

Správná laboratorní praxe v chemické laboratoři

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

Doporučená literatura



QUACHA TRAINING COURSE BOOK

QUALITY ASSURANCE FOR CHEMICAL ANALYSIS

Prepared by Elizabeth PRICHARD (LGC)
in conjunction with Members of project PL 96-5206

CZECH TRANSLATION

By Ivan KORUNA
National GLP Monitoring Authority, Prague

<http://www.swift-wfd.com/Local/swift/dir/doc/QUACHA-CZ%20translation.pdf>

Analýza a účel analýzy

- určení kompozice materiálů, tj. identifikaci jeho složek a zjištění
- kolik které složky je přítomno
- někdy též v jaké formě je přítomna.



Účel analýzy - příklady

Závažnost důsledků chybné analýzy

- Vytvoření číselné databanky za účelem zjišťování trendů
- Přijetí/odmítnutí chemikálie/výrobku před použitím ve výrobním postupu.
- Posouzení hodnoty dodávky zboží před zaplacením.
- Soudní žaloba na podnik, který prodal výrobek neodpovídající udané specifikaci
- Trestní obvinění osoby, u níž byly nalezeny drogy

ÚVOD DO PROKAZOVÁNÍ KVALITY

vymezení důležitých pojmů

Kvalita

- Dříve používaný pojem „jakost“ byl v roce 2005 nahrazen pojmem „kvalita“ a v roce 2008 implementován do norem ISO
- Kvalita je vhodnost pro daný účel
- Kvalita splňuje nebo dokonce přeplňuje zákazníkovo očekávání.
- Kvalita je nepřímo úměrná variabilitě výrobku nebo služby.
- Kvalita je žádoucí/charakteristická vlastnost nebo rysy výrobku/služby, které výrobek nebo služba má mít

SYSTÉMY KVALITY, ŘÍZENÍ KVALITY A PROKAZOVÁNÍ KVALITY

(ČSN EN ISO 9000:2001 Systémy managementu jakosti)

Řízení kvality – Quality control

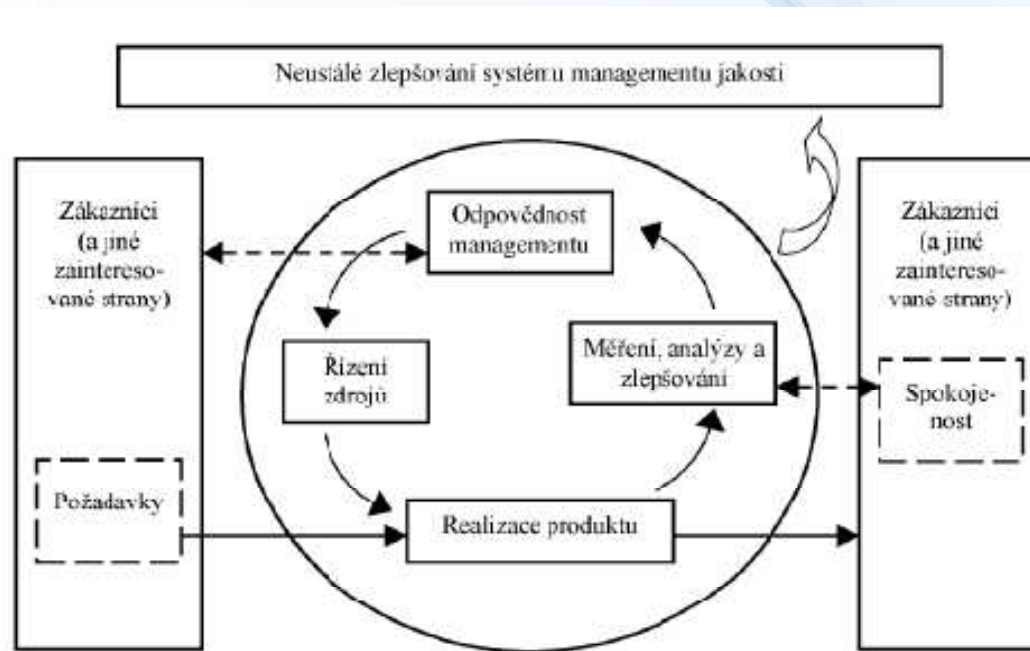
- část managementu kvality zaměřená na plnění požadavků na kvalitu
- plánované činnosti s cílem ověřovat kvalitu měření (operativní)

Prokazování kvality – Quality assurance

- část managementu kvality zaměřená na poskytování důvěry, že požadavky na jakost budou splněny
- Interní zabezpečení jakosti poskytuje důvěru vedení
- externí prokazování jakosti poskytuje důvěru zákazníkovi že se jedná o plánované činnosti navržené tak, aby bylo zjevné, že se řádně používají nástroje řízení jakosti.
- Soubor opatření, které laboratoř musí podniknout, aby zajistila, že je vždy schopna poskytnout data s vysokou kvalitou.

System kvality

Organizační struktura, postupy, procesy a zdroje potřebné k zavedení managementu kvality



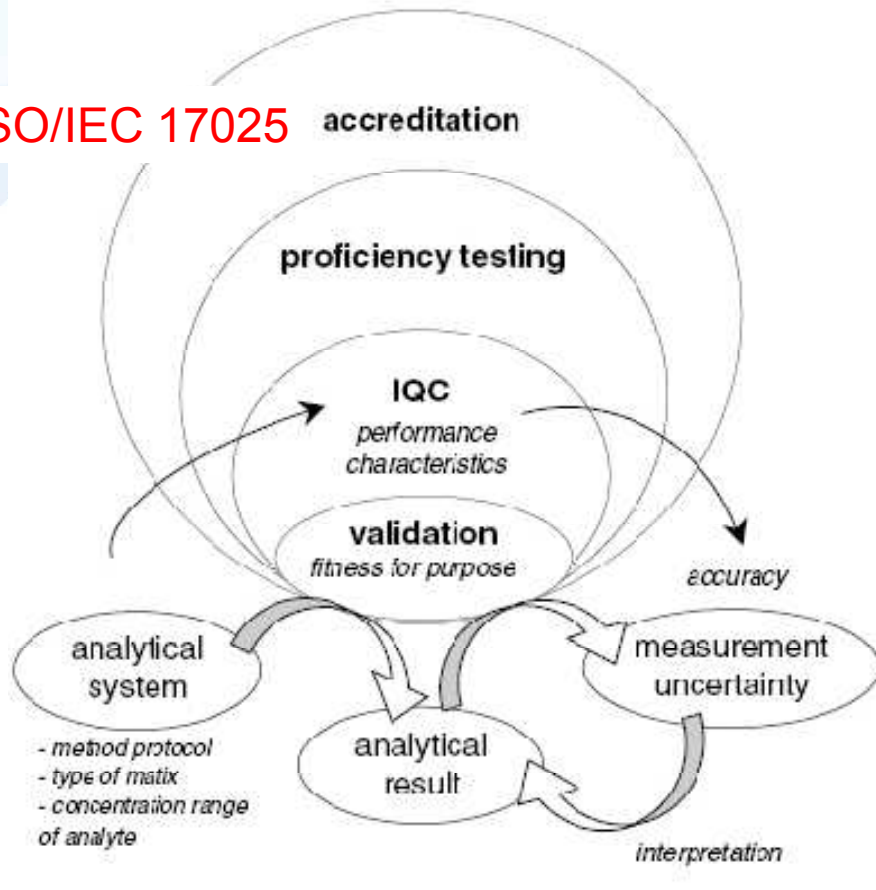
Kvalita měření

- reprodukovatelnost měření – porovnatelnost měření provedených různými laboratořemi
- návaznost měření k primárnímu etalonu
Použití referenčních materiálů návazných na základní SI jednotku (kg, mol...)

“Návaznost = vlastnost výsledku měření nebo hodnoty etalonu, kterou může být určen vztah k uvedeným referencím, zpravidla národním nebo mezinárodním etalonům, nepřerušeným řetězcem porovnávání, jejichž nejistoty jsou uvedeny”

Úrovně prokazování kvality (QA)

ISO/IEC 17025



- validace a standadisace metod
- IQC (vnitřní řízení kvality) – použití referenčních materiálů, regulačních diagramů
- účast na mezilaboratorních porovnávacích zkouškách
- akreditace

Příručky a standardy pro prokazování kvality (QA)

Table 1. Overview of European and international regulatory bodies and their guidelines and standards on different aspects of QA.

Body	Full name	Guidance on	References
Eurachem CITAC	A Focus for Analytical Chemistry in Europe Cooperation of International Traceability in Analytical Chemistry	<ul style="list-style-type: none"> • Method validation • Proficiency testing • Quality Assurance 	[2,4,11,12]
EA	European Cooperation for Accreditation	<ul style="list-style-type: none"> • Accreditation 	
CEN	European Committee for Normalization	<ul style="list-style-type: none"> • Standardization 	[13]
IUPAC ISO AOAC International	International Union of Pure and Applied Chemistry International Standardization Organisation Association of Official Analytical Chemists	<ul style="list-style-type: none"> • Method validation • Standardization • Internal quality control • Proficiency testing • Accreditation 	[1,5,14–23]
FDA USP ICH	United States Food and Drug Administration United States Pharmacopeia International Conference on Harmonization	<ul style="list-style-type: none"> • Method validation 	[7,24–26]
FAO/WHO: Codex/CCMAS	Food and Agricultural Organization/World Health Organisation: Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling	<ul style="list-style-type: none"> • Method validation 	[27–31]
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation	<ul style="list-style-type: none"> • Proficiency testing • Accreditation 	[32–34]

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 23, No. 8, 2004, 535-552

Postupy prokazování kvality (QA) při odběru vzorků a při nakládání se vzorky

- význam odběru vzorků
- identifikace různých typů vzorků
- význam vzorkovacích plánů
- zákonné požadavky
- význam správné manipulace a skladování vzorků.
- techniky odběru

Postupy prokazování kvality (QA) při odběru vzorků a při nakládání se vzorky

- Vzorkování = proces, jímž se nějakým způsobem vybírá podíl materiálu tak, aby reprezentoval nebo poskytl informace o větším souboru materiálu
- Musí být specifikováno, co se má zkoušet – důvod analýzy
- Analytický výsledek může záviset na postupu použitém k analýze, avšak vždy závisí na typu použitého plánu vzorkování
 - Chyba se nedá vyhodnocovat ani ovlivňovat pomocí referenčních materiálů
 - Existují směrnice nebo mezinárodní normy



malá chyba při odběru => vážná chyba ve výsledku měření

Vzorkovací a analytické operace

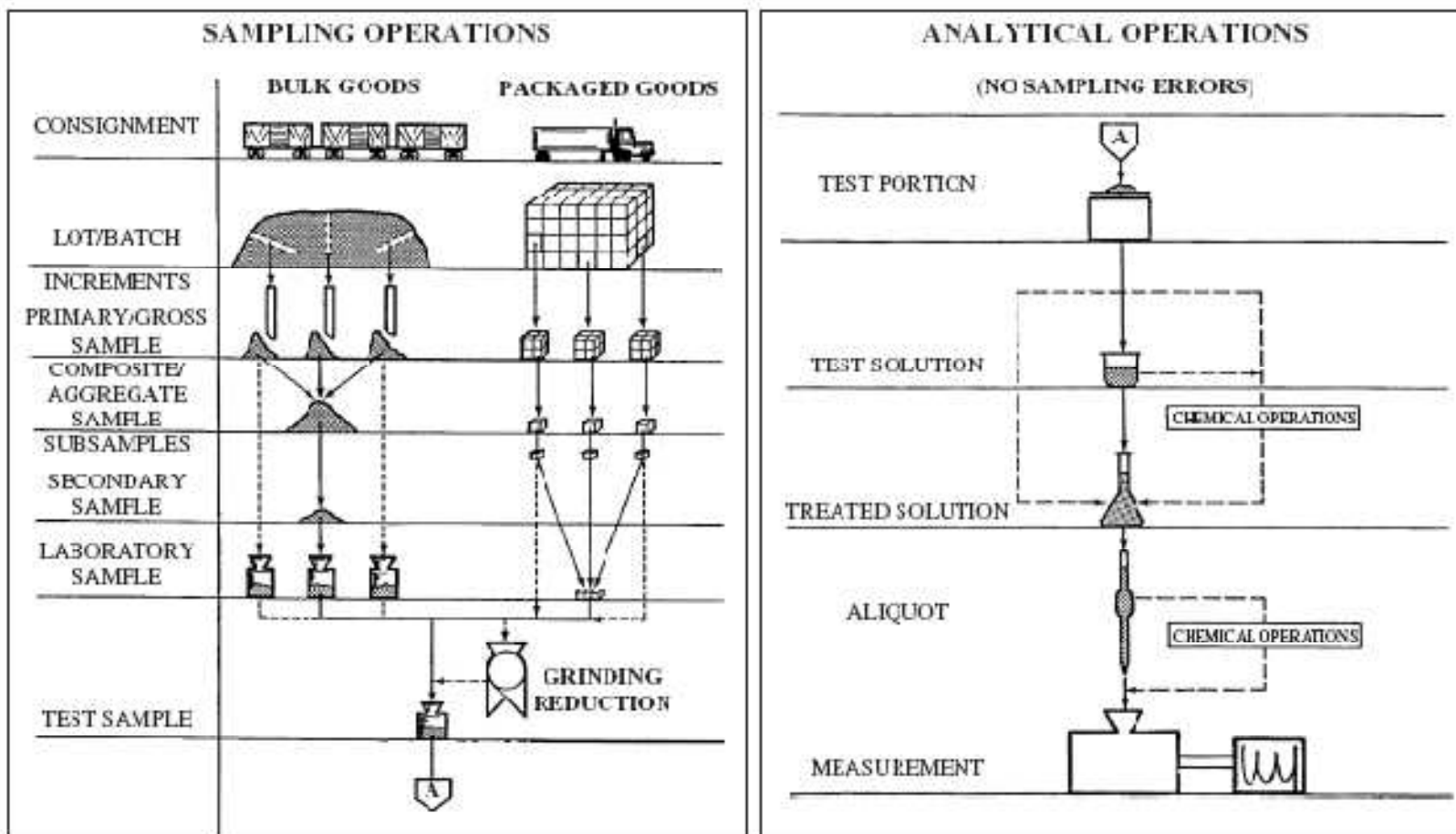


Figure 3.1 Schematic of sampling and analytical operations. Note: the lower "A" of the sampling operations continues with the upper "A" of the analytical operations [1]. Reproduced by permission of the International Union of Pure and Applied Chemistry, from Horwitz, W., *Pure Appl. Chem.*, **62**, 1193–1208 (1990).

Normy pro odběr vzorků

Příklad: Odběr vzorků vod

ODBĚRY VZORKŮ- skupina X			
Zkouška		SOP	Složka
1.V	Odběr vzorků pitných vod	SOP1V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN EN ISO 19458, ČSN ISO 5667-5)	MPOV
2.V	Odběr vzorků podzemních vod	SOP2V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN EN ISO 19458, ČSN ISO 5667-11)	MPOV
3.V	Odběr vzorků povrchových vod z vodních nádrží	SOP3V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN EN ISO 19458, ČSN ISO 5667-4)	MPOV
4.V	Odběr vzorků povrchových vod z řek a potoků	SOP4V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN EN ISO 19458, ČSN ISO 5667-6)	MPOV
5.V	Odběr vzorků odpadních vod	SOP5V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN EN ISO 19458, ČSN ISO 5667-10)	MPOV
6.V	Odběr vzorků dnových sedimentů	SOP6V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN ISO 5667-12)	MPOV
7.V	Odběr vzorků kalů z čistíren odpadních vod	SOP7V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN ISO 5667-13)	MPOV
9.V	Vzorkování odpadů	SOP9V (ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, Metodický pokyn MŽP (2008))	MPOV
10.V	Odběr vzorků bazénových vod	SOP10V(ČSN EN ISO 5667-1, ČSN EN ISO 5667-3, ČSN EN ISO 19458, Vyhláška č. 135/2004 Sb.)	MPOV

TYPY VZORKŮ

- **Fyzikální stav:**
 - plynný
 - kapalný
 - tuhý
- Homogenní a heterogenní materiál
- **Vzorkovací plán:**
 - reprezentativní
 - selektivní
 - náhodný
 - směsný vzorek



Reprezentativní vzorek

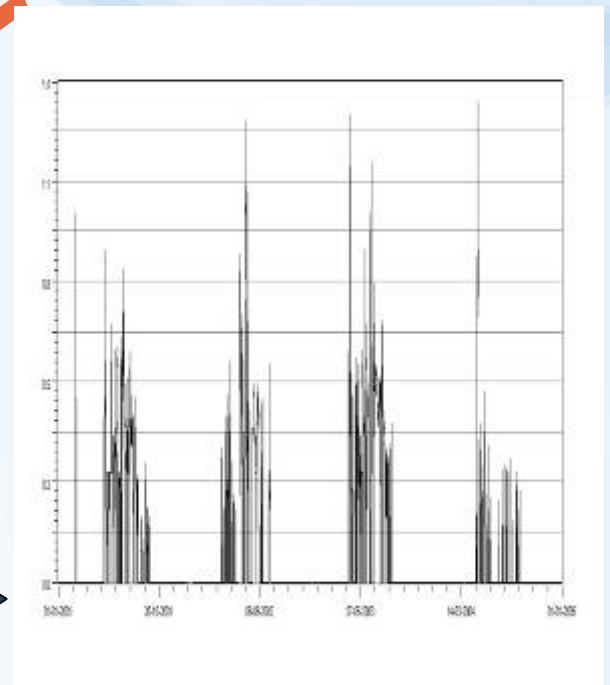
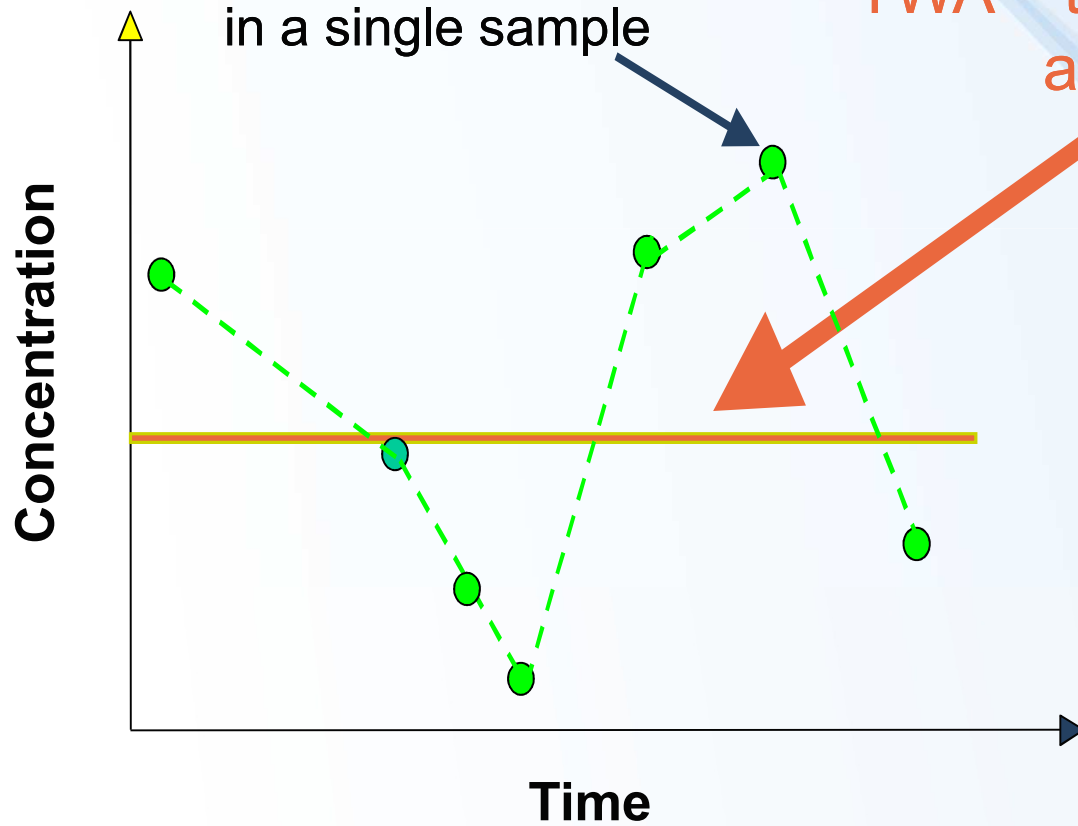
- vzorek přenáší z původního vzorku materiál sledované vlastnosti
 - musíme znát postup, který bude pro analýzu použit
 - stav původního zkoumaného materiálu
 - homogenní
 - heterogenní
 - statický (zádržný) systém
 - dynamické podmínky



Dynamický systém: kontaminant v řece

Contaminant concentration in a single sample

TWA = time-weighted average



Selektivní vzorek

vzorkovací plán, který odděluje

- materiály s určitou charakteristikou anebo
- vybírá pouze materiál s jinou požadovanou charakteristikou
- řízené nebo zaměřené vzorkování

Náhodný výběr

Vzorek odebraný náhodným procesem, aby se zabránilo pochybnostem o vychýlení při výběru anebo abychom vytvořili podmínky pro statistickou interpretaci naměřených dat

- **Jednoduchý náhodný výběr** – každý vzorek má stejnou pravděpodobnost, že bude vybrán
- **Náhodný výběr po vrstvách** – materiál se rozdělí na vrstvy a z každé vrstvy se odebere prostý vzorek.
- **Systematické vzorkování** – první vzorek se zvolí náhodně a následující vzorky se odebírají podle předem stanoveného plánu, tj. každý pátý, desátý, nebo s jinou vhodnou četností.

Směsný (kompozitní) vzorek

- způsob, jak snižovat náklady analýzy velkého počtu složek
- Zastoupení složek ve směsném vzorku může být na základě
 - objemu
 - času
 - průtoku
- Složky směsného vzorku se odebírají v poměru k množství materiálu, který reprezentují.

Směsný (kompozitní) vzorek

Automatické zařízení na odběr vzorků vody



STRATEGIE VZORKOVÁNÍ

- Vzorkovací plán = všechny aspekty procesu vzorkování
 - počet
 - místo
 - velikost podílu
 - instrukce k přípravě laboratorního vzorku
 - frekvence opakovaného odběru
- Vzorkovací schema
- Vzorkovací program
- Zákonné a právní požadavky

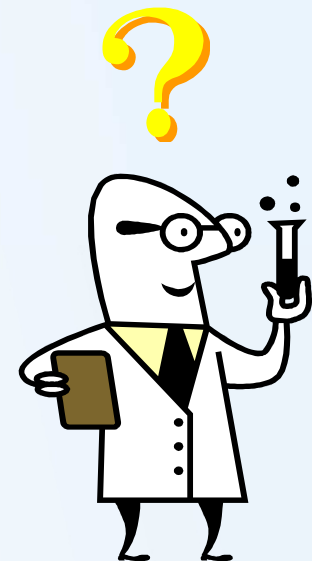
Vzorkovací schemata

- **Pravděpodobnostní výběr**
 - když je zapotřebí reprezentativní vzorek
- **Nepravděpodobnostní výběr**
 - když nelze odebrat reprezentativní vzorek. Je to metoda vhodná pro selektivní vzorky
- **Hromadný odběr (bulk sampling)**
 - Tento typ vzorkování zahrnuje odběr vzorku z materiálu, který se neskládá z diskrétních, identifikovatelných nebo stejných jednotek (plyn, kapalina...)
- **Přejímací plány**
 - Přejímka zahrnuje použití předem stanoveného plánu. Rozhoduje, zda šarže zboží vyhovuje stanoveným kritériím přejímky
 - **Přejímka může být**
 - srovnáváním (podle atributů)
 - měřením (podle proměnných)

PARAMETRY VZORKOVÁNÍ

Počet a velikost vzorků

- **Požadovaná přiměřenost vzorků k analýze**
 - Plány odběru vzorků by měly určit **počet** a **velikost** primárních vzorků,
 - Měla by rovněž popsat, jak má být získán laboratorní vzorek.
 - je zapotřebí rozhodnout, jak tím bude ovlivněna validita analýzy.



PARAMETRY VZORKOVÁNÍ

- odebrání reprezentativního vzorku z heterogenního celku
- test míry homogenity
- postup musí být validován pro odebrané množství vzorku
- analytický problém - Správně zavedený analytický postup - postup se musí kontrolovat kontrolními vzorky
- sociální/ekonomický problém, který je třeba řešit



Počet primárních vzorků

$$n = 3 \times \sqrt[3]{N}$$

- empirická pravidla
- primární vzorky se obvykle smíchají na hromadný vzorek, který, pokud je pro analýzu příliš objemný, se redukuje na reprezentativní dílčí vzorek

Počty primárních vzorků, odebíraných z konzervovaných výrobků

Počet plechovek, balení nebo obalů v dávce	Nejmenší počet primárních vzorků
1 – 25	1
26 – 100	5
101 – 250	10
> 250	15

Dílčí vzorky

- podíl, oddělený ze vzorku a připravený tak, aby obsahoval s nějakou spolehlivostí stejnou koncentraci analytu, jaká je přítomna v původním vzorku
- chyba dílčího vzorkování se zvyšuje s klesající koncentrací sledovaných prvků



Konstanta vzorkování K_s

- hmotnost dílčího vzorku, pro kterou je relativní chyba dílčího vzorkování 1 % (hladina spolehlivosti 68 %) při jednotlivém stanovení

$$C_v = \frac{100s}{\bar{x}}$$

$$C_v = \sqrt{\frac{K_s}{m}}$$

Dílčí vzorky

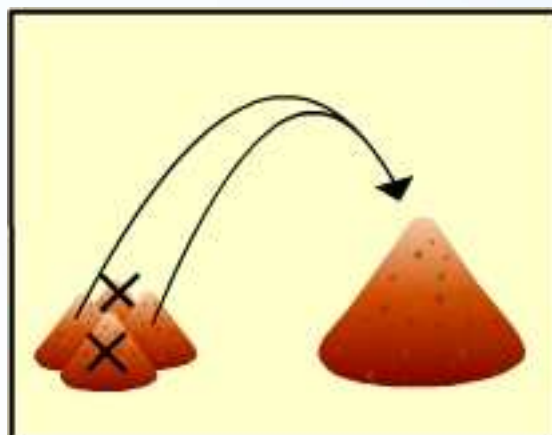
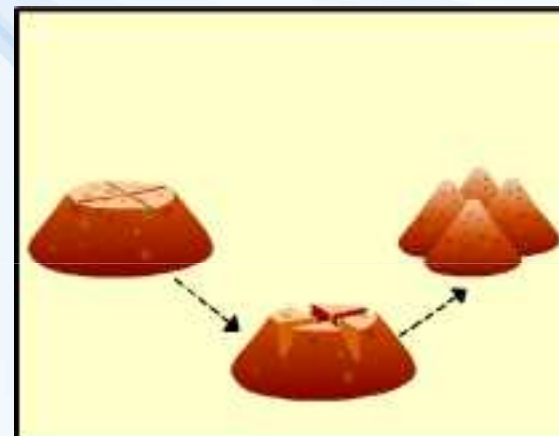
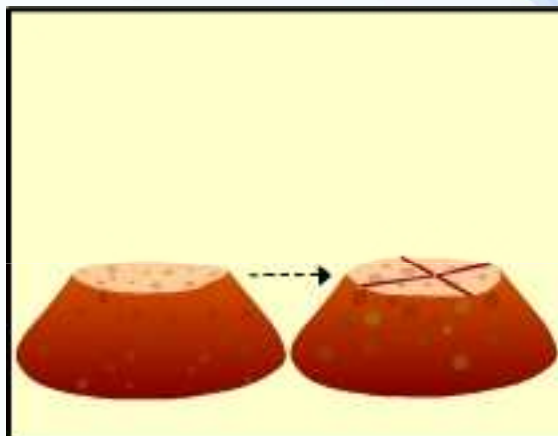
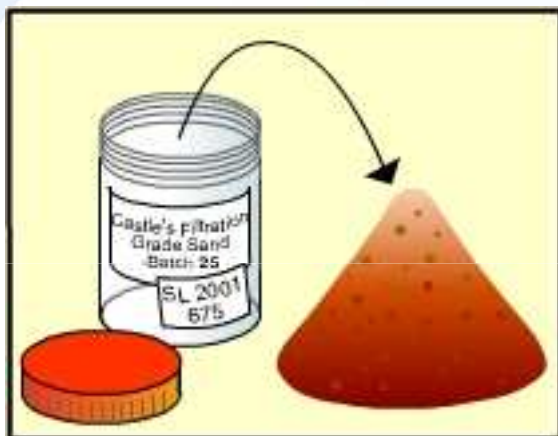
- granulované tuhé látky – o ptimální množství lze vyjádřit jako počet částic nezávisle na velikosti částic.

Vztah mezi velikostí částic a zkoušeným podílem

Přibližná hmotnost částice [mg]	Zkoušený podíl [g]
10	10
1	1
0,1	0,1

Postupy odběru dílčích vzorků Tuhé materiály

- jemné mletí – potenciální kontaminace
- Kde mletí není možné – kvartování (coning and quartering); riffing



Postupy odběru dílčích vzorků

Kapalné vzorky

- homogenizace suspenze třepáním
- filtrace může mít významný vliv na výsledek analýzy!!!



Stabilita vzorku

- Doba uchovávání - maximální interval, který smí uplynout od odběru vzorků do jejich měření dříve, než dojde k významným změnám vzorku

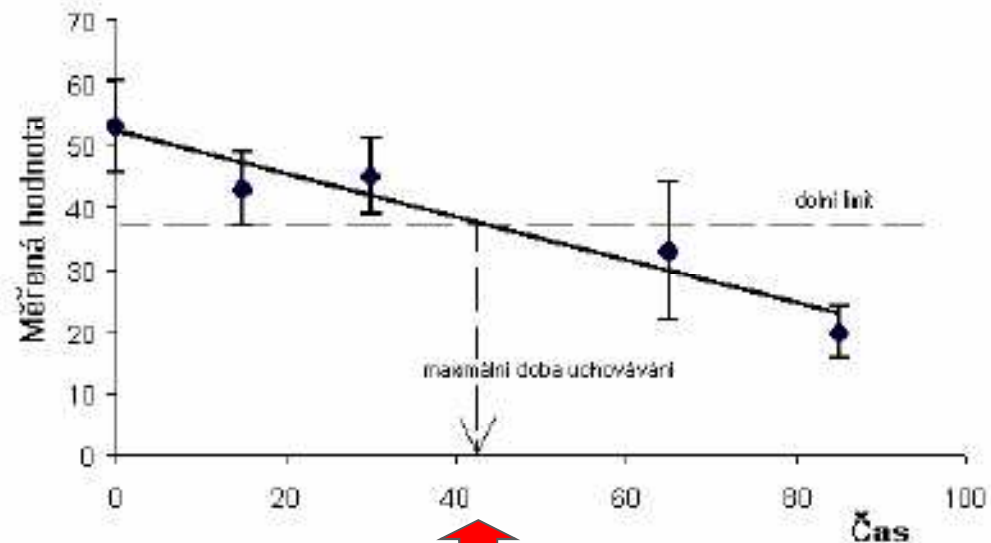
výběrová směrodatná odchylka

$$s = \sqrt{\frac{\sum d^2}{2n}}$$

d je difference mezi n duplikáty

Nejdelší doba uchovávání odpovídá bodu, který odpovídá průsečíku

přímky a počáteční hodnoty snížené o $3s$.



MANIPULACE SE VZORKEM

- Po převzetí vzorku je třeba jej **označit** jednoznačnou identifikací, číslem nebo kódem
- zaznamenat všechny **podrobnosti o vzorku**, které zahrnují i podmínky skladování.
- Pokud si vzorek předávají dvě osoby, musí to být plně dokumentováno.
- Zaznamenat se musí i **podrobnosti o vzorkovnici a jejích uzávěrech**, neboť mohou být nevhodné a ovlivnit výsledek analýzy.

MANIPULACE SE VZORKEM



Zdroje chyb při odběru vzorků

- **znečištění** - materiály odběrových zařízení a vzorkovnic, vzorky navzájem, konzervačními činidly, nevhodným skladováním a dopravou
- **nestabilita vzorku** - nesprávnou volbou typu odběrových zařízení a vzorkovnic, podmínkami přepravy a skladování vzorků)
- **nesprávná konzervace** materiály vzorkovnic a typ konzervačního činidla
- **nesprávný odber vzoriek** odchylka od postupu nebo nesprávná technika odběru
- **doprava a manipulace** se vzorky



Nedostatečná nebo absentující komunikace s analytickou laboratoří

Vzorkovnice

- Nesmí způsobovat
 - znečištění vzorku
 - adsorpci na povrchu, pohlcování nebo těkání stanovovaných zložek
 - uvolňování různých látek do vzorku
 - speciální vzorkovnice na určité druhy stanovení



“slepá” vzorka na ověření zprávnosti výběru a způsobu čištění vzorkovnic

SKLADOVÁNÍ VZORKU

- vlastnosti analytu
 - těkavost
 - tepelná stabilita
 - chemická reaktivita
- Vzorky se musí skladovat tak, aby nepředstavovaly riziko pro personál
- Nesmí nastat nebezpečí kontaminace nebo vzájemné kontaminace – žádný materiál se nesmí dostat do vzorkovnice nebo ji opustit.
- je třeba vyvarovat se extrémů prostředí, v němž je uložen
- chránit vzorek před světlem, zvýšenou teplotou nebo vlhkostí
- skladovat na místě fyzicky odděleném od analytických kalibračních standardů a dalších materiálů, které mohou obsahovat vysokou koncentraci analytu

Podmínky skladování analytických vzorků

Podmínky skladování	Vhodné typy vzorků	Nevhodné typy vzorků
hluboké zmrazení (-18 °C)	vzorky s vysokou aktivitou enzymů, např. játra většina typů vzorků méně stálé analyty	vzorky, které během tání kapalní vodné vzorky
chladnička (4 °C)	zeminy, minerály čerstvé ovoce a zelenina vodné vzorky	vzorky s pravděpodobnou enzymatickou aktivitou
pokožová teplota (temno)	tuhé prachy a granule minerály stabilní analyty	čerstvé potraviny
exsikátor	hygroskopické vzorky	vzorky, které jsou hygroskopičtější než sušidlo

Fyzikální a chemické způsoby konzervování vzorků

Způsob konzervování	Příklady použití	Kritická hlediska
lyofilizace	chléb, pečivo apod. vodné vzorky	nevhodné pro těkavé analyty
ozáření	vodné vzorky biologické vzorky	stabilitu analytu je třeba zjistit
antioxidanty	kapaliny a roztoky	stabilitu analytu je třeba zjistit ověřit specifické vlivy interferenci
antikoagulanty	klinické vzorky a vzorky krve	ověřit specifické vlivy interferenci
autoklavování	sterilizace tělních tekutin	stabilitu analytu je třeba zjistit

PŘEDBĚŽNÁ ÚPRAVA VZORKU

- **příprava vhodného a reprezentativního zkoušeného podílu** z původního přijatého vzorku.
 - předběžné úpravy vzorku
 - míchání,
 - Mletí
 - Drcení
 - Krájení
 - Filtrace
 - Odvržení jeho části a ponechání dílčího vzorku vhodné velikosti
- Získání reprezentativního podílu ze vzorku je **nejvíce neurčitý stupeň většiny analýz**
- **možnost kontaminace.** Téměř všechny techniky přípravy vzorků vyžadují tak těsný fyzický kontakt mezi vzorkem a laboratorním zařízením (a analytikem) - nebezpečí zavedení cizorodých látek do vzorku.
- **možnost ztrát analytu.**
- přípravné postupy by se měly projednat se zákazníkem a měl by se získat jeho souhlas v průběhu zadávání práce, ještě před odběrem vzorků.

Řízení kvality při odběru vzorků a při nakládání se vzorky

Příklad: ČSN ISO 5667-14

„Kvalita vod – Odběr vzorků – Část 14: Pokyny pro zabezpečování kvality odběru vzorků vod a manipulace s nimi.“

- systém slepých vzorků
- systém dvou analytických objemů vzorku, které se analyzují
- terénní vzorky na slepý pokus – tzv. „**trip blanks**“
- odběr opakovaných vzorků
- obohacené vzorky deionizované vody
- obohacené environmentální vzorky

System obohatených vzoriek

System opakovaných vzoriek

pre stopovú organickú analýzu

najčastejšie pri stanovení:

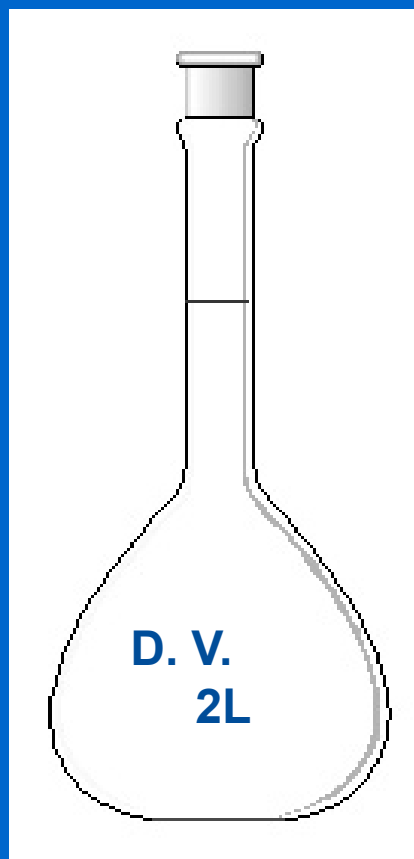
- **prchavých organických látok,**
- **PCB+OCP**
- **PAU**

Tieto látky sú menej stále vo vodnom prostredí v stopových množstvách, vzorky sa môžu stať nereprezentatívnymi

Hodnotenie:

- 1. kontaminácie vzorkovnic**
- 2. chýb pri procesoch odberu**
- 3. nestability vzorky**

Obohatená deionizovaná voda



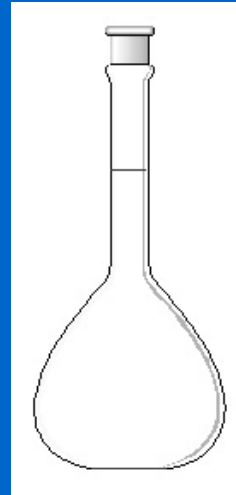
Prídavok presne známeho množstva ŠTD

Väčší objem deionizovanej vody obohatiť prídavkom vhodného štandardného roztoku

- presne známa koncentrácia
- presný známy objem



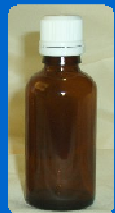
ostáva v lab., tma, T ↓
ANALÝZA



Obohatenú vzorku rozdeliť
na 2 časti, do vzorkovnic



zobrať do terénu, tma, T ↓



Preliať do
vzorkovnice



b_{3i}



b_{3ii}

Ostáva v pôvodnej vzorkovnici



Obohatiť
prídavkom ŠTD

b_3



Ostáva v pôvodnej
vzorkovnici

b_2



Preliať do
vzorkovnice

b_1

Obohatená deionizovaná voda

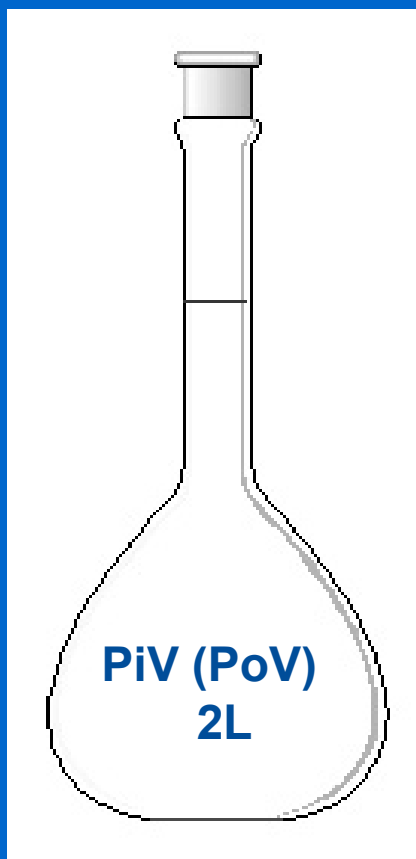
Všetky vzorky vrátiť do laboratória

ANALÝZA

vyhodnotenie

- **A vs b_1** – chyby spracovania vzorky, doprava
- **A vs b_{3ii}** – nestabilita, kontaminácia, doprava
- **A vs b_{3i}** – spracovanie vzorky, doprava,
nestabilita, kontaminácia
- **b_1 vs b_2** – kontaminácia vzorkovnic,
spracovanie vzorky
- **b_2 vs b_{3ii}** – nestabilita, kontaminácia
- **b_{3i} vs b_{3ii}** – kontaminácia vzorkovnic

Obohatená environmentálna vzorka



Prídavok presne známeho množstva ŠTD

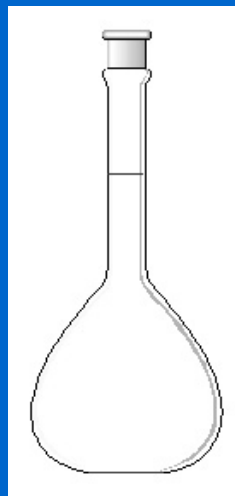
Väčší objem PITNEJ alebo POVRCHOVEJ vody obohatiť prídavkom vhodného štandardného roztoku

- presne známa koncentrácia
- presný známy objem

Pridávanie štandardu na mieste odberu! – málo praktické
Reálnu vzorku obohatiť v laboratóriu



ostáva v lab., tma, T ↓
ANALÝZA



Obohatenú vzorku rozdeliť
na 2 časti, do vzorkovnic



zobrať do terénu, tma, T ↓



Ostáva v pôvodnej
vzorkovnici



Preliat' do
vzorkovnice

Obohatená environmentálna vzorka

Všetky vzorky vrátiť do laboratória

ANALÝZA

vyhodnotenie

- **A vs b_1** – chyby spracovania vzorky, doprava
- **A vs b_2** – doprava
- **b_1 vs b_2** – kontaminácia vzorkovníc,
spracovanie vzorky, nestabilita

Všetko zopakovať 6x

Kontrolné vzorky majú tvoriť 2% analytických vzoriek

Opakovaná vzorka



Terénny odber



A_1

v čase t_0 prvá vzorka



a_1

A_2

v čase t_1 druhá vzorka



a_2

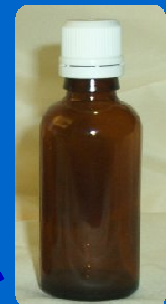
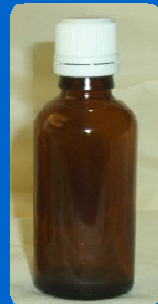
B

v čase t_2 tretia vzorka



B_1

B_2



b_{11}

b_{21}

b_{12}

b_{22}

Opakovaná vzorka

riadenie kvality napr. pre CHLOROFORM (VÚVH)

- **Odberové miesto – priesakový kanál Rajka**

Všetky vzorky do laboratória

ANALÝZA

vyhodnotenie

- **rozdiel A_1 a A_2 – celkový rozptyl (odber vzorky, vzorkovnica, skladovanie, analýza**
- **rozdiel medzi B_1 a B_2 (vyjadrené ako priemer b_{11} & b_{12} a b_{21} & b_{22}) – odhad analytického + odberového rozptylu**

Osnova

- porozumět principům GLP a nutnosti jejich dodržování pro zajištění kvality výsledků
- pracovat s příslušnými normami
- diskutovat organizace laboratoře a podmínky práce, akreditace zkušebních laboratoří a zkoušení jejich způsobilosti
- objasnit validaci zařízení, analytického systému a analytických metod
- vysvětlit provozní charakteristiky metod a hodnocením výsledků analýz
- realizovat správně odběry vzorků včetně základních technik odběru z homogenních a nehomogenních objektů
- navrhovat a vyhodnocovat vzorkovací plán
- zpracovávat experimentální data
- chápat a vysvětlit potřebu GLP v praxi

