

Vývoj, optimalizace a validace metod  
Základní pojmy  
Problematika nejistot v toxikologii

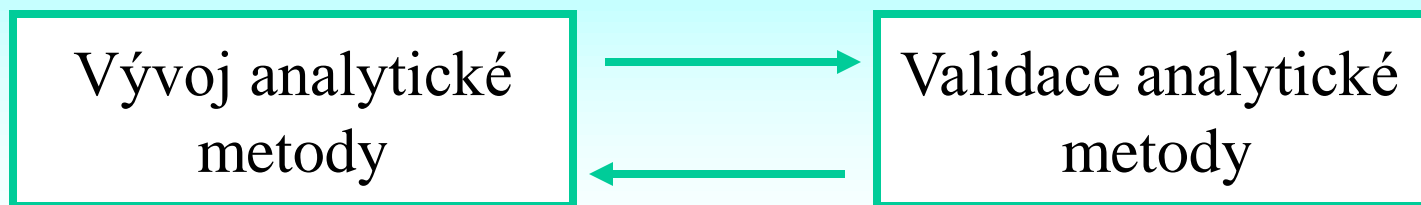
Ing. Věra Marešová, CSc  
Ústav soudního lékařství a toxikologie 1. LF UK a VFN  
vmare@lf1.cuni.cz

# Validace analytické metody

## **Obecný postup vývoje analytických metod**

- ✓ definice požadavků na zkušební metodu
- ✓ optimalizace podmínek zkušební metody
- ✓ validace metody
- ✓ nutno dokázat, že analytická metoda je přijatelná pro zamýšlené použití a poskytuje výsledky ve stanovených mezích spolehlivosti tj. měření látky s danou přesností, správností, detekčním limitem apod.
- ✓ hlavním cílem validace metod je zabezpečení jištění kvality (Quality assurance, QA) v laboratoři

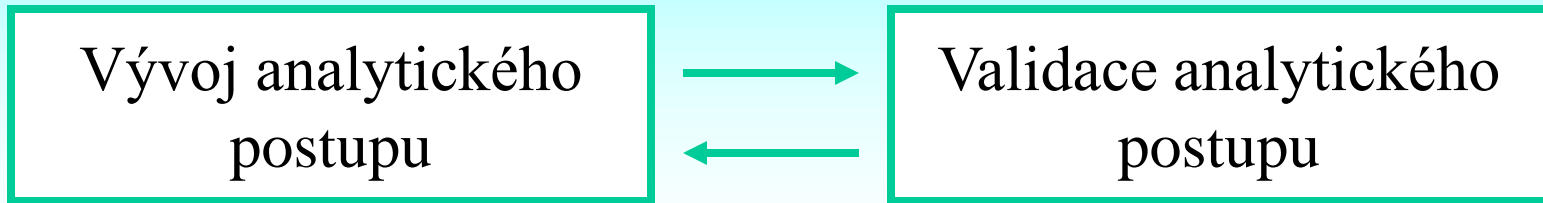
# Validace analytické metody



## Zlatá pravidla validace

- validovat celou metodu
- validovat celý rozsah koncentrací
- validovat v rozsahu všech uvažovaných matic

# Validace analytické metody



Vývoj:

nalezení optimálních podmínek pro měření analytického signálu

Podmínky:

parametry určující hodnotu analytického signálu

# Validace analytické metody

## Pracovní postup – analytický předpis

- ✓ oblast použití metody, princip měření, chemické reakce stanovované látky, koncentrační rozmezí pro stanovovanou látku, jednotky, vliv matrice
- ✓ příprava roztoků, činidel: chemická čistota použitých chemikálií, jejich úprava a čištění, příprava rozpouštědel, činidel a pomocných chemikálií, stabilita a koncentrace
- ✓ mechanická úprava vzorku, chemická úprava vzorku, měření vzorku, kalibrační měření, výpočet obsahu stanovované látky, hodnocení výsledku

# Validace analytické metody

## Validace – potvrzení platnosti

- ✓ potvrzení prostřednictvím poskytnutí *objektivních důkazů*, že **požadavky na specifické zamýšlené použití nebo na specifickou aplikaci byly splněny**  
*objektivní důkaz* je informace, jejíž pravdivost může být prokázána na základě skutečností získaných pozorováním, měřením, zkoušením nebo jinými prostředky
- ✓ validace analytického postupu je proces ujištění, že jsou analytická metoda nebo postup vhodné pro zamýšlený účel
- ✓ validace metody zjišťuje pomocí laboratorní studie, že metoda splňuje požadavky pro zamýšlené analytické použití

# Validace analytické metody

## **Validace analytické metody**

- ✓ prověření analytické metody, které zaručuje, že údaje o jednotlivých znacích validované metody byly ověřeny a že jsou pravdivé a vhodné pro zamýšlený účel
- ✓ chování metody se vyjadřuje v pojmech analytických charakteristik – výkonnostních parametrů (často znaků analytické metody): přesnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti, selektivita, specifická, rozsah, linearita, robustnost
- ✓ analytik musí prokázat, že je schopen validovanou metodu používat a získat deklarované charakteristiky analytického chování

# Validace analytické metody

## **Validace – potvrzení platnosti analytické metody**

- ✓ vhodnost analytické metody musí být validována před změnou (rozšířením) jejího použití
- ✓ validují se alespoň základní znaky analytické metody
- ✓ analytické znaky tvoří osnovu validačního plánu

## **Verifikace – ověřování analytické metody**

- ✓ potvrzení zkoumáním a poskytnutí objektivního důkazu, že specifikované požadavky jsou splněny – data o analytických znacích poskytnutá výrobcem, jinou laboratoří nebo referenční institucí jsou v dané laboratoři dosažena
- ✓ průkaz shody, přezkoušení či osvědčení pravdivosti daného jevu znamená, že měřící postup, systém, výrobek je plně funkční v konkrétní laboratoři



# Validace analytické metody

## **Validace/ verifikace analytické metody**

- ✓ výsledky analytických měření mají mimořádně silný dopad v praxi. V klinické laboratoři mohou rozhodným a někdy i fatálním způsobem ovlivnit zdraví, kvalitu života a někdy i samotný život pacienta. Ve forenzní laboratoři vedou závěry k závažným opatřením pro vyšetřovaného jedince.
- ✓ provádět měření o dostatečné kvalitě je profesionální povinností analytika
- ✓ validace poskytuje naprosto nezbytně potřebná data o nejistotě (intervalu spolehlivosti) výsledků měření
- ✓ akreditace, neboli úřední potvrzení kompetence laboratoře vyžaduje používání řádně validovaných a verifikovaných měření

# Validace analytické metody

## Kdy se provádí validace/verifikace

- ✓ při zavedení nové metody
- ✓ při pořízení a před aplikací nového analytického měřicího systému do laboratoře
- ✓ pokud rozšíříme použití stávající metody o další účel  
např. rozšíříme měření o další druh biologického materiálu
- ✓ ukazuje – li kontrola kvality přetrvávající problém
- ✓ při převzetí metody z jiné laboratoře
- ✓ po dohodnuté době (jeden rok) revalidace/reverifikace

# Validace analytické metody

## Validace analytické metody

- ✓ série experimentů pro zajištění důležitých charakteristik metody
- ✓ matematickostatistické zpracování experimentálních dat – metoda poskytuje při opakovaném použití reprodukovatelné a spolehlivé výsledky, je vhodná pro zamýšlené použití
- ✓ je třeba přesně definovat podmínky, za kterých bude metoda použita je třeba splnit stanovená kritéria – test způsobilosti analytického systému
- ✓ odborné směrnice pro validace analytických metod:
  - Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčiv (r. 1994, r. 1996) dokument je akceptován kontrolními úřady EU, USA a Japonska
  - směrnice OECD (Organization for Economic Co – operation and Development) zahrnující principy pro správnou laboratorní praxi (Good Laboratory Practice GLP)

# Validace analytické metody

The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (**ICH**)

ICH směrnice

USA – Federal Register

**[www.fda.gov/cder/guidance/index.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm)**

*Reference:*

ICH Harmonised tripartite Guideline Q2A

Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology

(říjen 1994) Fed. Reg. 60, 1 March 1995, p. 11260

ICH Harmonised tripartite Guideline Q2B

Validation of Analytical Procedures: Methodology

(listopad 1996) Fed. Reg. 62 (96), 19 May 1997, p. 27463

# Validace analytické metody

The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (**ICH**)

*Reference:*

Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, 1994

**[www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf](http://www.fda.gov/cder/guidance/cmc3.pdf)**

Analytical Procedures and Method Validation:

Highlights of the FDAs Draft Guidance, LCGC, Volume 19, Number 1, January 2001

**[www.lcgcmag.com](http://www.lcgcmag.com)**

**[www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.htm](http://www.fda.gov/cder/guidance/2396dft.htm)**

# Validace analytické metody

## **Kontrolní úřady v EU, USA a Japonsku:**

European Commission – European Union (EU)

European Federation of Pharmaceutical Industries Assoc. (EFPIA)

Ministry of Health and Welfare, Japan (MHW)

Japan Pharmaceutical Manufacturers Assoc. (JPMA)

U.S. Food and Drug Administration (FDA)

Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA)

# Validace analytické metody

## Literatura:

Kvalimetrie 9. Vhodnost analytických metod pro daný účel, EURACHEM – ČR, Praha 1999

Kvalimetrie 7. Validace analytických metod. EURACHEM – ČR, Praha 1997

Kvalimetrie 12. Průvodce jakosti v analytické chemii. Pomůcka k akreditaci, Praha 2003

**[www.eurachem.cz](http://www.eurachem.cz)**

**[www.sekk.cz](http://www.sekk.cz)**

# Validace analytické metody

**Validace vypracované analytické metody slouží k ověřování její vhodnosti, správnosti a spolehlivosti.**

**Parametry validace analytické metody:**

**Přesnost**

**Limit detekce**

**Správnost**

**Limit kvantifikace**

**Selektivita**

**Robustnost**

**Linearita**



# Validace analytické metody

## Selektivita

- ✓ schopnost metody rozlišit a jednoznačně prokázat či stanovit analyt resp. jednotlivé analyty v určité matici za přítomnosti možných vedlejších látek (příměsí) za definovaných podmínek reakce
- ✓ mění se s obsahem (množstvím, koncentrací) analytu a někdy i v závislosti na nastavení parametrů metody
- ✓ mírou selektivity je známý, kvantitativním způsobem vyjádřený vliv matrice
- ✓ míru selektivity lze určit metodou plánování pokusů či vyhodnocením analýzy rozptylu nebo porovnáním výsledků analýzy získaných s čistým analytem a za přítomnosti všech předpokládaných reálných rušivých složek v množstvích odpovídajících reálné matici

# Validace analytické metody

## **Správnost (accuracy)**

- ✓ těsnost souhlasu mezi jediným výsledkem měření a dohodnutou referenční hodnotou měřené veličiny
- ✓ kombinuje přesnost a pravdivost, tj. vlivy náhodných a systematických faktorů
- ✓ je kvalitativní termín:
  - za předpokladu, že výsledky použité metody vykazují nulovou nebo malou chybu se správnost rovná přesnosti
  - je – li přesnost nízká, bude konkrétní výsledek nesprávný a bude se výrazně lišit od konvenční skutečné hodnoty
  - je –li přesnost vysoká, budou všechny výsledky správné
  - pokud vykazuje metoda velkou chybu, budou i velmi přesné výsledky nesprávné

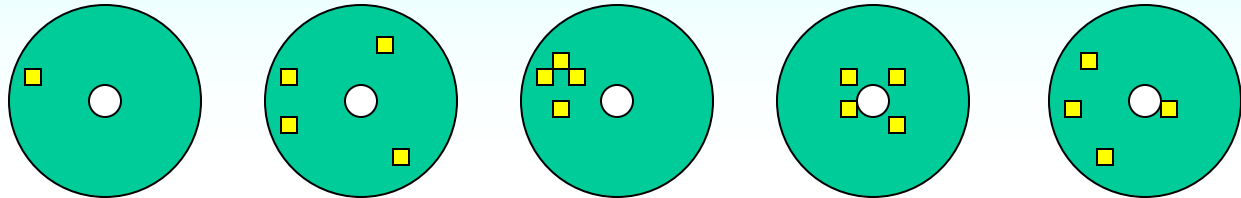
# Validace analytické metody

## Správnost (accuracy)

- ✓ je definována jako odchylka (vychýlení, bias) od správné hodnoty
- ✓ bias představuje kvantifikaci systematické chyby měření
- ✓ správnost v laboratoři zjišťujeme pomocí certifikovaného referenčního materiálu nebo pomocí laboratorního etalonu (referenční hodnota pro etalon byla získána primární metodou měření)
- ✓ odchylka mezi certifikovanou (referenční) hodnotou  $\mu$  a výsledkem analýzy  $x$  je způsobena chybou měřicího procesu a chybou certifikované hodnoty, kterou lze zanedbat
- ✓ vyjadřuje se jako procentuální odchylka od uznávané referenční hodnoty

# Validace analytické metody

## Odchylka(bias)



Odchylka (bias)	neznámá	veliká	veliká	malá	veliká
Přesnost	neznámá	špatná	dobrá	dobrá	špatná
Chyba	veliká	veliká	veliká	malá	veliká

# Validace analytické metody

## **Přesnost (precision)**

- ✓ je míra shody mezi nezávislými výsledky měření opakovaně prováděného s jedním homogenním vzorkem za předepsaných podmínek
- ✓ závisí pouze na rozdělení náhodných chyb a nemá vztah ke skutečné nebo specifikované hodnotě
- ✓ je vyjádřena kvantitativně jako výběrová směrodatná odchylka, rozpětí apod
- ✓ podle podmínek opakování metody se rozlišuje:
  - opakovatelnost, intra – run (repeatability)
  - intermediate precision
  - reprodukovatelnost, inter – run (reproducibility)

# Validace analytické metody

## Opakovatelnost (repeatability)

- ✓ přesnost uvnitř laboratoře během jednoho dne, intra - assay precision
- ✓ opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku
- ✓ nezávislé výsledky zkoušek se získají toutéž metodou, v téže laboratoři, týmž operátorem, za použití téhož vybavení během krátkého časového rozpětí

Výpočet výběrové směrodatné odchylky  $s_{(xi)}$

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

$x_i$  – měřená veličina

$n$  – počet měření

# Validace analytické metody

## **Analyt**

látka, která je subjektem měření (např. opiáty, konkrétně morfin)

## **Měřená veličina**

veličina, která je předmětem měření (např. obsah morfinu)

## **Princip měření**

vědecký základ měření (např. chromatografie)

# Validace analytické metody

## **Metoda měření**

logická sekvence operací, popsaných genericky, používaných při měření (např. stanovení morfinu pomocí GC/MS)

## **Měřicí postup**

soubor operací, popsaných specificky, používaných při měření podle určité metody v laboratořích: SOP, určitý analyt v určité matrici (stanovení morfinu GC/MS v séru)

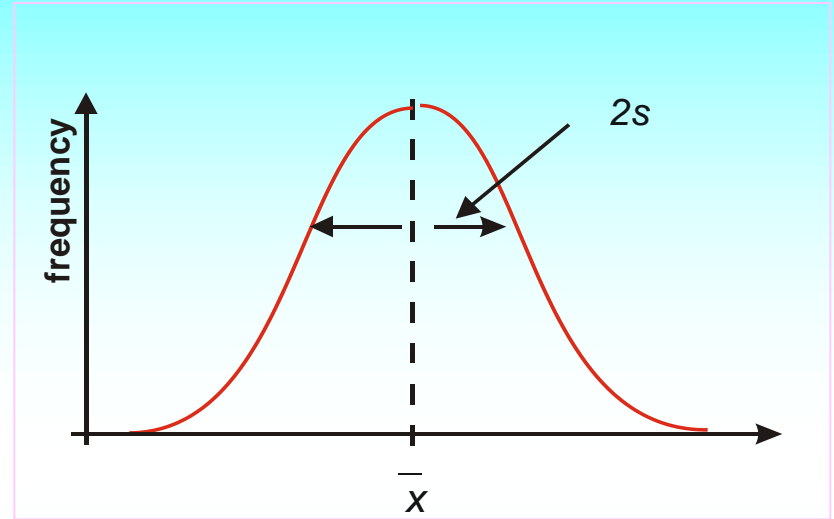


# Validace analytické metody

## Normální rozdělení (t rozdělení)

pro  $n$  hodnot  $x_i$

Průměr  $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$



(Výběrová) směrodatná odchylka

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Relativní směrodatná odchylka

$$RSD = \frac{s(x_i)}{\bar{x}}$$

# Validace analytické metody

## **Intermediate precision**

- ✓ měření se provádí v různé dny, různými analytiky za použití rozdílných pomůcek a přístrojů unvitř jedné laboratoře

## **Reprodukovatelnost**

- ✓ metoda se provádí na jednom zhomogenizovaném vzorku ale v různých laboratořích, různými analytiky, s různými činidly i přístroji
- ✓ má význam, předpokládá – li se použití metody v jiné laboratoři

Za přijatelné se považují hodnoty RSD do 15%.

Přesnost i bias se mohou značně měnit napříč kalibračním rozmezím, proto je nutné proměřit tyto parametry alespoň na třech koncentračních hladinách.

# Validace analytické metody

## **Linearita**

- ✓ posuzuje se závislost mezi koncentrací stanovované látky ve vzorku a odpovídající odezvou detektoru, ve které je analytický signál lineární funkcí koncentrace

## **Rozsah linearity**

- ✓ je interval mezi hladinami koncentrace stanovované látky, v němž je látka stanovena s takovou přesností, správností a linearitou, jak dokládají výsledky validace

## **Linearita analytické metody se dokládá**

- ✓ *graficky* jako závislost odezvy na koncentraci stanovované látky
- ✓ *matematicky* pomocí výsledků lineární regresní analýzy: uvádí se korelační koeficient  $R^2$ , směrnice  $k$ ,  $y$  – úsek  $q$  a chyby jejich stanovení ( $R^2$  je mírou linearity,  $k$  je mírou citlivosti a  $y$  - úsek mírou vedlejších vlivů)

# Validace analytické metody

## **Limit detekce (limit of detection) LOD**

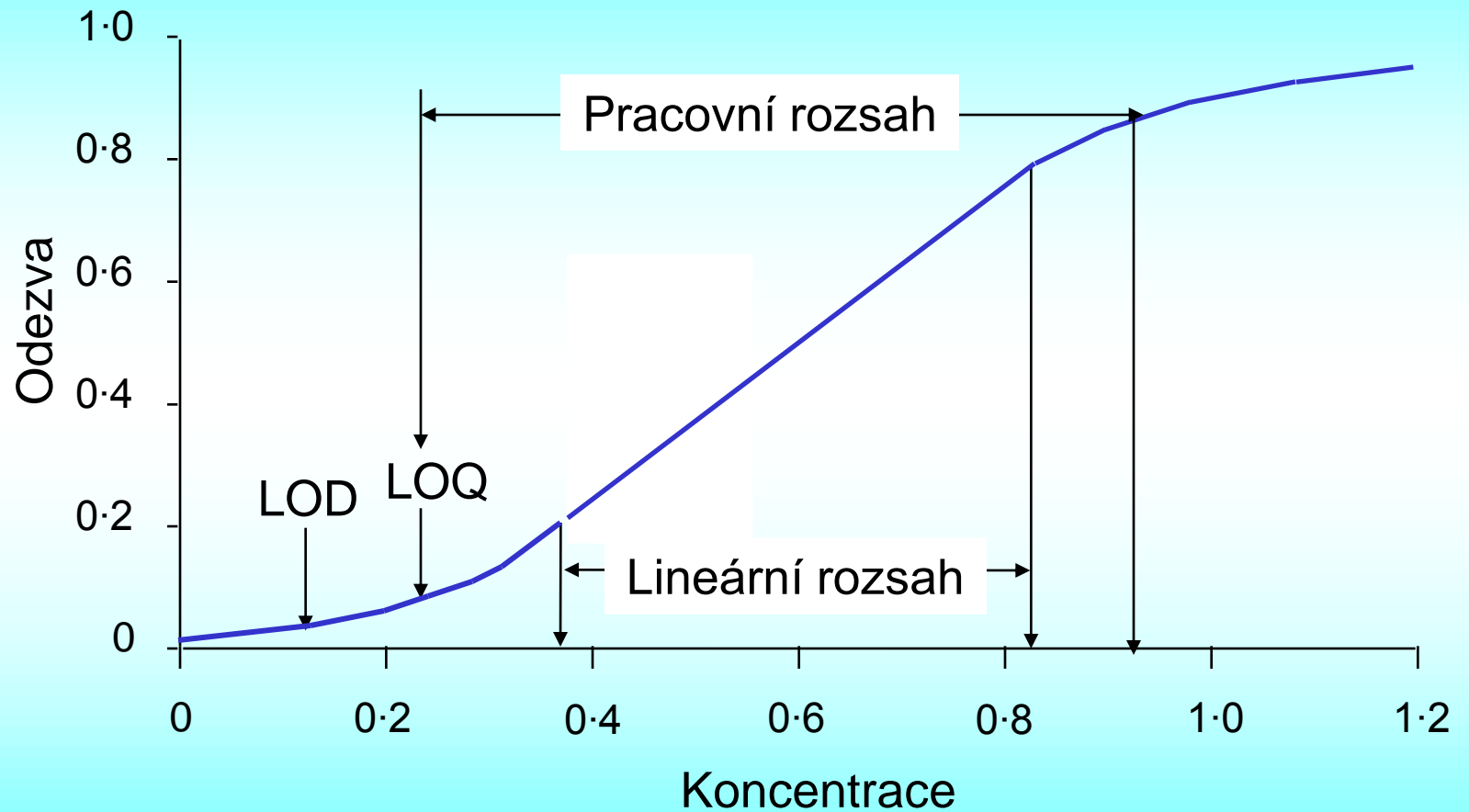
- ✓ je nejnižší spolehlivě detekovatelná koncentrace látky ve vzorku, která nemusí být stanovovaná kvantitativně
- ✓ je nejnižší výsledek měření pro daný analytický postup a analyt, který může být na dané hladině významnosti přijat za odlišný od hodnoty získané stejným analytickým postupem u materiálu, který daný analyt neobsahuje
- ✓ analytická metoda za definovaných experimentálních podmínek musí spolehlivě rozlišit analyt či analyty od pozadí matrice

# Validace analytické metody

## Limit kvantifikace (limit of quantification ) LOQ

- ✓ charakterizuje citlivost metody, je to nejnižší koncentrace látky, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností (RSD 15%)
- ✓ bývá shodný s dolní mezí (koncentrací) lineárního rozsahu kalibrace
- ✓ u instrumentálních chromatografických metod lze LOD a LOQ zjistit na základě *poměru signálu k šumu (S/N)*.
- jedná se o poměr mezi výškou píku sledovaného analytu (signál) a rozdílem nejvyššího a nejnižšího bodu na linii pozadí v okolí píku analytu (šum, noise).
- měření slepého vzorku (matrice bez sledované látky) vs. vzorek s analytem. Trojnásobek poměru výšky píku analytu (signál) k pozadí slepého vzorku v místě retenčního času  $R_t$  analytu (šum) odpovídá detekčnímu limitu (LOD,  $S/N \geq 3$ ) a desetinásobek kvantifikačnímu limitu (LOQ,  $S/N \geq 10$ )

# Validace analytické metody



# Validace analytické metody

## Výtěžnost (recovery)

- ✓ je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu a vzorku bez přídavku
- ✓ udává míru schopnosti měřicí metody (postupu) postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku
- ✓ je mírou účinnosti metody

$$R = \frac{C_{obs}}{C_{ref}}$$

$C_{obs}$  je nalezená koncentrace (nebo množství) analytu získaná aplikací měřicího postupu

$C_{ref}$  je hodnota CRM nebo hodnota daná “spikem” nebo změřená dohodnutou metodou

# Validace analytické metody

## **Robustnost (ruggedness)**

- ✓ je míra schopnosti metody stanovit správné a přesné výsledky také při malých změnách pracovních podmínek, ke kterým dochází i během rutinní analýzy při dodržování pracovního postupu
- ✓ znamená míru vlivu proměnných podmínek (lidský faktor, různé přístroje, šarže činidel, malé změny pH roztoků, stabilita vzorku v roztoku, výkyvy teploty, vliv výměny chromatografické kolony) na výsledky analýzy
- ✓ analytická metoda je robustní, není – li přesnost stanovení ovlivněna malými změnami pracovních podmínek



# Validace analytické metody

## **Revalidace**

analytické metody musí být provedena

- ✓ při každé úpravě analytického postupu
- ✓ při použití jiné matrice pro analýzu
- ✓ při modifikaci (např. při přenosu metody na jiné pracoviště)
- ✓ je nutná pro kontrolu, zda změna analytického postupu nebo modifikace metody nezpůsobila porušení dat validace obsažených v původní zprávě
- ✓ rozsah revalidace je dán povahou změn

# Validace analytické metody

Parametry důležité pro validaci analytických metod

	Kvalitativní analýza (průkaz)	Kvantitativní analýza (stanovení)
přesnost	ne	ano
správnost	ano	ano
linearita	ne	ano
selektivita	ano	ano
limit detekce	ano	ne
limit kvantifikace	ne	ano
robustnost	ano	ano

# Validace analytické metody

F. T. Peters, O. H. Drummer, F. Musshoff: Validation of new methods, FSI 2006

## Validace analytické toxikologické metody

<b>validační parametr</b>	<b>validační měření</b>	<b>hodnocení parametru</b>	<b>hodnocení kritéria</b>
<b>selektivita</b>	analýza 6, raději 10 –20 vzorků blanků, analýza 2 vzorků nulových kalibrátorů (blank + IS), analýza blankových vzorků spikovaných analyty očekávanými v reálných vzorcích, analýzy reálných vzorků bez analytů	kontrola interferujících signálů	absence interferujících signálů
<b>správnost (bias) a přesnost (směrodatná odchylka)</b>	QC vzorky při nízké, střední a vysoké koncentraci analytu relativně ke kalibračnímu rozsahu, analýza v dubletu po 8 dní	výpočet bias jako procentuální odchylky průměru vypočtené hodnoty z nominální hodnoty analytu, výpočet směrodatné odchylky pro analyt	bias 15% nominální hodnoty ( 20% v blízkosti LLOQ); přesnost 15% RSD ( 20% v blízkosti LLOQ)

# Validace analytické metody

## Validace analytické toxikologické metody

validační parametr	validační měření	hodnocení parametru	hodnocení kritéria
<b>kalibrace</b>	analýza kalibrátorů (blank + IS + analyt) 4 – 6 koncentračních hladin, analýza 5 - 6 kalibrátorů na určité koncentrační hladině	hodnocení lineárního modelu, hodnocení nelineárního modelu, výpočet korelačního koeficientu R, směrnice k, úseku q	potvrzení statistického modelu, využití dat získaných měřeními QC vzorků při stanovení správnosti a přesnosti
<b>limit detekce LOD</b>	analýzy spikovaných vzorků s klesající koncentrací analytu	kontrola dodržení identifikačního kritéria, hodnocení S/N	dodržení identifikačního kritéria, $S/N \geq 3$
<b>limit kvantifikace LLOQ</b>	analýzy QC vzorků pro koncentrace v blízkosti LLOQ nebo analýzy spikovaných vzorků se stoupající koncentrací analytu	využití hodnot správnosti a přesnosti získaných analýzou QC vzorků v blízkosti LLOQ, nebo hodnocením S/N ve spikovaných vzorcích	dodržení kritéria správnosti a přesnosti v blízkosti LLOQ, $S/N \geq 10$

# Validace analytické metody

## Validace analytické toxikologické metody

<b>validační parametr</b>	<b>validační měření</b>	<b>hodnocení parametru</b>	<b>hodnocení kritéria</b>
<b>výtěžnost</b>	extrakce 5 –6 spikovaných vzorků pro nízkou a vysokou koncentrační hladinu analytu, využití různých zdrojů matrice, analýza 5 –6 100% kontrol	výpočet výtěžnosti jako procenta odezvy analytu v extrahovaných a 100% kontrolních vzorcích, výpočet RSD	hodnocení výtěžnosti
<b>stabilita</b>	analýzy spikovaných vzorků pro nízkou a vysokou koncentrační hladinu analytu, opakování nástřiků analyzovaných vzorků v určitých časových intervalech	lineární regresní analýza odezvy vs. čas nástřiku	hodnocení stability
<b>uchování zamražením</b>	QC vzorky při nízkých a vysokých koncentracích, 6 opakování analýz před (kontrola) a po trojnásobném rozmražení a zamražení	výpočet průměrné koncentrace vzorků (kontrola) a po rozmražení a zamražení	hodnocení stability, průměrná koncentrace vzorků po zamražení v rozmezí 90 – 110% hodnoty kontrolních vzorků

# Nejistota měření

## Nejistota měření

- ✓ parametr přidružený výsledku měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, jež mohou být důvodně přisuzovány měřené veličině
- ✓ vymezuje hranice, v nichž je výsledek považován na určité hladině spolehlivosti za správný, přesný a pravdivý
- ✓ je podstatnou součástí každého výsledku měření
- ✓ prokazuje metrologickou **kvalitu** měření (nikoliv měření s nejmenší dosažitelnou nejistotou)
- ✓ zlepšuje poznání měřicího postupu
- ✓ umožňuje porovnávání výsledků
- ✓ je vyžadována v procesech akreditace
- ✓ u koncového uživatele poskytuje výsledku patřičnou důvěryhodnost

# Nejistota měření

**Chyba** zatěžuje každý výsledek měření, je to rozdíl mezi jednotlivým výsledkem a skutečnou hodnotou měřené veličiny

**Nejistota** je vždy spojena s výsledkem

$$\text{Výsledek} = \text{Hodnota} \pm \text{Nejistota}$$

$$20,7 \pm 2,5 \text{ ng/ml}$$

Hodnota je mezi 18,2 a 23,2 ng/ml

**Skutečná hodnota** (True value): hodnota odpovídající definici dané specifikované veličiny.

**Správnost měření** (Accuracy of measurement): těsnost shody mezi výsledkem měření a skutečnou (true) hodnotou (nebo přijatou referenční hodnotou).

**Standardní nejistota** (Standard uncertainty),  $u(x)$ : nejistota hodnoty veličiny vyjádřená jako směrodatná odchylka ( $k = 1$ )

# Nejistota měření

**Kombinovaná standardní nejistota** (Combined standard uncertainty),  $u(y)$ :

je rovna odhadu směrodatné odchylky tj. kladné hodnotě druhé odmocniny celkového rozptylu, získaného sloučením všech složek nejistoty s použitím zákona o šíření nejistot

**Rozšířená nejistota** (Expanded uncertainty),  $U(y)$ :

definuje interval hodnot v okolí výsledku měření, o kterém lze předpokládat, že se v něm nalézá hodnota měřené veličiny na vyšší hladině spolehlivosti. Získá se vynásobením standardní kombinované nejistoty  $u(y)$  koeficientem rozšíření  $k$



# Nejistota měření

**Koeficient rozšíření (pokrytí) (Coverage factor),  $k$ :**

číselný koeficient, jímž násobíme kombinovanou standardní nejistotu, abychom získali rozšířenou nejistotu

$$U(y) = k \cdot u(y)$$

$$R = y \pm U(y)$$

**Výsledek = Hodnota měřené veličiny  $\pm$  rozšířená nejistota**

# Nejistota měření

odhad nejistoty měření

zjistujeme skutečnou hodnotu měřené veličiny

$$\mathbf{R} = \hat{y} \pm \mathbf{U}(y)$$

**výsledek = odhad hodnoty měřené veličiny  $\pm$  rozšířená nejistota**

odhad nejistoty měření – pro kvalitu odhadu není určující způsob získání

- rozborem měřicího procesu po jednotlivých krocích
- rozborem zdola nahoru a konstrukcí bilance nejistot
- využitím celkových informací o výkonnosti metody např. z validace, regulačních diagramů a mezilaboratorních porovnávacích zkoušek

# Nejistota měření

Odhad nejistoty vyžaduje

- ✓ fundované pochopení významu nové veličiny
- ✓ detailní znalost analytického procesu
- ✓ schopnost používat chemometrické nástroje
- ✓ umět zvolit vhodnou metodiku výpočtu
- ✓ mít zkušenosti a informace pro posouzení reálnosti získané hodnoty nejistoty

# Nejistota měření

Odhad nejistoty měření – čtyři logicky na sebe navazující etapy:

**Specifikace** – jasné vymezení předmětu měření a jeho vazby na důležité parametry měření na kterých závisí

**Identifikace zdrojů nejistot** – vytvoření seznamu možných zdrojů nejistoty, obsahující všechny příspěvky nejistoty

**Vyhodnocení složek nejistoty** – převedení informací o jednotlivých složkách nejistoty do kvantitativní formy

**Výpočet kombinované a rozšířené nejistoty** – odráží vztah vstupních a ovlivňujících veličin k výsledku měření

# Nejistota měření

## Kombinovaná standardní nejistota

### a zákon propagace nejistot

a) pro nezávislé veličiny  $x_i$  :

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u(x_i)^2}$$

b) pro závislé veličiny  $x_i$  :

$$u(y) = \sqrt{\sum_{i=1}^N c_i^2 u(x_i)^2 + 2 \cdot \sum_{i=1}^{N-1} \sum_{j=i+1}^N c_i c_j u(x_i, x_j)}$$

$$c_i = \frac{\partial y}{\partial x_i}$$

$c_i$  jsou koeficienty selektivity měřené hodnoty  $y$  vzhledem k hodnotám jednotlivých vstupních veličin

# Nejistota měření

Pravidla pro výpočet kombinované standardní nejistoty.

Pravidlo 1: Aditivní model měření

$$y = k(x_1 + x_2 + x_3) \quad (k - \text{konstanta})$$

$$u(y) = k \cdot \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + u(x_3)^2}$$

Pravidlo 2: Multiplikativní model měření

$$y = k(x_1 \cdot x_2 \cdot x_3) \quad (k - \text{konstanta})$$

$$u(y) = y \cdot k \sqrt{\left(\frac{u(x_1)}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{u(x_2)}{x_2}\right)^2 + \left(\frac{u(x_3)}{x_3}\right)^2}$$

# Nejistota měření

## Nejistota měření v toxikologii

### Spolehlivost kvalitativních nálezů

- ✓ úplnost nálezů – nejistá vždy
- ✓ specifita metody, potvrzovací nezávislé analýzy, bezpečná identifikace nox
- ✓ nejistoty chemické identifikace u stopových nálezů, postupy validace kvalitativních metod v podstatě chybí
- ✓ opatření na eliminaci kontaminace přenosem ze vzorku do vzorku carry over potenciál metody, kontroly blank

### Správnost a přesnost kvantitativních nálezů

- ✓ přesnost zatížena obvyklými analytickými chybami - ředění apod.
- ✓ nejistoty ve správnosti naměřených hodnot
- ✓ problém dostupnosti certifikovaných referenčních substancí pro kalibrace
- ✓ nedostatek vhodných referenčních matric pro kalibrace spikované biologické tekutiny

# Nejistota měření

Doporučená literatura:

Sborníky technické harmonizace ÚNMZ. Nejistoty měření, přesnost měření, správnost měření a otázky spojené se vzájemnou porovnatelností výsledků měření a s prohlášením o shodě s technickými specifikacemi. Ludvík V. ÚNMZ 2005,

**[www.umnz.cz](http://www.umnz.cz)**

Doporučení pro určení odhadu nejistot výsledků měření klinických Testů v klinických laboratořích. Suchánek M., Friedecký B., Kratochvíla J., Budina M., Bartoš v. 2005, **[www.sekk.cz](http://www.sekk.cz)**

Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition 2000, EURACHEM/CITAC. Přeloženo jako Stanovení nejistoty analytického měření. Kvalimetrie 11, EURACHEM – ČR, Praha 2001 **[www.measurementuncertainty.org](http://www.measurementuncertainty.org)**