčních časů, ale pomocí selektivních detektorů
- Kombinované (hyphenated) techniky – LC-DAD (kontrola „čistoty“ píku), GC-MS, aj.
- „Vícerozměrné“ separační techniky



Studium potenciálních interferencí:

- K reálnému vzorku nebo modelové směsi přidáváme potenciální interferenty, sledujeme změny odezvy
- Je třeba vytipovat potenciální interference – nelze vyšetřit všechny možné interference
- Některé interference mohou být významné, ale nepravděpodobné
- Pokud nelze interference odstranit, lze je někdy korigovat



SOP pro validaci analytické metody

- **Název SOP**
(Validace chromatografických metod: plynová chromatografie)
- **Účel**
- **Postup při validaci** (validační parametry a postup při jejich určení)
- **Výpočty a interpretace**
- **Způsob záznamů výsledků**
- **Archivace dat z validační studie**
- **Literární odkazy**



Validační zpráva

- **cíl, vymezení aplikace validované metody**
- **popis principu metody**
- **použité chemikálie, standardy, včetně čistoty a jejího ověření a instrumentace**
- **výběr prověřovaných parametrů a způsob jejich určení**
- **popis experimentů**
- **statistické postupy**
- **výsledky**
- **zhodnocení výsledků, kritická rozmezí**
- **návrh postupů řízení jakosti**
- **kriteria pro revalidaci metody**
- **postupy odhadu nejistoty měření**
- **souhrn a závěry**
- **autoři validační studie, schválení**



Životní cyklus metody

- **Předběžná příprava**
 - identifikace požadavků
 - výběr metody
 - vývoj metody
- **Validace**
 - identifikace typu metody a stanovení rozsahu validace
 - vlastní validace, dokumentace
 - pracovní návod (SOP), autorizace managementem
- **Monitoring, revize**
 - QC
 - revize
 - prověrky managementem



VALIDACE

Z indoevropského kořene **WAL-**,

„býti silným“ (lat. **valére**) – valence, valerian, Valerie, valor, value, equivalent, ...

starogermansky „**waltan**“ - Gerald, Walter

staroslovansky - vlast, Vlasta, oblast

Bud'te silní!



Literatura

**M. Suchánek, D. Milde (Eds.): Vhodnost analytických metod pro daný účel. Pokyn EURACHEM. Druhé vydání.
KVALIMETRIE 20, Praha 2015**

- z anglického originálu:

EURACHEM Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2nd Edition, 2014



Literatura

- **Vhodnost analytických metod pro daný účel, Kvalimetrie 9, EURACHEM-ČR, Praha 1999**
- **Jak vyhovět požadavkům ISO 17025 na verifikaci metod (How to Meet ISO 17025 Requirements for Method Validation), AOAC Internat., 2007, český překlad EURACHEM-ČR, Praha (připraveno k vydání)**
- **Validation of Analytical Methods for Food Control, FAO, 1997**
- **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens. United Nation Office on Drugs and Crime, 2009**
- **EUROLAB Technical report No. 2/2006 Guidance for the Management of Computers and Software in Laboratories with Reference to ISO/IEC 17025/2005 (www.eurolab.org)**