



AGNIESZKA WOJDA



BOLESŁAW JERZAK



EWA BULSKA

Walidacja metod analitycznych jest tematem omawianym w każdym podręczniku poruszającym problematykę zapewnienia jakości w laboratorium; poświęcono jej odrębne opracowania książkowe i artykuły, jest także tematem ogromnej liczby szkoleń i kursów. Powszechnie przyjmuje się, że jest to proces o znaczeniu podstawowym dla laboratoriów wykonujących analizy chemiczne, a metody niepoddane walidacji nie powinny być stosowane.

Meandry procesu walidacji

POPRAWNOŚĆ WYNIKÓW POMIARÓW CHEMICZNYCH – JEDNO Z WAŻNIEJSZYCH ZAGADNIEŃ WALIDACJI

Zgodnie z terminologią opisaną w „Międzynarodowym słowniku metrologii. Pojęcia podstawowe i ogólne oraz terminy z nimi związane” (PKN-ISO/IEC Guide 99:2010; punkt 2.45), *walidacja* jest definiowana jako weryfikacja, gdzie określone wymagania są adekwatne do zamierzonego zastosowania. W tej definicji na szczególne podkreślenie zasługuje określenie „do zamierzonego zastosowania”, co wskazuje, że niezmiennie istotny jest cel prowadzenia pomiarów i obszar wykorzystania ich wyników. Ten aspekt jest również uwzględniony w opisie walidacji, który jest zawarty w normie PN-EN ISO/IEC 17025:2005. W praktyce laboratoryjnej termin „walidacja” używany w wielu kontekstach, zarówno w odniesieniu do weryfikacji nowych metod analitycznych, jak również w odniesieniu do weryfikacji metod znormalizowanych. Zgodnie z wymaganiami normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005, punkt 5.4.5, proces walidacji powinien być przeprowadzony w przypad-

ku nowych metod, które są rozwijane w laboratorium, lub metod normalizowanych, wykorzystywanych poza przewidzianym dla nich zakresem. Wdrażanie w laboratorium metod opisanych w normach, monografiach farmakopealnych czy innych uznanych dokumentach powinno obejmować proces zwany „weryfikacją” lub „sprawdzaniem” (ramka obok).

Pomijając kwestie nomenklaturowe, można stwierdzić, że zasady prowadzenia walidacji są dobrze znane i w pełni stosowane w większości laboratoriów. Niemniej warto przypomnieć niektóre z tych zasad, a w szczególności zwrócić uwagę na różne problemy wynikające z charakteru pomiarów chemicznych. W niniejszym artykule omówiony zostanie jeden z ważniejszych parametrów analitycznych procedury pomiarowej, a mianowicie ten związany z poprawnością wyników uzyskiwanych daną metodą analityczną.

Rozważania warto rozpocząć od przywołania definicji tego terminu, podanej w przewodniku PKN-ISO/IEC Guide 99:2010. Zgodnie z opisem podanym w punkcie 2.14 tego dokumentu *poprawność pomiaru to zbieżność zachodząca pomiędzy średnią z nieskończonej liczby powtórzonych wartości wielkości zmierzonych a wartością wielkości odniesienia*. Oczywiście w praktyce laboratoryjnej nie ma możliwości zrealizowania nieskończonej liczby powtórzeń, stąd do oceny poprawności pomiaru wykorzystuje się wartość średnią z możliwie największej ich liczby. W przypadku pomiarów wielkości chemicznych najlepszym sposobem oceny ich poprawności jest zastosowanie matrycowych certyfikowanych materiałów odniesienia CRM (ang. *Certified Reference Material*), odpowiednio dobranych do konkretnego zastosowania.

PRZEBIEG OBYDWU PROCESÓW:

WALIDACJI oraz WERYFIKACJI

jest w zasadzie taki sam, różni się tylko postawionym na ich początku pytaniem.

W przypadku walidacji stawiamy pytanie:

„Czy przewidziana do zastosowania metoda jest właściwa/nadaje się do przyjętego celu?”.

W przypadku weryfikacji stawiamy pytanie:

„Czy laboratorium wdrażające metodę potrafi/jest w stanie stosować ją właściwie i uzyskiwać oczekiwane wyniki?”.

Podstawowe reguły wyboru matrycowych materiałów CRM można bez trudności odnaleźć w literaturze. A do najważniejszych należą:

- zestaw analitów, dla których podano certyfikowane wartości odniesienia, powinien być taki sam, jak zestaw substancji chemicznych oznaczanych w analizowanych obiektach;
- zawartość tych substancji powinna być zbliżona do oczekiwanej ich zawartości w analizowanych próbkach;
- matryca powinna być jak najbardziej zbliżona (w idealnym przypadku, identyczna) do matrycy badanych obiektów.

Pomijając rozterki, co oznacza sformułowanie „możliwie zbliżona” (czy do oznaczania zawartości substancji organicznych w tkankach ryb bałtyckich można zastosować materiał „Tkanki ryb z jeziora Michigan?”), warto podkreślić, że wyżej wymienione wymagania są tymi najbardziej elementarnymi. Właściwy wybór materiału odniesienia nastręcza wiele dodatkowych trudności, o czym świadczą przedstawione dalej problemy.

Pierwszy z nich to postać fizyczna materiału odniesienia i badanych próbek. Spektakularnym przykładem jest gleba – certyfikowane materiały odniesienia mają z reguły postać pyłu o w miarę jednorodnej wielkości ziaren, natomiast jednorodność gleby pobranej z natury jest zazwyczaj znacznie mniejsza. Stąd

można oczekiwać, że ze względu na wielkość ziaren i powierzchnię kontaktu z roztworem ekstrakcyjnym proces ekstrakcji prowadzony dla próbek gleby i dla materiału odniesienia przebiega w odmienny sposób, co wpływa nie tylko na efektywność ekstrakcji, ale często również na zestaw wymywanych substancji. Podobny problem może występować w przypadku zastosowania materiału odniesienia w postaci liofilizatu, wtedy gdy badania prowadzone są dla próbek biologicznych, na przykład próbek żywności, tkanek roślin i zwierząt czy też krwi.

Kolejna wątpliwość może pojawić się przy ocenie statusu metrologicznego wartości podanych w certyfikacie. Zalecenia dotyczące procesu walidacji mówią o porównywaniu wyniku analizy materiału odniesienia z wartością certyfikowaną. Wielu wytwórców certyfikowanych materiałów odniesienia, w tym organizacje wiodące w tym zakresie, umieszcza w certyfikatach wartości inne niż certyfikowane. Zestawienie niektórych z nich przedstawiono w tabeli 1.

Tego rodzaju różnice w klasyfikacji (np. różne nazwy dla wartości certyfikowanych, różnie zdefiniowane wartości orientacyjne) mogą powodować dezorientację użytkowników certyfikowanych materiałów odniesienia. Nie zawsze jest jasne, czy wartości o różnych nazwach zamieszczone w certyfikacie mogą być traktowane jako certyfikowane i czy mogą

IKA® POL

Przedstawiciel w Polsce firmy IKA WERKE

Działalność firmy obejmuje doradztwo techniczne, dystrybucję i handel sprzętem laboratoryjnym, pomiarowo-analitycznym i produkcyjnym:

■ sprzęt laboratoryjny

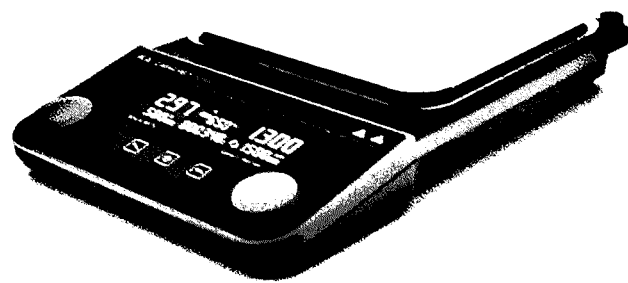
- mieszadła magnetyczne, mieszadła mechaniczne, homogenizatory, wytrząsarki, młynki, łaznie wodne, płyty grzewcze, pompy próżniowe i perystaltyczne, wyparki, ekstraktory substancji stałych, reaktory laboratoryjne

■ sprzęt pomiarowo-analityczny

- zagniataarki, elektrolizery, termograwimetry, kalorymetry, analizatory laboratoryjne C, S, N, O, H, CO₂

■ sprzęt produkcyjny

- pojemnościowy – homogenizatory, turbotrony, rototrony
- przepływowy – homogenizatory, dispax reaktory, młyny koloidalne
- pemulgatory – mieszalniki (o poj. od 10 – 4000 L), dla substancji o różnej lepkości



IKA POL

ul. Przy Bażantarni 4/6, 02-793 Warszawa
tel. +48 22 649 24 05, fax: +48 22 859 14 39
e-mail: info@ikapol.pl, www.ikapol.pl

Tabela 1. Terminologia stosowana w certyfikatach materiałów odniesienia różnych producentów

Materiały IAEA*	Materiały ERM**	Materiały NIST	Materiały LGC	Materiały MBH
Wartości zalecane (<i>recommended values</i>)	Wartości certyfikowane, spełniające najwyższe wymagania odnośnie do ich wiarygodności. Są spójne pomiarowo z ustalonymi odniesieniami i podawane z niepewnością rozszerzoną. <i>Certified values fulfill the highest standards for reliability. They are traceable to stated references and are accompanied by a GUM (ISO Guide 98 "Guide to the expression of uncertainty in measurement") compatible expanded uncertainty statement valid for the entire shelf life of the ERM-CRM.</i>	Wartości certyfikowane, w przypadku których NIST ma największe zaufanie co do ich dokładności, a wszelkie źródła obciążenia zostały dokładnie przebadane. <i>A NIST Certified Value represents data for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been fully investigated or accounted for by NIST.</i>	Wartości certyfikowane – uzyskane w LGC na drodze analizy metodą definitywną, niepewność tych wartości została w pełni oszacowana. Wartości certyfikowane są spójne pomiarowo z roztworami kalibracyjnymi otrzymanymi grawimetrycznie w LGC ze związków o znanej czystości. <i>The data for the certified values were obtained via analyses carried out at LGC using Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS) (a 'definitive' method with fully evaluated uncertainty) and are traceable to the primary calibration solutions prepared gravimetrically at LGC from the compounds of known purity.</i>	Wartości uzgodnione (<i>assigned values</i>)
	Wartości orientacyjne (<i>indicative values</i>) – nie są certyfikowane z powodu zbyt dużej niepewności lub niewystarczającej liczby metod, które zostały użyte do ich potwierdzenia. <i>Indicative values are not certified due to either a larger uncertainty than required for the intended use or insufficient variety of methods used in the characterisation. The information is therefore unsuitable for certification at the accuracy required for certified values.</i>	Wartości odniesienia, stanowiące najlepsze oszacowanie wartości prawdziwej. Nie wszystkie źródła obciążenia zostały w pełni przebadane przez NIST. <i>A NIST Reference Value is a best estimate of the true value provided by NIST where all known or suspected sources of bias have not been fully investigated by NIST.</i>	Wartości oszacowane zostały uzyskane metodą definitywną, ale niepewność ich jest zbyt wysoka, aby uznać je za certyfikowane, wartości te mogą być także uzyskane na drodze badań międzylaboratoryjnych <i>The data for the assessed values were also obtained via analyses carried out at LGC using IDMS, however due to a large contribution from the homogeneity uncertainty to the combined uncertainty the data were not considered to be of the same metrological quality as the certified values.</i>	
Wartości informacyjne (<i>information values</i>)	Dodatkowe informacje o materiale. Wartości uzyskane w trakcie procesu certyfikacji za pomocą jednej metody. Informują one raczej o rzędzie wielkości niż o dokładnej wartości. <i>Additional material information are values created during the certification exercise, which are usually the result of one method only and indicate the order of magnitude rather than an accurate value.</i>	Wartości informacyjne, mogące być interesujące dla użytkowników materiałów odniesienia, jednakże podawane bez niepewności z powodu zbyt małej liczby informacji. <i>A NIST Information Value is a value that will be of interest and use to the SRM/RM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value.</i>	Wartości orientacyjne (<i>indicativ</i>), uzyskane jako wynik programów badania biegłości lub we współpracy z pojedynczym laboratorium <i>Values were classified as indicative where the data were obtained from a PT scheme or under contract from a single laboratory.</i>	

* IAEA (International Atomic Energy Agency, Międzynarodowa Agencja Energii Atomowej) w certyfikatach podaje wartości zalecane (*recommended values*) i wartości informacyjne (*information values*), przy czym w certyfikacie brak bliższego wytłumaczenia tych pojęć. Więcej informacji na ten temat znajduje się w sprawozdaniach z procesu wytwarzania materiału. Na przykład w sprawozdaniu z otrzymywania materiału IAEA433 zamieszczono informację, że do klasyfikacji wartości zastosowano trzy kryteria: W zależności od zawartości danego składnika względna niepewność wartości średniej (względne odchylenie standardowe) nie powinna przekraczać następujących granic:

- 100 mg/kg – 500 mg/kg \pm 20 %
- 10 mg/kg – 100 mg/kg \pm 30 %
- 0,1 mg/kg – 10 mg/kg – 50 %; + 60 %
- < 0,1 mg/kg – 50 %; + 100 %

Wartość średnia uzyskana jest na podstawie wyników otrzymanych co najmniej dwiema różnymi metodami. Wartość średnia wyliczana jest na podstawie wyników uzyskanych przez następującą liczbę laboratoriów: (a) 10; (b) 5; (c) 3. Na podstawie tych kryteriów zbiór wartości podzielono na trzy grupy:

Grupa A: spełniająca kryteria 1, 2 i 3 (a)

Grupa B: spełniająca kryteria 1, 2 i 3 (b).

Wartości z grup A i B są to wartości rekomendowane.

Grupa C: wartości informacyjne spełniające kryteria 1 i 3 (c).

** ERM – European Reference Materials – program wytwarzania certyfikowanych Europejskich Materiałów Odniesienia.

Tabela 2. Problem ze sposobem określania niepewności wartości podanych w certyfikacie

Matryca/analizy	Rodzaj materiału (RM/CRM) według deklaracji producenta	Sposób określenia zakresu, w którym znajduje się wartość uzgodniona*
Metale w osadzie ściekowym	CRM (018-050)	Standard deviation Confidence interval Prediction interval
Metale w wodzie pitnej	CRM (Certified Reference Standard)	Confidence interval Tolerance interval

*Wartość uzgodniona – wartość przyjęta za prawdziwą, w przypadku CRM wartość certyfikowana.

być podstawą badania poprawności metody. Znaczna część certyfikatów nie zawiera jasnych informacji na ten temat, a dostępne wyjaśnienia nie zawsze są wystarczająco jednoznaczne. Na przykład, w certyfikacie materiału ERM-CA022a znajdujemy uwagę dotyczącą wartości orientacyjnych: *Wartości orientacyjne uzyskano w trakcie porównań międzylaboratoryjnych materiału. W tym przypadku jednak wyniki dostarczyło mniej niż 10 laboratoriów, co z punktu widzenia dobrej praktyki statystycznej nie jest wystarczające do ustanowienia certyfikowanych wartości odniesienia. Wartości orientacyjne, ustalone na podstawie otrzymanych danych, mogą być stosowane przez laboratoria do oceny sprawności wykonywania analiz dotyczących tych pierwiastków.*

Problemy mogą się też wiązać ze sposobem określania niepewności wartości podanych w certyfikacie, a ogólniej mówiąc – przedziału, w którym mieszczą się wartości przypisane materiałowi i w którym

powinny się także znaleźć wyniki analizy materiału uzyskane w laboratorium. Nie wszyscy producenci materiałów odniesienia określają precyzyjnie, czym jest podawany przez nich zakres zmienności. Zazwyczaj nie budzą wątpliwości przypadki dotyczące niepewności rozszerzonej – często podawany jest sposób jej wyliczenia łącznie ze współczynnikiem rozszerzenia. Jednakże w wielu certyfikatach odnaleźć można różnego rodzaju „zakresy akceptowalne” lub podobne określenia. Dwa najczęściej spotykane przypadki – tabela 2.

Kolejnym problemem jest ograniczony asortyment matrycowych materiałów CRM, ale ten problem zostanie omówiony szczegółowo w kolejnym numerze.

**Agnieszka Wojda*, Bolesław Jerzak*,
Ewa Bulska****

* LGC Standards

** Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych,
Uniwersytet Warszawski

ANALITYKA

chemia w dobrym wydaniu



**Zapraszamy
na Targi EuroLab 2017
do stoiska
Wydawnictwa MALAMUT**

gdzie będzie można kupić książki
(w tym II wydanie Chemometrii
Praktycznej i Magnez – pierwiastek
życia), oraz złożyć zamówienie na
prenumeratę czasopisma Analityka.

STOISKO

D • 10