

Správná laboratorní praxe v chemické laboratoři

Příprava k analýze

Ing. Branislav Vrana, PhD.
vrana@recetox.muni.cz

Příprava k analýze

- identifikace faktorů, které je třeba zvážit při výběru metody analýzy
- kde hledat vhodné metody
- identifikace příčin nevyhovujících výsledků
- validace analytických metod

Volba postupu

- Použitý postup (metoda) musí být vhodný pro svůj účel
- Zdroje postupů
 - vlastní postupy vyvinuté jednou laboratoří pro vlastní speciální použití
 - postupy publikované ve veřejné vědecké literatuře
 - postupy poskytnuté obchodními organizacemi
 - postupy v knihách publikovaných odbornými organizacemi, např. The Royal Society of Chemistry (Analytical Methods Committee), Association
 - postupy publikované normalizačními organizacemi, např. v ČR Český normalizační institut, v Evropě CEN, celosvětový ISO, v USA ASTM, v Británii BSI, atd.
 - postupy, vydávané státními orgány, např. v EU The Fertilisers (Sampling and Analysis) Regulations 1991 (S.I. No. 973) H. M. S. O., EC Legislation



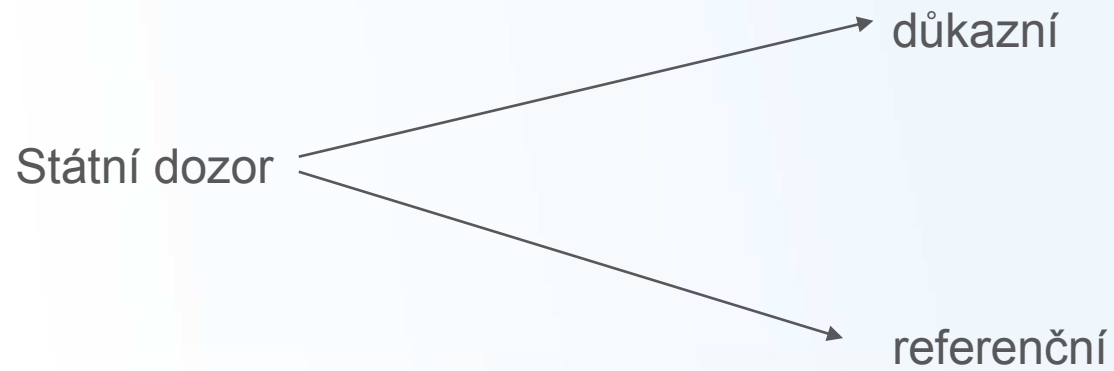
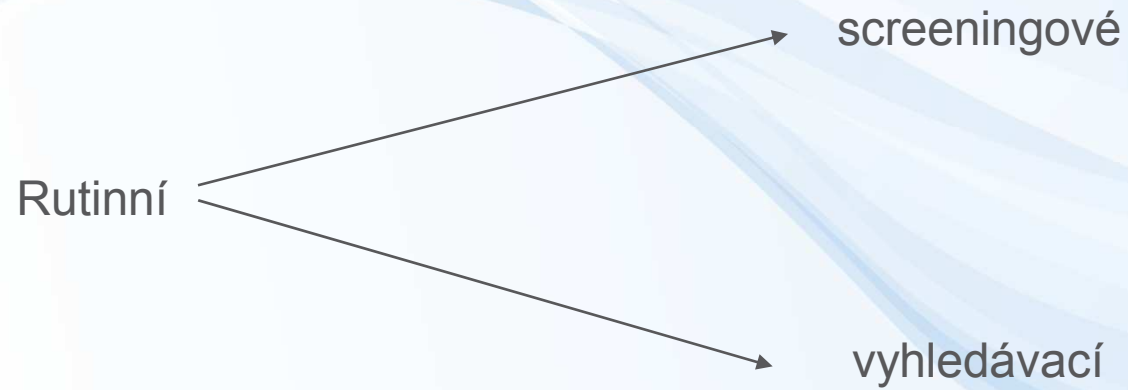
Podrobnost validace

Validace - studie která prokazuje, že při použití v laboratoři poskytne metoda výsledky vhodné pro očekávané použití

Rozdělení metod stopové analýzy

- stopová analýza - velmi nízké hladiny analytů (mg.kg^{-1} , $\mu\text{g.kg}^{-1}$) v složitých maticích
- faktory při výběru vhodné metody
 - rychlost
 - náklady
 - dostupnost měřicího zařízení
 - falešně negativní (*frequency of false negatives and false positives*)
 - falešně pozitivní
 - mez detekce (*limit of detection*)
 - mez stanovitelnosti (*limit of quantification*)
 - specifičnost (*specificity*)
 - rozsah validace (*extent of validation*)
 - Nejistota stanovení (*measurement uncertainty*)

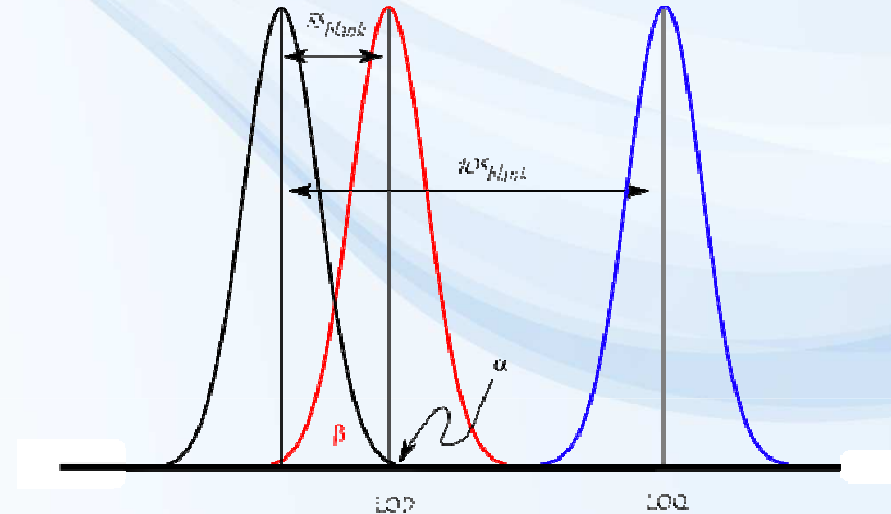
Typy metod v stopové analýze



Faktory rozhodující o výběru postupu

1. Mez detekce – limit of detection (LOD)

- nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale nemusí nutně být kvantifikováno jako exaktní hodnota



- nejnižší signál** -
- nejnižší koncentrace** -
- Ve většině případů se mez detekce bere jako
- koresponduje s %RSD = 33%

$$x_L = x_{bl} + 3s_{bl}$$

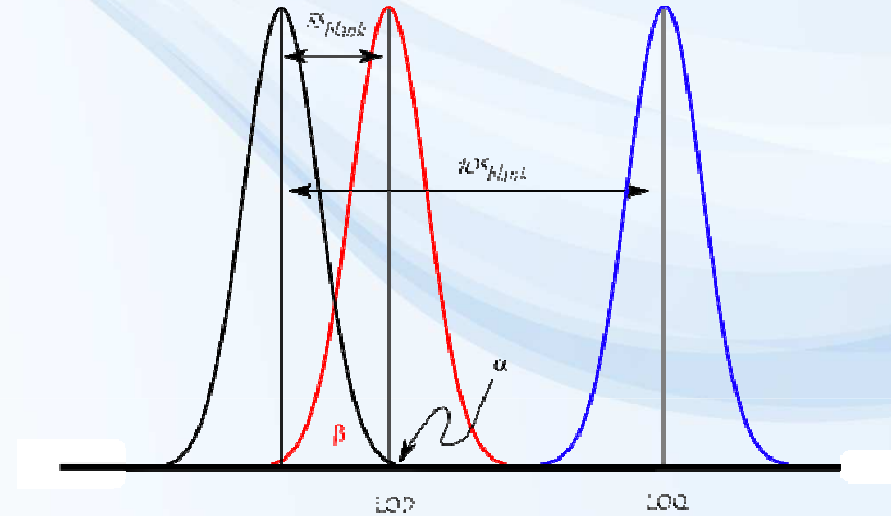
$$LOD = q_L(c_L) = x_L / S = 3s_{bl} / S$$

3 x s_{bl} nebo 3-krát poměr signál/šum.

Faktory rozhodující o výběru postupu

2. Mez stanovitelnosti - limit of quantification (LOQ)

- nejnižší množství analytu ve vzorku, které je možno kvantitativně stanovit s potřebnou nejistotou



- nejnižší signál -
- nejnižší koncentrace -
- Ve většině případů se mez detekce bere jako
- koresponduje s %RSD = 10%

$$x_L = x_{bl} + 10s_{bl}$$

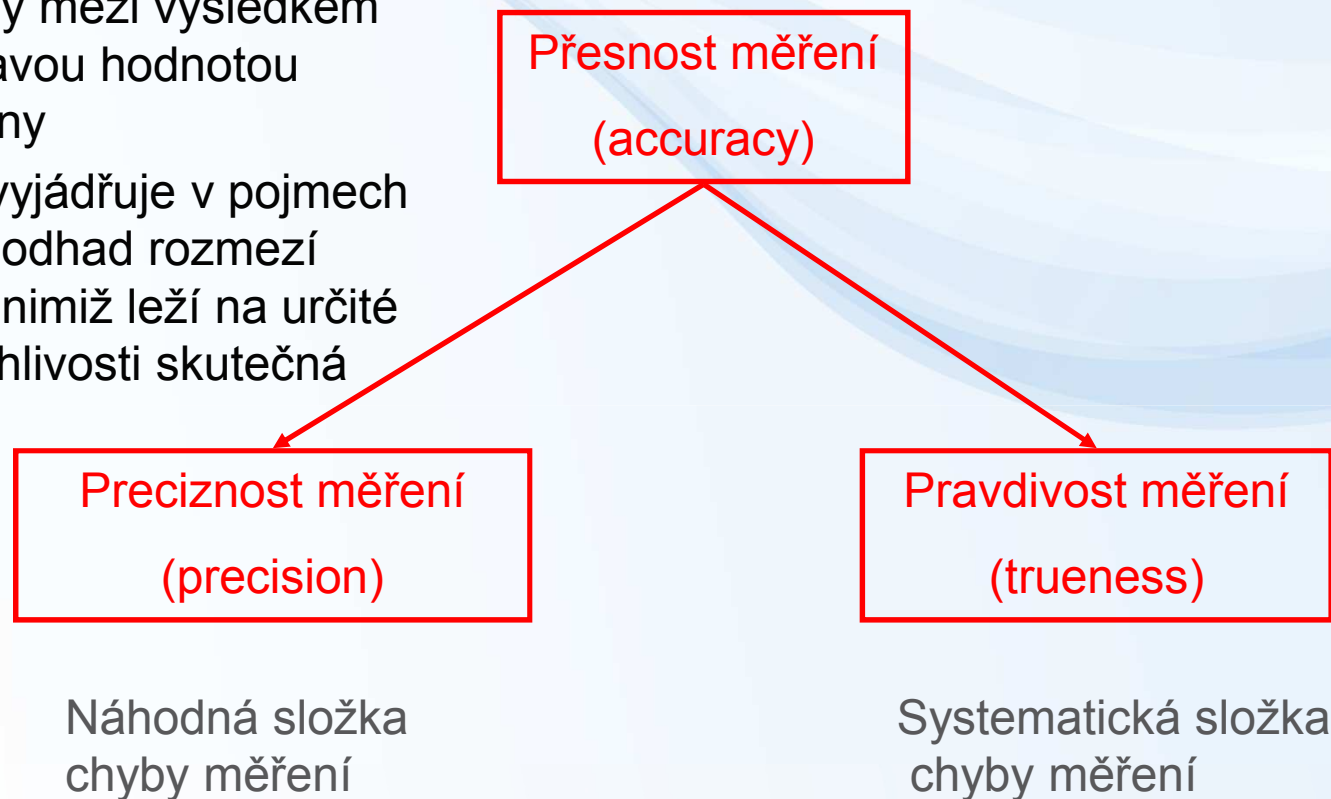
$$LOD = q_L(c_L) = x_L / S = 10 s_{bl} / S$$

10 x s_{bl} nebo 10-krát poměr signál/šum

Faktory rozhodující o výběru postupu

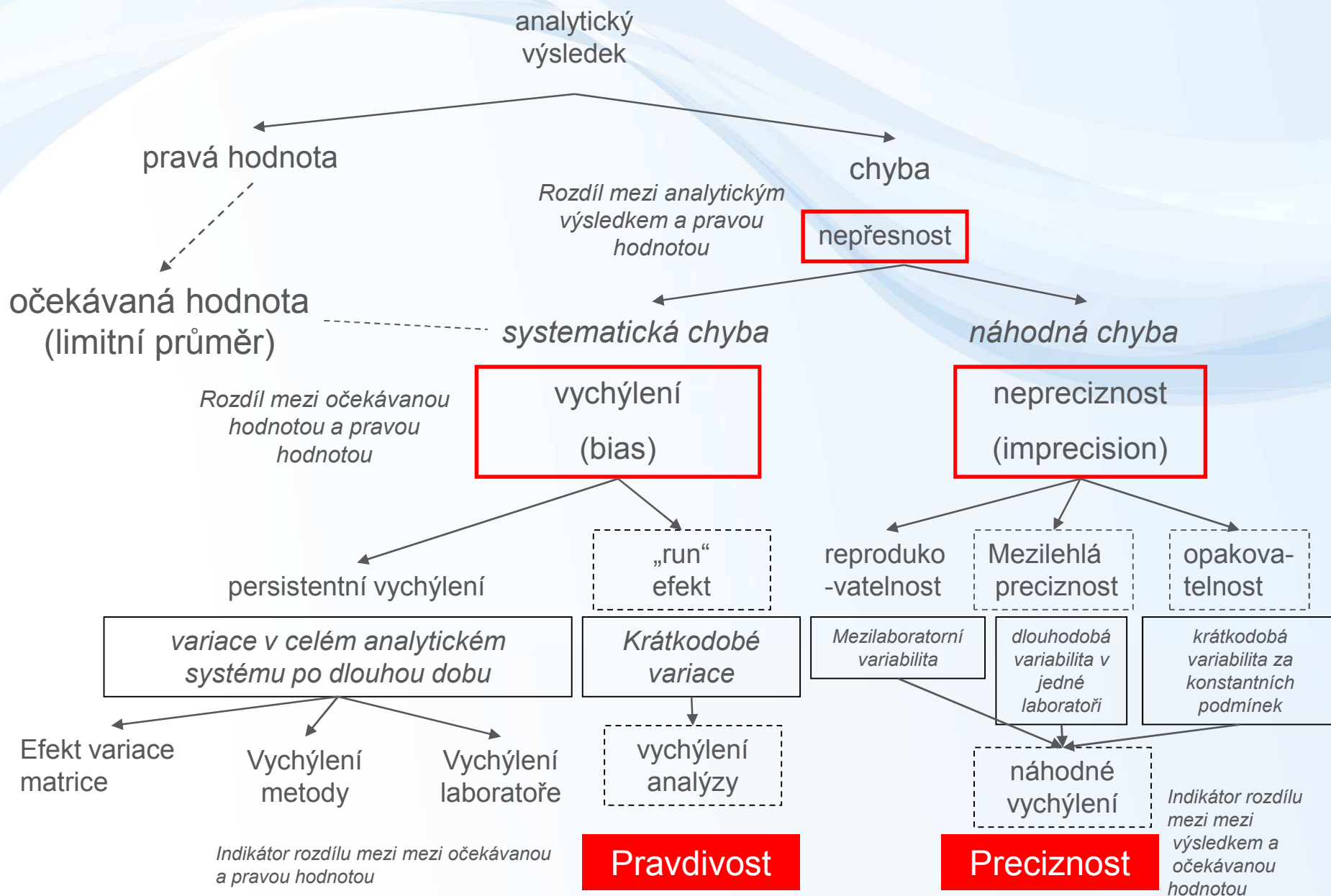
3. Přesnost měření - accuracy

- Těsnost shody mezi výsledkem zkoušky a pravou hodnotou měřené veličiny
- Výsledek se vyjádřuje v pojmech **nejistoty**, t.j. odhad rozmezí hodnot, mezi nimiž leží na určité hladině spolehlivosti skutečná hodnota



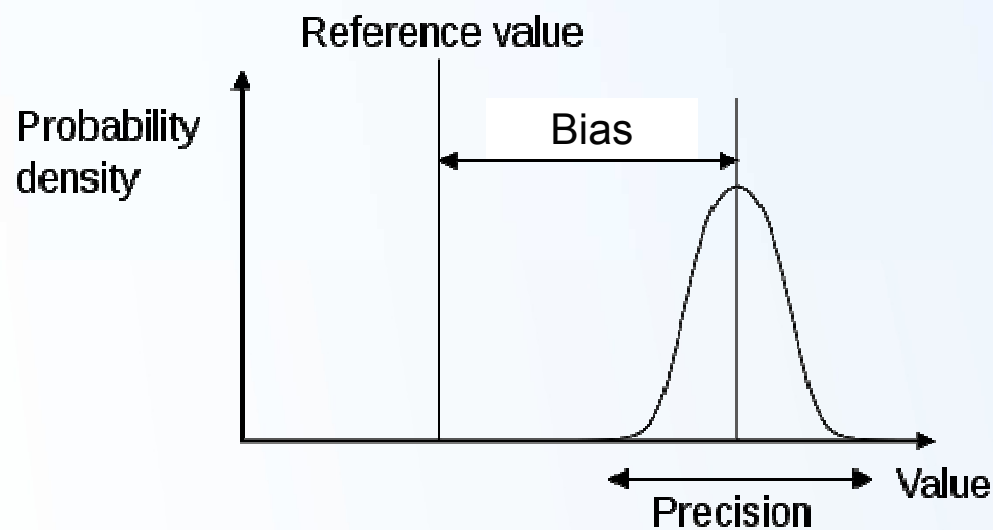
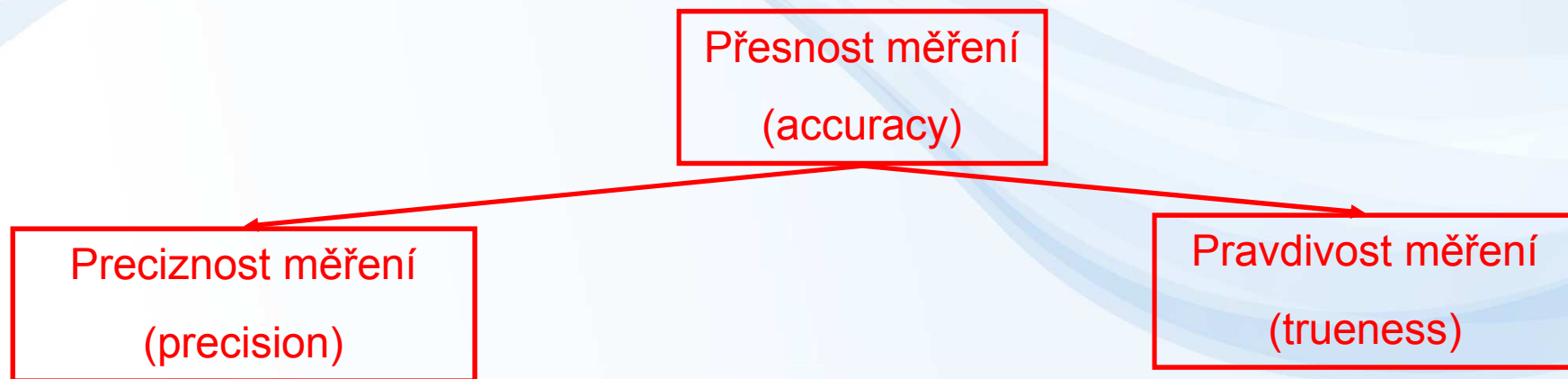
POZOR!!! Nová jednotná národní terminologie: *Eurachem ČR 2009, Metodický list 2: „Jak překládat precision, accuracy a trueness?“*

Složky chyby analytického výsledku ve vztahu k přesnosti metody


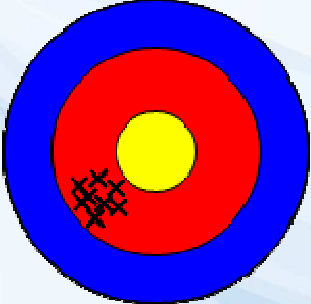
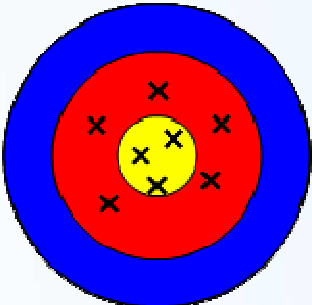
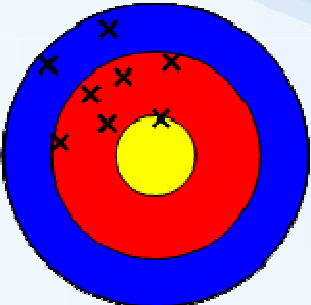


Faktory rozhodující o výběru postupu

3. Přesnost měření - accuracy

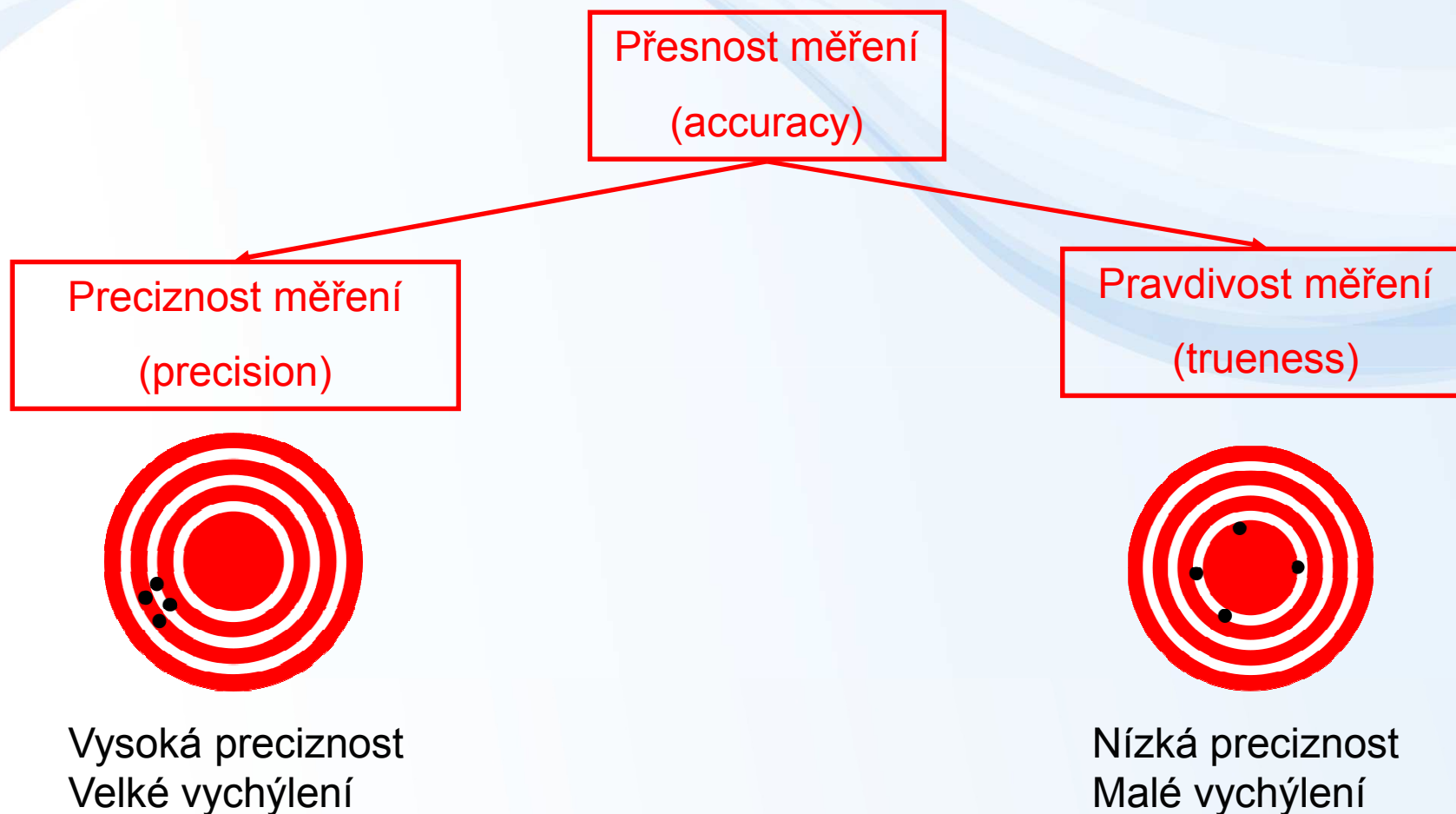


Accuracy (přesnost): Preciznost (precision) a Pravdivost (trueness)

	Nevychýlený Accurate	Vychýlený Inaccurate (systematic error)
Precise Precizní		
Imprecise (reproducibility error) Neprecizní (problém reprodukovatelnosti)		

Faktory rozhodující o výběru postupu

3. Přesnost měření - accuracy



POZOR!!! Nová jednotná národní terminologie: *Eurachem ČR 2009, Metodický list 2: „Jak překládat precision, accuracy a trueness?“*

Faktory rozhodující o výběru postupu

4. **Preciznost měření** - precision

- je těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušek získaných za dohodnutých podmínek
- závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a **nemá žádný vztah ke správné hodnotě**
- Vypočítá se jako směrodatná odchylka výsledků zkoušek z opakovaných měření



Faktory rozhodující o výběru postupu

4. Preciznost měření - precision

Mez opakovatelnosti (r) = repeatability je hodnota, pod níž lze se zadanou pravděpodobností 95 % předpokládat, že leží absolutní rozdíl výsledků dvou jednotlivých zkoušek, získaných stejnou metodou se stejným zkoušeným materiálem za stejných podmínek a neuplatňují se jiné pravděpodobnostní vlivy.

Mezilehlá preciznost vyjadřuje variabilitu uvnitř laboratoře v různých dnech, s různými analytiky, různým vybavením, atd. Běžně se odečítá z regulačních diagramů.

Mez reprodukovatelnosti (R) je hodnota, pod níž lze se zadanou pravděpodobností 95 % předpokládat, že leží absolutní rozdíl výsledků dvou jednotlivých zkoušek, získaných stejnou metodou se stejným zkoušeným materiálem za rozdílných podmínek, a neuplatňují se jiné pravděpodobnostní vlivy.



$$RSD = 100 \times \frac{SD}{\bar{x}}$$

$$r = 2.83 \times SD_r$$

$$R = 2.83 \times SD_R$$

Faktory rozhodující o výběru postupu

4. Preciznost – Horwitzova funkce

Table 4. Horwitz function as an empirical relationship between the precision of an analytical method and the concentration of the analyte regardless of the nature of the analyte, matrix and the method used. Acceptable RSD_R and RSD_r values according to [27] and to AOAC International [8, 14] (PVM=Peer Verified Methods (Program))

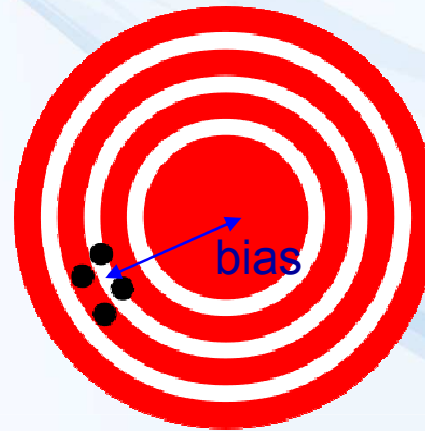
Analyte %	Analyte ratio	Unit	Horwitz %RSD	AOAC PVM %RSD
100	1	100%	2	1.3
10	1.00E-01	10%	2.8	2.8
1	1.00E-02	1%	4	2.7
0.1	1.00E-03	0.10%	5.7	3.7
0.01	1.00E-04	100 ppm	8	5.3
0.001	1.00E-05	10 ppm	11.3	7.3
0.0001	1.00E-06	1 ppm	16	11
0.00001	1.00E-07	100 ppb	22.6	15
0.000001	1.00E-08	10 ppb	32	21
0.0000001	1.00E-09	1 ppb	45.3	30

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, 2004

Faktory rozhodující o výběru postupu

5. Pravdivost - trueness

- Těsnost shody mezi výsledkem aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a přijatou referenční hodnotou
- představuje obecné systematické chyby nebo **vychýlení (bias)**



% vychýlení

Z-skóre = rozdíl mezi naměřenou hodnotou veličiny a certifikovanou referenční hodnotou

Porovnání metody s jinou, referenční metodou

Jestliže není CRM k dispozici:

% výtažnosti (recovery) známého přidaného množství analytu

$$z = \frac{X_{found} - X_{certified}}{\sqrt{\frac{SD_{found}}{n_{found}} + \left(\frac{SD_{certified}}{n_{certified}}\right)^2}}$$

$$z = \frac{X_{found} - X_{certified}}{\sqrt{\frac{SD_{found}}{n_{found}} + \left(\frac{CI}{2}\right)^2}}$$

if CRMs are used:
Z-score $\leq |2|$

Přijatelné hodnoty výtěžnosti – funkce koncentrace analytu

Table 5. Acceptable recovery percentages as a function of the analyte concentration [8]

Analyte%	Analyte ratio	Unit	Mean recovery (%)
100	1	100%	98–102
10	1.00E-01	10%	98–102
1	1.00E-02	1%	97–103
0.1	1.00E-03	0.10%	95–105
0.01	1.00E-04	100 ppm	90–107
0.001	1.00E-05	10 ppm	80–110
0.0001	1.00E-06	1 ppm	80–110
0.00001	1.00E-07	100 ppb	80–110
0.000001	1.00E-08	10 ppb	60–115
0.0000001	1.00E-09	1 ppb	40–120

L. Huber (Ed.), Validation and Qualification in Analytical Laboratories, Interpharm Press, East Englewood, CO, USA, 1998.