

# 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 kvality)

## **Řízení kvality – Quality control**

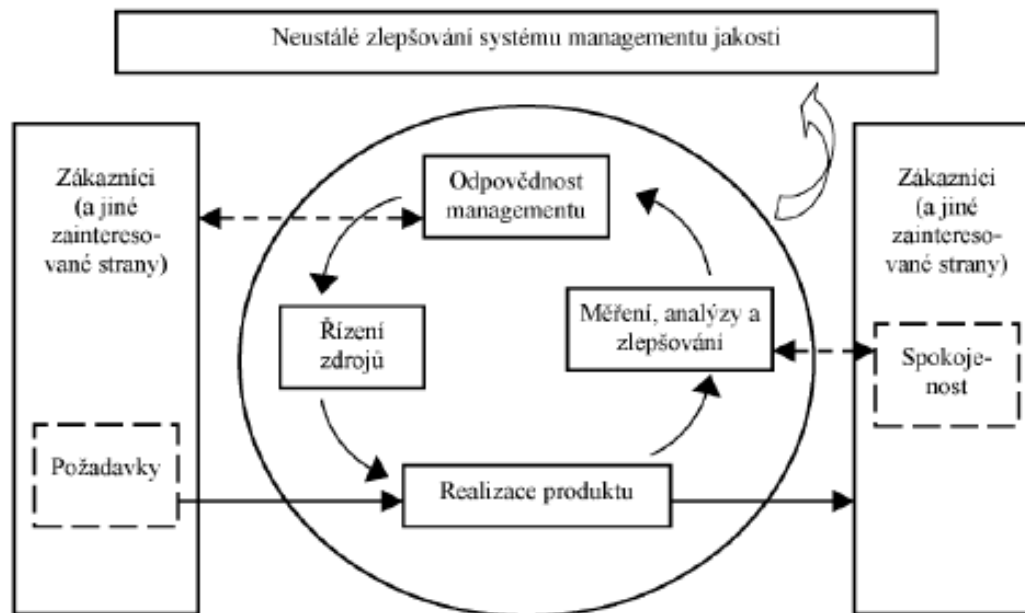
- část managementu kvality zaměřená na plnění požadavků na kvalitu
- plánované činnosti s cílem ověřovat kvalitu měření (operativní)

## **Prokazování kvality – Quality assurance**

- část managementu kvality zaměřená na poskytování důvěry, že požadavky na kvalitu budou splněny
- Interní zabezpečení kvality 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 kvality
- 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

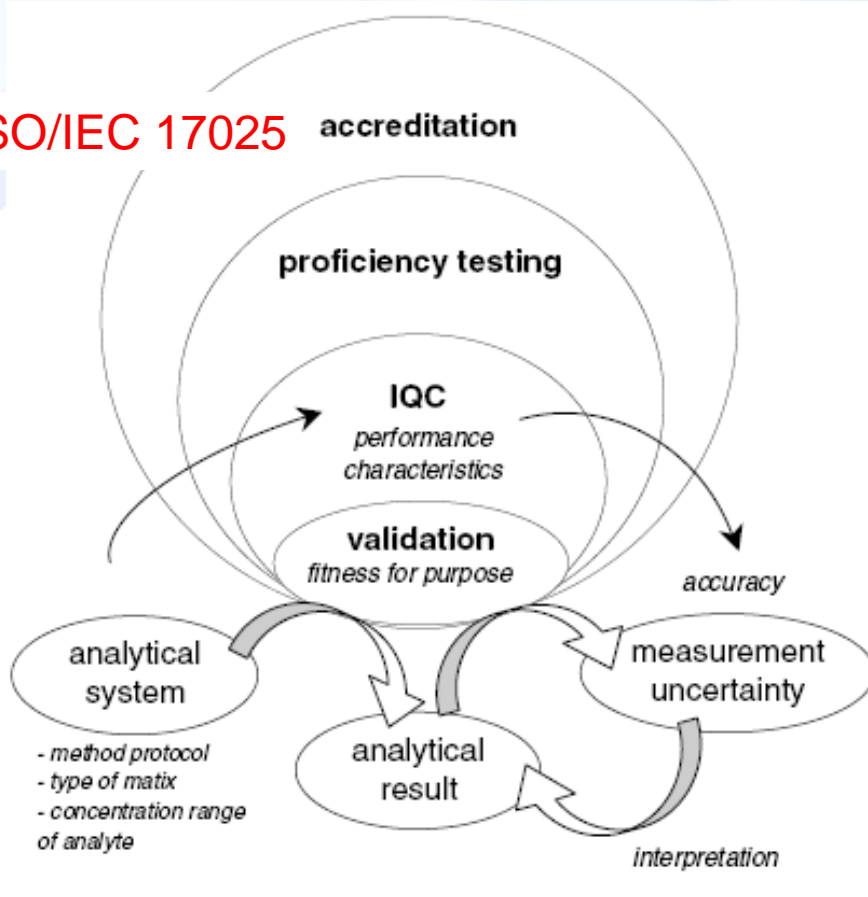
- reprodukovatelnost měření – porovnatelnost měření provedených různými laboratořemi
- návaznost měření k primárnímu etalonu  
Použití referenčních materiálů návazných na základní SI jednotku (kg, mol...)

*“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 standardisace 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 AQA

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"> <li>• Method validation</li> <li>• Proficiency testing</li> <li>• Quality Assurance</li> </ul>	[2,4,11,12]
EA	European Cooperation for Accreditation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Accreditation</li> </ul>	
CEN	European Committee for Normalization	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Standardization</li> </ul>	[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"> <li>• Method validation</li> <li>• Standardization</li> <li>• Internal quality control</li> <li>• Proficiency testing</li> <li>• Accreditation</li> </ul>	[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"> <li>• Method validation</li> </ul>	[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"> <li>• Method validation</li> </ul>	[27–31]
ILAC	International Laboratory Accreditation Cooperation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proficiency testing</li> <li>• Accreditation</li> </ul>	[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

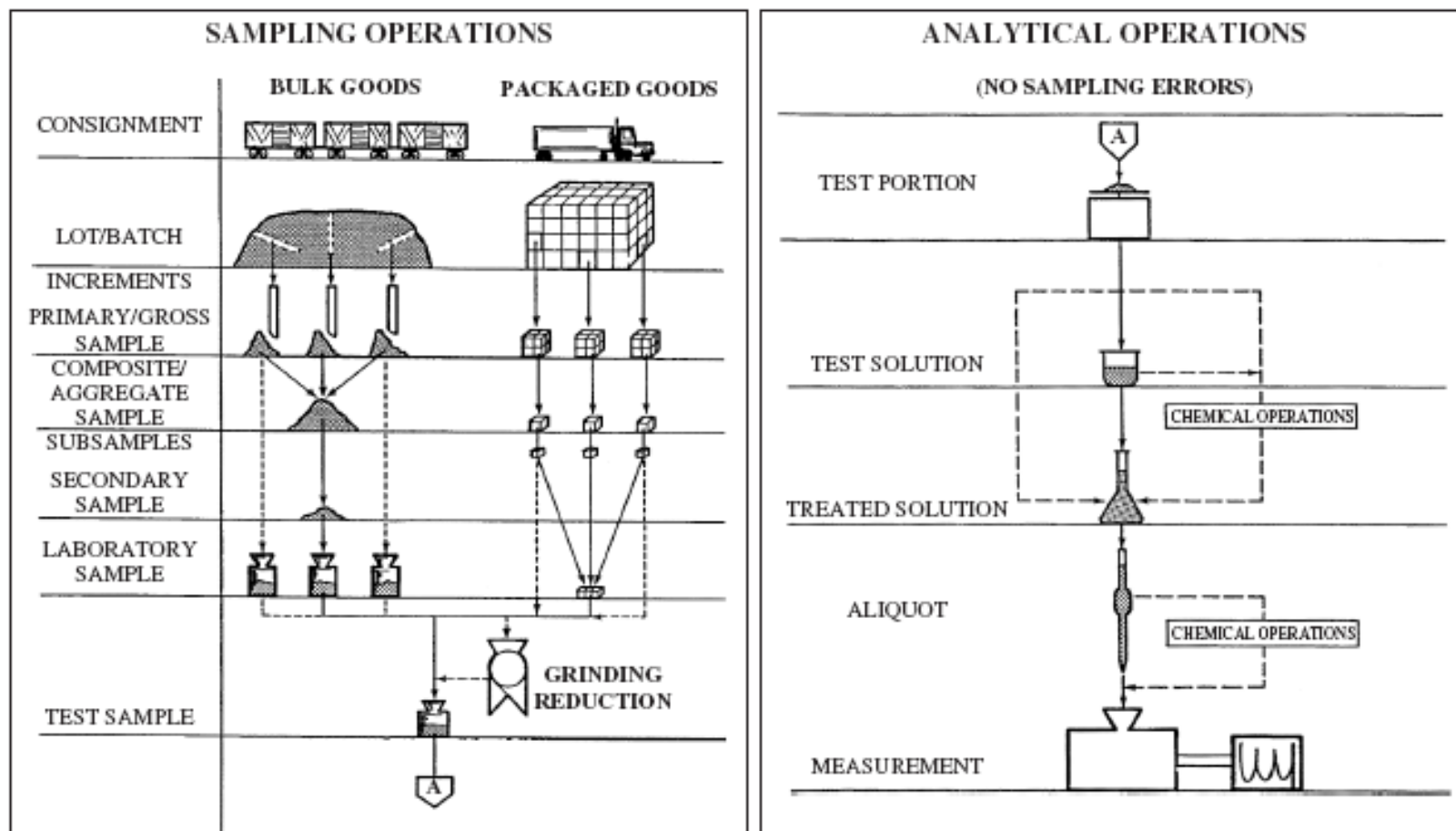
# Postupy prokazování kvality (QA) při odběru vzorků a při nakládání se vzorky

- 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 bažinových 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



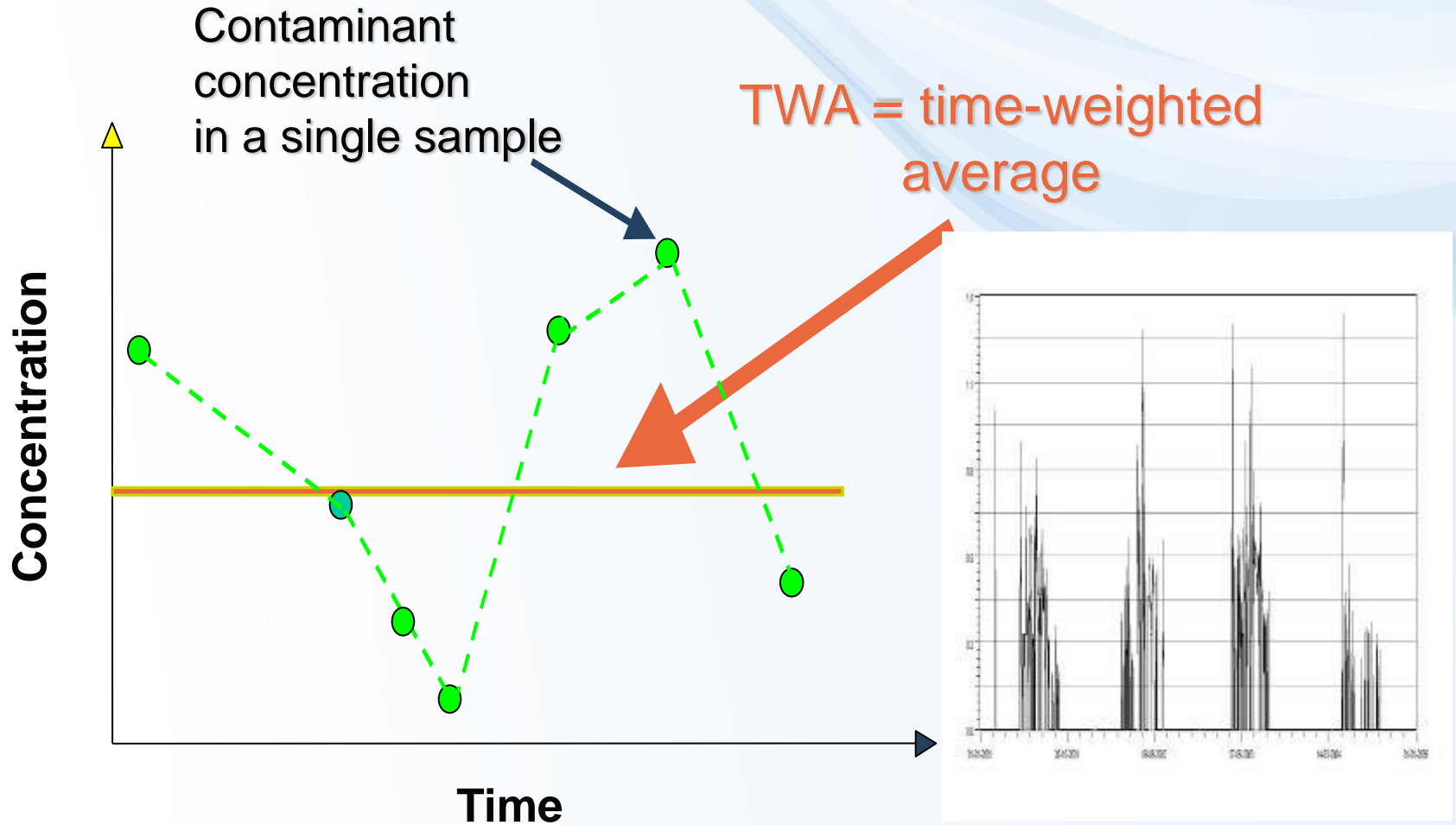
# Reprezentativní vzorek

- 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



# Selektivní vzorek

vzorkovací plán, který odděluje

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

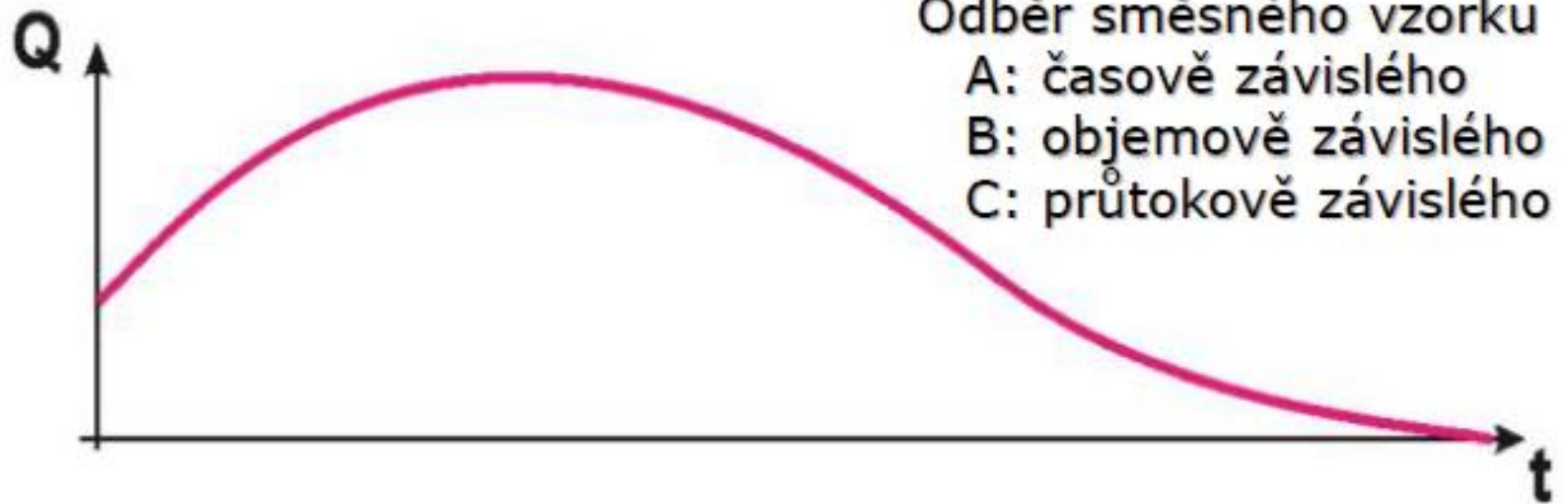
# Náhodný výběr

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

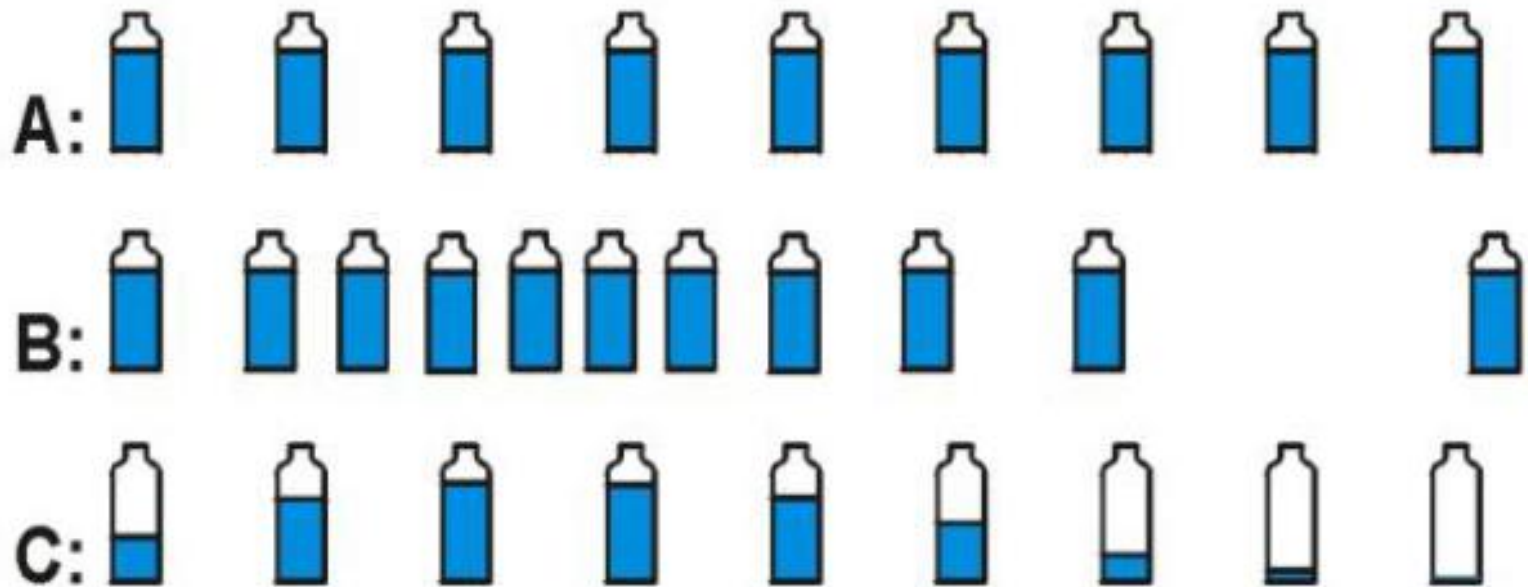
- **Jednoduchý náhodný výběr** – každý vzorek má stejnou pravděpodobnost, že bude vybrán
- **Náhodný výběr po vrstvách** – materiál se rozdělí na vrstvy a z každé vrstvy se odebere prostý vzorek.
- **Systematické vzorkování** – první vzorek se zvolí náhodně a následující vzorky se odebírají podle předem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

# Směsný (kompozitní) vzorek

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



Odběr směsného vzorku  
A: časově závislého  
B: objemově závislého  
C: průtokově závislého



# 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

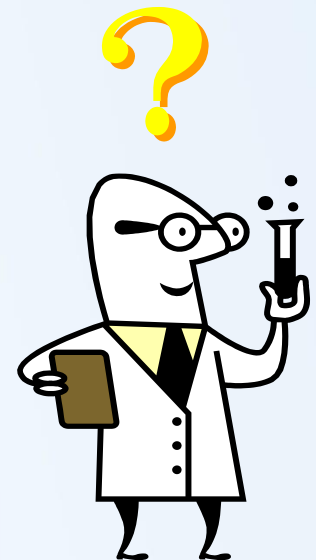
- **Pravděpodobnostní výběr**
  - když je zapotřebí reprezentativní vzorek
- **Nepravděpodobnostní výběr**
  - když nelze odebrat reprezentativní vzorek. Je to metoda vhodná pro selektivní vzorky
- **Hromadný odběr (bulk sampling)**
  - Tento typ vzorkování zahrnuje odběr vzorku z materiálu, který se 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 – optimální množství lze vyjádřit jako počet částic nezávisle na velikosti částic.

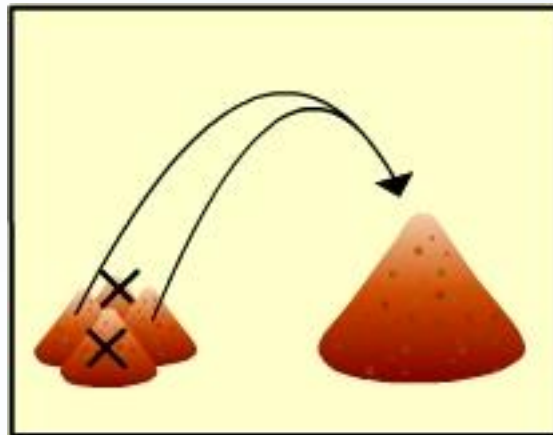
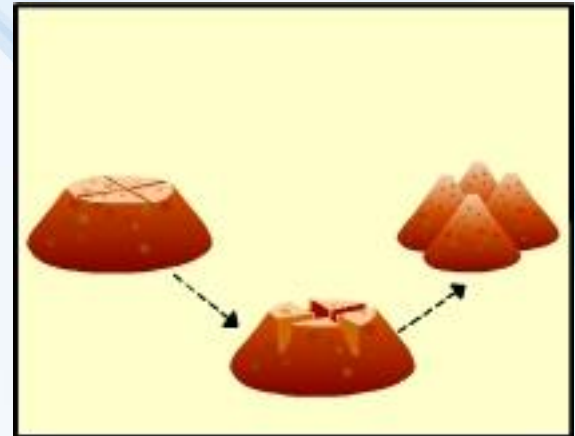
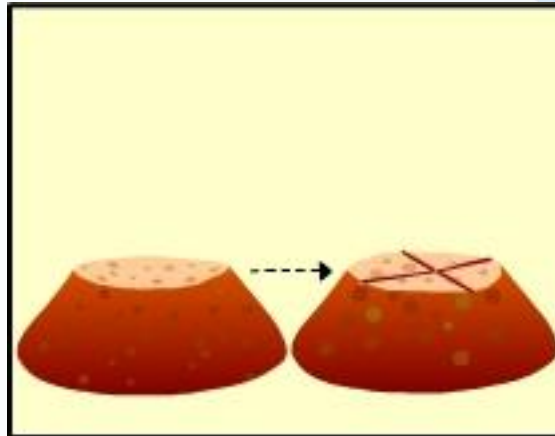
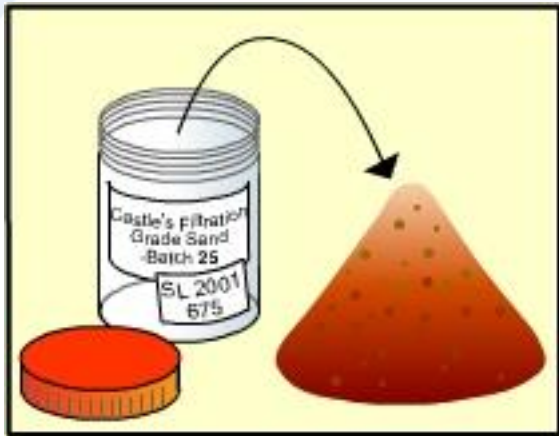
*Vztah mezi velikostí částic a zkoušeným podílem*

<b>Přibližná hmotnost částice [mg]</b>	<b>Zkoušený podíl [g]</b>
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

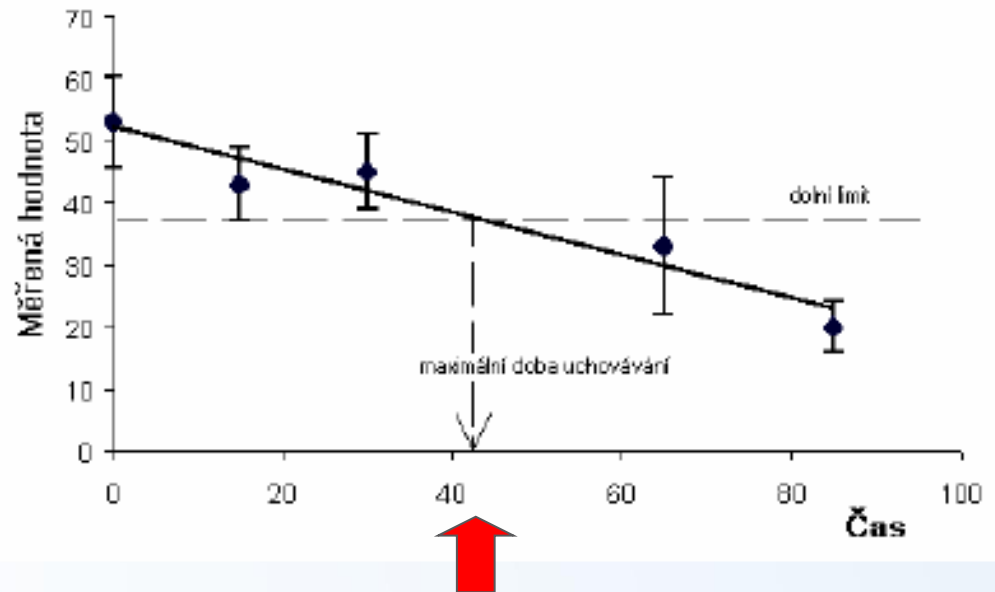
výběrová směrodatná odchylka

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

$d$  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 odběr vzorků** 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



**“slepý” vzorek 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 interferencí
antikoagulanty	klinické vzorky a vzorky krve	ověřit specifické vlivy interferencí
autoklávování	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