



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí

Správná laboratorní praxe

Branislav Vrana

vrana@recetox.muni.cz



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 s důrazem na vzorkování složek životního prostředí.
- chápat a vysvětlit potřebu GLP v praxi (testování bezpečnosti látek pro člověka a prostředí, mikrobiologie, laboratorní zvířata, léčiva, GMO atd.).





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>



Úvod



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

Kvalita



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 ČSN 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

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”

SYSTÉMY KVALITY, ŘÍZENÍ KVALITY A PROKAZOVÁNÍ KVALITY

(ČSN EN ISO 9000:2001 Systémy managementu kvality)

Řízení kvality – Quality control

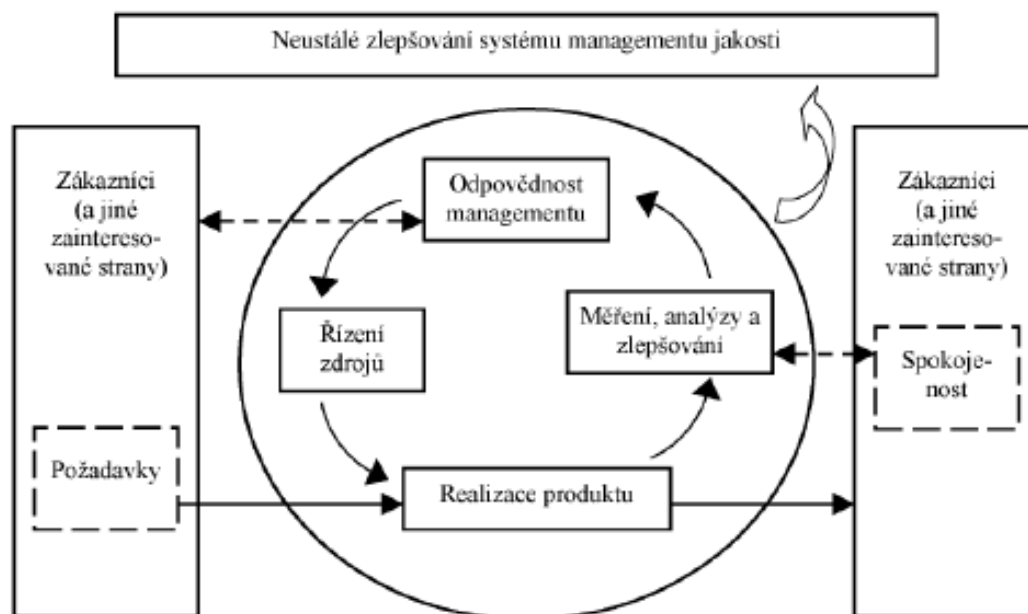
- plánované činnosti s cílem ověřovat kvalitu měření (operativní)
- část managementu kvality zaměřená na plnění požadavků na kvalitu

Prokazování kvality – Quality assurance

- Soubor opatření, které laboratoř musí podniknout, aby zajistila, že je vždy schopna poskytnout data s vysokou kvalitou.
- 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

System kvality

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



SYSTÉM KVALITY

- Činnosti prokazování a řízení kvality (QA/QC) jsou v organizaci uskutečňovány prostřednictvím souboru postupů prováděných personálem laboratoře při stálém monitorování její činnosti, které by ve svém důsledku měly vést k produkci důvěryhodných dat a k eliminaci příčin nedostatečné spolehlivosti (prevence chyb).
Vhodně nastavený **vnitřní systém řízení kvality** obsahuje
 - indikativní složku (= včasné odhalení neshody)
 - kurativní složku (= analýza a odstranění příčin)
 - zpětnou vazbu (úprava systému tak, aby se zamezil výskyt podobné neshody)

5Q – pět pravidel pro celkové zajištění a zlepšování kvality

- **plánování kvality (QP)** – volba analyzátorů, kalibračních a kontrolních materiálů, způsob odběru a přepravy vzorku do laboratoře;
- **kvalita laboratorního procesu (QLP)** – kvalifikace personálu, přístroje a údržba, měřící postupy – úkolem je standardizovat laboratorní činnost;
- **řízení kvality (QC)** – sledování a hodnocení procesů v laboratoři;
- **zabezpečení kvality (QA)** – monitorování činností, označování vzorků, snižování času od dodání vzorku do laboratoře po expedici výsledků (TAT – *anglicky* turn around time);
- **zlepšování kvality (QI)** – řešení problémů týkajících se kvality, stálé zlepšování procesů

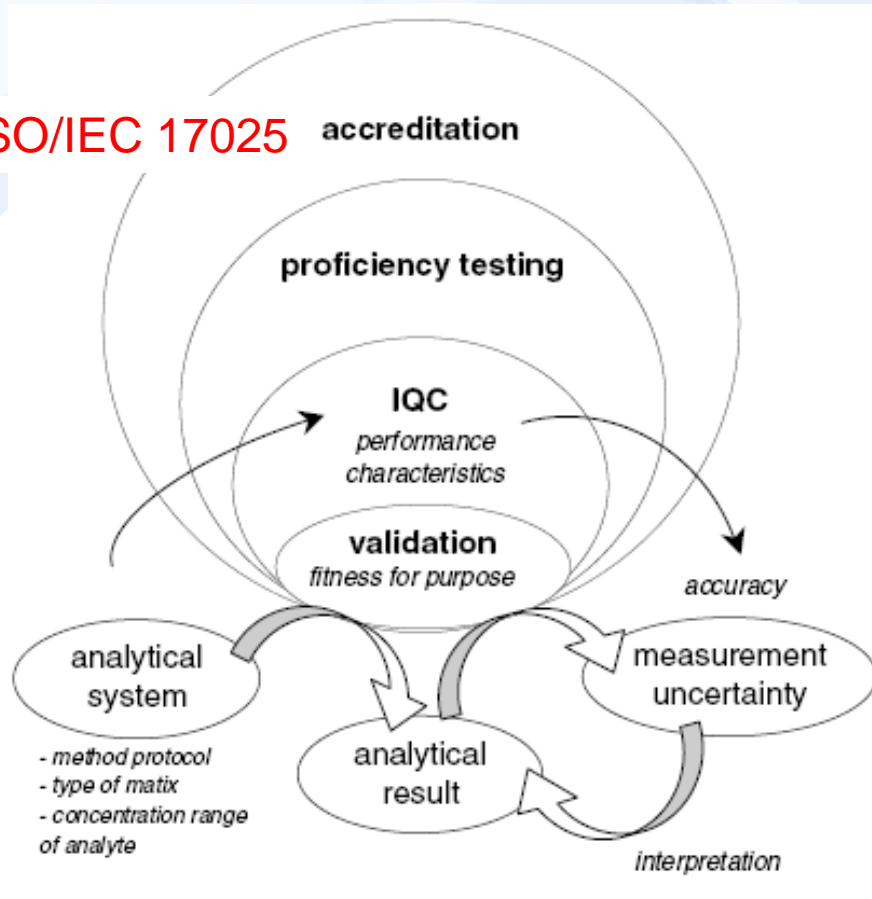
PŘÍRUČKA KVALITY

Dokumentem nejvyšší úrovně je příručka jakosti.

- laboratorní prostředí;
- zařízení;
- personál;
- požadavky na činidla, kalibrační a kontrolní standardy, referenční materiály;
- metody, postupy;
- kontrola a vydávání zpráv;
- návaznost výsledků;
- interní audity a přezkoumání systému;
- plány vzdělávání a záznamy.

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

QA/QC

Zabezpečování kvality (Quality assurance)

jsou všechny plánované a systematické činnosti nezbytné pro poskytnutí nezbytné důvěry, že produkt nebo služba bude splňovat dané požadavky na kvalitu (preventivní činnost).

Zahrnuje

- systém kvality
- vhodné laboratorní prostředí
- personál s odpovídajícím vzděláním a výcvikem, postupy a záznamy o něm
- vhodné zařízení, náležitě udržované a kalibrované
- postupy řízení kvality
- dokumentované a validované metody
- standardní operační postupy
- návazné kalibrace
- požadavky na činidla
- zkoušení způsobilosti
- kontrolní postupy a postupy vyjadřování výsledků
- preventivní opatření a opatření k nápravě
- interní prověrky a přezkoumání systému kvality
- postupy pro řešení stížností

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"> • 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

Terminologie

Kvalita (jakost): stupeň splnění určitých požadavků souborem znaků

Akreditace: postup, na jehož základě vystavuje úřední orgán oficiální uznání, že organizace nebo osoba jsou způsobilé k vykonávání určitých činností

Certifikace: postup, kterým třetí strana poskytuje písemné ujištění, že výrobek, proces nebo služba jsou ve shodě se stanovenými požadavky. Certifikace se od akreditace liší zejména tím, že výslovně nezmiňuje odbornou způsobilost.

Audit má několik forem:

- audit kvality uvnitř laboratoře - interní audit (ověření existence a zavedení postupu kvality)
- přezkoumání vyšším managementem (ověření, zda je systém účinný)
- posuzování: externí audit nezávislým orgánem jako součást akreditace

Od vstupu do EU ČR upravuje své zákonodárství a pravidla tak, aby nebyla v rozporu s mezinárodně přijatým systémem.

Týká se to i systému **Správné laboratorní praxe (SLP = GLP)**, na nějž navazují další mezinárodní pravidla zahrnující bezpečnost práce a ochranu zdraví, ochranu prostředí, práci s živými organismy, vnášení geneticky modifikovaných organismů do prostředí, vhodnost lékařských a veterinárních produktů, testy, patenty a podobně.

Firmy a instituce (zdravotnické, veterinární, obchodní) komunikující se zahraničím jsou nuceny režim GLP co nejrychleji zavést, jinak jejich laboratorní výsledky nebudou mít žádnou váhu.

Pojem **Správná laboratorní praxe** skrývá soubor opatření k zajištění kvality dat.

Odhaduje se, že až 10% HDP průmyslově vyspělých zemí lze přičíst k nákladům na různá měření, přičemž nejméně desetina této částky se spotřebuje na různá opatření v důsledku nesprávných měření. V minulosti se totiž často ukázalo, že analytické výsledky různých laboratoří nebo dokonce jedné laboratoře v různých obdobích nemusí být vůbec srovnatelné. Výsledky laboratorních testů jsou přitom často podkladem pro další rozhodnutí a opatření. Hodnota dat každé laboratoře závisí na úrovni důvěryhodnosti, kterou je možno přiřadit jejím výsledkům. Větší váhu budou mít výsledky od laboratoří, které mohou svým zákazníkům poskytnout důkaz o tom, že výsledky jejich práce mají určitou kvalitu. Je proto nezbytné, aby laboratoře měly zavedený určitý **system kvality**, který si mohou nechat posoudit třetí stranou.

Na zavedení pravidel GLP působí i silný **ekonomický tlak**. Systém, který umožní sjednotit kvalitu laboratorní praxe, přispívá k všeobecnému zlepšení ochrany zdraví a životního prostředí. Akceptování výsledků jiných laboratoří, zabrání zároveň zbytečnému opakování zkoušek v dalších zemích a uspoří finance státu i průmyslu, usnadní výměnu informací a odstraní překážky mezinárodního obchodu.

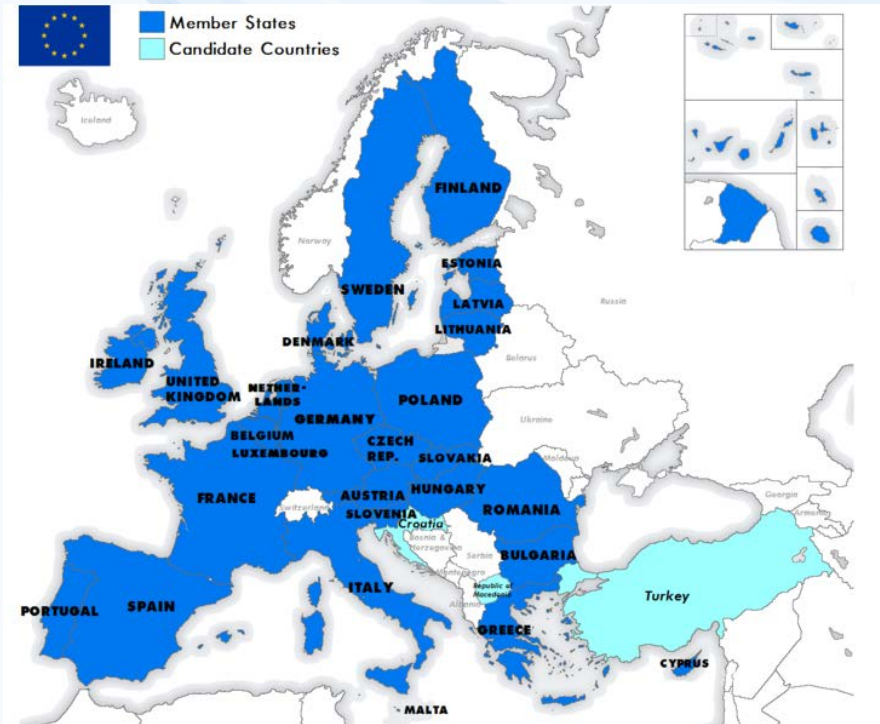
Zejména pro členské státy EU existuje silná legislativní provázanost a je nezbytné při tvorbě zásad GLP postupovat jednotně. Nekompatibilní pravidla v jednotlivých státech by totiž znamenala znemožnění vzájemného vývozu chemikálií a léčiv.

Historie



Historie Evropské unie

- 1952 Společenství pro uhlí a ocel (I, F, B, N, D, L)
- 1958 Evropské hospodářské společenství (EHS, EES)
- 1967 Evropská společenství (ES, EC)
- 1972 GB, 1981 G, 1986 S, P
- 1992 Maastrichtská dohoda
- 1992 EU
- 2004 Vstup ČR do EU

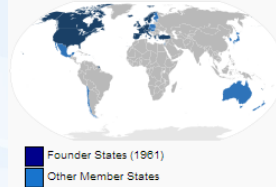


Nejdůležitější instituce

- Komise (výkonný orgán)
- Evropský parlament
- Rada ministrů
- Evropský soudní dvůr

Dokumenty pěti kategorií

- Nařízení (Regulation), závazné pro členy, nadřazené národním zákonům
- Směrnice (Directive), hranice, které se musí přizpůsobit národní legislativa
- Rozhodnutí (Decision), závazné jen pro určitého adresáta
- Doporučení (Recommendation), návrh nebo rada
- Stanovisko (Opinion), nezávazné hledisko



Historie Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj

(Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD)

- 1948 Organizace pro Evropskou hospodářskou spolupráci (OEEC)
- 1961 OECD

Nejvyšší orgány

- Rada
- Výkonný výbor

Základní úkoly

- Dosáhnout nejvyššího udržitelného hospodářského růstu a zaměstnanosti a zvyšovat životní standard členských zemí při udržení finanční stability
- Přispívat k rozumnému zvyšování hospodářství v členských i nečlenských zemích
- Přispívat k rozšiřování světového obchodu

Historický přehled o správné laboratorní praxi

- vlády jsou povinny chránit zdraví lidí a životní prostředí
- veškeré chemikálie vstupující na trh musí být testovány
- regulační úřady jednotlivých zemí nesou odpovědnost za provádění těchto testů
- v minulosti řada afér s klinickým užíváním preparátů, které se ukázaly jako toxické
- 70.léta: FDA v USA provádí kontrolu laboratorních postupů farmaceutických firem s velmi neuspokojivým výsledkem
- 1973 GLP v legislativě Nového Zélandu a Dánska
- 1978 předpisy o GLP v USA
- 1979 EPA GLP standardy
- 1977 při OECD vytvořena skupina, která má vytvořit mezinárodní pravidla GLP
- 1981 oficiální schválení OECD principů GLP
- 1989 schválení dokumentu o vzájemném akceptování dat v souladu s GLP
- tyto zásady se musí promítnout do legislativy členských států
- v každé zemi bude ustanoven inspektorát GLP
- 1998 nové zmodernizované **OECD Zásady GLP**
- ČR je členem OECD od roku 1996
- regulačním úřadem je Ministerstvo životního prostředí
- zásady SLP převzaty dokumenty Commission Directive č. 2004/10/EC (zásady SLP tvoří přílohu) a č. 2004/9/EC

EU a Správná laboratorní praxe

- EU převzala systém Správné laboratorní praxe OECD a podle tohoto rozhodnutí platí pro členské státy, že:
 - vypracují národní postupy pro sledování shody se zásadami SLP,
 - založené na inspekcích testovacích zařízení a auditech studií,
 - jmenují národní orgán, který bude vykonávat funkce a činnosti
 - vyžadované postupy pro sledování shody,
 - budou vyžadovat, aby testovací zařízení vystavovala prohlášení, že studie proběhla podle zásad SLP.

REACH a Chemický zákon

Nařízení č. 1907/2006 (**REACH**) Nový systém kontroly chemikálií zajistí, aby se nejpozději od roku 2020 používaly pouze chemické látky se známými vlastnostmi a to způsobem, který nepoškozuje životní prostředí a zdraví člověka.



Správnou laboratorní praxi stanovuje zákon č. 350/2011 Sb. o chemických látkách a chemických směsích a o změně některých zákonů (chemický zákon)

Správná laboratorní praxe = GLP



„Soubor pravidel tvořících systém práce testovacích zařízení při provádění neklinických studií bezpečnosti chemických látek a chemických přípravků; tato pravidla se týkají podmínek, za kterých se tyto studie plánují, kontrolují, zaznamenávají, předkládají a archivují (OECD).“

Správná laboratorní praxe není určena pro testovací zařízení – laboratoře, provádějící rutinní kontrolní analýzy, např. provozní kontroly, analýzy pitných vod nebo ovzduší

Správná laboratorní praxe

je manažerské schéma a vztahuje se na proces organizace a podmínky pro plánování, provádění, sledování, zaznamenávání a ohlašování výsledků studií.

Správná laboratorní praxe, včetně jejího formálního uznání akreditací nebo certifikací, pomáhá zajistit, že výsledky jsou validní a vhodné pro svůj účel.

Jádrem GLP je systém zabezpečování kvality (QA/QC)

Metody OECD

- Jedním z nutných předpokladů pro vzájemné uznávání výsledků je míra jejich hodnověrnosti. Ta je založena na:
 - práci ve stejném systému jakosti
 - použití stejných metod.
- **Zásady SLP** jako jediný systém předepisují pro určitý druh zkoušky konkrétní metodu.

GLP test guidelines

- Pokyny OECD ke zkouškám jsou kolekce mezinárodně dohodnutých zkušebních metod používaných vládami, v průmyslu a nezávislých laboratořích . Ty se používají k určení bezpečnosti chemických látek a chemických přípravků, včetně pesticidů a průmyslových chemikálií
- Metody stanovené OECD lze rozdělit do čtyř základních skupin:
 - metody fyzikálně chemické
 - vliv na biotický systém
 - degradace a akumulace
 - zdravotní efekty



Fyzikálně chemické metody

- OECD stanovuje 21 fyzikálně chemických metod. Z hlediska SLP se jedná o typické krátkodobé studie.
- Týkají se vlastností látek:
 - teploty tání
 - teploty varu
 - rozdělovacího koeficientu n-oktanol voda
 - rozpustnosti ve vodě
 - hustoty kapalin a tuhých látek
 - viskozity kapalin
 - dalších

Vliv na biotický systém

- Testů zkoumání vlivu na biotický systém je předepsáno 17. Jedná se o nejjednodušší testy, ve kterých jsou jako testovací systém použity živé organismy.
 - stanovení akutní toxicity na rybách
 - akutní toxicity na dafniích
 - inhibice růstu řas.

Degradace a akumulace

- Tato skupina zahrnuje 8 základních testů.
 - stanovení snadné biologické rozložitelnosti
 - BSK
 - ChSK
 - Zahn-Wellensova metoda (stanovení úplné biologické rozložitelnosti ve vodě rozpustných netěkavých organických látek, při které jsou tyto látky vystaveny účinku vysokých koncentrací mikroorganismů)
 - další

Vlivy na zdraví

- Testy zaměřeny na zjišťování nebezpečných vlastností převážně na živých organismech.
- Jako testovací systémy jsou používány jak vyšší organismy, tak buňky či mikroorganismy
- Patří sem:
 - akutní toxicita (orální, inhalační, kožní dráždivost)
 - subakutní toxicita
 - mutagenita
 - testování chronické toxicity
 - Karcinogenita
 - reprodukční toxicita
 - toxikokinetika.

Jednotlivé systémy kvality a jejich charakteristiky



Jednotlivé systémy kvality

Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO) je celosvětově zodpovědná za harmonizaci technických předpisů, včetně kvality

Společný evropský institut pro normalizaci (CEN) je zodpovědný za vydávání evropských norem EN

Základní filozofie **GLP, ISO 9000 a ISO/IEC 17025** je shodná, jde o systémy kvality, na jejichž konci je odvedená práce v nejvyšší možné kvalitě. Podmínkou je školený personál, odpovídající prostory a vybavení, kvalitní výchozí materiál, dobře odvedená činnost, dokumentace umožňující kdykoli činnost rekonstruovat a dobře fungující systém jištění kvality.

Volba systému kvality

- Jaký systém kvality je vhodný pro práci určité laboratoře, je do značné míry určeno oblastí, ve které působí.
 - Normy **ISO 9000** jsou určeny zejména pro výrobní podniky.
 - chce-li laboratoř vydávat protokoly, může prokázat svou způsobilost akreditací podle **ISO 17025**, která popisuje všeobecná kritéria pro činnost zkušebních laboratoří.
 - Působí-li laboratoř v oblasti bezpečnosti látek ve vztahu k ochraně člověka a prostředí, měla by pracovat ve shodě v **principy GLP**.

Normy řady ISO 9000

popisují modely zabezpečování kvality při návrhu, vývoji, výrobě, instalaci a servisu. Jsou aplikovatelné na různé průmyslové obory, jsou zaváděny především v průmyslových podnicích.

V rámci certifikace může být do systému kvality zařazena i podniková laboratoř, která produkuje výsledky pro interní kontrolu. Výsledkem posouzení je certifikát potvrzující dosažení přiměřené důvěry, že výrobek, postup nebo služba je ve shodě s předepsanou normou.

Certifikace je dobrovolná a je spojena s konkurenceschopností podniku. Certifikační orgán pak provádí periodické kontroly během celé doby platnosti certifikátu.

Je to mezinárodní systém kvality a slouží jako podklad pro certifikaci, k dosažení podnikatelského cíle, k zabezpečování kvality (audity) nebo odstraňování nedostatků.

Tento systém je **nejobecnější** a **je komplexní**, povinnost jej dodržovat **nevyplývá ze zákona** a firma jej zavádí jako známku své kvality.

ISO/IEC 17025

kladou důraz na zabezpečení kvality a věrohodnost údajů poskytovaných laboratoří. Rozšiřuje prvky systému jakosti o:

- právní identifikovatelnost laboratoře
- nestrannost a věrohodnost laboratoře při vykonávání zkoušek
- odbornou kvalifikaci personálu a prokázání technických znalostí
- prokázání návaznosti měření (referenční materiály, mezilaboratorní testy)
- stanovení minimálního rozsahu informací v protokolu o zkoušce
- požadavky na archivaci i primárních dat
- požadavky na důvěrnost a utajení získaných dat

Je určeno především pro laboratoře provádějící zkoušky opakujícího se charakteru (analýzy vod, ovzduší potravin)

ČSN EN ISO/IEC 17025 a jeho dokumentace

Aby laboratoř získala osvědčení o akreditaci, musí mít zaveden funkční a dostatečně zdokumentovaný systém kvality, aby bylo možné kdykoli prokázat, že zkouška proběhla za definovaných podmínek. Musí dodržovat platné národní legislativy a hygienické předpisy a veškeré své činnosti musí mít popsány v **příručce kvality**. To je základní dokument popisující plnění akreditačních kritérií a má být k dispozici všem pracovníkům laboratoře a být trvale udržován v aktuálním stavu. Musí obsahovat:

- identifikační údaje laboratoře a organizace, kam je začleněna
- ustanovení o koncepci kvality
- strukturu laboratoře, organizační schéma, kvalifikovaný personál
- popis pracovních a funkčních činností, odpovědností a pravomocí (laboratoř má mít vedoucího, technického vedoucího a manažera kvality)
- dokumentaci prostor, vstupů osob, úklidu, zařízení a vybavení
- všeobecné a specifické postupy zabezpečování kvality
- odkazy na zkoušení způsobilosti a referenční materiály
- uspořádání zpětné vazby a opatření k nápravě
- postupy pro vyřizování stížností
- zabezpečení neustrannosti, nezávislosti a věrohodnosti (nesmí být vnější vlivy, komerční ovlivnění, vazba na výrobce)

Laboratoř musí vést záznamy o každém důležitém **zařzení** a tyto musí obsahovat:

- název zařízení
- výrobce, identifikace typu a výrobní číslo
- datum dodání a uvedení do provozu
- současné umístění
- stav zařízení při dodání a údržba
- poškození, selhání, opravy
- identifikační číslo v laboratoři
- údržba, zodpovědná osoba
- technická dokumentace
- omezení pro použití
- postupy pro provádění kalibrace (jak se provádí, jak často, rekalkibrace standardů, návaznost)

Potřebnou **návaznost** poskytují v chemických měřeních **referenční materiály**. Jsou používány pro kalibraci přístrojů a metod, sledování provozu a prokazování správnosti výsledků a validaci metod.

Referenční materiál je definován jako látka, jejíž jedna nebo více vlastností jsou dostatečně homogenní a určené, aby mohly být použity pro přisouzení hodnot.

Certifikovaného referenčního materiálu lze použít pro kalibraci s návazností celé metody. Shoda mezi hodnotou získanou analýzou a certifikovanou hodnotou lze použít pro stanovení správnosti hodnot u analyzovaných vzorků.

U maticových RM je třeba volit matici co nejpodobnější analyzovanému vzorku. Pro přípravu roztoků standardů v laboratoři jsou nezbytné písemné návody a trvalé označení roztoků identifikací, koncentrací, datem, expirací a zdravotními riziky. RM je třeba vhodným způsobem skladovat a je nutné vést evidenci všech používaných RM s přesnou identifikací (typ, zdroj, šarže), podmínkách skladování, expiraci, způsobu použití, omezení, certifikátem a dokumentací výrobce.

Laboratoř by měla vycházet z **normovaných metod**, v případě vlastních metod je třeba provést jejich **validaci**

Vlastní metody musí být plně dokumentovány, validace podloženy výsledky měření, stanoven postup pro řízení kvality.

Metody se používají jako **standardní operační postupy (SOP)**.

Metody podléhají periodickým revizím, i zrevidované metody musí být dokumentovány a chváleny, a staré nahrazeny.

Validace je soubor systematických laboratorních studií dokládajících provozní charakteristiky metody a měly by zahrnovat:

- selektivitu
- rozsah
- linearitu
- citlivost
- mez detekce
- mez stanovitelnosti
- robustnost
- správnost
- přesnost

To vše musí být uvedeno v dokumentaci metody.

Správná laboratorní praxe

V systému GLP se provádí farmakologické a toxikologické studie nových léčiv a chemikálií a veškeré zkoušky, kde se získávají údaje s ohledem na lidské zdraví a životní prostředí.

GLP je systém jakosti, týkající se procesu organizace a podmínek, za nichž jsou neklinické studie plánovány, prováděny, sledovány, zaznamenávány, archivovány a o jejich výsledcích podávány zprávy.

Oproti dříve uvedeným má některé zvláštnosti:

- Na rozdíl od správné výrobní praxe, kde na konci stojí výrobek o vysoké kvalitě, zde stojí výsledek o vysoké validitě.
- Jelikož se testují potenciální zdroje poškození zdraví, je systém GLP povinný
- Existuje státní inspektorát GLP, který dohlíží, že testování probíhá v souladu se zásadami GLP
- Inspektorát vydává Osvědčení GLP zařízením, která splňují požadavky.

Správná výrobní praxe, SVP (Good manufacturing practice, cGMP)

se týká zejména farmaceutické výroby. Požadavky na kvalitu léčiv jsou extrémně vysoké a tato kvalita nesmí kolísat v čase.

Rozdíly oproti ostatním systémům jištění kvality:

- trojí nezávislé jištění kvality
 - ředitel má nejvyšší odpovědnost
 - vedoucí kontroly kvality (rozhoduje o splnění kvality podle zkoušky)
 - vedoucí jištění kvality (neustále sleduje výrobní podmínky)
- Dodržování cGMP je povinné, systém jištění kvality je doplněn o státní dozor.
- Státní orgány provádějí inspekce, zda v kterémkoli okamžiku nedochází ohrožení kvality
Inspektor má právo kdykoli podnik navštívit a okamžitě zastavit výrobu a distribuci

Správná klinická praxe

Po úspěšném ukončení neklinických zkoušek následuje klinické zkoušení, které musí probíhat za přesně definovaných a objektivně kontrolovatelných podmínek, aby se dospělo k validním výsledkům.

Podmínky Správné klinické praxe jsou podobné GLP:

- klade se důraz na zkoušení a výsledky
- dodržování je povinné
- existuje inspektorát SKP, jehož pracovníci provádějí audity na pracovištích

Rozdíly:

- klinické pracoviště žádá státní regulační úřad o schválení každé konkrétní klinické zkoušky
- každé klinické pracoviště smí provádět jen určitý typ klinického hodnocení

Správná laboratorní praxe



Definice používaných pojmů

Pojmy vztahující se k organizaci zkušebního pracoviště:

- **zkušební pracoviště** (osoby, prostory, vybavení)
- **vedoucí studie** (osoba odpovědná za celkovou studii)
- **plán zajišťování kvality** (vnitřní kontrolní systém k zajištění GLP)
- **standardní operační postupy** (podrobné písemné popisy zkoušek)
- **zadavatel** (osoba nebo organizace, která studii zadává a financuje)

Pojmy vztahující se ke studii

- **studie** (pokus nebo soustava pokusů k získání požadovaných údajů)
- **plán studie** (dokument stanovující celý rozsah studie)
- **zkušební systém** (použitý ve studii - chemický, biologický, buněčný)
- **primární údaje** (všechny laboratorní záznamy původních pozorování)
- **testovaný vzorek** (materiál odebraný ze studovaného systému ke zkoušce)

Pojmy vztahující se ke zkoušené látce:

- **zkoušená látka** (látka nebo směs, která je předmětem zkoumání)
- **referenční látka** (dostatečně definovaná látka sloužící ke srovnání)
- **šarže** (specifické množství látky získané v jediném výrobním cyklu)
- **vehikulum** (nosič, prostředek pro rozpouštění zkoumané látky pro aplikaci)

Zásady GLP zahrnují

- organizaci a pracovníky
- plán zajišťování kvality
- pracoviště
- přístroje, materiály, činidla
- zkušební systémy
- zkoušené a referenční látky
- standardní operační postupy
- provádění studie
- dokumentaci výsledků
- archivaci záznamů



Organizace a pracovníci zkušebního pracoviště

Povinnosti vedení pracoviště:

- zajistit dodržování GLP (prostory, vybavení, kvalifikovaní pracovníci, zvyšování kvalifikace a školení, dodržování bezpečnosti, jasná pravomoc a odpovědnost, plány studií, dokumentace, SOP, archivace, termíny, dostatek pracovníků)

Povinnosti vedoucího studie:

- zodpovědný za celkové provedení studie a zprávu (odsouhlasení plánu, dodržování postupů, záznamy změn, plná dokumentace, archivace dat)
- podepsáním a datováním závěrečné zprávy potvrzuje dodržení zásad GLP a přebírá odpovědnost za správnost údajů
- po ukončení studie se archivuje plán studie, primární data, závěrečná zpráva a podpůrné materiály

Povinnosti pracovníků:

- dodržování pravidel bezpečnosti práce s chemikáliemi
- dodržování zdravotních opatření, aby neohrozili sebe a nenarušili studii

Plán zajišťování kvality

- je písemný plán zaručující, že prováděné studie budou ve shodě s GLP
- je realizován odpovědnou osobou, pověřenou vedením pracoviště
- tato osoba se nemá účastnit studie, jejíž kvalitu zajišťuje
- veškerá zjištění hlásí přímo vedoucímu pracoviště

Pracovník pověřený zajišťováním kvality

- dohlíží na to, aby zúčastnění pracovníci měli plán studie a odpovídající SOP
- pravidelnými inspekcemi a audity dohlíží na jejich dodržování
- uchovává veškeré zápisy z těchto inspekcí
- neprodleně oznamuje vedoucímu pracoviště a vedoucímu studie odchylky
- prostuduje závěrečné zprávy a prověří, že metody a pozorování jsou správně popsány a výsledky odpovídají primárním datům
- napíše a podepíše hlášení, které se přikládá k závěrečné zprávě studie

Pracoviště

- má mít přiměřené prostory a konstrukci, aby se omezily rušivé faktory
- má umožnit oddělení různých činností

Prostory pro zkušební systémy

- dostatečně velké a oddělené, aby se zajistila izolace jednotlivých zkoušek
- specializované pracoviště pro diagnostiku vzorků, které by mohly postihnout systém a narušit jeho kvalitu
- oddělené a dostatečně chráněné skladovací prostory
- chlazení nestabilních vzorků

Manipulační prostory

- předcházení záměnám a kontaminacím, sklady oddělené od laboratoří
- zásobní roztoky odděleně od vzorků a zkušebních systémů
- jednoznačné označení totožnosti, koncentrace, čistoty, stability
- bezpečné uchování nebezpečných látek

Archivy

- prostory pro uchovávání primárních dat, závěrečných zpráv a vzorků

Likvidace odpadů

- zacházení s odpady a jejich likvidace nesmí narušovat průběh studie
- zacházení s odpady a jejich likvidace musí být v souladu s platnými předpisy

Přístroje, materiály a činidla

Přístroje

- musí být vhodného typu a přiměřené výkonnosti
- vhodné umístění
- dobrý technický stav
- pravidelné prohlížení, čištění, údržba
- pravidelná kalibrace podle SOP
- uchovávání záznamů o všech činnostech

Materiály

- použité ve studii nesmějí mít rušivý vliv na zkušební systém

Činidla

- musí být příslušně označena
- jednoznačný původ, totožnost, koncentrace, datum přípravy, expirace
- informace o uchovávání

Zkušební systémy

Systemy fyzikální a chemické

- vhodného typu, výkonnosti a umístění
- pro kontrolu funkce se užívá referenčních materiálů

Systemy biologické

- vhodné podmínky pro laboratorní zvířata, rostliny, buněčné systémy
- dodržení platných předpisů o dovozu, získávání, ošetřování a užití
- izolace nově došlých systémů do ověření zdravotního stavu
- záznamy o dodavateli, datu a stavu
- dodržení aklimatizace systémů před zkouškou
- plná identifikace na všech kontejnerech
- je třeba evidovat veškerá onemocnění v průběhu studie, diagnózy, léčení

Zkoušené a referenční látky

Převzetí, skladování a vzorkování látek

- je třeba vést záznamy o převzetí látek, datu, množství, testování
- všechny zásobní roztoky musí mít příslušné označení a pokyny ke skladování
- musí existovat postupy na odběr a zacházení se vzorky, aby se zaručila homogenita a stabilita a předešlo se kontaminaci

Charakterizace látek

- každá zkoušená i referenční látka musí být přiměřeně označená
- musí být známa totožnost všech zkoušených látek
- musí být známa jejich stabilita za podmínek uchovávání
- musí být známa jejich stabilita za podmínek zkoušky
- je-li látka testována v nosiči, musí existovat SOP na homogenitu
- u studií delších než 4 týdny musí být uchována část vzorku k přezkoušení

Standardní operační postupy

- Každé zkušební pracoviště musí mít vypracovány vlastní písemné SOP, schválené vedením, které zaručují kvalitu a neporušenost údajů.
- V každé jednotlivé laboratoři musí být okamžitě k dispozici SOP k činnostem, které se v ní provádějí, upřednostňují se normované metody.

SOP jsou nezbytné pro následující činnosti:

- převzetí látky, ověření totožnosti, označení, skladování, vzorkování
- kontrola, údržba, čištění a kalibrace přístrojů, příprava činidel
- vedení záznamů a hlášení, ukládání a vyhledávání, zpracování dat, sestavování zpráv, kódová značení
- příprava prostor, kontrola podmínek,
- ověření systému před začátkem, během a po ukončení studie
- zacházení s uhynulými jedinci zkušebního systému
- postup zajišťování kvality, provádění auditů probíhajících studií, revize závěrečných zpráv, podávání hlášení
- opatření k ochraně zdraví a bezpečnosti podle požadavků národní a mezinárodní legislativy

Provedení studie

Před zahájením studie musí být vypracován písemný plán studie, který se archivuje s primárními daty. Veškeré schválené změny, zdůvodněné a podepsané vedoucím studie, se také archivují.

Plán studie obsahuje:

- název, povaha a účel studie, zkoušené látky, jejich názvy a kódy, referenční materiály
- jméno a adresa zadavatele, zkušebního pracoviště a vedoucího studie
- datum schválení a podepsání plánu vedoucím studie, případně zadavatelem termíny zahájení a ukončení práce
- metody zkoušení, odkaz na směrnice
- zdůvodnění výběru a charakteristika zkušebního systému
- aplikace, velikost dávek, koncentrace, trvání
- podrobný popis pokusného schématu, metod, podmínek, frekvence analýz
- dokumentace, seznam záznamů, jež je třeba chovávat

Průběh studie

- studie a její materiály musí být jednoznačně označeny
- musí probíhat podle plánu,
- veškeré experimentální údaje musí být zapsány, datovány, podepsány, opravy zdůvodněny, datovány a podepsány
- počítačová data vnášena odpovědným pracovníkem

Dokumentace výsledků studie

Každá studie musí být uzavřena závěrečnou zprávou, podepsanou a datovanou vedoucím studie. Jakékoli dílčí zprávy musí být datovány a podepsány. Opravy a doplňky mají mít formu zdůvodněných a datovaných dodatků.

Závěrečná zpráva obsahuje:

- název zprávy, název a adresa laboratoře
- označení zkoušené látky a referenčních materiálů, čistota, stabilita
- informace o zkušebním pracovišti, vedoucí studie, případně dílčích studií
- data započetí a ukončení
- prohlášení útvaru zabezpečování kvality s daty inspekcí, nálezy a hlášením
- popis materiálů a zkušebních metod, odkazy na směrnice
- souhrn výsledků, všechny informace požadované plánem
- vlastní vyhodnocení výsledků, výpočty, statistické metody
- hodnocení, diskuse, závěry
- archivace, údaje o uložení vzorků, primárních dat a závěrečné zprávy

Archivace záznamů a materiálů

Ukládání a vyhledávání

Archivy musí bezpečně uchovávat:

- plány studií
- primární údaje
- závěrečné zprávy
- hlášení o inspekcích a auditech podle plánu zajišťování kvality
- vzorky

Materiály musí být přehledné a snadno vyhledatelné. Přístup k nim mají jen osoby zmocněné vedoucím pracoviště, o pohybu dokumentů je třeba vést řádné záznamy.

Uchovávání dokumentace

Po dobu určenou úřady je třeba uchovávat:

- plán studie, primární údaje, vzorky, závěrečné zprávy
- záznamy o inspekcích a auditech
- přehled o kvalifikaci, školení, délce praxe pracovníků, popisy práce
- záznamy o údržbě a kalibraci zařízení
- SOP v historickém pořadí podle a data vzniku

Vzorky se uchovávají jen dokud jejich stav umožňuje vyhodnocení.

Při zrušení pracoviště se příslušný archiv převede zadavateli

Způsoby posuzování systémů kvality



AKREDITACE

"Accredo - dávám důvěru"

- **Akreditace** (z franc. *accréditer*, z *mettre à crédit*, ověřit důvěryhodnost) znamená oprávnění k určité činnosti nebo ověření a uznání takového oprávnění.
- Pomocí akreditace se ve veřejném zájmu vymezuje **odborná způsobilost a bezúhonnost organizací**, které nabízejí služby zkoušení, inspekce, kalibrace a certifikace (často známější jako služby posuzování shody).

AKREDITACE

Akreditace (používaná ve všech sektorech trhu) poskytuje neustranné posouzení dodržování mezinárodně uznávaných standardů. Nabízí jednotný, transparentní a opakovatelný přístup, který:

- podniky a podnikatelé dobrovolně přijímají,
- omezuje nutnost zaměstnávat specializované posuzovatele v ústředních orgánech státní správy a regionální samosprávy,
- posiluje důvěru podnikatelů a spotřebitelů.

Proces akreditace nabízí cenově efektivní způsob jak realizovat veřejné služby, které:

- jsou spolehlivé, vysoce kvalitní a bezpečné,
- napomáhají plnění předpisů,
- vyžadují nižší administrativní zatížení a snižují byrokracii

AKREDITACE

- je poskytována v souladu s právním rámcem,
- pokud probíhá podle uznávaných harmonizovaných norem – je považována za činnost orgánu veřejné správy,
- je realizována jako nezisková činnost a zcela nezávisle na obchodních zájmech
- nekonkuruje jiným akreditačním orgánům ani subjektům posuzování shody
- je nezávislá a nestranná,
- orgány neprovádějí činnosti posuzování shody

Akreditace

Akreditaci provádí třetí, nezávislá strana, kterou je **akreditační orgán**.

Osvědčení o akreditaci je oficiální konstatování, že laboratoř splňuje kritéria ČSN EN ISO/IEC17025 (2005) a je odborně, technicky, organizačně a personálně způsobilá k nezávislému provádění zkoušek specifikovaných v příloze osvědčení.

Akreditace se řídí metodickým pokynem

MPA 00-01-12 *Český Institut pro akreditaci*, o. p. s..

Akreditační orgán provádí minimálně jedenkrát ročně **dozor nad dodržováním akreditačních kritérií** u držitelů osvědčení.

Akreditace může být

- dobrovolná, přispívá k věrohodnosti laboratoře
- vyžadovaná legislativou (v regulované sféře)

Akreditační systém České republiky

vychází z mezinárodních souvislostí:

Globální koncepce přístupu ke zkoušení a certifikaci ES:

- nebude se budovat nadnárodní systém, ale budou se uznávat národní
- akreditační, certifikační a inspekční orgány se budou řídit jednotnými pravidly (EN ISO/IEC 17025:2005, EN ISO 15189:2007 – speciálně pro zdravotnické laboratoře)
- systémy kvality výrobků budou odpovídat normám ISO 9000
- odpovědnost za kvalitu výrobků nese výrobce
- specifikuje se používání značky Evropský certifikát CE
- upravuje se vzájemné uznávání zkoušek
- harmonizace se týkají především ochrany veřejných zájmů (zdraví obyvatel, bezpečnost, ochrana životního prostředí), tj. regulovaná sféra, neregulovaná sféra je dobrovolná

Evropské nařízení č. 765/2008/ES

- právní rámec pro poskytování akreditačních služeb v Evropě
Národní akreditační orgány se sdružují v mezinárodních organizacích, zabývajících se akreditací, certifikací a zkoušením:

- **Evropská organizace pro akreditaci**

(EA - European co-operation for Accreditation)



- **Mezinárodní organizace pro akredici laboratoří**

(ILAC - the International Laboratory Accreditation Cooperation)

- **Mezinárodní akreditační forum**

(IAF – the International Accreditation Forum)



Základní požadavky pro prohlášení důvěry:

- nestrannost a nezávislost akreditačních orgánů

- technická způsobilost akreditovaných objektů



Český institut pro akreditaci (ČIA)

je národní akreditační orgán České republiky.

Je výkonným orgánem pro:

- akreditaci zkušebních laboratoří
- akreditaci kalibračních laboratoří
- akreditaci certifikačních orgánů provádějících certifikaci výrobků, systémů jakosti a personálu
- akreditaci certifikačních orgánů provádějících certifikaci EMS organizací
- akreditaci inspekčních orgánů

Akreditační systém je založen na evropských normách EN ISO/IEC, které byly přeloženy a začleněny do systému národních norem jako ČSN EN ISO/IEC.

ČIA vydává **Metodické pokyny pro akreditaci**, které interpretují a zpřesňují obecné formulace evropských norem a jsou pravidelně aktualizovány.

ČIA je **přidruženým členem EA ILAC a IAF**, což umožňuje uzavření dohody o vzájemném uznávání výsledků akreditací. Dohled na nestrannost a správnou činnost akreditačních orgánů zajišťuje **Rada pro akreditaci**, která je dozorčím orgánem ČIA. Jejími členy jsou zástupci orgánů státní správy, výrobců, podnikatelů, spotřebitelů, akreditovaných objektů a nezávislých expertů. Existují **technické výbory** pro jednotlivé oblasti akreditace (zkušební, kalibrační laboratoře,...), a také rozsáhlá **data báze expertů** (odborných posuzovatelů). Posuzovatelé musí mít potřebnou odbornost i znalost procesu akreditace a podléhají procesu dalšího vzdělávání a hodnocení.

Akreditace

je proces **časově i finančně náročný**, proto je třeba náležitě zvážit, co může přinést a jaké jsou veškeré požadavky, prostudovat všechny normy a zhodnotit jejich dopad na fungování laboratoře.

Fáze přípravy zahrnuje:

- inventarizaci materiálních i lidských zdrojů
- přípravu personálu laboratoře
- vybudování funkčního systému kvality
- zavedení dokumentace

Akreditační proces

- podání žádosti (příhláška, dotazník o připravenosti a shodě)
- registrace žádosti (po kontrole žádosti a zaplacení poplatku),
- přidělení vedoucího posuzovatele z ČIA)
- uzavření obchodní smlouvy
- posuzování dokumentace systému řízení kvality (zejména příručka jakosti)
- sestavení skupiny posuzovatelů (odborník na systém kvality, metrologii, jednotlivé typy zkoušek, pozorovatelé), podepsání prohlášení posuzovatele
- posuzování na místě (shody kritérií se skutečným stavem)
- vypracování souhrnné zprávy (identifikace, předmět, rozsah, posuzovatelé, plnění jednotlivých kritérií)
- rozhodování o akreditaci (vydání, pozastavení, zrušení, odmítnutí - vydává ředitel ČIA)
- dozor nad akreditovanými subjekty (prověřování průběžného plnění plánované i mimořádné, min. jednou ročně)

Osvědčení o akreditaci

je oficiálním konstatováním, že akreditovaný subjekt trvale plní kritéria příslušné evropské normy a je odborně, technicky, organizačně a personálně způsobilý k nezávislému provádění zkoušek. Součástí osvědčení je **příloha s přesnou specifikací** předmětu akreditace.

Platnost osvědčení o akreditaci je tři roky, poté je možné žádat o reakreditaci.

Platnost reakreditace je pět let.

Závazky vyplývající z akreditace

- být trvale v souladu s požadavky normy
- používat akreditaci jen v souvislosti s obory, kde je udělena
- uhradit poplatky
- nepoškodit pověst akreditačního orgánu
- po ukončení akreditace ji přestat používat
- upozornit zákazníky, že akreditace zkoušky neznamena schválení výrobku, nelze využívat části výsledků k reklamě
- akreditační orgán musí být informován o změnách
- při odkazech na akreditaci musí být přesně uvedeno, pro co akreditace platí, kdo ji provedl a pod jakým číslem
- při odebrání akreditace se nesmí dále používat
- laboratoř se může akreditace písemně vzdát

CERTIFIKACE

je postup, při kterém třetí strana (nezávislá osoba nebo orgán nezainteresovaný v daném problému) poskytuje písemné ubezpečení, že výrobek, proces nebo služba jsou **ve shodě se specifikovanými požadavky**

Jaký je rozdíl mezi akreditací a certifikací

- **Akreditace** je zmocněným orgánem udělené formální uznání odborné způsobilosti k provádění práce v souladu se specifikovanými standardy.
- **Certifikace** představuje písemné ujištění o shodě produktu, procesu nebo služby se specifikovanými požadavky, vydané třetí stranou.

Certifikace

je postup, při kterém třetí strana (nezávislá osoba nebo orgán nezainteresovaný v daném problému) poskytuje písemné ubezpečení, že výrobek, proces nebo služba jsou ve shodě se specifikovanými požadavky.

Třetí stranou je certifikační orgán, který musí být pro svou činnost akreditovaný.

Normy řady ISO 9000 jsou obecný návod pro management kvality, nezávisí na průmyslovém odvětví:

- ISO 9 001: shoda s požadavky v průběhu návrhu, vývoje, výroby, instalace, servisu
- ISO 9 002: shoda s požadavky v průběhu výroby, instalace, servisu
- ISO 9 003: shoda s požadavky pouze při výstupní kontrole a zkoušení

CERTIFIKACE

- Certifikaci podle normy, upravující obecný systém managementu, jako například ISO 9001:2000, lze použít pro všechny organizace bez ohledu na jejich typ, velikost nebo produkty či poskytované služby.
- Důraz se klade na prokázání toho, že organizace plní požadavky systému managementu.
- Tato certifikace nemá být vykládána jako osvědčení odborné způsobilosti organizace generovat platná data nebo výsledky.

Audit ze strany certifikačního orgánu

se zabývá **posuzováním** toho

- zda zavedený systém zahrnuje všechny body systému kvality požadované příslušnou normou
- zda je konkrétní naplnění bodů vhodné pro daný proces
- zda je vše náležitě popsáno a zdokumentováno v příručce kvality

Organizace usilující o akreditaci svého systému musí stanovit **dokumentovat**

- politiku kvality
- organizační strukturu
- vymezení vztahů, odpovědnosti, pravomoci
- jmenování pracovníka odpovědného za kvalitu
- přezkoumání systému kvality

System ISO 9001 musí obsahovat **dokumentované postupy** odpovídající požadavkům normy pro

- řízení návrhu, dokumentů, údajů
- nákup
- identifikaci a sledovatelnost výrobku během procesu
- kontrolní a zkušební činnost
- kalibrace a údržbu měřícího zařízení
- opatření k nápravě a preventivní opatření
- manipulaci, skladování, balení, dodávku
- identifikaci, registraci, ukládání
- plánování a provádění interních prověrek jakosti
- výcvik pracovníků provádějících činnost
- servis

Výsledkem úspěšného auditu je **certifikát**, který uvádí shodu s příslušnou zavedenou normou pro zkoumaný proces. Certifikační orgán dále provádí **kontrolu** nad dodržováním kritérií.

ISO 9000 jsou obecně určeny pro výrobní procesy, nezabývají se laboratořemi, na rozdíl od **ISO EN/IES 17025**.

Nezabývají se tedy operativním řízením jakosti v laboratoři, zkoušením způsobilosti, používáním referenčních materiálů a dalšími detaily spojenými s technickou způsobilostí..

Inspekce

se řídí směrnicemi, zejména rozhodnutím Rady OECD C(95)8/FINAL, které zavazuje členské země k vytvoření národních úředních postupů ke kontrole dodržování zásad GLP.

Národní program dodržování GLP je podrobné schéma vytvořené členskou zemí ke kontrole pomocí inspekcí a auditů.

Národní úřad pro kontrolu GLP je zodpovědný řídicí orgán kontroly.

Inspekce je na místě provedená kontrola pracovních postupů a zvyklostí na zkušebním pracovišti, posouzení shody s GLP a kvality a neporušenosti dat.

Audit je porovnání primárních údajů s průběžnými a závěrečnými zprávami za účelem ověření, že byly zpracovány a interpretovány správně, podle plánu a SOP, a že nedošlo k něčemu, co by mohlo zpochybnit jejich platnost.

Postup inspekci

- předběžná inspekce (seznámení inspektora s pracovištěm)
- úvodní pohovor (vysvětlení účelu, rozsahu inspekce, vyžádání dokumentů a vzorků, kontakt s útvarem zajišťování kvality)
- organizace práce a pracovníci (personál, vzdělávání, dokumentace)
- plán zajišťování kvality (ověření dostatečnosti mechanismů)
- pracoviště (rozměry, uspořádání, záměny, kontaminace)
- biologické zkušební systémy (péče, ošetření, pomocná zařízení)
- přístroje, materiály, činidla, vzorky (kvalita, kapacita)
- zkušební systémy (přiměřené postupy užití a kontrola)
- referenční látky (totožnost, skladování, SOP na zacházení)
- SOP (písemné pro všechny důležité postupy, dodržování)
- provádění studií (plány, dodržování, zaznamenávání)
- zprávy (podpisy, jakost, opravy, archivace)
- archivace, dokumentace (SOP pro archivaci, typy dokumentů)

Dohled nad prováděním činností

- Dohled nad dodržováním opatření a realizace stanovených záměrů (např. hodnocení souladu s požadavky norem) může být prováděna
 - interním zaměstnancem, který není na kontrolované činnosti zainteresovaný,
 - třetí stranou – např. akreditačním či certifikačním orgánem) /ČESKÝ INSTITUT PRO AKREDITACI

AUDITY KVALITY A PROVĚŘOVÁNÍ SYSTÉMU KVALITY

- **Interní audit kvality (QA)** - kontinuální proces kontrolování systémů kvality používaných v laboratoři s cílem ověřit, zda jsou systémy účinné, dokumentované a dodržované personálem
- **Prověřování systému kvality (QSR)**
Prověřování systému jakosti je periodické přezkušování systémů kvality laboratoře, zda jsou stále přiměřené.

Audit

může být součástí inspekce, může mít velmi různý rozsah. Cílem je zrekonstruovat celou studii na základě jejího plánu a SOP, primárních údajů a archivu.

Může jít o kontrolu

- dostatečného personálního zajištění (vzdělání a čas)
- konkrétního zařízení (údržba, kalibrace)
- zacházení s materiálem
- osudu laboratorních zvířat (aplikace, dávky, nálezy)
- dokumentace

Jak přežít audit

Příprava

- shromáždit data a dokumentaci k auditované studii, nenechat auditory hledat v ostatních materiálech
- uložit vedoucímu studie projít veškeré materiály a zodpovědět otázky
- prohlédnout časový harmonogram a zajištění kvality
- připravit pracovní místo pro auditory
- vyvěsit plán místností
- připravit zaměstnance na to, jak bude audit probíhat

Průběh auditu

- kontinuálně sledovat inspekci, doprovázet auditory
- mít všechny materiály připraveny
- předkládat kopie, nedávat originály
- uschovat duplikáty všech poskytnutých materiálů
- ihned realizovat korigující akce
- denně organizovat informační schůzky k průběhu auditu
- být zdvořilý a spolupracovat
- odpovídat jen na položené otázky
- chránit důvěrné informace

Závěr

- provést závěrečné shrnutí
- zeptat se na další otázky a důvody k nespokojenosti
- připravit složky s inspekčními materiály
- připravit zprávu o auditu

Výsledky inspekce a auditu

musí být zpracovány písemně a projednány se zkušebním pracovištěm.

Drobné závady nemusí zabránit konstatování shody pracoviště se zásadami GLP, ale vedoucí musí zjednat nápravu.

Inspektor může tato nápravná opatření znovu zkontrolovat. Závažnější odchylky hlásí inspektor příslušnému úřadu pro kontrolu dodržování GLP.

Byla-li inspekce provedena na žádost kompetentního orgánu, bude mu úplná zpráva doručena prostřednictvím úřadu pro kontrolu dodržování GLP.

Interní audit

Audit má několik forem:

- Audit kvality uvnitř laboratoře
 - prověrka kvality, interní audit, (ověření existence a dodržování postupu kvality, kompetence vnitřního systému kontroly kvality)
 - přezkoumání vyšším managementem (ověření, zda je systém účinný)
- posuzování, externí audit nezávislým orgánem jako součást akreditace.

Jedná se o systematické a nezávislé zkoumání s cílem posoudit, zda činnosti a výsledky vztahující se ke kvalitě jsou v souladu s plánovaným uspořádáním, zda jsou účinně zavedeny a vhodné k dosažení daného cíle.

Interní systém zajištění kvality

- činnosti prováděné při každé analýze (**kalibrace, citlivost**)
 - porovnání změny odezvy systému na standardu (do 20%)
 - stanovení rozpětí paralelních stanovení
- kontrola **přesnosti, opakovatelnosti, správnosti** (kontrolní vzorky se užívají po 50 analýzách nebo 1x týdně, případně na začátku důležité série nebo při nestabilitě systému, vždy několik analýz, výpočet odchylky, regulační diagramy, varovné a regulační meze, opatření, certifikované materiály)
- kontrola **meze detekce** celého zařízení (aspoň 1x ročně na aspoň 10 slepých vzorcích, vypočte se standardní odchylka a porovná s dřívějšími hodnotami)
- externí kontrola kvality (**srovnávací analýzy**, účast na okružních testech a testování referenčních materiálů), tyto výsledky je třeba propojit do interní kontroly)

Vnitřní kontrola kvality (interní prověrka)

Provádí ji manažer kvality tak, aby každý prvek systému byl zkontrolován alespoň 1x ročně

- horizontální (detailní zkoumání jednoho prvku)
- vertikální (kontrola na základě náhodně vybraného vzorku a veškeré manipulace s ním (identifikace, kalibrace, metody, pracovníci, protokoly, data))

Prověrky jsou plánované i namátkové (reakce na anomálie a stížnosti), protokoly se zapisují do knihy kontrol (jméno auditora, datum, prověřované oblasti, podrobnosti o nich a zjištění, opatření k nápravě a termín, podpis).

Interní audit kvality

Oblast	Co by měl auditor hledat
Personál	Záznamy o školení
Prostředí	Vyhovuje laboratorní prostředí prováděné práci?
Vybavení	Požívané vybavení vyhovuje účelu, je podle potřeby dostatečně udržované a kalibrované?
Metody a postupy	Postupy jsou plně dokumentované, dostatečně validované a schválené k používání?
Chemické a fyzikální etalony	Jsou k dispozici standardy a další materiály potřebné ke zkouškám?
Řízení jakosti	Ke každé zkoušce je řízení jakosti na dostatečné úrovni
Řízení vzorků	Existuje funkční dokumentovaný systém příjmu vzorků, identifikace vzorků a požadovaných analýz, evidence postupu analýzy, vystavení zprávy a osud vzorku?
Záznamy	Pracovní sešity/listy a další záznamy obsahují údaj o datu zkoušky, analytikovi, analytu, detailech vzorku, pozorováních, řízení jakosti, všechny průběžné výpočty, záznamy o přístrojích a platná kalibrační data?
Zpráva o zkoušce	Informace ve zprávách se kryjí s požadavky platné normy managementu jakosti?

Přezkoumání systému kvality

(hodnocení stavu ve vztahu ke změnám, výsledkům auditu, stížnostem, akreditacím) se provádí nejméně 1x ročně za účasti ředitele, vedoucích laboratoří a manažera kvality.

Podklady:

- výsledky předchozího přezkoumání
- protokoly akreditačních orgánů
- výsledky interních prověrek kvality
- výsledky mezilaboratorních testů
- stížnosti zákazníků
- příručka kvality včetně dodatků

Realizace zajištění analytické kvality výsledků

- stanovení opatření, které je třeba zavést;
- interní a externí zajištění kvality;
- systém analýzy (kontrola a udržování);
- osoby pracující v laboratořích (zkušenosti a školení);
- dokumentace zavedených opatření.

Vertikální audit

- chronologické zkoumání všech záznamů týkajících se určitého vzorku, který prošel laboratoří, od okamžiku převzetí přes různé analýzy až po zprávu o výsledcích a jeho případnou likvidaci
- audit *,od narození do smrti‘.*

ODPOVĚDNOST PERSONÁLU ZA KVALITU

- Odpovědnost managementu laboratoře
- Odpovědnost manažera kvality
- Odpovědnosti jednotlivých zaměstnanců laboratoře

Systém kvality v laboratoři pro GC

Základní údržba měřícího zařízení se provádí dle plánu údržby
Základní kalibrační křivka je tvořena nejméně pěti koncentračními úrovněmi

Při změně kalibračního roztoku se sleduje metrologická návaznost

Kvantifikujeme pouze pro oblast lineární odezvy

Každý 10. vzorek je kalibrační standard

Kontrola čistoty skla a chemikálií

S každou sérií se v laboratoři analyzuje slepý vzorek

Obsah analytu ve slepém vzorku nesmí překročit 1/20 obsahu analytu ve vzorku

Používá se referenční vzorek pro zjištění výtěžnosti metody

Výtěžnost metody nesmí klesnout pod 50 %

Enormně kontaminované vzorky se ředí tak, aby hodnota odezvy byla přibližně v 1/2 kalibrační křivky

Pozitivní vzorky se potvrzují pomocí GC/MS

Vedeme regulační diagramy

MPZ a výměna vzorků s dalšími pracovišti

Data v elektronické podobě se pravidelně archivují

Standardní operační postupy



SOP – standardní operační postup

1. Úvod (všeobecné údaje, oblast použití, princip metody, terminologie, rušivé vlivy, omezení metody, bezpečnost při práci, toxikologické údaje, odpady a jejich likvidace)
2. Normativní odkazy
3. Chemikálie a spotřební materiál (roztoky, činidla, požadavky na jejich čistotu, příprava roztoků, příprava a uchovávání referenčních materiálů, požadavky na laboratorní sklo)
4. Vzorkování (odběry vzorků, zásady odběru, plán odběru, podmínky transportu vzorku do laboratoře, konzervace vzorků, příprava k analýze)
5. Přístroje a pomocná zařízení (příprava přístroje k měření, požadavky na metrologickou návaznost, kalibrační standard, regulační standard, CRM)

6. Kalibrace

7. Postup zkoušky – analytické schéma

8. Kontrola kvality metody (interní kontrola- CRM, regulační diagramy, externí kontrola – MPZ, nejistota stanovení, validační protokol (většinou příloha SOP)

9. Výpočet (vyhodnocení dat, vyjadřování výsledků)

10. Poznámky, doplňky, přílohy (například validační protokol)

Specifické problémy environmentální stopové analýzy:

- stopové koncentrace (riziko kontaminace ve všech krocích, nutnost preseparace a koncentrace, nároky na citlivost a selektivitu)
- omezená stabilita analytů a matrice
- nehomogenita vzorků
- speciace analytů a vazba analytů na složky

Oblast ultrastopových analýz vyžaduje **optimalizaci**

- požadavků normy
- vynaložených ekonomických prostředků
- časové náročnosti

vzhledem k **zabezpečení kvality postupu.**

Použití normovaných metod

Pokud není normovaná metoda převzatá včetně SOP, je třeba jej vytvořit. Musí obsahovat:

- všechny informace uvedené u SOP výše
- jméno autora překladu při převzetí cizojazyčné metody
- jména těch, kdo metodu zaváděli
- informace o validaci metody (selektivita, rozsah, linearita, robustnost, přesnost, správnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- systém průběžné kontroly správnosti a přesnosti (regulační diagramy)
- výpočetní postupy, způsob prezentace výsledků
- výpočty nejistoty výsledku

Použití vlastních postupů

musí být zdokumentováno v SOP. SOP musí být srozumitelné a dostupné pro pracovníky, kteří uvedené postupy používají, musí obsahovat:

- všechny informace uvedené u SOP výše
- jména těch, kdo postup vypracovali
- jména těch, kdo postup schvalovali
- jména těch, kdo postup průběžně kontrolují, včetně charakteru a četnosti zkoušek
- informace o validaci metody
- regulační diagramy
- postupy pro výpočet a prezentaci výsledků
- postupy pro výpočet nejistot

Harmonogram optimalizace a validace analytické metody

- úvodní rozvaha (aplikace, dostupné zařízení, ekonomický stav)
- optimalizace analytické metody
 - ověření statistické kontroly (konstantní průměrné hodnoty, dostačující shodnost)
 - ověření přesnosti metody (kontrolní limity)
- validace - pilotní studie (aplikovatelnost, výtěžnost, efekty matric, kalibrace, linearita, opakovatelnost)
 - standardní operační postup
 - mezilaboratorní porovnávání (reprodukovatelnost)
 - konečná verze textu

Validace a verifikace

Validace metody je potvrzení přezkoušením a poskytnutí objektivního důkazu, že jsou jednotlivé požadavky na specifické zamýšlené použití splněny. Provádí se pomocí reálných vzorků pro celý předepsaný koncentrační rozsah a různé matrice. Norma uvádí, že laboratoř musí validovat metody nenormalizované, vyvinuté, rozšířené, modifikované, normalizované mimo zamýšlený rozsah. Není nutno provádět při převzetí normovaných metod. Závěrem je vypracování validačního protokolu, který obsahuje získané výsledky, postup využití pro validaci a prohlášení, že metoda vyhovuje zamýšlenému použití.

Verifikace metody je ověření správného fungování metody. Provádí při zavádění všech metod, včetně normovaných, dále při jakýchkoli změnách (personál, materiál, laboratoř, přístroje)

Software

Norma ČSN ISO/IEC 17 025 uvádí, že laboratoř musí zajistit, aby:

- softwarové vybavení vyvinuté uživatelem bylo dostatečně podrobně zdokumentováno, vhodně validováno a vhodné k danému použití
- byly stanoveny a zavedeny postupy pro ochranu dat. Takové postupy musí zahrnovat věrohodnost a důvěryhodnost vstupních údajů, jejich sběru, ukládání a zpracování
- počítače a automatizovaná zařízení byla udržována za účelem zajištění správné funkce a byly zajištěny podmínky nezbytné k udržení věrohodnosti zkušebních a kalibračních údajů
- musí být zajištěna ochrana dat při přenosu a archivaci a ochrana počítačů a sítě

MS Word a Excel se považují za validované.

Validační parametry

- citlivost, linearita, rozsah
- Přesnost = pravdivost a preciznost
- selektivita, specificita, robustnost
- mez detekce a stanovitelnosti
- opakovatelnost, reprodukovatelnost

Kalibrace a regulační diagramy nejsou nedílnou součástí validace, nicméně:

- z kalibrační křivky lze vyhodnotit citlivost, linearitu, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti
- regulační diagramy monitorují fungování metody v čase

Přesnost (accuracy) je těsnost shody mezi výsledkem měření a přijatou referenční hodnotou

Pravdivost (trueness) těsnost shody mezi průměrnou hodnotou a přijatou referenční hodnotou

Preciznost (precision) těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky získanými za definovaných podmínek

Selektivita – stupeň nezávislosti na interferencích

Specifičnost – schopnost metody umožnit zjistit analyt v přítomnosti jiných složek

Robustnost – vliv změn matrice na výsledek analytické zkoušky

Opakovatelnost – nezávislé výsledky získané za stejných podmínek

Střednědobá opakovatelnost – regulační diagramy

Reprodukovatelnost – shodnost mezi laboratořemi např. z MPZ

Metrologická terminologie v klinické a analytické laboratoři

www.sekk.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm

accuracy = přesnost
trueness = pravdivost
precision = preciznost

$\text{přesnost} = \text{pravdivost} + \text{preciznost}$

Referenční materiál - látka o dostatečně určené vlastnosti tak, aby mohla být použita pro kalibraci

Certifikovaný referenční materiál - referenční materiál vybavený certifikátem

Přijatá referenční hodnota – odsouhlasená referenční hodnota pro porovnání

Výtěžnost – podíl stanoveného množství analytu na jeho celkovém množství ve vzorku

Vychýlení, odchylka, bias – rozdíl mezi střední hodnotou zkoušek a přijatou referenční hodnotou

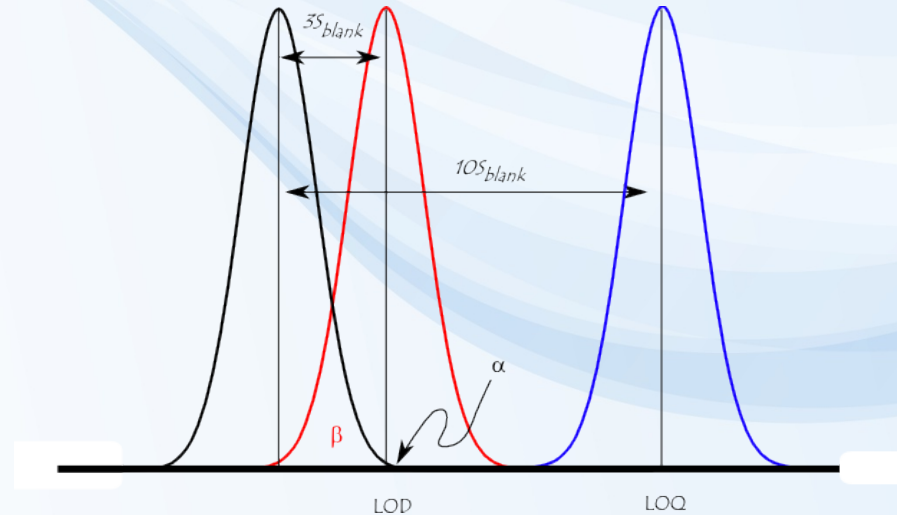
Systematická chyba výsledku se mění předvídatelným způsobem

Náhodná chyba výsledku se mění nepředvídatelně

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%

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

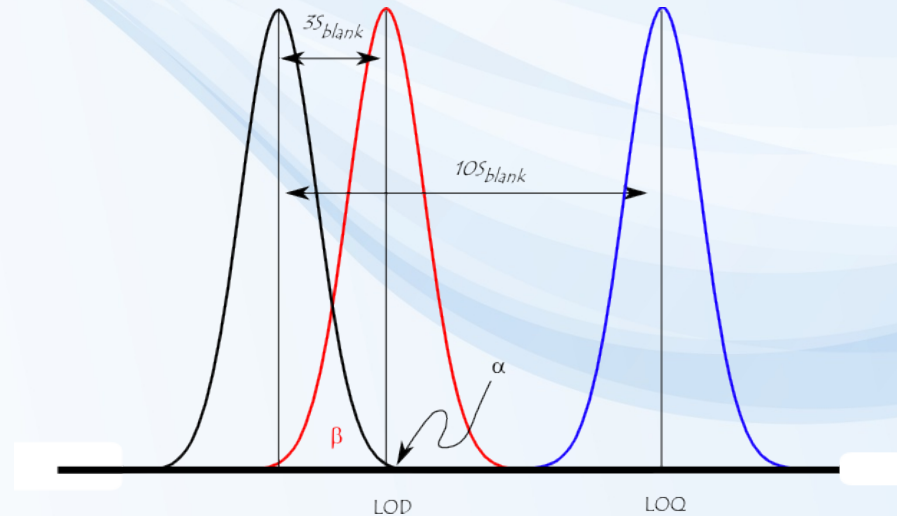
$$LOD = q_L(c_L) = x_L / S = 3s_{bl} / S$$

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%

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

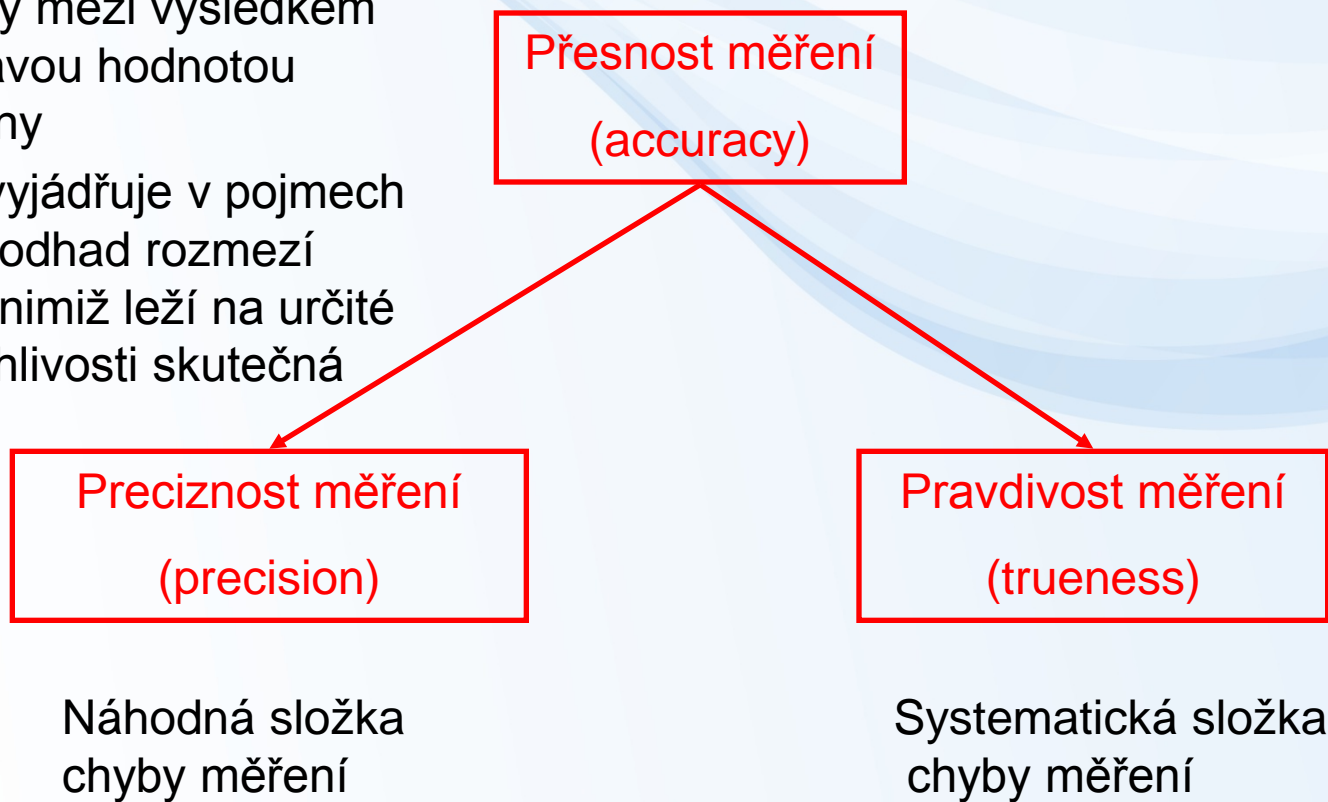
$$LOD = q_L(c_L) = x_L / S = 10 s_{bl} / S$$

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

Faktory rozhodující o výběru postupu

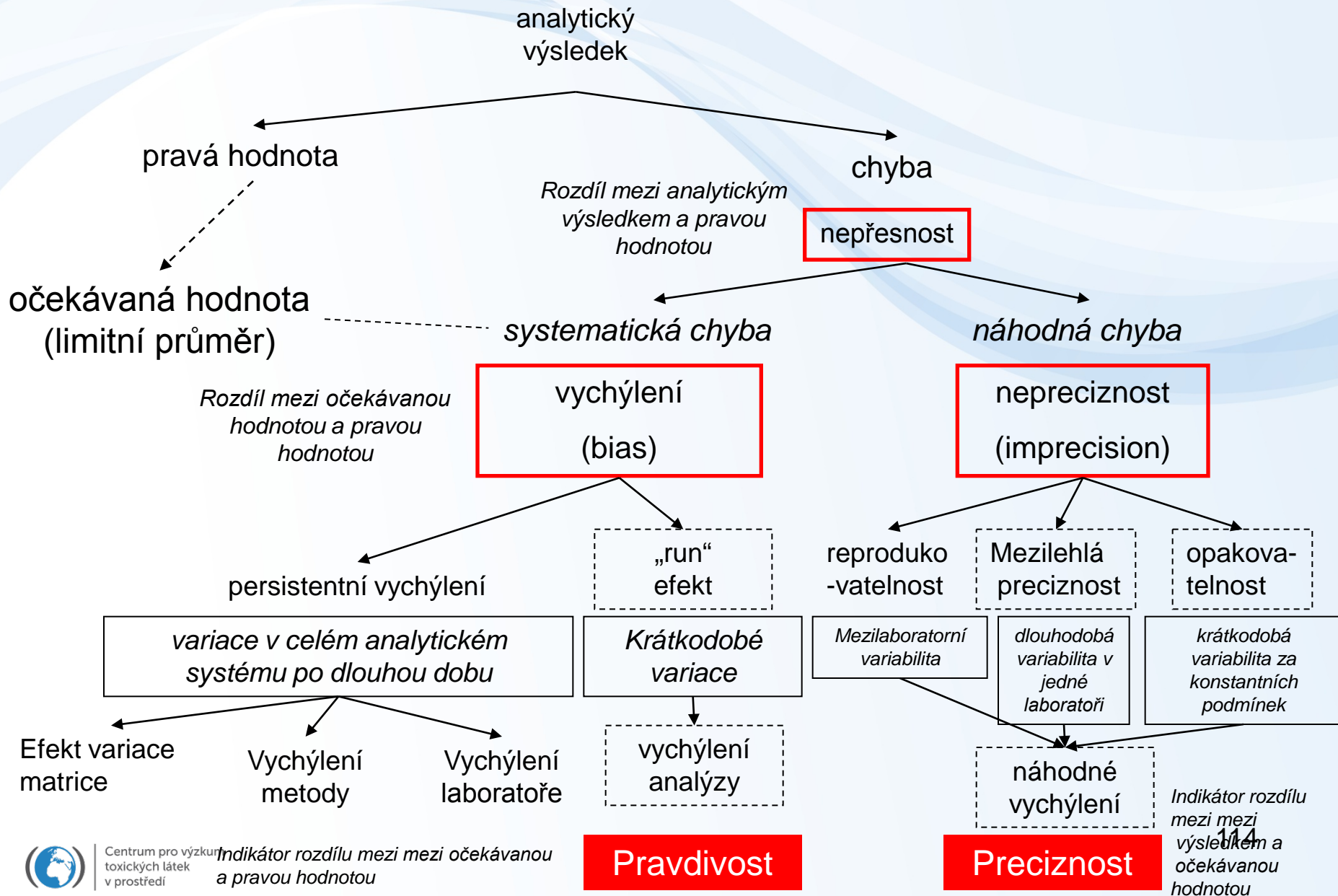
3. Přesnost měření - accuracy

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



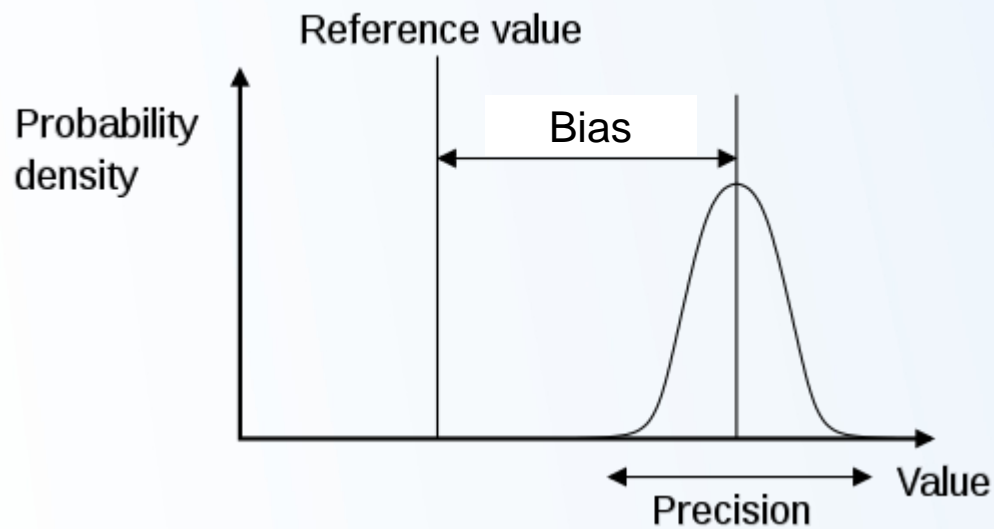
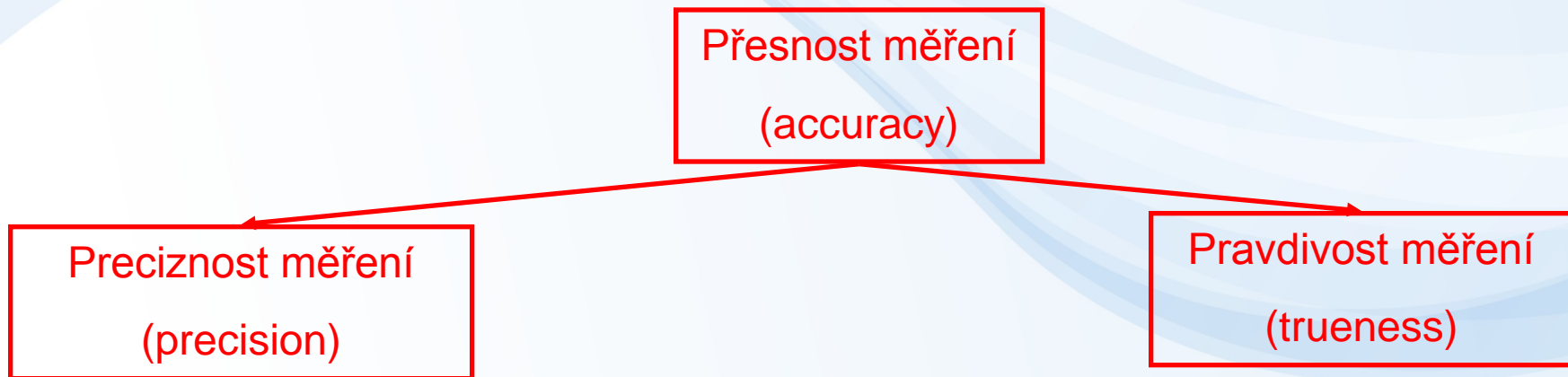
POZOR!!! Nová jednotná národní terminologie: *Eurachem ČR 2009, Metodický list 2: „Jak překládat precision, accuracy a trueness?“*

Složky chyby analytického výsledku ve vztahu k přesnosti metody







Faktory rozhodující o výběru postupu

3. Přesnost měření - accuracy

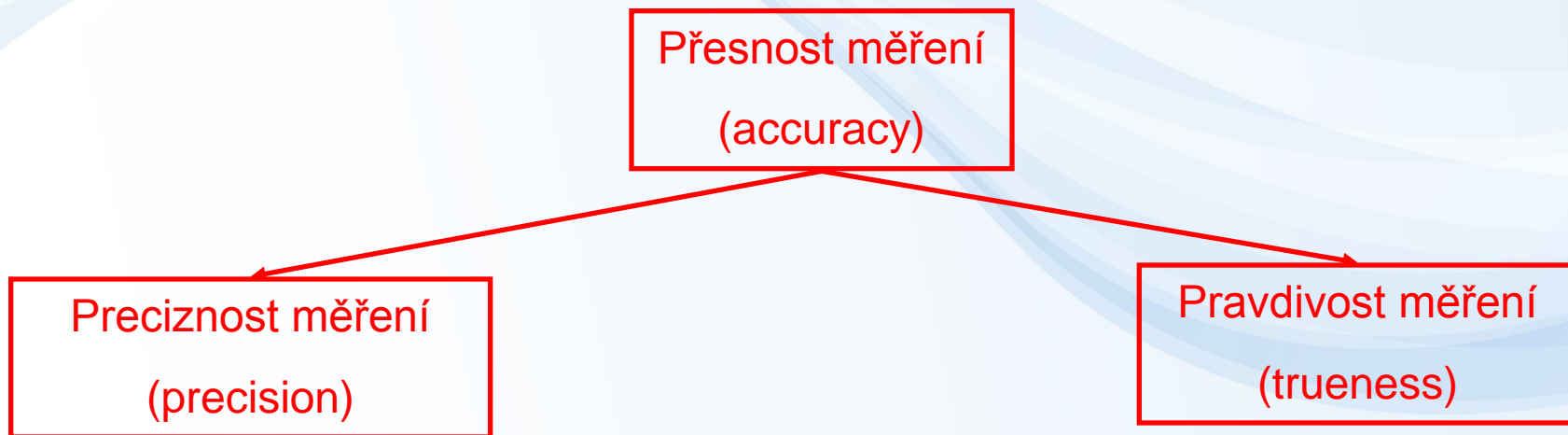


Accuracy (přesnost): **Preciznost** (precision) a **Pravdivost** (trueness)

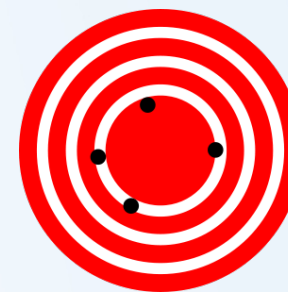
	Nevychýlený Accurate	Vychýlený Inaccurate (systematic error)
Precise Precizní		
Imprecise (reproducibility error) Neprecizní (problém reprodukovatelnosti)		

Faktory rozhodující o výběru postupu

3. Přesnost měření - accuracy



Vysoká preciznost
Velké vychýlení



Nízká preciznost
Malé vychýlení

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))

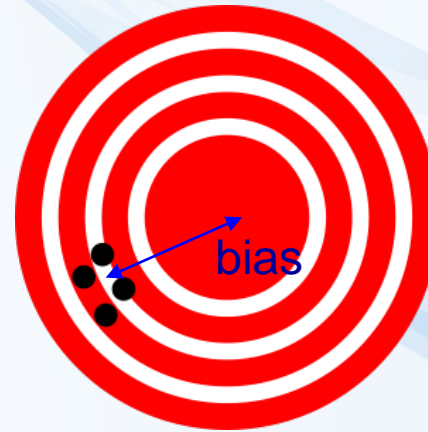
Analyte %	Analyte ratio	Unit	Horwitz %RSD	AOAC PVM %RSD
100	1	100%	2	1.3
10	1.00E-01	10%	2.8	2.8
1	1.00E-02	1%	4	2.7
0.1	1.00E-03	0.10%	5.7	3.7
0.01	1.00E-04	100 ppm	8	5.3
0.001	1.00E-05	10 ppm	11.3	7.3
0.0001	1.00E-06	1 ppm	16	11
0.00001	1.00E-07	100 ppb	22.6	15
0.000001	1.00E-08	10 ppb	32	21
0.0000001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

Faktory rozhodující o výběru postupu

6. **Specifičnost** - specificity

- míra, do níž se navzájem ovlivňují analyt a ostatní přítomné látky přítomné v matrici nebo z ní extrahované
- schopnost metody stanovit přesně a konkrétně analyt v přítomnosti jiných složek v matrice vzorku za stanovených podmínek zkoušky



Specificita = 100% selektivita

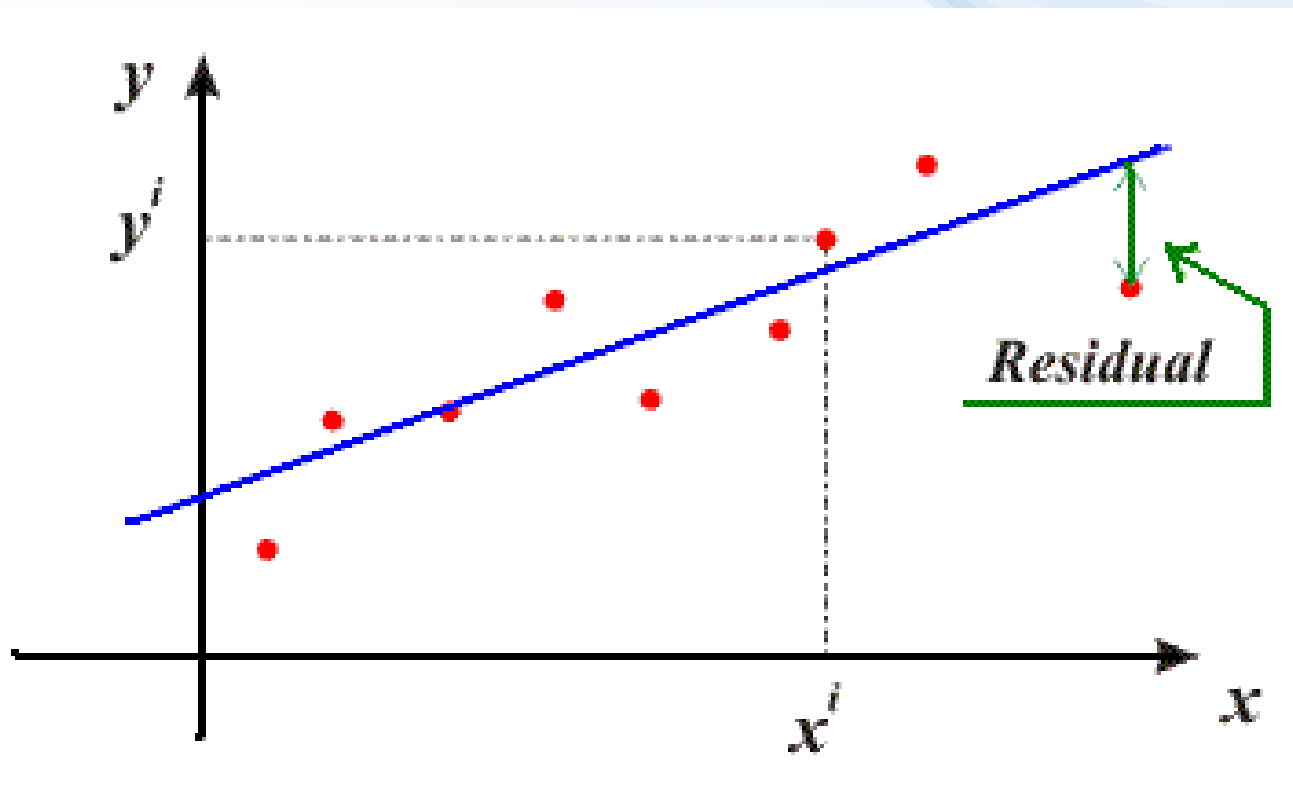
Nedá se vyjádřit, musí se demonstrovat, napr.

- *% správné klasifikace*
- *schopnost diskriminace příbuzných látek*

Faktory rozhodující o výběru postupu

7. Linearita - linearity

- schopnost metody získat výsledek testu úměrný koncentraci analytu (v pracovním rozsahu koncentrací)



Faktory rozhodující o výběru postupu

8. Robustnost - ruggedness/robustness

- Míra kapacity analytického postupu zůstat neovlivněna malými, úmyslnými změnami parametrů metody – demonstruje spolehlivost metody při běžném použití
- *Míra, do níž lze postup modifikovat*

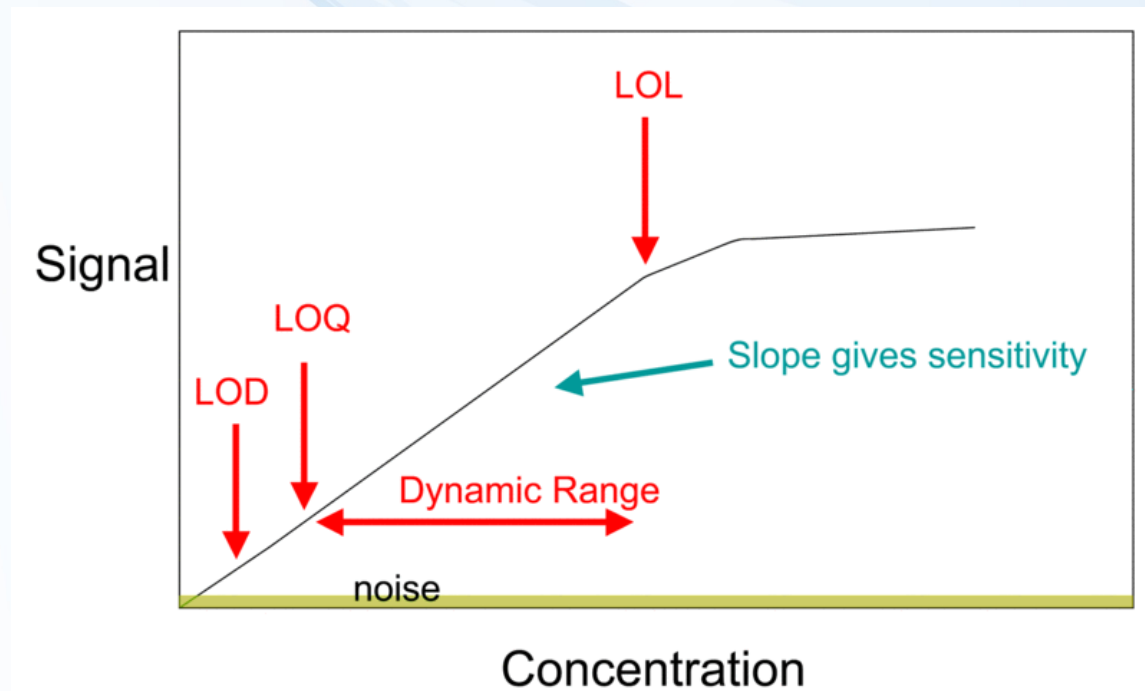
%RSD (inter laboratory)



Faktory rozhodující o výběru postupu

9. Citlivost - Sensitivity

- Metoda se nazývá citlivá, pokud malé změny v koncentraci nebo množství analytu způsobí velkou změnu měřeného signálu



mez detekce (LOD)
limit kvantifikace (LOQ),
dynamický rozsah
limit linearity (LOL).

PŘÍČINY NESPRÁVNÝCH ANALYTICKÝCH VÝSLEDKŮ

- nekvalifikovanost / nedostatečná péče
- nevhodný postup
- kontaminace
- interference
- chyby v kalibraci
- chyby vzorkování
- ztráty / rozklad



preventivní opatření pro zajištění validity výsledků

- Replikace
- Testy výtěžnosti
- Slepý vzorek
- Alternativní postupy
- Alternativní detekce
- Referenční materiály

Validační programy

Existují programy pro validaci, například **EffiChem** a **EffiValidation**. Používají se v akreditovaných laboratořích a farmaceutickém průmyslu, od roku 1998 už stovky uživatelů.

Poskytuje možnost provozu lokálně nebo v síti, možnost různých druhů validace (plná, průzkumová, retrospektivní, převod metody). Obsahuje moduly pro validaci metod, nejistoty, regulační diagramy, kalibrace, mezilaboratorní porovnávání, evidenční knihy, validací software.

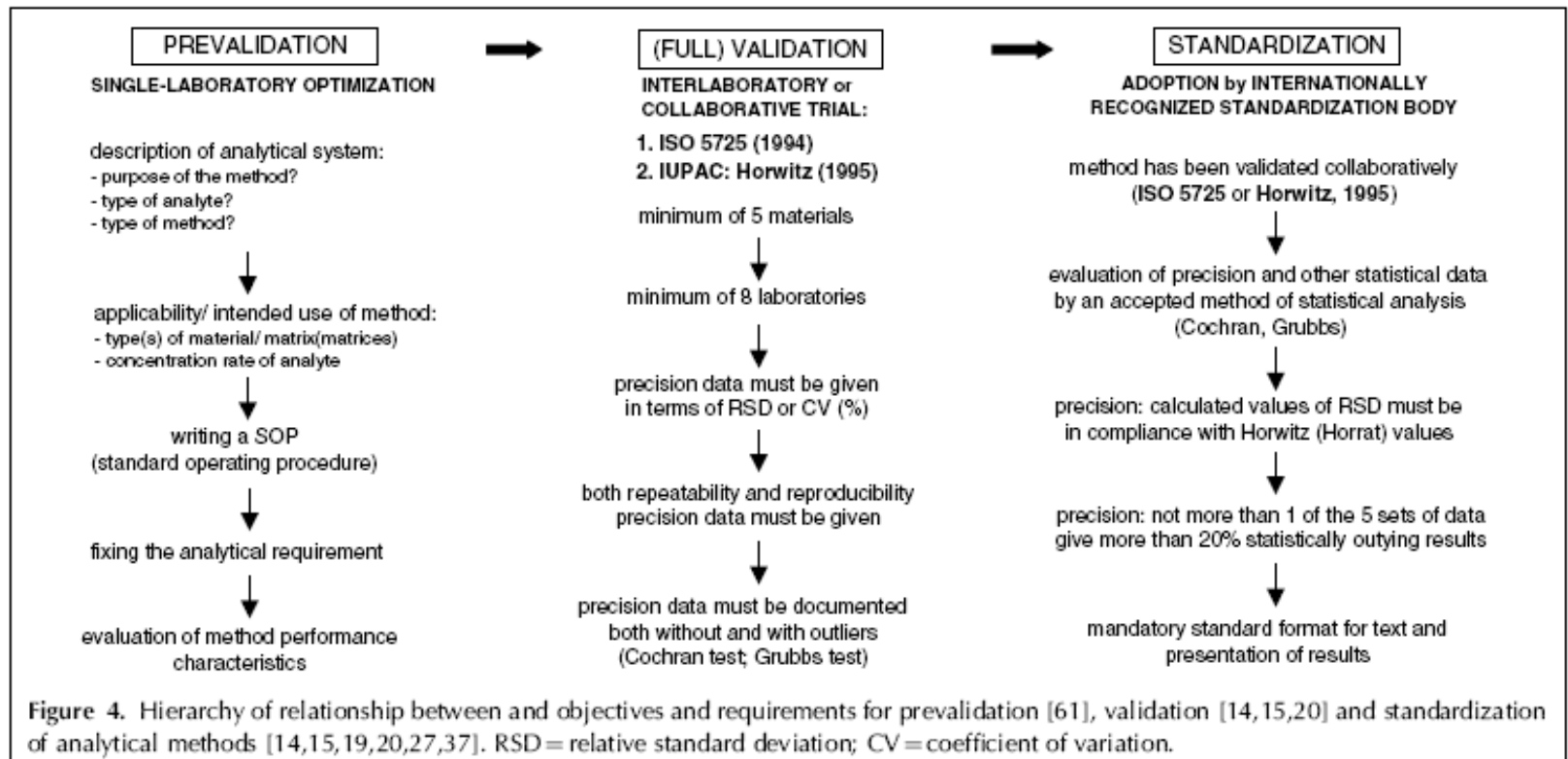
Vyhodnocení poskytuje detailní výsledky a globální závěr, detekci odlehlých bodů, testování normality, grafy. Je možné výsledky tisknout, různě sestavovat, archivovat, exportovat

Kontrola kalibrace v celém rozsahu se provádí při každém podstatném zásahu do systému, nejméně dvakrát ročně. Z ní je možné určit **citlivost** (porovnáním odezvy systému), **linearitu** (testujeme těsnost proložení kalibrační křivky regresní funkcí a vypočteme korelační koeficient), **mez detekce a stanovení** (kontrolu meze detekce provádíme aspoň jednou ročně na deseti vzorcích, porovnáme s dřívějšími hodnotami). S každou sérií měření se provádí **kontrola kalibrace** na jednom standardu.

Pracovní rozsah metody hledáme obvykle v souvislosti s požadavky legislativy. Je to koncentrační oblast, ve které může být dosaženo přijatelné pravdivosti a preciznosti.

Pravdivost a preciznost metody určujeme pomocí opakovaných měření referenčních materiálů, obvykle se vyhodnocuje na dvou významných bodech pracovního rozsahu, kontrola vždy po 50 analýzách, jednou týdně, při nestabilitě systému nebo na začátku důležité série.

VALIDACE ANALYTICKÝCH METOD



Měření



Návaznost měření

Zařízení, které má významný vliv na přesnost nebo platnost výsledků zkoušek nebo vzorkování musí být **kalibrováno**.

Podle metodického pokynu MPA 30-02-97 provádějí kalibrace jen laboratoře Českého metrologického institutu (ČMI) nebo Akreditované kalibrační laboratoře (AKL).

Návaznost je nutná jednak na jednotky SI, jednak na referenční materiály.

Pro zajištění kvality kalibrací a výsledků je nutné

- pravidelné používání CRM (CRM nejvyšší kvality, definovaná nejistota, expirace, RM z MPZ, vlastní RM)
- opakování zkoušek
- pravidelná účast v mezilaboratorním porovnávání způsobilosti laboratoří (MPZ). Podle MPA 30-02-02 má laboratoř povinnost se účastnit dostupných MPZ ve své oblasti působnosti, může se pak prokázat osvědčením o účasti.

KALIBRACE MĚŘENÍ

- **Kalibrování přístroje** - porovnání měřené veličiny s hodnotou reference
 - *primární standardy - systém mezinárodně uznávaných etalonů*
 - *sekundární kalibrační standardy*
 - *přenosné kalibrační standardy*
 - *pracovní kalibrační standardy*
- **návaznost** = schopnost odkazovat zpět k jedinému kalibračnímu standardu
 - kalibrace použitím čistých chemických sloučenin
 - matricové referenční materiály



CHEMICKÉ KALIBRAČNÍ STANDARDY A REFERENČNÍ MATERIÁLY



Referenční materiál

Materiál nebo látka, jejíž jedna nebo více hodnot vlastností je dostatečně homogenní a dobře stanovená, aby mohl(a) být použit(a) ke kalibraci přístroje, posouzení měřicí metody nebo k přiřazení hodnot materiálů

Certifikovaný referenční materiál (CRM)

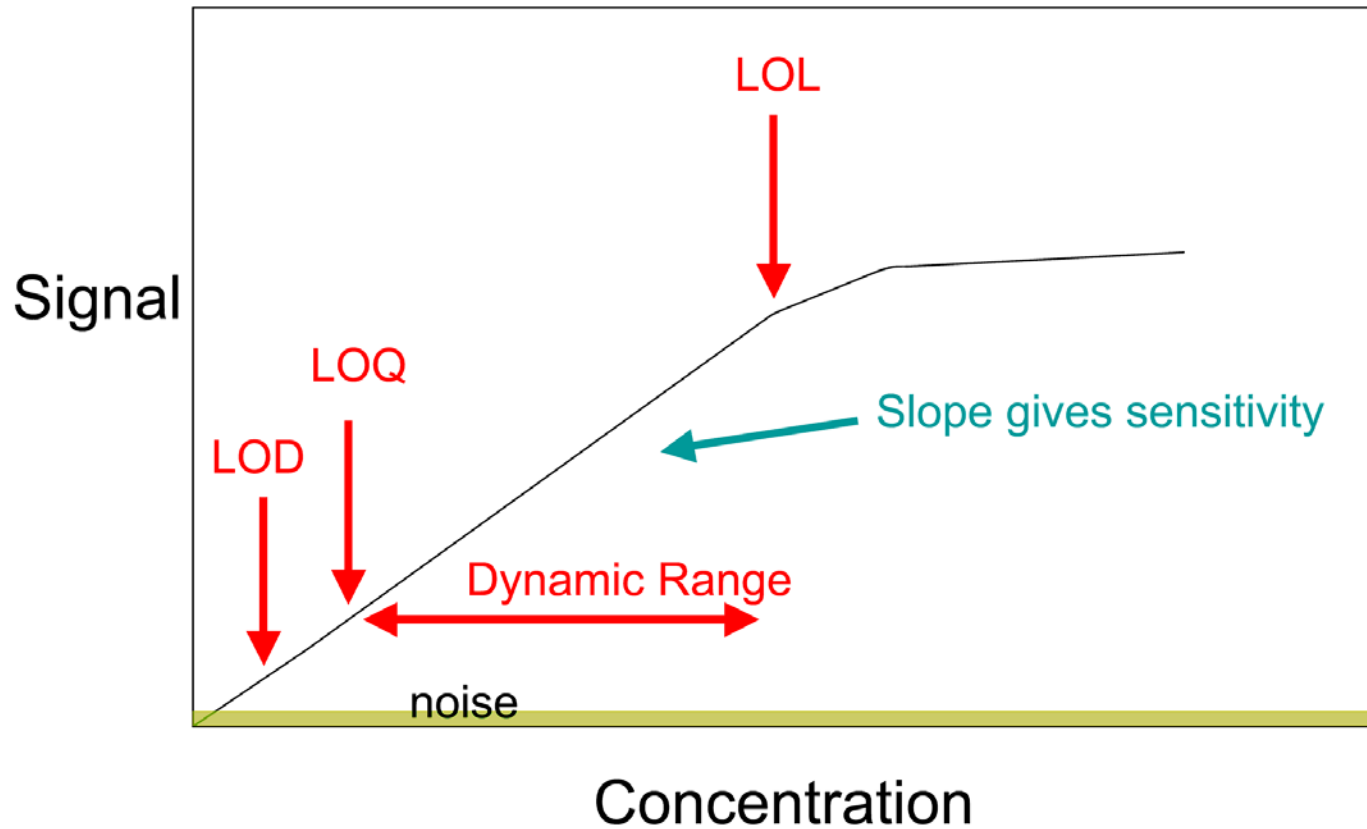
Referenční materiál doprovázený certifikátem, jehož jedna nebo více vlastností jsou certifikovány postupem, který vytváří návaznost na správnou realizaci jednotky, v níž jsou hodnoty vlastností vyjádřeny, a jehož každá certifikovaná hodnota je doprovázena nejistotou na uvedené hladině spolehlivosti

POUŽITÍ CRM

- kalibrace a verifikace měřicích procesů za běžných podmínek,
- interní kontrola kvality a programy zabezpečení kvality,
- ověření správného používání normovaných metod,
- vývoj a validaci nových postupů měření,
- definování hodnot jiných materiálů, které se mohou používat jako sekundární kalibrační standardy.



Externí kalibrace

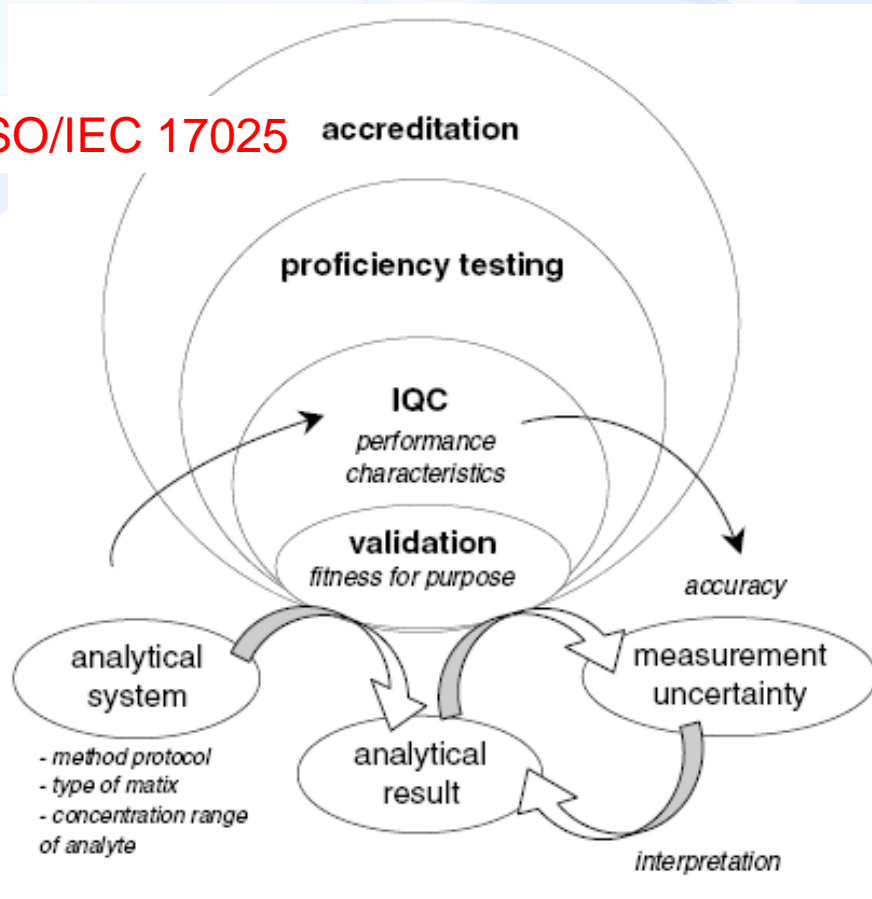


Vnitřní kalibrace

- Zahrnuje přidání chemického kalibračního standardu přímo do vzorku, takže se standard a vzorek měří fakticky současně
- **vnitřní standard** - přímo analyt nebo blízká látka. Ta se obvykle vybírá tak, aby nebyla přítomna ve vzorku, ale aby se chovala v měřicím procesu podobně jako analyt
- **standardní přídavek** - vnitřní standard stejný jako analyt

Úrovně prokazování kvality (QA)

ISO/IEC 17025



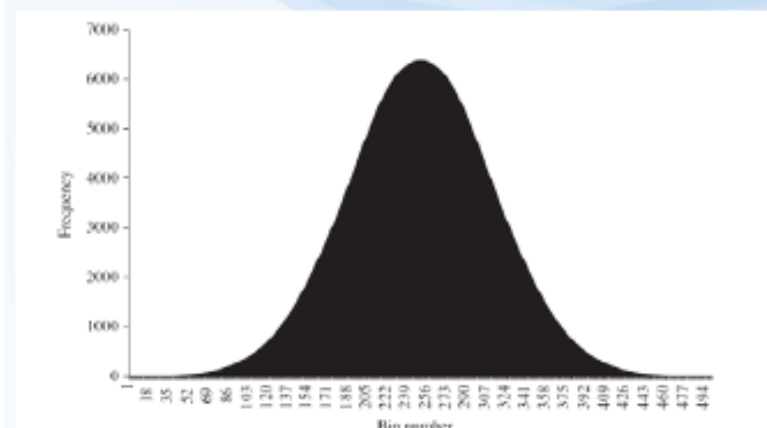
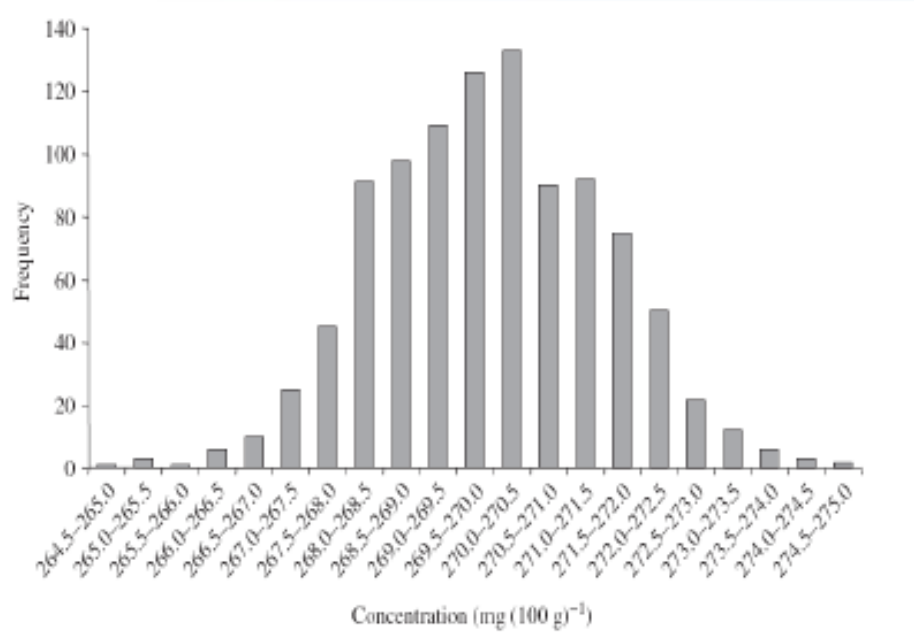
- validace a standardisace metod
- IQC (vnitřní řízení kvality) – použití referenčních materiálů, regulačních diagramů
- účast na mezilaboratorních porovnávacích zkouškách
- akreditace

ŘÍZENÍ KVALITY MĚŘENÍ

- Slepé vzorky
- Vzorky řízení kvality (QC)
- Opakované vzorky
- Tajné kontrolní vzorky
- Chemické kalibrační standardy a přídavky (spiky)

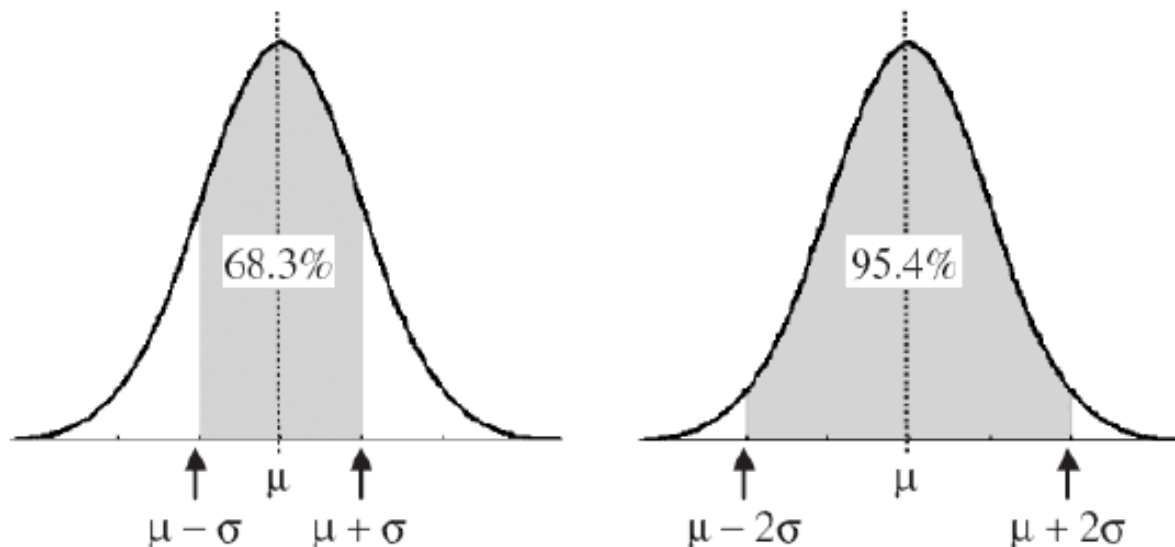
REGULAČNÍ DIAGRAMY

- Soubor výsledků = *populace*
- střední hodnotu = *průměr - μ*
- hodnoty jsou nejčastěji rozděleny symetricky kolem průměru normálním *Gaussovým rozdělením*



REGULAČNÍ DIAGRAMY

- Distribuci hodnot kolem průměru určuje **směrodatná odchylka - σ** .

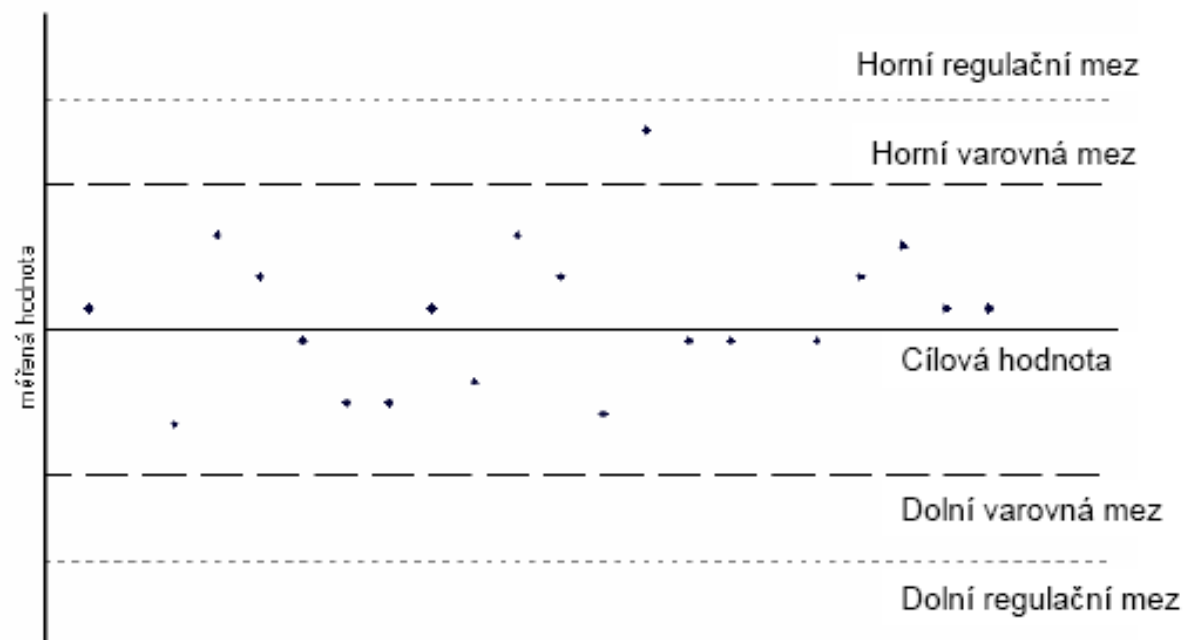


- 68 % hodnot leží uvnitř ± 1 standardní odchylky od střední hodnoty
- 95 % hodnot leží uvnitř ± 2 standardních odchylek od střední hodnoty
- 99,7 % leží uvnitř ± 3 standardních odchylek od střední hodnoty

Pokud tomu tak není, nastala pravděpodobně v měřicím systému nějaká změna, která významně změnila jeho výkonnost a způsobila posunutí průměru nebo zvětšení směrodatné odchylky.

Shewhartův regulační diagram

- nejjednodušší typ regulačního diagramu
- monitorování každodenních variací analytického procesu



Varovné meze – cílová hodnota (průměr) ± 2 směrodatné odchytky

Regulační meze – cílová hodnota (průměr) ± 3 směrodatné odchytky

Regulační diagram

slouží k monitorování výsledků v čase, je založen na periodickém měření referenčních materiálů.

Konstrukce:

- centrální přímka je zjištěná průměrná hodnota X
- horní a dolní varovná mez $X \pm 2\sigma$ (95.5% výsledků uvnitř)
- horní a dolní regulační mez $X \pm 3\sigma$ (99.7% výsledků uvnitř)

Neakceptovatelné je, pokud je

- naměřená hodnota mimo regulační meze
- sedm po sobě jdoucích hodnot klesajících nebo stoupajících
- sedm po sobě jdoucích hodnot pod nebo nad centrální přímkou
- dvě ze tří následujících hodnot mimo varovné meze

Porovnávání laboratoře s jinými



MEZILABORATORNÍ STUDIE

MEZILABORATORNÍ STUDIE

Test výkonnosti
postupu

Test výkonnosti
laboratoře

Několik laboratoří analyzuje společný materiál, který distribuovala centrální laboratoř, odpovědná též za shromáždění dat a jejich vyhodnocení.

PROGRAMY ZKOUŠENÍ ZPŮSOBILOSTI

- Laboratorním účastnícím se programu se předají vzorky a vyzvou se, aby analyzovaly jednu nebo více složek postupy, které pro stanovení určených analytů běžně používají.
- Hodnocení způsobilosti se vyjadřuje v pojmech skóre, které lze snadno interpretovat statistickými termíny.

Organizování programů zkoušení způsobilosti

- **Koordinující orgán stanoví pravidla průběhu testů a postupy interpretace dat.**
- Seznámí s nimi účastníky, aby přesně porozuměli jak program proběhne a jak se budou jejich výsledky vyhodnocovat.
- **Materiály** se vybírají tak, aby pokud možno co nejvíce reprezentovaly běžně analyzovaný materiál, co se týká matrice a koncentračního rozsahu analytu.
- Před distribucí se u materiálu musí testovat homogenita
- Po dokončení analýz vzorků podá laboratoř zprávu o výsledcích koordinátorovi, jenž pro každou laboratoř vytvoří skóre.

Hodnocení testů způsobilosti

- z-skóre

$$z = \left| \frac{x_i - A}{s} \right|$$

x_i je naměřená hodnota koncentrace analytu, A je ‚skutečná‘ hodnota koncentrace analytu, s je zvolená směrodatná odchylka. Organizátoři musí určit pro tuto rovnici dva parametry, A a s .

Odhad ‚skutečné‘ hodnoty A

- Přídavkem známého množství analytu k matrici, která jej neobsahuje.
- Použití konsensuální hodnoty vytvořené skupinou expertních laboratoří s použitím nejlepších dostupných metod
- Použití konsensuální hodnoty vytvořené v založené na výsledcích účastníků

Odhad směrodatné odchyly s

- Použití cílové směrodatné odchyly, která charakterizuje analyt při dané koncentraci
- Výpočet směrodatné odchyly z výsledků dodaných všemi laboratořemi v programu
- směrodatná odchylyka z mezilaboratorních testů, kde všichni účastníci testu používali stejný postup

Z - skóre

- Požadujeme-li 95% spolehlivost svých výsledků, pak jsou meze přijatelných hodnot z $+2$ až -2 .

$|z| \leq 2$ uspokojivé

$2 \leq |z| < 3$ problematické

$|z| > 3$ neuspokojivé

Odhad nejistot

Podle požadavků normy ISO/IEC 17 025 se laboratoř musí přinejmenším pokusit identifikovat všechny složky nejistoty, udělat její přiměřený odhad a zajistit, aby nevzbuzovala nesprávnou představu o hodnotě nejistoty. Takový odhad musí být založen na znalosti provedení metody a na rozsahu měření a musí používat údajů o validaci, měření kontrolních vzorků a předchozích zkušenostech. Nejistota vždy odpovídá dané koncentrační úrovni. Laboratoř musí mít zpracovány postupy pro stanovení nejistoty měření.

Alternativy:

- z regulačních diagramů (z individuálních nebo opakovaných měření)
- z dat pro vyhodnocení preciznosti (vícenásobná měření nebo paralelní měření)
- z parciálních nejistot

Standardní nejistota je nejistota výsledku vyjádřená jako směrodatná odchylka

Kombinovaná standardní nejistota je nejistota výsledku měření, je-li výsledek získán z hodnot odpovídajících několika dalším veličinám (například druhá mocnina rozptylů)

Rozšířená nejistota definuje interval hodnot zahrnující výsledek měření

Vyjadřování výsledků analýz v blízkosti meze detekce

Stanovení mezí detekce a stanovitelnosti (oblast **LOD-LOQ** limit of detection, limit of quantification) je nezbytné pro určení rozumné míry nejistot měření.

Výsledky měření jsou **pravděpodobnostní intervaly** určené střední hodnotou a směrodatnou odchylkou. Relativní směrodatná odchylka roste se snižující se koncentrací. Skutečná hodnota leží s 95% pravděpodobností uvnitř intervalu spolehlivosti, který je dán nulovou koncentrací a dvojnásobkem střední hodnoty. Údaje v oblasti $X < LOD$ nejsou regulárními kvantitativními údaji. Je třeba rozlišit a hlásit dva rozdílné případy:

- $X < LOD$
- nestanoveno (pro případ vlivu interferencí).

Mají-li data v této oblasti pro uživatele význam, je nutné snížit hodnotu LOD.

Před zahájením analýzy

- lokalizovat vzorky;
- přesvědčit se, že má k dispozici platný výtisk **standardního operačního postupu**;
- přečíst si postup, pokud jej zevrubně nezná;
- ověřit, že jsou všechny potřebné přístroje dostupné a v dobrém stavu, čisté a správně kalibrované;
- naplánovat sled činností a náplň každého kroku

Před zahájením analýzy

- uvážit všechna rizika související s postupem a s používáním některých činidel.
- je pro práci vymezena dostatečná a čistá plocha na pracovním stole;
- připadá-li v úvahu zvýšené riziko, může být nutný dozor.
- ověřit, že je potřebné nádobí čisté, neporušené a podle potřeby kalibrované.
- ověřit, že jsou zásoby činidel, kalibračních standardů a referenčních materiálů dostatečné a v odpovídajícím stupni čistoty.
- naplánovat postupy likvidace například použitých vzorků, činidel a kontaminovaných zařízení;
- naplánovat postupy očisty zařízení.

V průběhu analýzy

- zjistěte detaily o každém vzorku, jeho stav a odkazy na připojené doklady;
- ověřte ještě před otevřením vzorkovnic, že vzorky mají správnou teplotu;
- odeberte vzorky a zajistěte, aby byl každý dostatečně označen v každém kroku analýzy, aby byl sledovatelný zpět k původnímu vzorku;
- pokud se používá přístroj vícekrát pro různé vzorky, zajistěte potřebné čištění mezi každým použitím, abyste zamezili vzájemné kontaminaci;
- pokud postup nestanoví jinak, je správný sled činností: potřebná kalibrace; je-li kalibrace uspokojivá, proveďte kontroly kvality; pokud jsou kontroly kvality uspokojivé, proveďte analýzy vzorků. Když se vzorky analyzují v sériích, jsou během série nutné pravidelné kontroly kalibrací a kvality; postupujte přesně podle písemného popisu postupu.
- zaznamenávejte srozumitelně pozorování, data a neobvyklé detaily postupu, tak jak se to doporučuje.

Po analýze

- ze získaných dat vypočítejte požadované odpovědi, přičemž hledejte obvyklé chyby jako je nesouhlas duplikátních vzorků, pozitivní výsledky tam, kde očekáváme negativní, atd.;
- kontrolujte přenosy dat a výpočty, s výhodou někým jiným než osobou, která pracovala na úkolu.;
- vzorky se musí uchovávat alespoň do té doby, než bude napsána vyhovující zpráva.
- Vzorek se může uchovávat i déle podle zásad laboratoře, nebo se může vrátit zákazníkovi nebo zlikvidovat.
- oblast laboratoře používaná k práci, příslušné vybavení a přístroje se musí dekontaminovat, očistit a ponechat pro další práci vyčištěné

Uvádění výsledků

Protokol o zkoušce musí obsahovat

- název a identifikaci protokolu
- název a adresu laboratoře
- název a adresu zákazníka
- identifikaci použitých metod
- popis zkoušené položky
- datum přijetí vzorku a provedení analýz
- odkaz na plán a postup vzorkování
- výsledky zkoušek včetně jednotek
- identifikace osob podepisujících protokol

Práce s daty a zprávami



ŘÍZENÍ DOKUMENTACE

- **Záznam** - informace uchovávaná trvale nebo dočasně na nějakém médiu
- **Účel záznamu** - umožnit vyhledání nezkreslené informace podle potřeby
 - monitorování
 - kontrolování
 - komunikování
 - dokazování

Druhy záznamů

- nakupování – objednávky, faktury, dodací listy, seznamy, účetní doklady,
- laboratorní postupy – analytické metody, pravidla kalibrování přístrojů, postupy údržby a čištění, záznamy o školení, postupy pro zaznamenávání stížností zákazníků, řízení jakosti,
- komunikace mezi laboratoří a zákazníkem – požadavky na analýzy, odhady nákladů, pracovní příkazy, analytické zprávy, faktury
- analytická činnost – laboratorní deníky a listy, analytická data, regulační diagramy, záznamy o kalibracích

ŘÍZENÍ DOKUMENTACE

- Tvorba dokumentů
- Identifikace dokumentů
 - co to je
 - co obsahuje
 - kdo jej vytvořil a kdy
 - jestli měl příslušné oprávnění,
 - zda je obsah stále platný
 - stupeň zabezpečení, právo ke kopírování a celistvost

ŘÍZENÍ DOKUMENTACE

- **Katalogy dokumentů**
 - soupis historie
 - identifikaci platné verze
 - kdo je oprávněn vytvářet a doplňovat konkrétní typ dokumentu
- **Každá stránka dokumentu** musí nést následující informaci:
 - název (obvykle plný titul na první stránce a zkrácený tvar na následujících stránkách)
 - číslo verze,
 - datum,
 - číslo stránky (z celkového počtu – DŮLEŽITÉ),
 - stupeň zabezpečení.
- **Titulní stránka** – údaje o
 - zákazu kopírování
 - schvalující osobě
 - rozdělovník
 - číslo kopie (celkový počet výtisků)



ŘÍZENÍ DOKUMENTACE

- Kopírování dokumentů
 - **zákaz kopírování!**
- Ukládání a archivace dokumentů

Uplatnění GLP při terénních studiích

Vzorkování

Laboratoř musí mít:

- plán odběru vzorků
- standardní pracovní postup pro odběr vzorků
- dokumentace odběru vzorků



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

Plán vzorkování

Konkrétní způsob jednotlivých činností vedoucí k odběru reprezentativního vzorku (vzorek by měl v době zkoušek vykazovat stejné vlastnosti jako celý vzorkovaný objekt v časovém intervalu odběru vzorku)

Struktura plánu vzorkování

Cíl vzorkování

Definice místa odběrů, poznatky z místního šetření

Rozsah ukazatelů a koncentračních hladin

Požadovaný rozsah analýz, technika vzorkování

Volba počtu, doby, četnosti a termínu odběru vzorků

Zabezpečení jakosti vzorkování (dekontaminace vzorkovnic, identifikace, konzervace vzorků, zabezpečení)

Volba analytických metod

Ochrana zdraví a zásady bezpečnosti

Požadavky na formu a způsob předávání výsledků

Standardní pracovní postup

Písemný návod detailně popisující provádění odběru vzorků
Definuje použité vzorkovnice, způsob odběru vzorku, jeho konzervaci a homogenizaci
Definuje podmínky přepravy vzorku

Struktura standardního pracovního postupu

Úvod

Vymezení působnosti

Oblast použití

Definice pojmů, symbolů a zkratk

Princip postupu

Bezpečnost práce

Přístroje a vybavení

Pracovní postup

Kontrola funkce přístrojů

Vnitřní kontrola a řízení jakosti

Četnost kontrol

Titulní list SOP

Název metody
Číslo metody
Řízený/neřízený výtisk
Vypracoval
Kontroloval
Schválil
Rozdělovník
Datum platnosti
Změny



Záznam o odběru vzorku

- označení záznamu, označení vzorku
- jméno osoby provádějící odběr
- datum odběru
- časový údaj či interval odběru vzorku
- popis místa odběru, meteorologické podmínky, výsledky měření prováděných na místě
- způsob odběru vzorku s odkazem na použitý SOP
- použité zařízení
- způsob předběžné úpravy vzorku, konzervace, stabilizace
- kontrolní vzorky, duplicitní, terénní slepý, obohacený
- způsob přepravy a uchovávání vzorku
- čas předání vzorku do laboratoře, odpovědná osoba
- odchylky od pracovního postupu

Kvalita vzorku

zahrnuje dostačující velikost, reprezentativnost, stabilitu, pořizovací náklady. Vzorky mohou být **homogenní**, heterogenní nebo kombinované, složené z několika odběrů nebo naopak dělené. Před analýzou se homogenizují a testují na stejnorodost. Odběr může být **systematický** nebo náhodný, vzorky **reprezentativní** nebo nereprezentativní. Technika odběru musí být vybrána podle požadovaného typu analýzy, účelu analýzy (průzkum, monitoring), vlastností analytu a matrice. **Velikost** odběru se musí řídit hmotností potřebnou pro analýzu. Pro odhad nejistot je třeba vzít v úvahu všechny zdroje chyb. Jakost jednotlivých kroků (čistota vzorkovnic, slepé vzorky, doprava, skladování) je třeba kontrolovat

Vzorkovací a analytické operace

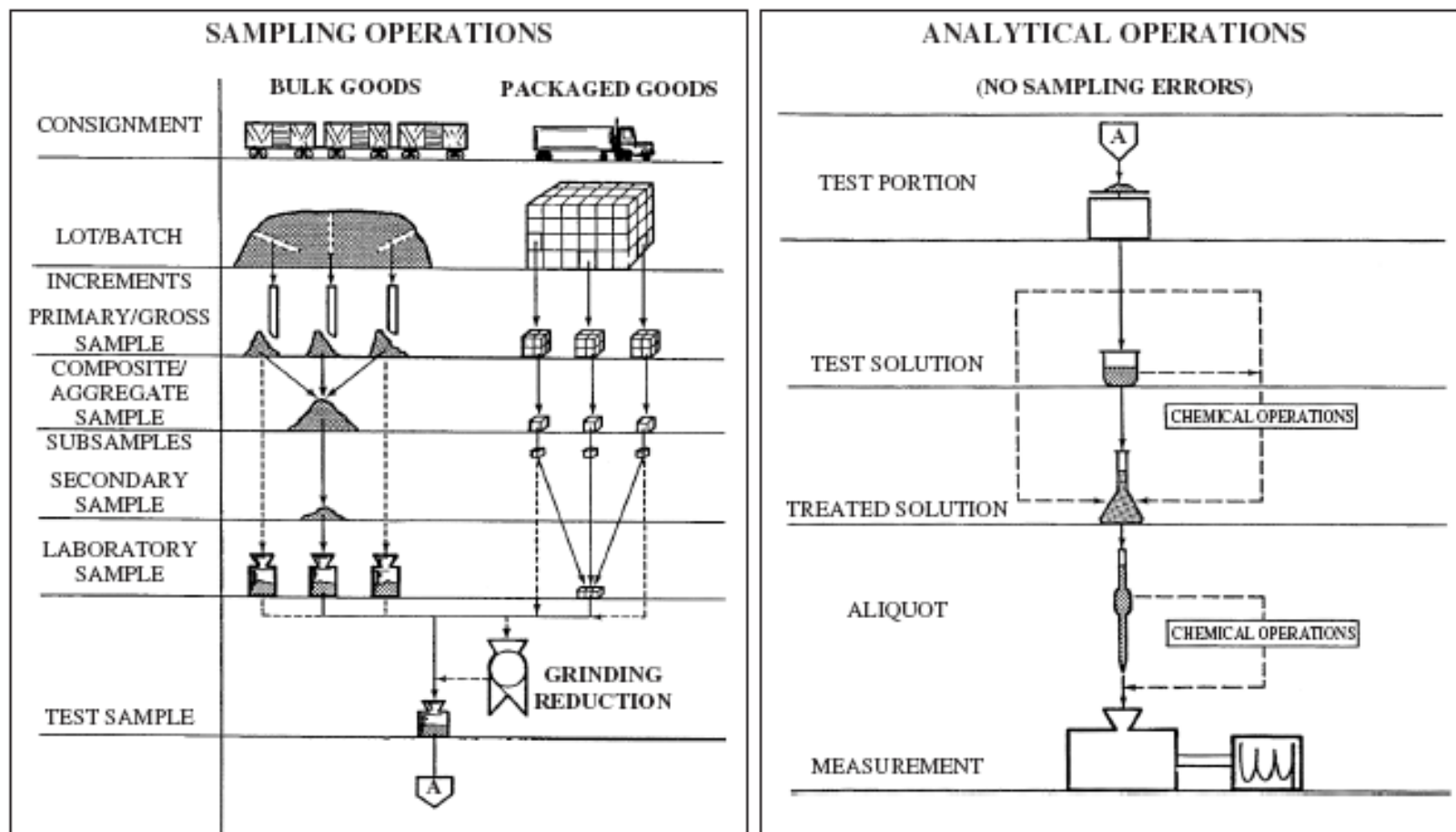


Figure 3.1 Schematic of sampling and analytical operations. Note: the lower "A" of the sampling operations continues with the upper "A" of the analytical operations [1]. Reproduced by permission of the International Union of Pure and Applied Chemistry, from Horwitz, W., *Pure Appl. Chem.*, 62, 1193–1208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

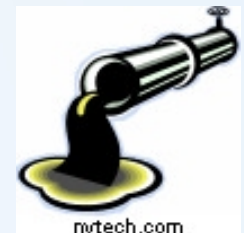
TYPY VZORKŮ

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

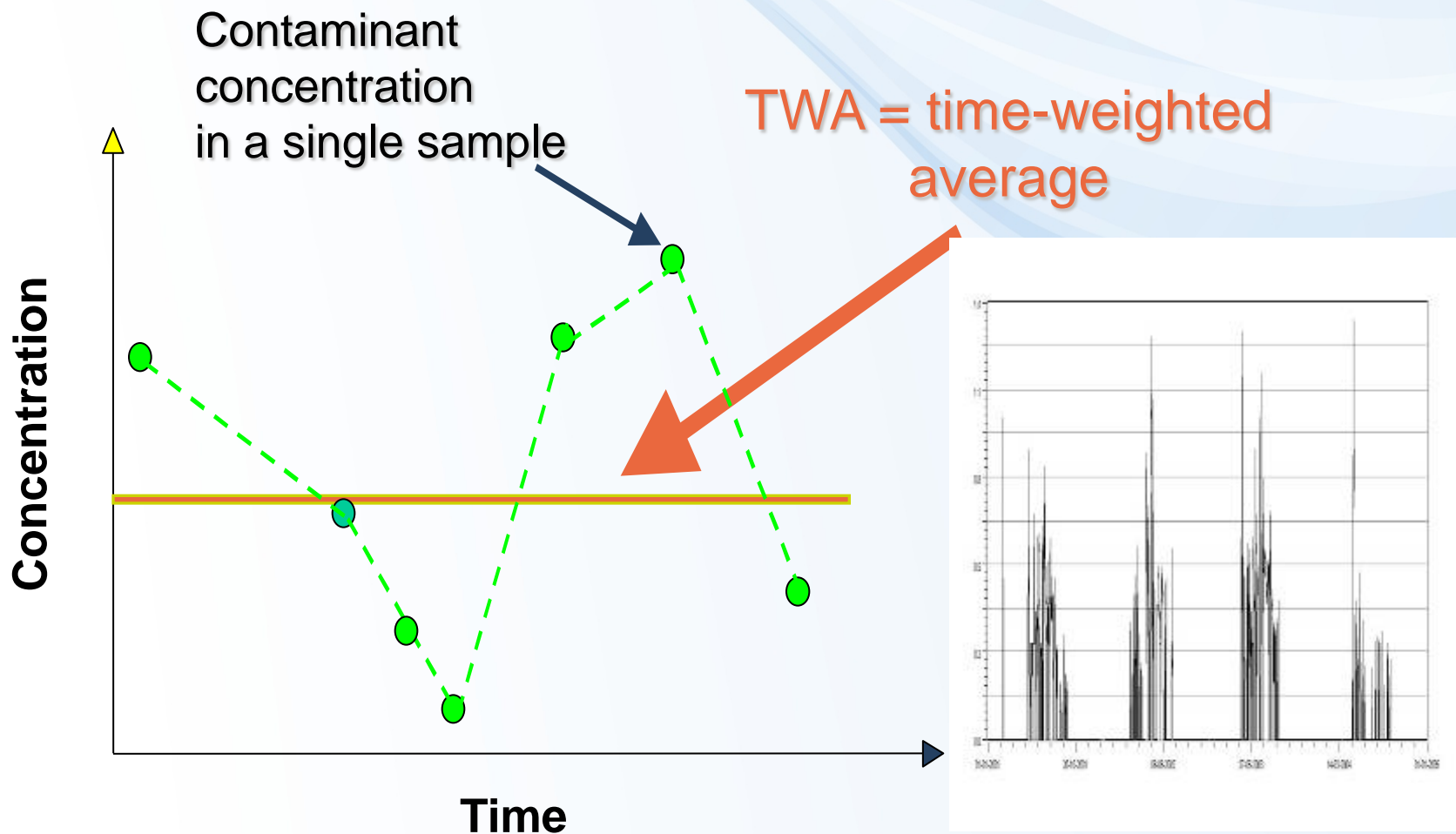


Reprezentativní vzorek

- 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
- 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

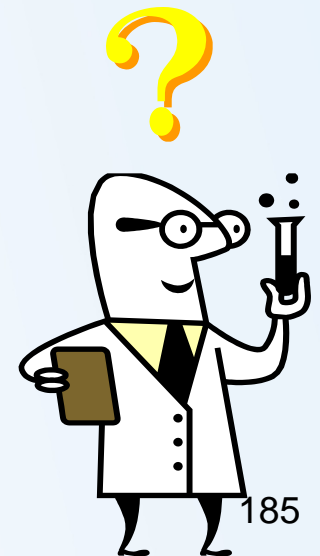
Vzorkovací schemata

- **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 obyčejně 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.

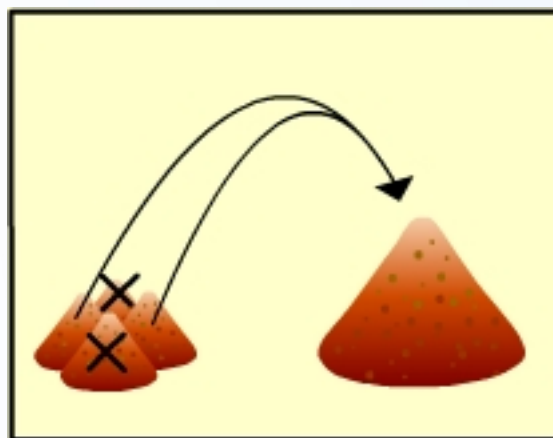
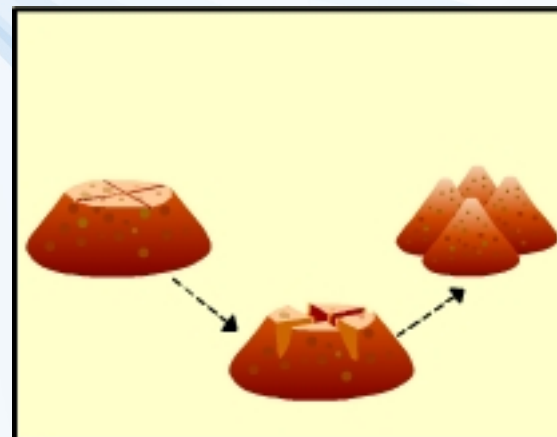
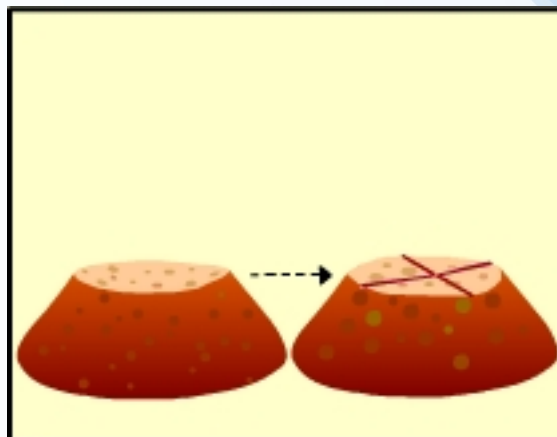
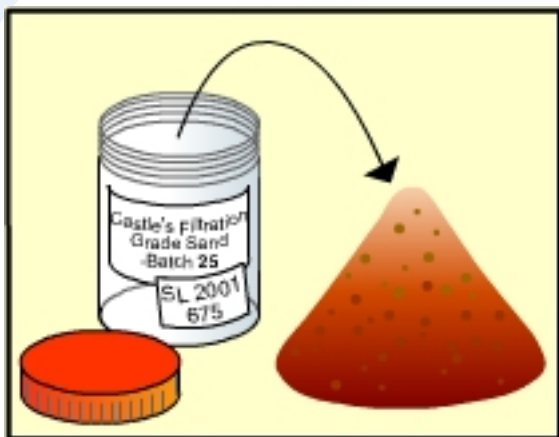
Vztah mezi velikostí částic a zkoušeným podílem

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

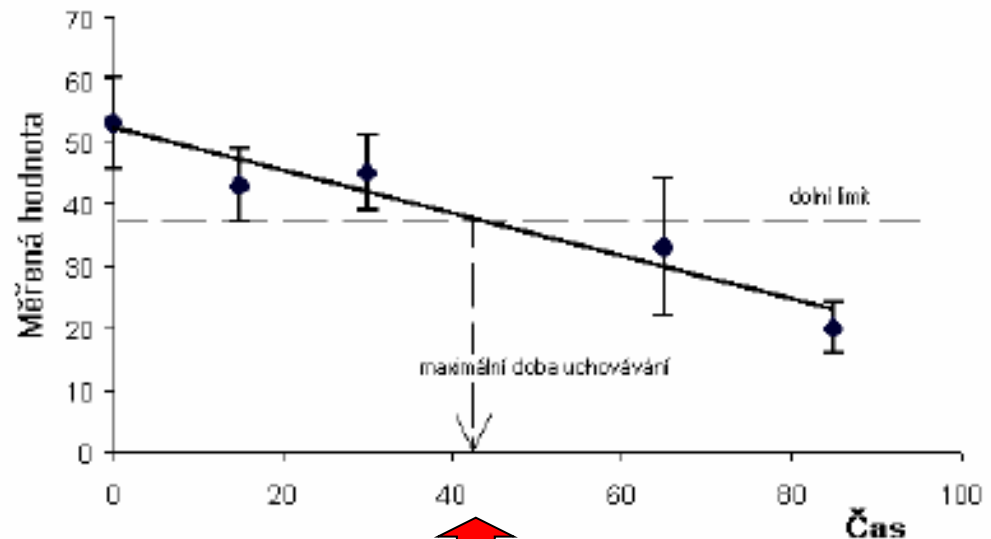
výběrová směrodatná odchylka

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

d je difference mezi *n* duplikáty

Nejdelší doba uchovávání odpovídá bodu, který odpovídá průsečíku

přímky a počáteční hodnoty snížené o **3s**.



MANIPULACE SE VZORKEM

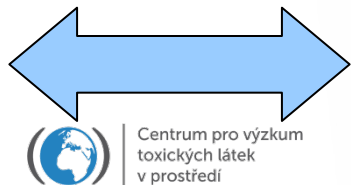
- Po převzetí vzorku je třeba jej **označit** jednoznačnou identifikací, číslem nebo kódem
- zaznamenat všechny podrobnosti o vzorku, které zahrnují i podmínky skladování.
- Pokud si vzorek předávají dvě osoby, musí to být plně dokumentováno.
- Zaznamenat se musí i podrobnosti o vzorkovnici a jejích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



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
pokojeová 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

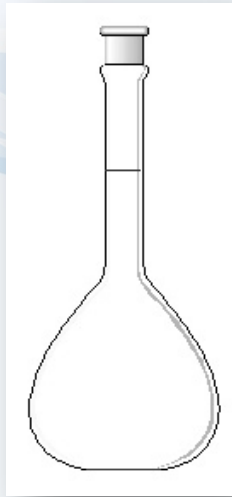
„Kvalita vod – Odběr vzorků – Část 14: Pokyny pro zabezpečování kvality odběru vzorků vod a manipulace s nimi.“

- 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

A



ostáva v lab., tma, T ↓
ANALÝZA



Obohatenú vzorku rozdeliť
na 2 časti, do vzorkovníc

B



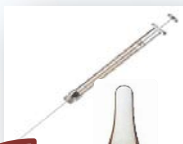
zobrať do terénu, tma, T ↓



Preliať do
vzorkovnice

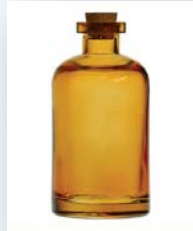


b_{3i}



Obohatiť
prídavkom ŠTD

b₃



Ostáva v pôvodnej
vzorkovnici

b₂

b₁



Preliať do
vzorkovnice

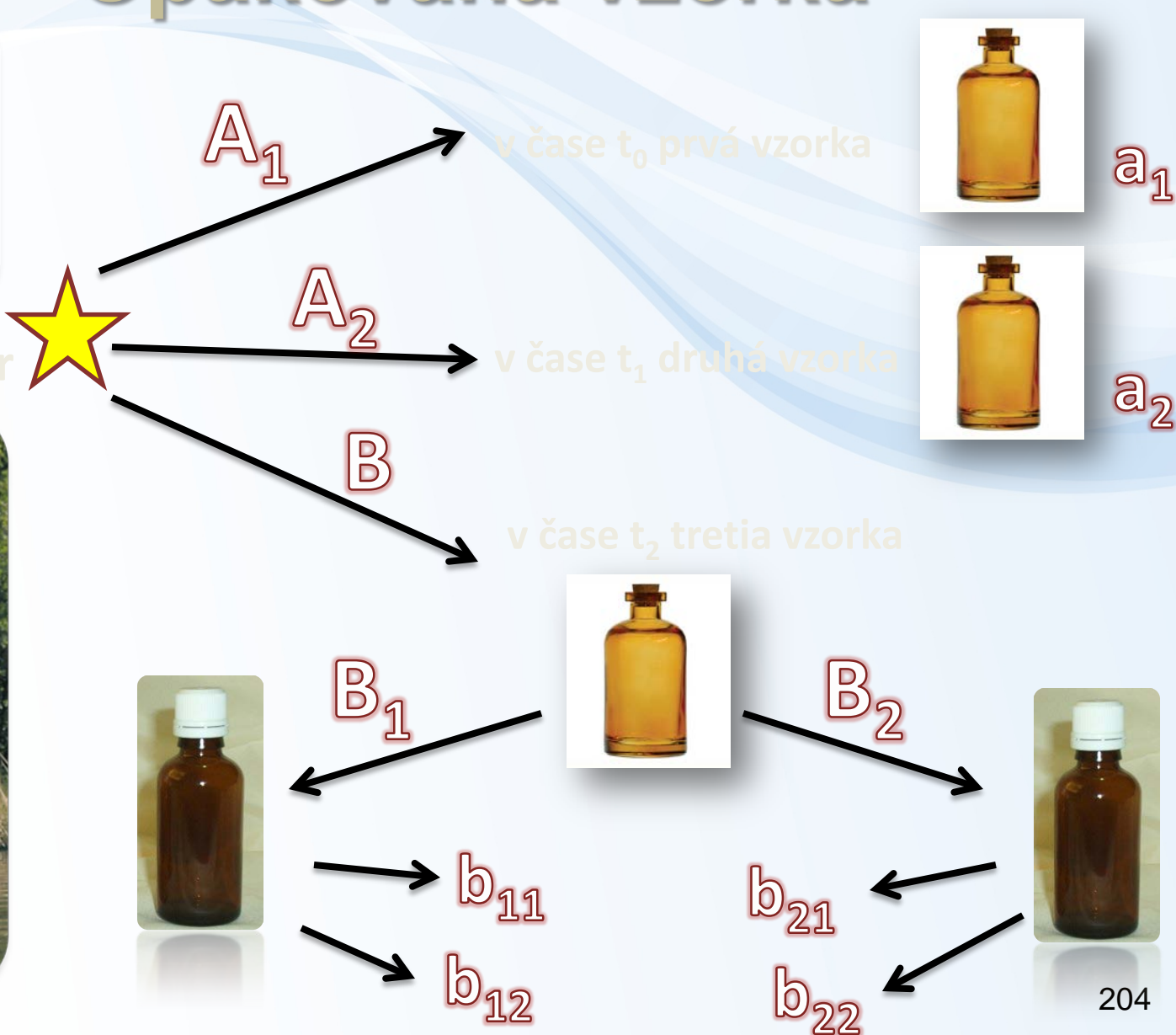
b_{3ii}



Opakovaná vzorka



Terénny odber



Definice validačních parametrů

Kalibrace zavádí vztah mezi hodnotami udávanými měřícím systémem a hodnotami odpovídajícími obsahu analytu ve vzorku

Citlivost – velikost nárůstu závisle proměnné vyvolaná nárůstem koncentrace analytu, směrnice kalibrační křivky

Linearita – vlastnost metody poskytnout výsledek zkoušky v určitém rozsahu přímo úměrné koncentraci

Mez detekce – nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno

Mez stanovitelnosti - nejmenší množství analytu které může být stanoveno s přijatelným stupněm správnosti a shodnosti (např. pro chromatografii z poměru signál:šum mez detekce 3:1, mez stanovitelnosti 10:1)