

EDITOR: **David Milde**

# **KVALIMETRIE**

## **23. Měření v chemii** **Stručný přehled metrologie v chemii**



**EURACHEM-ČR**

Řada příruček pro laboratoře



---

# KVALIMETRIE

Václav Červený, Eva Klokočnicková, Sylvie Kříženecká, David Milde,  
Alena Nižnanská, Zbyněk Plzák, Miloslav Suchánek, Jan Vilímc

## **23. Měření v chemii** **Stručný přehled metrologie v chemii**

---

Autorský kolektiv: RNDr. Václav Červený, Ph.D. (kapitola 2.2), Ing. Eva Klokočnicková (kapitola 2), Ing. Sylvie Kříženecká, Ph.D. (kapitola 5), doc. Ing. David Milde, Ph.D. (kapitoly 2.3, 5, 7 a 11), Ing. Alena Nižnanská (kapitola 9), doc. Ing. Zbyněk Plzák, CSc. (kapitoly 3, 4 a 6), prof. Ing. Miloslav Suchánek, CSc. (kapitoly 1 a 11), Ing. Jan Vilímeč (kapitoly 8 a 10)

Editor: David Milde

Poděkování za finanční podporu patří MŠMT v rámci projektu LTV17015 a ÚNMZ v rámci projektu PRM 2018 VII/6/18.

Vydal Eurachem-ČR, z.s., Pasteurova 3544/1, 400 01 Ústí nad Labem, jako 23. publikaci v řadě příruček KVALIMETRIE.

První vydání, Ústí nad Labem 2018

Copyright © Eurachem-ČR 2018

**ISBN 978-80-86322-11-7**

# OBSAH

1 Metrologická struktura ve světě a v ČR .....	1
1.1 Historie metrologie .....	1
1.2 Mezinárodní metrologická infrastruktura .....	1
1.3 Struktura metrologie v ČR .....	2
1.4 Soustava jednotek SI .....	3
1.5 Terminologie v metrologii .....	4
1.6 Zvláštnosti metrologie v chemii .....	5
2 Systémy managementu v analytické laboratoři, akreditace laboratoří .....	7
2.1 Akreditace laboratoří, Správná laboratorní praxe .....	7
2.2 Systém managementu v souladu se zásadami Správné výrobní praxe .....	10
2.3 Certifikace metodik .....	12
3 Metrologická návaznost .....	14
4 Referenční materiály .....	20
4.1 Úvod .....	20
4.2 Kritéria posuzování chemických referenčních materiálů .....	22
4.3 Použití referenčních materiálů v analytické laboratoři .....	23
4.3.1 Použití referenčních materiálů k hodnocení .....	25
4.3.2 Referenční materiály při přenosu hodnot .....	27
4.4 Metrologická návaznost výsledků měření .....	29
4.5 Přidělení hodnot dalším materiálům .....	29
4.6 Zacházení s referenčními materiály .....	30
4.7 Informace o dostupnosti referenčních materiálů .....	30
4.8 Vlastní příprava materiálů pro řízení kvality .....	31
4.9 Použití referenčních materiálů v laboratorní medicíně .....	32
5 Validace a verifikace postupů měření .....	34
5.1 Úvod .....	34
5.2 Výkonnostní charakteristiky .....	36
5.3 Rozsah validace .....	45
6 Přístroje a další vybavení analytické laboratoře .....	47
6.1 Úvod .....	47
6.2 Legální metrologie – stanovená měřidla a jejich ověřování .....	48
6.3 Kalibrace .....	49
6.4 Kvalifikace instrumentace .....	50
6.5 Metrologická konfirmace a management měření .....	52
6.6 Validace softwaru .....	53
7 Nejistota měření .....	55
7.1 Úvod .....	55
7.2 Principy ISO GUM pro vyjadřování nejistoty měření .....	57
7.2.1 Specifikace měřené veličiny .....	57
7.2.2 Identifikace zdrojů nejistoty .....	58
7.2.3 Kvantifikace složek nejistoty .....	59

7.2.4 Výpočet kombinované a rozšířené nejistoty .....	62
7.3 Příklady pro přístupy „zdola nahoru“ a „shora dolů“ .....	64
7.4 Uvádění nejistoty .....	69
7.5 Přezkum bilance nejistoty .....	69
7.6 Nejistota měření a posuzování shody .....	70
7.7 Cílová nejistota měření .....	72
8 Interní řízení kvality .....	74
8.1 Regulační diagramy .....	75
9 Mezilaboratorní porovnávání .....	78
9.1 Úvod.....	78
9.2 Definice.....	78
9.3 Zkoušení způsobilosti (externí hodnocení kvality).....	79
9.3.1 Druhy programů zkoušení způsobilosti.....	80
9.3.2 Účast ve zkoušení způsobilosti (PT).....	81
9.3.3 Využívání PT při akreditaci laboratoří.....	82
9.3.4 Požadavky na poskytovatele PT.....	83
9.3.5 Statistické vyhodnocování PT.....	83
9.3.6 Hodnocení výkonnosti.....	85
9.3.7 Kvalitativní programy zkoušení způsobilosti.....	88
9.3.8 Zkoušení způsobilosti v oblasti vzorkování .....	88
9.3.9 Zkoušení způsobilosti s malým počtem účastníků .....	89
10 Vzorkování .....	91
11 Vybrané aplikace statistiky.....	95
Distribuční funkce.....	95
Statistika opakovaných měření, náhodný výběr .....	96
Testování robustnosti .....	97
Kragtenův algoritmus .....	99
Testování hypotéz .....	101
Nejistota hodnoty odečtené z lineární kalibrace .....	103
Statistické základy Shewhartových regulačních diagramů.....	103

# 1 METROLOGICKÁ STRUKTURA VE SVĚTĚ A V ČR

Metrologie je věda o měření. Mezi hlavní úkoly metrologie patří definování všeobecně uznávaných veličin a jednotek měření, realizace jednotek měření s pomocí vědeckých metod a vytváření řetězců návaznosti od výsledků měření v laboratořích k etalonům jednotek měřených veličin. Metrologie tedy zahrnuje veškeré teoretické a praktické aspekty měření, jakékoliv nejistoty měření a obory použití.

## 1.1 Historie metrologie

Historie měření sahá až do starověkého Egypta ke stavitelům pyramid a opakovanému vyměřování polí po nilských záplavách. Poučný příklad realizace délkových a hmotnostních jednotek ve starém Egyptě je ukázán ve sbírkách Louvru.

Rovněž ve středověku byla snaha zavést do obchodní praxe jednotky hmotnosti, objemu a délky. Úsilí jednotlivých zemí ale nebylo koordinováno, každá země měla vlastní soustavu měř a vah. Důležitým mezníkem se stala Velká francouzská revoluce, kdy byl ve Francii zaveden metrický systém. Velký průmyslový rozvoj v 19. století vyžadoval jednotný systém měř a vah. V roce 1875 byl vytvořen Mezinárodní ústav pro váhy a míry a v roce 1960 byla vytvořena *Mezinárodní soustava jednotek SI* (fr. *Systeme International d'Unites*).

V Rakousku byl metrický systém zaveden v roce 1875. Po vzniku Československa v roce 1918 byl metrický systém přijat zákonem, v roce 1980 byla v ČSR přijata soustava SI.

## 1.2 Mezinárodní metrologická infrastruktura

V roce 1875 byla v Paříži podepsána smlouva o Metrické konvenci a založena vědecká instituce Mezinárodní úřad pro váhy a míry (Bureau International des Poids et Mesures, BIPM). Generální konference pro váhy a míry (CGPM) je tvořena zástupci vlád signatářských zemí a je nejvyšším orgánem v metrologické struktuře. CGPM projednává a posuzuje činnost BIPM a jednotlivých národních metrologických institutů a podává doporučení o všech otázkách týkajících se metrologie. CGPM volí 18 zástupců do Mezinárodního výboru pro váhy a míry (Comité International des Poids et Mesures, CIPM), který má dohled nad BIPM a připravuje odborná rozhodnutí pro CGPM. CIPM je podporován 10 poradními výbory. Jedním z deseti poradních výborů je Poradní výbor pro látkové množství: Metrologie v chemii a biologii (Consultative Committee for Amount of Substance: Metrology in Chemistry and Biology, CCQM). CCQM má 11 pracovních skupin, např. pro anorganickou a organickou analýzu, pro analýzu proteinů, pro analýzu plynů, pro redefinici základní jednotky „mol“. BIPM má v gesci mezinárodní výzkum fyzikálních jednotek a etalonů a řízení mezilaboratorních porovnání národních metrologických institutů a přidružených laboratoří.

Velice důležitým aktem bylo podepsání Ujednání CIPM o vzájemném uznávání (CIPM Mutual Recognition Arrangement, CIPM MRA) Českým metrologickým institutem v roce 1999. Tato úmluva se týká stanovení stupně ekvivalence státních etalonů a vzájemného uznávání výstupních dokladů o kalibracích a měřeních (certifikátů, kalibračních listů, kalibračních protokolů).

Do mezinárodní metrologické infrastruktury rovněž patří další instituce.

*Národní metrologické instituty* jsou zřízeny rozhodnutím státu a jsou určeny k uchování a vývoji státních etalonů některých veličin. *Přidružené instituty (laboratoře)* jsou pověřeny národními metrologickými instituty k spravování specifických státních etalonů a standardů měření. Národní metrologické instituty a přidružené laboratoře se mohou sdružovat v regionálních metrologických organizacích. Pro evropské státy je takovým sdružením EURAMET. Další mezinárodní metrologickou organizací je *Mezinárodní organizace pro legální metrologii* (International Organisation of Legal Metrology, OIML), jejímž posláním je harmonizace postupů legální metrologie.

### 1.3 Struktura metrologie v ČR

Mezi hlavní cíle metrologického systému patří:

- zajistit jednotnost a přesnost u všech celospolečensky důležitých měřidel a měření,
- zajistit mezinárodně uznávanou návaznost pro všechny obory měření,
- rozvíjet a udržovat české primární etalony v těch oblastech měření, kde je to ekonomicky výhodné nebo žádoucí z hlediska zapojení do mezinárodní spolupráce; využívat zahraniční etalony v oblastech, kde se jedná o méně frekventovanou potřebu nebo není reálné dosáhnout přiměřené úrovně,
- zabezpečit vysokou úroveň české metrologie na úseku státní metrologické kontroly měřidel, tvorby metrologických předpisů a certifikace pracovníků v metrologii,
- všestranně podporovat českou podnikatelskou sféru v oblasti výroby, montáže, oprav, dovozu a vývozu měřidel,
- zabezpečit výkon státní správy na úseku metrologie.

Do českého metrologického systému patří:

- Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví (ÚNMZ)
- Český metrologický institut (ČMI)
- Státní metrologická střediska (SMS)
- Střediska kalibrační služby (SKS)
- organizace provádějící úřední měření
- uživatelé, výrobci, opravárenské organizace, dovozci měřidel

## 1.4 Soustava jednotek SI

System je založen na definici sedmi základních jednotek:

**sekunda**, symbol s, jednotka času. Je definována numerickou hodnotou frekvence  $\Delta \nu_{\text{CS}} = 9\,192\,631\,770 \text{ Hz (s}^{-1}\text{)}$  odpovídající přechodu mezi dvěma hladinami velmi jemné struktury základního stavu atomu Cs 133,

**metr**, symbol m, jednotka délky. Je definována numerickou hodnotou rychlosti světla ve vakuu  $c = 299\,792\,458 \text{ m s}^{-1}$ , kde sekunda je definována pomocí frekvence  $\Delta \nu_{\text{CS}}$ . Jinými slovy, je to délka dráhy, kterou proběhne světlo ve vakuu za dobu  $1/299\,792\,458 \text{ s}$ ,

**kilogram**, symbol kg, jednotka hmotnosti. Rovná se hmotnosti mezinárodního prototypu kilogramu. V listopadu 2018 konference CGPM redefinovala kg tím, že definovala pevnou hodnotu Planckovy konstanty  $h = 6,626\,070 \cdot 10^{-34} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-1}$ , kde m a s jsou definovány v předchozích definicích,

**ampér**, symbol A, jednotka elektrického proudu. Je definována numerickou hodnotou elementárního náboje  $e = 1,602\,176\,634 \cdot 10^{-19} \text{ A}\cdot\text{s}$ , kde sekunda je definována pomocí frekvence  $\Delta \nu_{\text{CS}}$ . Dříve byl ampér definován jako stálý elektrický proud, který při průchodu dvěma přímými rovnoběžnými vodiči nekonečné délky a zanedbatelného průřezu, umístěnými ve vzdálenosti 1 m ve vakuu, vyvolá mezi nimi sílu  $2 \cdot 10^{-7} \text{ Newtonu}$  na 1 metr délky vodičů,

**kelvin**, symbol K, jednotka termodynamické teploty. Je definována fixní hodnotou Boltzmanovy konstanty  $k = 1,380\,649 \cdot 10^{-23} \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ , kde kilogram, metr a sekunda jsou definovány pomocí  $h$ ,  $c$  a  $\Delta \nu_{\text{CS}}$ . Dříve byl Kelvin definován jako  $1/273,16$  díl termodynamické teploty trojného bodu,

**mol**, symbol mol, jednotka látkového množství. Je definován numerickou hodnotou Avogadrovy konstanty  $N_{\text{A}} = 6,022\,140\,76 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ . 1 mol tedy obsahuje  $N_{\text{A}}$  entit (atomů, molekul, iontů nebo specifikovaných částic). Dříve byl mol definován jako látkové množství soustavy, která obsahuje tolik entit, kolik je atomů v 0,012 kg nuklidu uhlíku  $^{12}\text{C}$ ,

**kandela**, symbol cd, jednotka svítivosti v daném směru. Je to svítivost zdroje, který v daném směru emituje monochromatické záření o frekvenci  $540 \cdot 10^{12} \text{ Hz (s}^{-1}\text{)}$  a jehož zářivost v tomto směru je  $1/683 \text{ W/steradian}$ .  $\text{W} = \text{kg m}^2 \text{ s}^{-3}$ , kg, m a s jsou definovány výše.

## 1.5 Terminologie v metrologii

Uvedeme jen některé termíny, které jsou pro chemická měření nejdůležitější. Zdrojem definic je Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM 3), 2008 [1].

**Výsledek měření** je soubor hodnot veličiny přiřazený měřené veličině s jakoukoliv další dostupnou relevantní informací. Výsledek měření je obecně vyjádřen jako jedna naměřená hodnota veličiny a nejistota měření.

**Měření** je proces experimentálního získávání jedné nebo více hodnot veličiny, které mohou být důvodně přiřazeny veličině.

**Skutečná, pravá hodnota** (true value) je hodnota veličiny, která je ve shodě s definicí veličiny. Je to hodnota, která by mohla být získána dokonalým měřením. V chybovém přístupu je při popisu měření skutečná hodnota veličiny považována za jedinečnou a v praxi za nepoznatelnou. Nejistotovým přístupem se připouští, že následkem ve své podstatě neúplného množství podrobností v definici veličiny neexistuje jediná skutečná hodnota veličiny, ale spíše soubor skutečných hodnot veličin ve shodě s definicí. Tento soubor je z principu a v praxi nepoznatelný.

**Přesnost měření** (accuracy of measurement) je těsnost shody mezi naměřenou hodnotou veličiny a skutečnou hodnotou měřené veličiny. Je to kvalitativní míra, nikoliv kvantitativní. Přesnost měření je někdy chápána jako těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny, které jsou přiřazeny měřené veličině.

**Pravdivost měření** (measurement trueness) je těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny (střední hodnota základního souboru) a referenční hodnotou veličiny. Pravdivost měření je kvalitativní míra. Kvantitativní míra pravdivosti je **vychýlení** (bias).

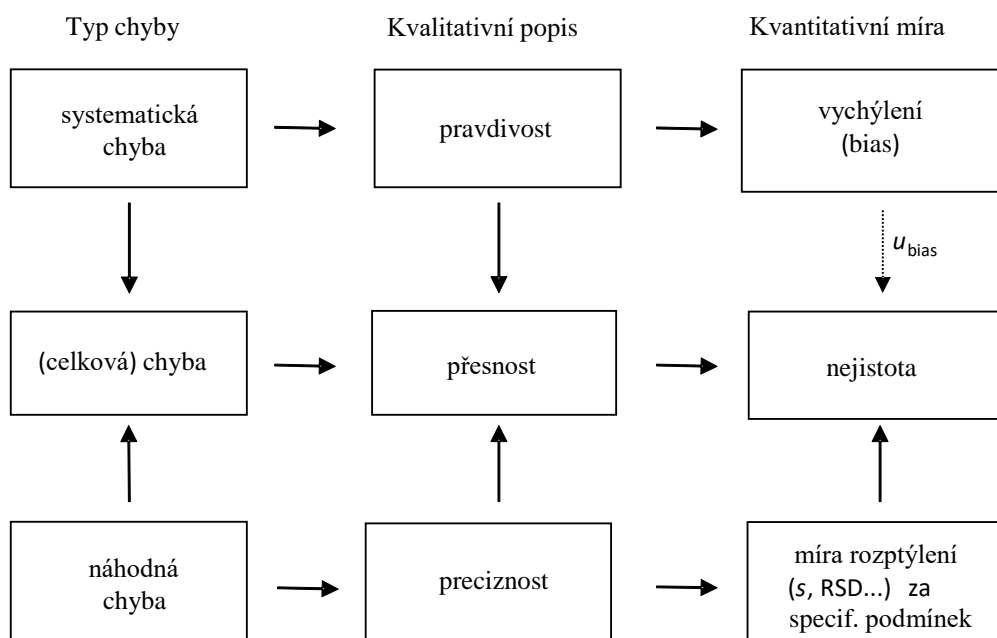
**Preciznost měření** (measurement precision) je těsnost shody mezi indikacemi nebo naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu nebo podobných objektech za specifikovaných podmínek. Preciznost měření je zpravidla vyjádřena číselně mírami nepřeciznosti, jako např. směrodatnou odchylkou, rozptylem nebo variačním koeficientem za specifikovaných podmínek měření. Preciznost měření je používána k definování **opakovatelnosti** měření, **mezilehlé preciznosti** a **reprodukovatelnosti** měření.

**Opakovatelnost** měření (measurement repeatability) je preciznost měření za souboru podmínek opakovatelnosti. Soubor podmínek opakovatelnosti zahrnuje stejný postup měření, stejný obslužný personál, stejný měřicí systém, stejné pracovní podmínky a stejné místo, a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v krátkém časovém úseku.

**Mezilehlá preciznost** měření (intermediate measurement precision) je preciznost měření za souboru podmínek mezilehlé preciznosti. Soubor podmínek zahrnuje stejný postup měření, stejné místo a opakování měření na stejném nebo podobných objektech v rozšířeném časovém úseku, ale smí obsahovat další podmínky zahrnující změny. Změny mohou zahrnovat nové kalibrace, kalibrátory, operátory a měřicí systémy.

**Reprodukovatelnost** měření (measurement reproducibility) je preciznost měření za souboru podmínek reprodukovatelnosti. Soubor podmínek zahrnuje různá místa, obslužný personál, měřicí systémy a opakování měření na stejném nebo podobných objektech. Různé měřicí systémy mohou používat různé měřicí postupy.

Znázornění souvislostí mezi některými základními koncepty používanými pro popis kvality výsledků měření je uvedeno na obrázku 1.1.



Obrázek 1.1 Znázornění souvislostí mezi některými základními termíny používanými pro popis kvality výsledků měření [2]. Vyhodnocování nejistoty podle GUM předpokládá provedení korekce na známé vychýlení (bias) a to, že nejistota korekce vychýlení  $u_{\text{bias}}$  se započítává do konečného vyjádření nejistoty. To je vyjádřeno čárkovanou šipkou pod rámečkem 'vychýlení'. Jak pojetí přesnosti, tak i nejistoty předpokládají, že měření se provádí podle dokumentovaného postupu a že vlivy 'hrubých chyb' nejsou započítávány.

## 1.6 Zvláštnosti metrologie v chemii

Vědecká metrologie se člení podle BIPM do 9 oborů.

Metrologie ve fyzice: Akustika, elektřina a magnetismus, ionizující záření a radioaktivita, délka, hmotnost, fotometrie a radiometrie, termometrie, čas a frekvence.

Metrologie v chemii (a biologii): Látkové množství.

Rozvoj biologických věd přinese v budoucnu i další obory.

Rozdíl mezi metrologií ve fyzikálních vědách a metrologií v chemických a biologických vědách je způsoben hlavně rozdílem v definici tzv. **měřené veličiny** (angl. measurand). Podle mezinárodního metrologického slovníku VIM3 je **měřená veličina** (measurand) veličinou, kterou máme měřit. Abychom zabránili jakékoliv nejasnosti, je třeba měřenou veličinu určit dostatečně podrobně. Měřená veličina se vždy vztahuje k určité veličině, u které se měřením přiřadí hodnota veličiny. V chemické a biochemické analýze definujeme ještě analyt, což je vlastně složka měřeného systému představovaná názvem měřitelné veličiny. Podívejme se na příklad veličin měřených v klinické chemii:

- látková koncentrace glukózy v plazmě,
- látková koncentrace glukózy v moči.

V obou případech představují tyto výroky různé měřené veličiny, přičemž analyt je stejný – glukóza. Z tohoto příkladu plyne, že přesné určení měřené veličiny je závislé na charakteru vzorku. Zároveň je zřejmé, že výsledek měření musí být vhodný pro zamýšlené použití (diagnóza?) a měřená veličina silně závisí na měřicím postupu. V našem případě jsou měřicí postupy pro stanovení glukózy v plasmě a moči rozdílné. V jiných případech může být měřená veličina definována pouze s odkazem na dohodnutý empirický postup měření (standardní metodou).

Z definice a charakteru měřené veličiny plynou i rozdíly mezi metrologií ve fyzikálních vědách a metrologií v chemických a biologických vědách. Ve fyzikálních vědách získáváme hodnoty měřených veličin většinou přímým měřením, přičemž výsledek je invariantní k charakteru vzorku. V chemických a biologických vědách získáváme hodnoty měřených veličin nepřímo a výsledek silně závisí na charakteru vzorku a na měřicím postupu.

#### **Literatura:**

1. TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
2. KVALIMETRIE 20. Vhodnost analytických metod pro daný účel. Pokyn EURACHEM, 2. vydání. EURACHEM-ČR, Praha 2015 (ISBN 978-80-86322-00-1).

## **2 SYSTÉMY MANAGEMENTU V ANALYTICKÉ LABORATOŘI, AKREDITACE LABORATOŘÍ**

Laboratoře, které poskytují analytická data, by měly mít zavedený systém managementu odpovídající mezinárodním normám, aby bylo umožněno všeobecné uznávání těchto výsledků. Systém managementu je soubor opatření, která mají za úkol zajistit dostatečnou efektivitu procesů zavedených v laboratoři a co nejvyšší kvalitu poskytovaných výsledků zkoušek. Systém managementu laboratoře je zaměřen na klíčová hlediska, která jsou rozhodující pro platnost výsledků, náklady a včasnost provedených analytických prací a zároveň zabraňují plýtvání energií na méně významné záležitosti. Je však potřeba podotknout, že systém managementu nezajistí, že 100 % analytických výsledků bude spolehlivých. Nezabrání hrubým chybám v laboratoři, měl by ale snížit jejich četnost výskytu na minimum. V laboratoři dochází také k náhodným nebo systematickým chybám, které pak mají vliv na velikost nejistoty výsledků daného analytického postupu. Mezinárodní normy používané po celém světě obsahují požadavky na systém managementu pro zkušební a kalibrační laboratoře (ISO/IEC 17025), pro zdravotnické laboratoře (ISO 15189), pro laboratoře provádějící testování chemikálií je dobře využitelný systém SLP (Správná laboratorní praxe).

### **2.1 Akreditace laboratoří, Správná laboratorní praxe**

Systém managementu zkušební/kalibrační laboratoře je popsán v normě ISO/IEC 17025, která byla vydána v nejnovější třetí revizi v roce 2017. V České republice vyšla tato norma počátkem roku 2018 jako ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 „Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří“ [1]. Norma byla vypracována Komisí ISO pro hodnocení shody (CASCO), v pořadí třetí vydání normy přináší oproti předchozímu vydání nový přístup k systému managementu laboratoře založený na zvažování rizik, přináší dále větší flexibilitu v požadavcích na procesy, postupy, dokumentované informace a organizační odpovědnost. Laboratoř je v této normě definována jako subjekt, který provádí jednu nebo více z následujících činností: zkoušení, kalibraci nebo vzorkování za účelem zkoušení nebo kalibrace.

Norma ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 obsahuje požadavky pro laboratoře, které jim umožní prokázat svou kompetenci a schopnost poskytovat platné výsledky. Laboratoře, které vykazují soulad s tímto dokumentem, pracují také obecně v souladu se zásadami ISO 9001 (ISO 9001 je všeobecná norma pro systémy managementu kvality, kterou lze použít ve všech organizacích bez ohledu na typ, velikost, druh výroby nebo poskytované služby). Norma ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 je použitelná pro všechny organizace provádějící laboratorní činnosti bez ohledu na počet pracovníků, velikost nebo náplň činnosti laboratoře. Norma může být využita laboratoří pro nastavení systému managementu (tzv. posouzení první stranou), dále zákazníky, regulačními orgány nebo jinými organizacemi k posouzení kompetence laboratoře (tzv. posouzení druhou stranou) a akreditačními orgány (tzv. posouzení třetí stranou) ke splnění požadavků pro udělení akreditace. Posuzovatelé jmenovaní akreditačním orgánem jsou zcela nezávislí na posuzovaném systému managementu.

Norma obsahuje tyto části:

- **obecné požadavky** (nestrannost, důvěrnost),
- **požadavky na strukturu**,
- **požadavky na zdroje** (pracovníci, prostory a podmínky prostředí, vybavení, metrologická návaznost, externě poskytované produkty a služby),
- **požadavky na proces** (přezkoumání poptávek, nabídek a smluv, výběr, verifikace a validace metod, vzorkování, zacházení se zkušebními a kalibračními položkami, technické záznamy, vyhodnocení nejistoty měření, zajištění platnosti výsledků, uvádění výsledků, stížnosti, neshodná práce, řízení dat a management informací,
- **požadavky na systém managementu** (dokumentace, řízení dokumentace systému managementu, řízení záznamů, opatření k zohlednění rizik a příležitostí, zlepšování, nápravná opatření, interní audity, přezkoumání systému managementu).

Norma obsahuje v příloze požadavky na metrologickou návaznost a na uvedeném obrázku příklad možného schématického znázornění provozních procesů v laboratoři.

Pro zdravotnické laboratoře, které zpracovávají vzorky pocházející z lidského těla za účelem získávání informací pro určení diagnózy, prevenci a léčbu nemocí člověka nebo pro hodnocení lidského zdraví je určena norma ČSN EN ISO 15189:2013 Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a způsobilost. Norma vychází z normy ISO/IEC 17025 a ISO 9001 a obsahuje specifické požadavky pro systém managementu těchto typů laboratoří. Norma je využitelná pro vývoj systému managementu zdravotnické laboratoře i pro orgány posuzující způsobilost těchto laboratoří. Norma obsahuje požadavky na management zdravotnické laboratoře a technické (odborné) požadavky týkající se pracovníků, prostorů laboratoří a jejich vybavení, procesů před laboratorním vyšetřením, procesů laboratorních vyšetření, zajištění kvality laboratorních vyšetření, procesů po laboratorním vyšetření, sdělování a uvolňování výsledků a řízení informací v laboratoři.

**Správná laboratorní praxe (SLP)** se zabývá organizací, procesy a podmínkami laboratorních studií k zajištění validity výsledků testování chemikálií. Správná laboratorní praxe se uplatňuje v oblasti vývoje a testování léčiv, pesticidů a dalších chemikálií, v oblasti kontroly potravinářských aditiv a testování látek s ohledem na nebezpečí exploze. V souladu se směnicemi 2004/9/ES a 2004/10/ES, které implementovaly zásady SLP OECD (Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/9/ES ze dne 11. února 2004, o inspekci a ověřování správné laboratorní praxe (SLP), a Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2004/10/ES ze dne 11. února 2004, o harmonizaci právních a správních předpisů týkajících se používání zásad Správné laboratorní praxe a ověřování jejich používání při zkouškách chemických látek), je v České republice vytvořen národní program monitorování shody se zásadami Správné laboratorní praxe (dále jen Národní program). Tento Národní program je založen na inspekcích testovacích zařízení a na auditech studií, které provádějí národní monitorovací orgány SLP (Státní ústav pro kontrolu léčiv a Národní inspekční orgán SLP, Středisko pro posuzování způsobilosti laboratoří ASLAB, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, veřejná výzkumná instituce, zřízený Ministerstvem životního prostředí ČR), a vytváří tak podmínky vzájemného uznávání výsledků studií mezi jednotlivými členskými státy EU/EHP a státy OECD.

Pro zákazníky laboratoře je důležitá informace, že laboratoře jsou k provádění požadovaných analýz dostatečně kompetentní. Z toho důvodu je potřeba, aby jejich kompetence byla nestranně posouzena a potvrzena. Toto potvrzení poskytují akreditační orgány, které jsou nestranné a nezávislé ve vztahu k laboratořím a jejich zákazníkům. Akreditační orgány pravidelně posuzují laboratoře z hlediska plnění požadavků příslušných norem a dalších souvisejících dokumentů. Cílem akreditace laboratoří je zajistit důsledné posuzování shody s mezinárodními normami ve prospěch veřejného zdraví, bezpečnosti, životního prostředí a prosperity a k podpoře regulátorů a koncových uživatelů. Přináší dále usnadnění národního a přeshraničního obchodu. Akreditace je v normě ČSN EN ISO 17011:2018 definována jako potvrzení vydané třetí stranou vztahující se k orgánu posuzování shody (např. laboratoře), které vyjadřují formální potvrzení jeho kompetence provádět specifické činnosti posuzování shody. Akreditací se rozumí oficiální uznání (reprezentované vydáním Osvědčení o akreditaci), že subjekt akreditace je způsobilý provádět specifické činnosti.

Pravomocným orgánem provádějící akreditace je v České republice **Český institut pro akreditaci, o.p.s.** (ČIA, [www.cai.cz](http://www.cai.cz)), který provádí nestranné posuzování orgánů posuzujících shodu (např. laboratoří). Na internetových stránkách Národního akreditačního orgánu ČIA lze najít všechny potřebné informace k získání akreditace laboratoře. Akreditační systém České republiky je soubor procesů, postupů a pravidel umožňující získat od příslušného autoritativního orgánu akreditaci – je upraven především nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 765/2008 ze dne 9. července 2008, kterým se stanoví požadavky na akreditaci a dozor nad trhem týkající se uvádění výrobků na trh a kterým se zrušuje nařízení (EHS) č. 339/93 ve znění opravy z 3. července 2015 a zákonem č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky, ve znění pozdějších předpisů (ZTPV). Národním akreditačním orgánem České republiky je Český institut pro akreditaci, o.p.s. (ČIA), a to na základě pověření Ministerstvem průmyslu a obchodu a notifikace u Evropské komise v souladu výše uvedenými právními předpisy. V akreditačním procesu má ČIA jako národní akreditační orgán postavení orgánu veřejné moci. Provádění akreditace a posuzování plnění akreditačních požadavků v jeho rámci se řídí ZTPV a zákonem č. 500/2004 Sb., správní řád, ve znění pozdějších předpisů (SŘ), a to formou správního řízení, nebo na základě veřejnoprávní smlouvy. Při akreditační činnosti je ČIA vázán kromě platné legislativy též závazky vyplývajícími z postavení ČIA jako člena Evropské organizace pro spolupráci v oblasti akreditace (EA) – orgánu uznaného Evropskou komisí, Mezinárodní spolupráce v oblasti akreditace laboratoří (ILAC), Mezinárodního akreditačního fóra (IAF) a také z uzavřených souvisejících multilaterálních dohod o vzájemném uznávání akreditace.

ČIA akredituje různé typy orgánů posuzování shody:

- Zkušební a kalibrační laboratoře (ČSN EN ISO/IEC 17025),
- Zdravotnické laboratoře (ČSN EN ISO 15189),
- Certifikační orgány pro certifikaci systémů managementu (ČSN EN ISO/IEC 17021-1),
- Certifikační orgány pro certifikaci osob (ČSN EN ISO/IEC 17024),
- Certifikační orgány pro certifikaci výrobků ČSN EN ISO/IEC 17065),
- Inspekční orgány (ČSN EN ISO/IEC 17020),
- Ověřovatele výkazů emisí skleníkových plynů,
- Poskytovatele zkoušení způsobilosti (ČSN EN ISO/IEC 17043) a

Výrobce referenčních materiálů (ČSN EN ISO 17034).

Pro laboratoře je významná akreditace poskytovatelů zkoušení způsobilosti dle ČSN EN ISO/IEC 17043 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti. Tato norma zajišťuje dostatečnou a srovnatelnou kvalitu výsledků zkoušení způsobilosti, které je jedním z významných požadavků na zajištění platnosti výsledků zkoušek laboratoří.

Norma ČSN EN ISO 17034 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na kompetenci výrobců referenčních materiálů uvádí odborné požadavky a požadavky na systém managementu výrobců referenčních materiálů pro zajištění kvality a spolehlivosti v laboratořích často využívaných referenčních materiálů. Obě naposledy jmenované mezinárodní normy jsou také uváděny v ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 v souvislosti se zkoušením způsobilosti nebo používáním referenčních materiálů v laboratořích.

V naší společnosti je zákazníky, včetně regulačních a jiných orgánů využívajících analytická data ke svému rozhodování, vyžadováno, aby zkušební laboratoře, které poskytují takové výsledky, byly akreditovány a splňovaly požadavky normy ČSN EN ISO/IEC 17025. Akreditace zkušebních laboratoří jakéhokoli typu je prováděna podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 a podle dokumentu MPA 10-01-18 Metodické pokyny pro akreditaci k aplikaci uvedené normy v akreditačním systému České republiky. Audit, který je prováděn v laboratořích za účelem získání Osvědčení o akreditaci, zahrnuje také posouzení laboratoře odbornými posuzovateli pro činnost, která má být předmětem akreditace. Odborní posuzovatelé, kteří posuzují metody zkoušení nebo kalibrací v laboratoři, sledují odbornou způsobilost laboratoře i systém zajištění platnosti výsledků, který zahrnuje povinně i účast v programech zkoušení způsobilosti laboratoří.

## 2.2 Systém managementu v souladu se zásadami Správné výrobní praxe

Pro výrobní závody a laboratoře kontrolující farmaceutickou výrobu je povinný systém managementu v souladu se zásadami **Správné výrobní praxe (SVP)**, anglicky Good Manufacturing Practice (GMP). Výrobce léčivých přípravků je podle zákona o léčivech č. 378/2007 Sb. povinen dodržovat pravidla správné výrobní praxe určená vyhláškou č. 229/2008 Sb., kterou se stanoví správná výrobní praxe, správná distribuční praxe a bližší podmínky povolování výroby a distribuce léčiv a další náležitosti upřesněné pokyny **Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL)**. Aktuální příslušné pokyny (mající zkratku **VYR** a číslo) i seznam povolených výrobců farmaceutik a kvalifikovaných laboratoří lze dohledat na webových stránkách [www.sukl.cz](http://www.sukl.cz) v sekci výroba léčiv. Kromě specifik trhu s léčivými přípravky v ČR odrážejí tyto pokyny především nařízení evropské komise (EC) a dalších orgánů Evropské unie (EU) č. 2003/94/EC (2003), (EU)2017/1569 (2017) a (EU)2017/1572 (2017) pro přípravky humánní medicíny a 91/412/EEC (1991) pro veterinární léčiva. Z direktivy EU také vychází norma ČSN EN ISO 22716:2008 Kosmetika - správná výrobní praxe (SVP) - Směrnice pro správnou výrobní praxi. Zásadami správné výrobní praxe se musí řídit také analytické laboratoře, které jsou buď interní (výrobní závod má vlastní laboratoř řízení kvality (QC z angl.

Quality Control), nebo externí (laboratoř pracuje na základě objednávky výrobce léčiva nebo kontrolního orgánu). Oba přístupy je možné kombinovat a u externí laboratoře objednat vybrané analýzy namísto pořízení drahé instrumentální techniky (např. NMR – nukleární magnetická rezonance). **SÚKL vydává certifikát správné výrobní praxe i povolení k činnosti takové kontrolní laboratoře.**

Na rozdíl od správné laboratorní praxe (SLP), jejímž cílem je minimalizace zdravotních rizik jednotlivých chemických látek a posuzování možného nebezpečí těchto látek samotných, jsou správná výrobní praxe a správná distribuční praxe zaměřeny na **ochranu spotřebitele**. Jejich cílem je **minimalizovat riziko**, že se k pacientovi (zákazníkovi nebo obecně na trh) dostane **lék nevyhovující kvality** nebo takový, který **není vhodný pro zamýšlené použití**.

SVP i SLP jsou právně závazné nejen v ČR a EU, ale i jinde ve světě. Například pro vývoz do Spojených států amerických (USA) je třeba dodržovat pravidla GMP sepsaná v dokumentu CFR 21 a vydaná americkým úřadem pro potraviny a léčiva Food and Drug Administration (FDA). Proto FDA audituje i do USA exportující české výrobce farmaceutik a jimi využívané laboratoře.

**SVP je tedy definována jako soubor požadovaných přísných pravidel a nařízení zabezpečujících výrobu a kontrolu léčiv**, včetně výroby a kontroly nakupovaných surovin při příjmu; výroby meziproductů, účinných látek a konečných léčivých produktů (tj. definovaných směsí různých chemických individuí), jejich testování, skladování, příjem, propouštění atd. Při aplikaci SVP by se tedy **nemělo** stát, že:

- a) **Léčivý přípravek neodpovídá specifikaci** před datem expirace, pokud byl skladován předepsaným způsobem. Specifikace je podrobný popis jeho vlastností a zahrnuje vzhled (barvu, tvar, konzistenci, ...), obsah účinné látky (včetně možné tolerance např. maximálního i minimálního obsahu účinné látky), maximální povolené množství nečistot (vedlejších produktů výroby, produktů rozpadu a jiných nečistot), obsah vody, hodnotu pevnosti tablet, dobu jejich rozpadu atd. Pokud by byl obsah účinné látky (API z angl. Active Pharmaceutical Ingredient) v léčivu menší, nemuselo by být dostatečně účinné pro vyléčení pacienta, zatímco naopak vyšší obsah API by mohl způsobovat nežádoucí účinky.
- b) Současná interakce účinné látky a pomocných látek v daném léčivém přípravku způsobuje zesílený nebo zeslabený účinek nebo nežádoucí účinky ve větším procentu případů, než je popsáno v příbalové informaci, což bylo u originálních přípravků zjištěno na základě neklinického testování v laboratoři i klinické studie, u tzv. generických (napodobujících) přípravků bývá klinické testování menšího rozsahu u tzv. bioekvivalenční studii.

SVP tedy systematicky kontroluje kvalitu především farmaceutické výroby včetně jejich dílčích kroků, a také stabilitu vyrobeného léčivého přípravku. **Validované** musí být **výrobní procesy**, výrobní i analytická **zařízení**, všechny používané **softwary a počítačové systémy** pro sběr a zpracování dat (např. LIMS), atd.; validovány musí být také **postupy analýzy**, které musí být dostatečně selektivní a přesné (tj. poskytují pravdivé a zároveň reprodukovatelné výsledky) a jejich parametry (např. mez detekce, linearita, pracovní koncentrační rozsah, robustnost a citlivost) jsou dostatečně známy a ustáleny (řízeny). Pro všechny běžně prováděné činnosti musí existovat **standardní**

**pracovní postupy (SOP z angl. Standard Operation Procedure).** SVP klade **velký důraz na dokumentaci** všeho, co souvisí s výrobou a testováním, tedy i provedených analýz včetně uchování referenčních vzorků nejméně jeden rok po skončení expirace produktů výroby.

Právně závazné zásady SVP však opět nikdy neříkají, jakým konkrétním způsobem se má provádět určitá činnost. To je pak cílem různých doporučení (angl. Guideline) např. od Mezinárodní konference pro harmonizaci (ICH), která se snaží sjednocovat pravidla pro různé trhy a regiony. Ačkoli tato doporučení [<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guidelines.html>] právně závazná nejsou, jejich dodržování je při auditech víceméně vyžadováno.

## 2.3 Certifikace metodik

Jedním z možných výsledků výzkumu a vývoje podporovaného grantovými prostředky je tzv. certifikovaná metodika. Jedná se o výsledek, kdy autor výsledku vypracuje metodiku (nutnou podmínkou je originalita postupů), která byla příslušným orgánem státní správy nebo příslušným odborným certifikačním (akreditačním) orgánem schválena a doporučena pro využití v praxi. Pojem **certifikovaná metodika** je zaveden Metodikou hodnocení výsledků výzkumu, vývoje a inovací jako jeden z výsledků výzkumu, experimentálního vývoje a inovací od roku 2008. Od roku 2010 je stanoveno, že certifikace má být udělena poskytovatelem na základě vypracování dvou nezávislých oponentních posudků. Certifikovat metodiky je účelné zejména v případech, kdy je možné je užít jako oficiální postup doporučený kompetentním orgánem, např. pro stanovení obsahu určité látky, výskytu škodlivých organismů, určení bezpečnostních rizik, prokazování fyzikálních vlastností látek/materiálů nebo např. pro oblast péče o kulturní dědictví, obrany a bezpečnosti (ale i v jiných oblastech). Každý, kdo užije certifikovanou metodiku, by měl mít jistotu, že při jejím dodržení budou získané výsledky průkazné a opakovatelné a že konkrétní postup je regulován nebo doporučován státem a jeho orgány, případně mezinárodními úmluvami [2].

Národní akreditační orgán (Český institut pro akreditaci, o.p.s.) na svých webových stránkách uvádí v odpovědi na otázku „*Poskytuje ČIA certifikaci metodik, které jsou výstupem aplikovaného výzkumu?*“ následující odpověď: „*ČIA neprovádí žádnou certifikaci, tudíž ani certifikaci metodik, které mohou být výstupy aplikovaného výzkumu, a ani neudělil akreditaci žádnému certifikačnímu orgánu pro tyto účely. Způsob udělení certifikace metodiky je v pravomoci poskytovatele účelové podpory (ministerstva a Technologická agentura ČR).*“ [3].

Způsob udělení certifikace metodiky je v pravomoci poskytovatele účelové podpory. Například Národní agentura pro zemědělský výzkum, Odbor vědy, výzkumu a vzdělávání je oprávněným orgánem pro uznávání výsledků certifikovaných metodik, podporovaných i z jiných zdrojů než z projektů Ministerstva zemědělství, např. Technologické agentury ČR. Podrobnosti lze nalézt na webových stránkách [www.eagri.cz](http://www.eagri.cz) [4].

Certifikované metodiky jsou příslušným orgánem státní správy schváleny a doporučeny k využití v praxi. Certifikované metodiky by tak měly být využity v praxi k zamýšlenému účelu jako celek a vždy s uvedením autora/autorů a vlastníka.

#### **Literatura:**

1. ČSN EN ISO/IEC 17025:2018. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří.
2. Doporučení Rady pro výzkum, vývoj a inovace k certifikaci metodik. Dostupné online na <http://www.vyzkum.cz>.
3. Zdroj online, 31.8.2018: [<http://www.cia.cz/cape-dotazy/certifikace-metodik.aspx>].
4. Zdroj online, 31.8.2018: [<http://eagri.cz/public/web/mze/poradenstvi-a-vyzkum/vyzkum-a-vyvoj/narodni-agentura-pro-zemedelsky-vyzkum/uznani-vysledku/vysledek-typu-nmet/>].

### 3 METROLOGICKÁ NÁVAZNOST

Kvalitní výsledky analýz by měly být nezávislé na čase a místě, kde byly získány, tedy měly by být porovnatelné v mezích svých nejistot. U chemických měření přístup k zajištění tohoto požadavku prodělal v poslední době vývoj, který od standardizace postupů měření dospěl k přijetí koncepce návaznosti měření, která byla po několika tisíciletí používána v oblasti přímých fyzikálních měření délky a hmotnosti a která se technicky v poslední době dále zdokonalovala a rozšířila i na další veličiny. Podstatou měření je porovnávání, a tak je logické, že porovnávání s mezinárodně uznávanými referencemi – etalony přineslo srovnatelnost měření, která v oblasti fyzikálních měření nyní uspokojivě funguje na celosvětové úrovni.

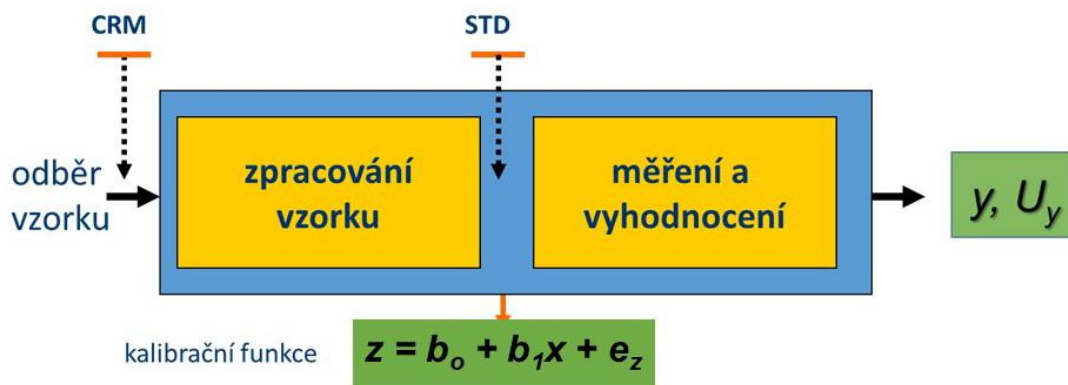
V současné době definujeme metrologickou návaznost jako: *vlastnost výsledku měření, pomocí níž může být výsledek vztažen ke stanovené referenci přes dokumentovaný nepřerušovaný řetězec kalibrací, z nichž každá se podílí svým příspěvkem na stanovené nejistotě měření* [1].

Pro tuto definici může být „stanovenou referencí“ definice měřicí jednotky prostřednictvím její praktické realizace nebo postup měření zahrnující měřicí jednotku. Pro fyzikální měření představuje praktickou realizaci stanovené reference systém mezinárodních a národních etalonů (standardů), pro chemii a laboratorní medicínu především certifikované referenční materiály.

Je nutno zdůraznit, že se jedná o vlastnost výsledku měření. Můžeme se totiž setkat s chybným slovním spojením návaznost měřidla (ev. návaznost laboratoře ev. i metody), historicky pocházejícím z návaznosti přímých fyzikálních měření, kde kalibrace měřícího prostředku – měřidla byla jediným a postačujícím nástrojem, jak zajistit metrologickou návaznost. Toto za současného pojetí návaznosti chybné spojení obsahuje i staré znění zákona o metrologii, který prochází v současnosti novelizací.

Co jsou stanovené reference? V ideálním případě by měly být referencemi hodnoty národních a mezinárodních standardů (etalonů), vyjádřené v jednotkách SI. U chemických měření hrají stěžejní úlohu certifikované referenční materiály jako stanovené, mezinárodně uznávané reference. Návaznost je realizována prostřednictvím řetězce kalibrací. U teploty, hmotnosti, času a mnoha jiných fyzikálních veličin si lze uskutečnění metrologické návaznosti výsledku měření řetězcem kalibrací k národním a posléze i mezinárodním etalonům dobře představit a poměrně snadno zajistit.

V chemii má většina analýz – chemických měření – charakter nepřímých měření sestávajících zpravidla ze dvou kroků: zpracování vzorku a vlastního měření, často instrumentálního charakteru a často elektrických veličin. Toto měření, někdy pracovně nazývané analytická koncovka, zpracovává a ke kalibraci používá vzorky, které se diametrálně liší od vzorků dodaných do laboratoře. Proces znázorňuje obrázek 3.1.



Obrázek 3.1 Dvě etapy chemického měřicího procesu ( $x$  – měřená veličina, CRM – certifikovaný referenční materiál, STD – kalibrační standard – kalibrátor pro analytickou kalibraci pro získání lineární kalibrační funkce  $z$  s chybou  $e_z$ ,  $y$  – odhad hodnoty měřené veličiny,  $U_y$  – odhad její rozšířené nejistoty).

Je tedy třeba zpracovat **model měření**, kvantitativně ho popsat **rovnici měření** – tedy výrazem (3.1) jak se bude konečný výsledek  $y$  (např. koncentrace analytu A v odpadní vodě v  $\text{mg kg}^{-1}$ ) počítat ze vstupních veličin  $x_1$  až  $x_m$ , kterými jsou např. navážka, ředění, hodnoty absorbance, plochy píků apod. Rovnice ovšem platí jen za podmínek dodržení parametrů  $x_{m+1}$  až  $x_n$ , kterými jsou např. teplota a doba rozkladu vzorku, doba a podmínky extrakce stanovované složky ze vzorku apod., které je třeba mít pod kontrolou.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_m) \Big|_{x_{m+1}, x_{m+2}, \dots, x_n} \quad (3.1)$$

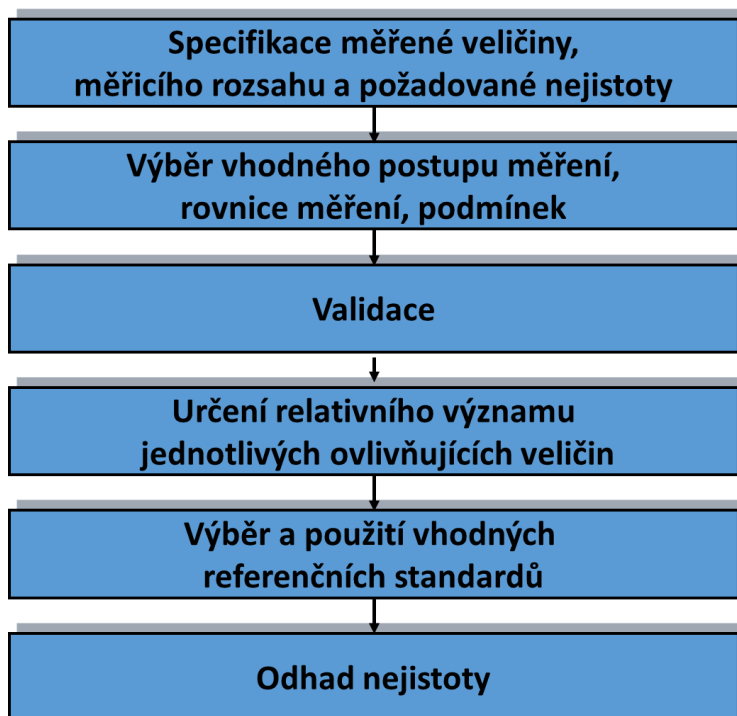
K tomuto základnímu rozdílu mezi přímými fyzikálními měřeními a chemickými měřeními a obtížemi z toho vyplývajících přispívají při zajišťování metrologické návaznosti další specifika chemických měření:

- **diverzita chemických měření.** Zatímco počet typů fyzikálních měření nepřesahuje počet základních a odvozených veličin, počet chemických měřicích systémů je prakticky nekonečný a je úměrný počtu chemických individuů násobenému počtem možných matic. Měření v chemii jsou silně závislá na matici vzorku – stanovení Cd v mléce a Cd ve slitině představují dva zcela odlišné systémy měření.
- **nestabilita materiálů** neumožňuje připravit referenční standardy – mezi příklady lze uvést dioxiny v kouři, ozón v atmosféře, biochemická měření.
- **roli stanovených referencí - etalonů ztělesňují referenční materiály**, ty jsou však speciálním zbožím, které si laboratoře kupují, na rozdíl od péče státu o etalony fyzikálních měření, na jejichž realizaci a údržbu podle zákona stát vynakládá nemalé finanční prostředky.

To vede k tomu, že potřeba standardů (etalonů) je tudíž nasycena z 5-10 % v chemii a 1 % v biologii ve srovnání s 80-90 % u fyzikálních měření.

Kromě základních tří uvedených specifík chemických měření existují v porovnání s fyzikálními měřeními při zajišťování návaznosti i další rozdíly:

- **návaznost k SI jednotce látkového množství molu nejde z principu realizovat** – například u stanovení pH, zákalu, u všech měřených veličin definovaných postupem – kovy loužitelné lučavkou královskou, u mnoha stanovení ve zdravotnických laboratořích.
- **vzorkování, zpracování vzorků** má v oblasti fyzikálních měření na rozdíl od chemických měření malý význam a malý vliv.
- **kalibrační standardy** nejsou používány v chemii jen ke kalibraci instrumentace, ale též ke kalibraci pro celkové vyhodnocení. Analytická kalibrace prováděná nebo ověřovaná denně u fyzikálních měření neexistuje. Např. u stanovení látky UV spektrofotometrem se ke kalibraci přístroje používá holmiový filtr – standard vlnové délky, který nemá nic společného s analyzovaným vzorkem a dále se konstruuje analytická kalibrační křivka za pomoci standardních roztoků se zvyšující se koncentrací analytu.
- **mezilaboratorní experiment** hraje důležitější roli u chemických a biologických měření.
- **kvalitativní analýza** není uplatňována v oblasti fyzikálních měření.
- **charakter chyb** – převažují náhodné chyby, a systematické chyby lze těžko odhalit, to se takřka neodráží v pojetí ISO GUM pro odhad nejistot měření.



Obrázek 3.2 Postup při zajištění návaznosti chemických měření

Obecný přístup k zajištění návaznosti chemických měření znázorňuje postupový graf na obrázku 3.2. Obrázek ukazuje, že u komplexních analytických měřicích procesů hraje validace stěžejní roli. Validace měřicího postupu prokazuje, že postup (soubor podmínek používaných v laboratoři) byl v daném čase vhodný pro daný účel a že byly identifikovány všechny významné vlivy a jejich relativní význam. Prověří, zda

konkretizovaná rovnice měření, uvedená v obecném výrazu (3.1), je adekvátní za použitých podmínek. Kalibrace rozhodujícího vybavení kompletuje řetězce metrologické návaznosti. Nejistota měření se pak odhadne z validace metody a návaznosti. Řízení kvality (interní a externí) zajistí, že výsledky měření (včetně nejistoty) budou stejné kvality, jako byly v době validace.

Pokud tedy validace měřicího postupu pomocí vhodných testů prověří, že odhad hodnoty měřené veličiny  $y$  lze získat pomocí konkretizovaného výrazu (3.1), kde  $y$  se vypočítá z  $x_1$  až  $x_m$  za použití vztahu  $f$ , který platí za podmínek specifikovaných pomocí  $x_{m+1}$  až  $x_n$ , pak  $y$  prokazuje návaznost k  $x_1$  až  $x_m$ . Vše, co je nutné pro prokázání návaznosti výsledku měření, je prokázat návaznost  $x_1$  až  $x_m$  k vhodným referencím: tyto reference vhodně zvolit a prokázat, že všechny hodnoty vstupních veličin  $x_1$  až  $x_m$  mají sami o sobě návaznost nebo jsou definovaných hodnot. V praxi postačuje zajistit, že hodnoty  $x_1$  až  $x_m$  jsou pod dostatečnou kontrolou, aby poskytovaly požadovanou nejistotu  $Uy$ . Pro kritické veličiny to vyžaduje kalibraci s návazností k zvoleným referenčním hodnotám. Pro méně kritické veličiny může být odpovídající i méně náročná kontrola. Stejně požadavky platí i pro parametry podmínek  $x_{m+1}$  až  $x_n$  podle míry, se kterou ovlivňují nejistotu výsledku.

### **Příklad:**

Praktický příklad zajištění návaznosti výsledku stanovení rtuti ve vzorku tuňáka podrobně popisuje Metodický list EURACHEM-ČR č. 13 [2]. Uvedeme hlavní rysy tam popsaného postupu.

- Stanovení rtuti ve vzorku tuňáka (jako hmotnostní zlomek) poskytlo výsledek  $4,03 \pm 0,11 \text{ mg kg}^{-1}$ . Výsledek se uvádí jako celková Hg v sušině (sušeno na  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ , 12 h, stanoveno na jiném podílu vzorku) a nejistota měření se uvádí na 95% konfidenční úrovni ( $k=2$ ).
- Rtuť byla stanovována na rtuťovém analyzátoru (AAS, technika studených par) po mikrovlnném rozkladu. Vzorky byly navažovány na vahách s kalibračním listem, který deklaruje vazbu udávané hmotnosti k jednotce SI kg. Mineralizát byl naředěn do odměrné baňky, u níž výrobce uvádí návaznost objemu baňky k národnímu etalonu (standardu).
- Kalibrační křivka byla vytvořena za použití CRM (certifikovaného referenčního materiálu) – standardu rtuti s certifikátem udávajícím hodnotu veličiny  $0,998 \pm 0,005 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $k=2$ ) s návazností k čisté rtuti.
- Metoda byla validována za použití vhodného matricového CRM s celkovou koncentrací rtuti rovnou  $1,97 \pm 0,04 \text{ mg kg}^{-1}$  ( $k=2$ ). Taková validace je ověřením výkonnosti metody.

Dokumenty, které potřebuje laboratoř pro prokázání návaznosti výsledku měření rtuti, jsou následující:

1. koncentrace roztoku Hg – certifikát roztoku CRM,
2. hmotnost vzorku – kalibrační list vah,
3. objem odměrné baňky – kalibrační list od výrobce nebo dodavatele,
4. teplota sušení – kalibrace sušárny,
5. podmínky rozkladu – kontrola podle specifikace,

6. doba sušení – běžné hodinky nebo stopky.

Položka 1 si vyžaduje zvláštní pozornost pro zajištění kvality a návaznosti kalibračního standardu. Návaznost u položek 2, 3 a 6 se snadno dosáhne s postačující nejistotou za použití komerčního vybavení. Položky 4 a 5 vyžadují od laboratoře dodatečnou pozornost.

Pro validaci postupu měření je použití matricového CRM zásadní, ale není součástí návaznosti, protože CRM se nepoužívá pro kalibraci. Pokud by se takový CRM použil pro korekci výtěžnosti, mělo by to tvořit součást návaznosti. Nejistota spojená s tímto matricovým CRM pak bude však možná muset být součástí bilance nejistoty.

Další dva příklady uvádí podrobně příručka EURACHEM/CITAC, jejíž překlad je součástí KVALIMETRIE 14 [3], v ní lze nalézt i podrobnější pojednání o problematice návaznosti chemických měření. Způsobu zajištění a prokazování metrologické návaznosti výsledků se věnuje, včetně informativní přílohy, i nová verze normy ISO/IEC 17025 [4].

#### **Shrnutí:**

- Metrologická návaznost je klíčovým prvkem moderních systémů zabezpečování kvality a vzájemného uznávání výsledků i u chemických měření. Návaznost je nástrojem standardizace měření s cílem minimalizace vychýlení měření a srovnatelnosti výsledků stejného druhu měření v různých laboratořích bez závislosti na čase a místě analýzy.
- Návazné jsou jenom takové výsledky, které jsou „ukotveny“ ke společnému základu, přednostně mezinárodně uznávanému.
- Návaznost je vlastnost výsledku měření a vztahuje se k uvedeným referencím na udané úrovni nejistoty. Validace měřicího postupu je často nejdůležitějším krokem k zajištění návaznosti.
- Kalibrační standardy jsou důležité u fyzikálních měření, u chemických nejsou dostatečným prostředkem zajištění návaznosti vzhledem ke komplexnímu charakteru měřicího procesu zahrnujícího i zpracování vzorků.
- Při akreditacích laboratoří se vyžaduje, aby laboratoř stanovovala a udržovala metrologickou návaznost výsledků svých měření pomocí dokumentovaného nepřerušovaného řetězce kalibrací, z nichž každá přispívá k nejistotě měření a vztahuje se k příslušné referenci [4].

#### **Literatura:**

1. TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
2. Metodický list 13 - Eurachem Leaflet: Metrologická návaznost analytických výsledků (český překlad) EURACHEM-ČR 2014, <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>.

3. KVALIMETRIE 14. Návaznost chemických měření. Průvodce k dosažení srovnatelných výsledků chemických měření. Pokyn EURACHEM/CITAC. EURACHEM-ČR, Praha 2004 (ISBN 80-86322-02-5).
4. ČSN EN ISO/IEC 17025:2018. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří.

## 4 REFERENČNÍ MATERIÁLY

### 4.1 Úvod

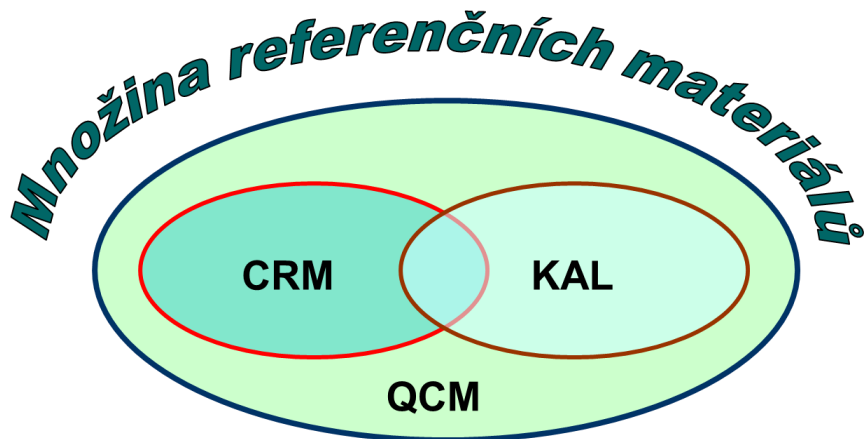
Zvláštnosti chemické analýzy se ve srovnání s jinými obory měření projevují i v postavení referenčních materiálů (RM) chemického složení. Převážně složitý vztah mezi obsahem stanovované složky (analytu) a měřeným analytickým signálem, jeho výrazné ovlivňování maticí vzorku i značný počet různých analytů jsou důvodem, proč jsou RM v chemické analýze nepostradatelné a nenahraditelné. Nepřekvapí proto, že RM chemického složení řádově převyšují jak počtem typů, tak celkovou spotřebou ostatní RM a etalony. Pro chemickou laboratoř představují RM nástroj k dosažení a prokázání požadované kvality, na druhé straně však často i nezanedbatelné náklady. Efektivní využití této investice záleží především na analytikovi.

Zvláštností v oblasti referenčních materiálů je, že nástrojem určujícím pravidla, včetně např. určení toho, co má být obsahem certifikátu RM, nejsou technické normy, ale tzv. ISO Guidy, Pokyny ISO, vydávané výborem pro referenční materiály mezinárodní normalizační organizace ISO (ISO/REMCO). Uplynulé desetiletí přineslo zásadní inovaci všech těchto základních pokynů ISO o RM (Pokyny řady 30+ a Pokyn ISO 80) [1-7] a vývoj jak v oblasti terminologie, užití referenčních materiálů, jejich přípravy v laboratořích pro vlastní použití při řízení kvality, a i při posuzování způsobilosti výrobců referenčních materiálů. Základním přístupem je, že všechny tyto dokumenty specifikují požadavky na referenční materiály obecně a pak určují další požadavky, které musí certifikované referenční materiály jako vyšší třída referenčních materiálů splňovat. Právní problémy s aplikací Pokynu ISO 34 při akreditacích vedly k jeho transformaci na normu ISO 17034, podle níž jsou nyní prováděny akreditace výrobců referenčních materiálů. Důležitou informací pro českého uživatele je, že všechny tyto Pokyny jsou přeloženy jako Technické normalizační informace (TNI) a jsou předplatitelům dostupné v systému ČSN online. Podrobně a souhrnně pojednává o problematice referenčních materiálů stať českých autorů v Kvalimetrii 21 [8], ze které v této kapitole vycházíme.

RM chemického složení se obvykle rozlišují podle typu (charakteru výchozího materiálu) anebo podle metrologické klasifikace. Podle typu se RM dělí na:

- **čisté látky** s certifikovaným obsahem hlavní složky, případně nečistot,
- **standardní roztoky a směsi plynů** (připravené obvykle gravimetricky),
- **matricové RM**, připravené z reálných přírodních nebo technických materiálů, výjimečně i synteticky tak, aby co nejvíce odpovídaly složení analyzovaných vzorků. Tento typ je v chemické analýze používán nejčastěji; obvykle se také jedná o materiál s více nebo všemi certifikovanými relevantními složkami.

V současné době se používá několik druhů referenčních materiálů, které se liší způsobem svého použití a svojí kvalitou, přičemž pojem referenční materiál je nově používán jako generický pojem ve smyslu, který je znázorněn na obrázku 4.1.



Obrázek 4.1 Mezi referenční materiály patří: Certifikované referenční materiály (CRM), kalibrátory (kalibrační standardy, KAL) a materiály pro řízení kvality – (QCM – Quality Control Material)

Podle Pokynu ISO 30 (ISO Guide 30) [2], a obdobně podle definic uvedených v Mezinárodním metrologickém slovníku [9] se rozlišují dvě základní metrologické třídy referenčních materiálů.

**Referenční materiál RM** – materiál dostatečně homogenní a stabilní vzhledem k jedné či více specifikovaným vlastnostem, u kterého se stanovilo, že se hodí pro jeho zamýšlené použití v měřicím procesu.

POZNÁMKA 1: RM je generický termín.

POZNÁMKA 2: Vlastnosti mohou být kvantitativní nebo kvalitativní, např. identita látek nebo specií (druhů).

POZNÁMKA 3: Použití může zahrnovat kalibraci měřicího systému, posuzování měřicího postupu, přidělení hodnot jiným materiálům a řízení kvality.

**Certifikovaný referenční materiál CRM** – referenční materiál (RM) charakterizovaný metrologicky platným postupem pro jednu či více specifikovaných vlastností, doprovázený certifikátem referenčního materiálu, který poskytuje hodnotu specifikované vlastnosti, její přidruženou nejistotu a prohlášení o metrologické návaznosti.

POZNÁMKA 1: Pojem hodnoty zahrnuje jmenovitou vlastnost nebo kvalitativní znak jako je identita či sekvence. Nejistoty pro takové znaky mohou být vyjádřeny jako pravděpodobnosti nebo konfidenční úrovně.

POZNÁMKA 2: O metrologicky platných postupech pro výrobu a certifikaci referenčních materiálů pojednávají, mezi jinými, Pokyny ISO 34 a 35 [4 a 6].

POZNÁMKA 3: Pokyn ISO 31 [2] je směrnici o obsahu certifikátů RM.

Pro úplnost je ještě třeba uvést značení dalších dvou tříd RM, s nimiž se analytik setkává v poslední době stále častěji jak v literatuře, tak i v analytické praxi. Jsou to:

**Materiál pro řízení kvality (QCM)**, (quality control material – QCM, in-house RM, pracovní standard aj.) je dostatečně homogenní materiál, který se používá při řízení kvality – zjišťování a kontrole stavu statistické regulace analytického systému

kontrolními vzorky. Zásady pro vlastní přípravu těchto materiálů jsou předmětem příručky publikované jako Pokyn ISO 80 [7].

**Kalibrátor** je referenční materiál použitý pro kalibraci zařízení nebo měřicího postupu. Termín *kalibrátor* často používaný zejména v oblasti laboratorní medicíny je shodný s termínem *kalibrační standard*.

Použití referenčních materiálů je oprávněné jen tehdy, jsou-li nejvhodnějším zdrojem relevantní a využitelné informace. Je proto vždy třeba dobře uvážit i ostatní alternativy jako mezilaboratorní experiment nebo jiný přístup. Neplatí automaticky, že použití certifikovaného referenčního materiálu zaručuje, že výsledky jsou správné a kvalitní. Správný výběr a použití RM je komplexní odborný proces, který vyžaduje vyhodnocení a zvážení mnoha parametrů.

## 4.2 Kritéria posuzování chemických referenčních materiálů

Vybrat referenční materiál vhodný pro dané použití v laboratoři je náročným odborným úkolem laboratoře. Kritéria výběru jsou jednak obecná, tj. pro zvolenou třídu a typ na úloze nezávislá, jednak specifická pro danou úlohu a podmínky:

- metrologická úroveň měřících metod použitých při stanovení certifikovaných hodnot RM
- homogenita a stabilita RM (minimální množství vzorku, podmínky skladování k udržení stability),
- velikost hodnoty a nejistoty certifikované hodnoty RM,
- metrologická úroveň a postavení výrobce RM v mezinárodním (nebo národním) metrologickém systému – respektování požadavků normy ISO 17034 [5] a tedy jeho kompetenci k výrobě RM mohou nyní výrobci prokazovat akreditací,
- schopnost poskytnout důkaz návaznosti RM.

RM je nedílnou jednotou hmotného objektu a příslušného informačního dokumentu<sup>1</sup>. V případě RM jiných než CRM je takový dokument nově nazýván informačním listem produktu (product information sheet), u CRM je to povinný certifikát, oba dokumenty musí v současné době vyhovovat požadavkům uvedeným podrobně pro tyto kategorie v Pokynu ISO 31 [2]. Obecně řečeno, jak informační list produktu, tak i certifikát musí obsahovat informace, které jsou nezbytné pro správné použití referenčního materiálu. U certifikátu, jehož vystavení je pro výrobce CRM povinné, musí být navíc povinně uvedeny přidružená nejistota uvedené hodnoty vlastnosti, prohlášení o metrologické návaznosti, a pokud jsou hodnoty vlastnosti CRM definovány postupem měření, pak i informace o použité měřicí metodě. Certifikát má udávat:

- technický popis RM a jeho analytické a metrologické určení,
- **certifikované hodnoty** jednoznačně definovaných složek, jejich **nejistoty**,
- homogenitu a stabilitu, dobu platnosti RM, komutabilitu RM (připadá-li v úvahu),

---

<sup>1</sup>Je-li RM jen ta „lahvička“ s materiálem a dokumentace je založena někde mimo dosah, může docházet k závažným pochybením při zacházení s referenčním materiálem.

- **minimální množství (odběr) vzorku**, pro nějž údaje certifikátu platí (u materiálů, kde to připadá v úvahu),
- způsob **zajištění metrologické návaznosti** uváděných hodnot,
- způsob a vstupy certifikace; metody, metodiku určení certifikovaných hodnot, použitou statistiku,
- zdroje, metodiku odhadu a statistické vyjádření nejistoty,
- **návody k použití, pokyny pro skladování** a operativní uchovávání apod.,
- necertifikované, indikativní hodnoty a další doplňující informace, pokud jsou pro použití relevantní (charakteristiky matrice, obsah ovlivňujících složek),
- biologická a hygienická rizika ev. zdravotní nezávadnost.

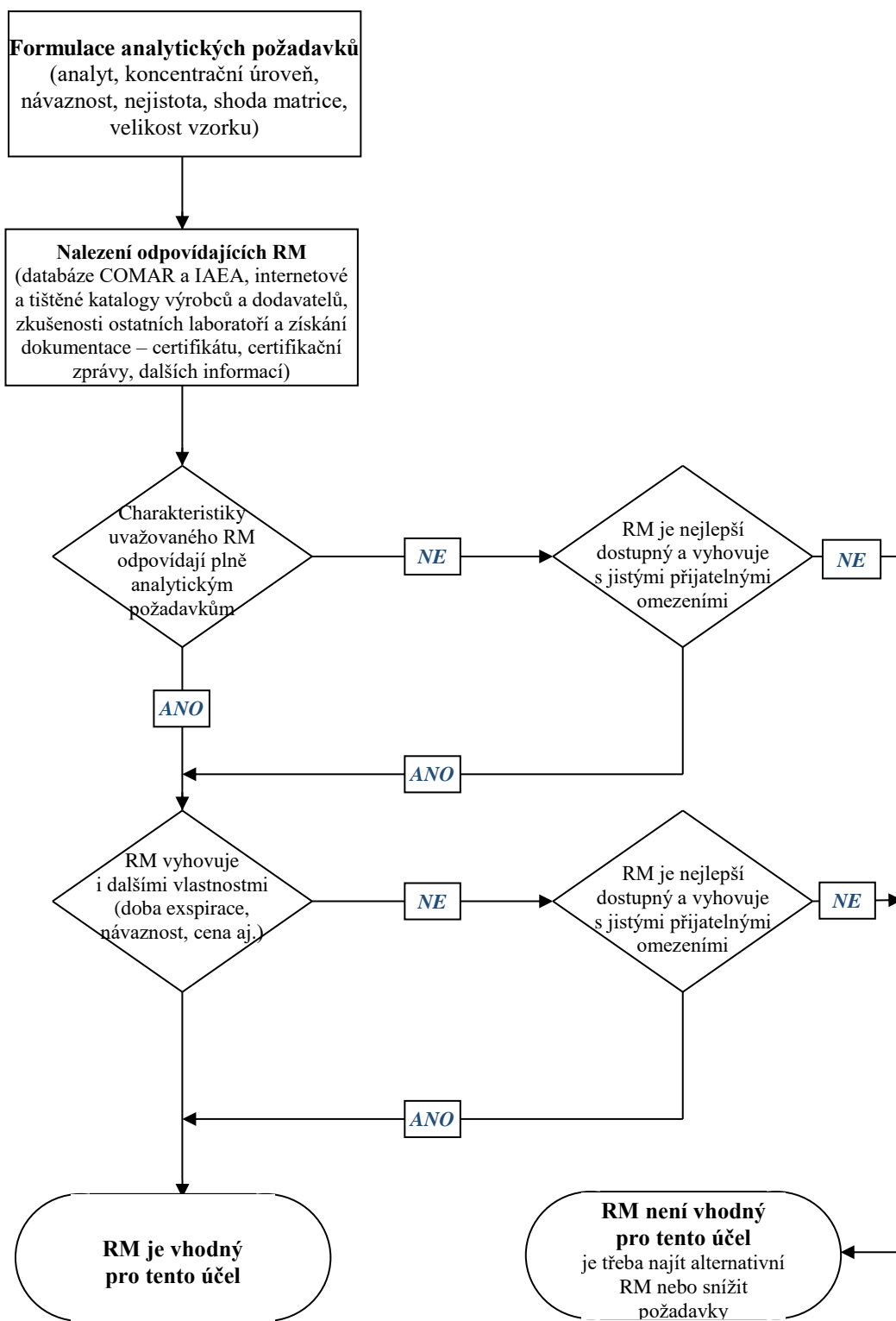
Podrobný popis certifikační studie obsahuje **Certifikační zpráva**.

Je nutno si uvědomit důležitou skutečnost, že výroba RM je finančně i časově náročnou činností. Není výjimkou, že výroba CRM trvá několik let. Nelze tedy očekávat, že se nové koncepty vyjadřování nejistoty a metrologické návaznosti projeví u několika desítek tisíc existujících kvalitních RM okamžitě. Uživatel musí publikované údaje z tohoto pohledu zhodnotit a eventuálně do nových charakteristik je transformovat. Schematický postup výběru vhodného referenčního materiálu chemického složení znázorňuje obrázek 4.2.

### 4.3 Použití referenčních materiálů v analytické laboratoři

RM se uplatňují v analytické laboratoři ve dvou hlavních směrech:

- **hodnocení**
  - validace metody
  - vyhodnocování nejistoty výsledku
  - verifikace správného provedení metody, posouzení výkonu laboratoře nebo analytika
- **přenos hodnot**
  - kalibrace měřicího (analytického) přístroje nebo systému
  - zajištění metrologické návaznosti výsledků
  - zajištění metrologické návaznosti hodnot RM nižších tříd a standardů



Obrázek 4.2 Schematický postup výběru vhodného referenčního materiálu chemického složení

### 4.3.1 Použití referenčních materiálů k hodnocení

#### Test vychýlení

Kontrola vychýlení je pro laboratoře při hodnocení kvality výsledků stěžejní záležitostí při hodnocení kvality výsledků a představuje základní činnost při validaci měřicího postupu. Pro kontrolu vychýlení je podstatné, aby reference, vůči které je vychýlení kontrolováno, byla spolehlivá a metrologicky návazná. CRM, který má být použit pro hodnocení vychýlení, je vhodný, pokud druh materiálu a předmětné vlastnosti jsou relevantní pro zamýšlené použití.

Test vychýlení (bias) analýzou CRM je založen na porovnání experimentálně stanovené hodnoty  $x_{meas}$  s certifikovanou hodnotou  $x_{CRM}$  a příslušných nejistot. Jednotný postup testování předepisuje Pokyn ISO 33:2017 [3].

Vychýlení je nevýznamné, jestliže platí vztah 4.1

$$|x_{meas} - x_{CRM}| \leq k \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2} \quad (4.1)$$

ve kterém  $k$  je koeficient rozšíření a  $u_{meas}$  a  $u_{CRM}$  jsou kombinované nejistoty experimentálně stanovené a certifikované hodnoty. Hodnota  $k$  závisí na předpokládaném rozdělení pravděpodobnosti (často normální nebo Studentovo rozdělení) a úrovni pokrytí (pro  $k = 2$  přibližně 95 %). Při použití vztahu 4.1 je často potřeba převést rozšířenou nejistotu  $U_{CRM}$  certifikované hodnoty, obvykle uváděnou v certifikátu, na kombinovanou nejistotu  $u_{CRM}$  dělením koeficientem rozšíření  $k$ . Pokud platí podmínka 4.1, jsou experimentálně stanovená a certifikovaná hodnota vlastnosti vůči sobě konzistentní v rámci svých příslušných nejistot.

Následující příklad převzatý z Metodického listu 3 EURACHEM-ČR [10] demonstruje použití vztahu (1). Další příklady lze nalézt v Kvalimetrii 21 [8].

#### Příklad:

Analýzou CRM uhelného popílku, jenž má certifikovaný obsah As ( $136,2 \pm 2,6$ )  $\mu\text{g g}^{-1}$  (rozšířená nejistota,  $k = 2$ ), byla zjištěna (10 stanovení provedených v delším časovém intervalu) průměrná hodnota obsahu As  $139,8 \mu\text{g g}^{-1}$ . Variabilita obsahu As, charakterizovaná (výběrovým) odhadem směrodatné odchylky, byla rovna  $4,1 \mu\text{g g}^{-1}$ . Zjistěte, zda používaný analytický postup vykazuje významné vychýlení<sup>2</sup>.

**Řešení:** Dosazením do vztahu (4.1)  $x_c = 136,2$ ;  $u_c = 2,6/2 = 1,3$ ;  $x_{meas} = 139,8$ ;  $u_{meas} = 1,3$  ( $u_e = (4,1/\sqrt{10}) = 1,3$  protože je porovnáván průměr a jeho směrodatná odchylka je  $s/\sqrt{n}$ , kde  $n$  je počet měření) a  $k = 2$  (volíme přibližně 95% hladinu spolehlivosti), zjistíme, že nerovnost

$$|136,2 - 139,8| \leq 2\sqrt{1,3^2 + 1,3^2}$$

<sup>2</sup> Pro hodnocení porovnejte absolutní hodnotu rozdílu certifikované a naměřené hodnoty s nejistotou přiřazenou k tomuto rozdílu.

$$3,6 \leq 3,7$$

**je splněna** a stanovená hodnota  $A_s$  **není vychýlena** na uvedené hladině spolehlivosti 95 %.

Příklad ukazuje, jak závisí výsledek testu vychýlení na vztahu nejistoty zjištěné a certifikované hodnoty. Kdyby se pouze neoprávněně porovnávalo, zda naměřená hodnota zapadá do intervalu určeného pomocí rozšířené nejistoty certifikované hodnoty (s horní mezní hodnotou  $136,2 + 2,6 = 138,8$ ), došlo by se k chybnému, zcela opačnému závěru.

**O použití RM při validaci** pojednává kapitola 5 této příručky. Z výčtu činností při validaci je zřejmé, že se referenční materiál může uplatnit při vyhodnocení téměř všech výkonnostních charakteristik. Nejdůležitější je však použití certifikovaných referenčních materiálů při vyhodnocování nepřítomnosti vychýlení a návaznosti. Ostatní výkonnostní parametry lze vyhodnotit i bez použití CRM. Např. preciznost je výhodné stanovit, zejména z ekonomických důvodů, opakovanou analýzou dostatečně homogenního a matricově a koncentračně vhodného vzorku (např. interního RM či QCM).

**Pro vyhodnocení nejistoty měření** nabízí analýza certifikovaných referenčních materiálů (CRM) vhodná data pro odhad nejistoty, protože poskytuje informace o kombinovaném vlivu řady potenciálních zdrojů nejistoty a umožňuje doplnit bilanci nejistoty o příspěvek odrážející vychýlení výsledků použitého analytického postupu. Nutnými předpoklady a způsobem využití výsledků analýzy RM k odhadu nejistoty se zabývá kapitola 7 této příručky. Je pouze nutné připomenout, že při vyhodnocení nejistoty s využitím RM je třeba brát v úvahu následující příspěvky:

- nejistotu deklarované hodnoty RM,
- reprodukovatelnost měření RM,
- příspěvek, odrážející rozdíl mezi naměřenou a deklarovanou hodnotou RM,
- rozdíl mezi složením vzorku a RM,
- operace prováděné se vzorkem, nikoliv však s RM (např. předúprava vzorku apod.).

Věrohodnost kvantifikace nejistoty z výsledků analýz RM závisí významně na tom, jak podobné jsou matrice a koncentrace vzorku a RM, zejména u metod významně závislých na matici.

### **Posouzení výkonu laboratoře nebo analytika**

Ani u řádně validované a dobře zavedené metody (měřicího postupu) nelze vyloučit, že se v určité laboratoři nebo u určitého analytika neobjeví chyby, které nebylo možno předvídat. V dobrém systému řízení kvality jsou pro jejich včasné zjištění a odstranění připraveny účinné mechanismy. Ty jsou založeny mj. na použití RM. Alternativou k používání RM je účast v mezilaboratorních experimentech (proficiency testing, zkoušení způsobilosti) jako jedné z účelových variant mezilaboratorního experimentu. I ve zkoušení způsobilosti se mohou RM výhodně uplatnit. Zpravidla ne jako vlastní zkušební vzorek, to by bylo zbytečně nákladné a pro velký počet potřebných vzorků i těžko schůdné. Kromě toho nelze vždy vyloučit odhalení hodnot RM při jeho poměrně snadné identifikaci a tím možnost ovlivnění výsledků, zvláště v případech, kdy je vhodných

druhů RM omezený počet. RM lze s výhodou využít především při kontrole pravdivosti vztažné hodnoty, která se často stanovuje jako střední hodnota (aritmetický průměr nebo medián) průměrů účastnických laboratoří. Pokud má totiž významnější část účastníků vychýlené výsledky, způsob vyhodnocení zkoušení způsobilosti založený jen na výsledcích účastníků vychýlení neodhalí.

### 4.3.2 Referenční materiály při přenosu hodnot

#### Kalibrace

Kalibrace analytické metody je klíčovým krokem v celém analytickém procesu. Kalibrace není zapotřebí jen u přímých primárních analytických metod, jak vyplývá z jejich definice. Většina instrumentálních analytických metod je nepřímá a vyžaduje tudíž aplikaci určitého kalibračního modelu.

Kalibrace je definována jako *činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony (standardy) a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace* [9]. V definici se indikacemi míní hodnota analytického signálu.

Matematicky spočívá kalibrace v určení funkční závislosti mezi měřeným signálem a koncentrací (obsahem) analytu. Na výstupu analytického systému nepřímých metod je signál  $y_A$ , z jehož intenzity se stanovuje obsah analytu  $x_A$ . Toho se dosahuje tak, že se s kalibračními vzorky se známým obsahem analytu  $x$  (pokud možno s malou přidruženou nejistotou) určí odpovídající intenzita signálu  $y$  a vyjádří se závislost intenzity signálu  $y$  na obsahu analytu  $x_A$ .

Regresní závislost  $y = f_k(x_A)$  nazýváme kalibrační funkcí a její první derivaci

$$\frac{\partial y}{\partial x_A} = \frac{\partial f_k(x_A)}{\partial x_A}$$

nazýváme citlivostí. Při vlastní analýze, která probíhala za stejných experimentálních podmínek jako kalibrace, najdeme střední hodnotu signálu  $\bar{y}_A$  z  $n_A$  paralelních stanovení. K určení obsahu analytu  $x_A$  z  $\bar{y}_A$  se použije funkce inverzní ke kalibrační funkci, tj. analytická funkce  $x_A = f_A(\bar{y}_A)$ .

Uvedené zákonitosti platí pro jakýkoliv kalibrační model (kalibrační přímku, metodu přidavků standardů aj.), u nelineárních závislostí však bývají komplikovanější než u lineárního modelu.

## Kalibrační modely

### Jednobodová kalibrace

Jednobodová kalibrace je nejjednodušším kalibračním modelem. Ke kalibraci měřicího zařízení stačí jeden kalibrátor (CRM). Z odezvy  $y_{CRM}$  a  $y_{vzorek}$ , získané měřením CRM a vzorku v uvedeném pořadí a z hodnoty vlastnosti  $x_{CRM}$  se výsledek vypočítá ze vztahu (4.2)

$$x_{vzorek} = x_{CRM} \cdot \frac{y_{vzorek}}{y_{CRM}} \quad (4.2)$$

Nejistota  $u(x_{vzorek})$  zahrnuje pouze vlivy z opakovatelnosti měření a nejistotu přidruženou hodnotě vlastnosti CRM. Tato bilance nejistoty by se měla doplnit o příspěvky nejistoty spojené s manipulací se vzorkem (vzorkování, ředění apod.). Použití tohoto modelu kalibrace a vyhodnocení přidružené nejistoty by mělo být omezeno na situaci, kdy vztah mezi  $x$  a  $y$  lze přesně modelovat pomocí vztahu  $y=b_1 \cdot x$ , kde  $b_1$  označuje směrnici.

### Kalibrace ohraničením (bracketing)

Kalibrace ohraničením vyžaduje dva kalibrátory (CRM), jeden s hodnotou vlastnosti vyšší než hodnota vzorku a druhý s hodnotou vlastnosti nižší než tyto hodnoty. Prostřednictvím lineární interpolace mezi oběma kalibrátory se přiřadí hodnoty dalším vzorkům. Zvolený interval by měl být dostatečně malý, aby eventuelní nelinearita detektoru nevedla k vychýlení hodnoty, která bude přiřazena neznámému vzorku. Model pro kalibraci ohraničením lze vyjádřit vztahem (4.3)

$$x_{vzorek} = \frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} (y_{vzorek} - y_1) + x_1 \quad (4.3)$$

kde  $y$  značí odezvu a  $x$  měřenou veličinu (např. koncentraci). Hodnoty CRM jsou označeny  $x_1$  a  $x_2$ , odpovídající odezvy  $y_1$  a  $y_2$ , odezva vzorku  $y_{vzorek}$  a jeho hodnota  $x_{vzorek}$ .

### Vícebodová kalibrace

Vícebodová kalibrace je nejpoužívanějším kalibračním modelem v analytické chemii. Ze získaných změřených odezev souboru kalibrátorů se následně pomocí regrese stanoví křivková (v ideálním případě přímková) závislost mezi změřenou odezvou a příslušnou veličinou. Údaje z vícebodové kalibrace vyžadují tudíž určitý způsob „prokládání“ závislosti a vhodný model pro získání hodnoty pro neznámý vzorek z dané odezvy tohoto vzorku (tyto modely jsou obvykle součástí softwaru u většiny moderních analytických přístrojů). Ve většině případů k získání parametrů kalibračního modelu se používá metoda nejmenších čtverců.

Zvláštním případem vícebodové kalibrace je metoda přidavků standardů. Namísto použití oddělených kalibrátorů je kalibrační standard přidáván přímo do (upraveného) vzorku. Prostřednictvím extrapolace se určí hodnota měřené veličiny. Další podrobnosti o kalibračních modelech a přidružených nejistotách jsou uvedeny v příloze B pokynu ISO 33 [7].

Snaha o odstranění problémů s maticovým vlivem vede někdy k používání maticových CRM ke kalibraci. Nejistota certifikovaných hodnot maticových CRM je však většinou vyšší než u CRM čistých látek, takže se musí uvážit, zda odstranění (nebo alespoň částečné zmírnění) nejistoty  $u_{mat}$  přispěje tímto způsobem ke snížení nejistoty  $u_c$ . Náklady na pořizování celé škály maticových CRM ke kalibraci mohou někdy podstatně zvýšit cenu analýzy. Navíc jsou maticové CRM určeny zejména k hodnocení a ne pouze ke kalibraci. Je však třeba respektovat zásadu, že je-li referenční materiál použit ke kalibraci, pak nelze stejný materiál použít k validaci ani k verifikaci tohoto postupu měření. Oba postupy musí být nezávislé.

Často se používají ke kalibraci čisté látky či jejich roztoky. Při použití chemikálií od komerčních dodavatelů nebo z výzkumných programů pro tento účel, může laboratoř často z těchto zdrojů získat údaje prokazatelně deklarující jejich identitu a čistotu. Uživatel odpovídá za posouzení takových údajů o kvalitě použitých chemikálií pro kalibrace včetně rozhodnutí provést případné doplňující experimenty.

#### **4.4 Metrologická návaznost výsledků měření**

O metrologické návaznosti výsledků měření pojednává podrobně kapitola 3 této příručky. Ukazuje stěžejní úlohu, kterou u chemických měření hrají certifikované referenční materiály jako stanovené, mezinárodně uznávané reference.

V metrologii v chemii je návaznost zajišťována především pomocí referenčních materiálů použitých ke kalibraci metody měření a pomocí definovaných primárních metod měření, které mají nejbližší k přímé návaznosti na základní jednotky SI. Primární metody měření jsou metody, jejichž pracovní postup může být úplně popsán a pochopen, pro něž může být udán kompletní výčet nejistot v jednotkách SI a jejichž výsledky jsou tudíž přijímány bez reference ke standardu měřené veličiny. Příkladem takových metod jsou gravimetrie, odměrná analýza (titrimetrie), coulometrie, izotopové zředování s hmotnostní spektrometrií (IDMS). Tyto metody patří do kategorie, která je označována jako metody s výpočtem nebo definitivní či absolutní. Slouží k zajišťování metrologické návaznosti ve vyšších patrech metrologické hierarchie. Zde se používají referenční materiály nazývané primární referenční materiály a definované jako materiály, jejichž vlastnost (látkové množství) je certifikována primární metodou. Představují často prvky a sloučeniny nejvyšší dosažitelné čistoty.

#### **4.5 Přidělení hodnot dalším materiálům**

Z certifikovaných referenčních materiálů se zvláště pro účely kalibrace zařízení připravují další referenční materiály mísením, ředěním nebo jinými způsoby. Hodnota vlastnosti (hodnoty vlastností) nově připraveného materiálu se odvíjejí od hodnoty (hodnot) CRM použitého při přípravě. Takovéto aplikace CRM zahrnujeme pod obecný název „přidělení hodnot dalším materiálům“. Mezi nejčastější metody přípravy patří gravimetrie a volumetrie. Koncentrace, látkový zlomek nebo nějaká míra složení se může vypočítat na základě údajů o přípravě. Tyto operace s CRM se nepovažují za přerušení řetězce metrologické návaznosti, nejistota metody přípravy však musí být zahrnuta do

kombinované nebo rozšířené nejistoty přidělené hodnoty. Pokud je zařízení použité v procesu řádně kalibrováno a okolní podmínky jsou monitorovány odpovídajícím způsobem, je možno získat hodnoty vlastností, které vykazují metrologickou návaznost.

## 4.6 Zacházení s referenčními materiály

Zásady a povinnosti při zacházení s RM nejsou, na rozdíl od vybraných stanovených měřidel, regulovány zákonem, jsou však nedílnou a neopomenutelnou součástí systému managementu laboratoře. Metrologické zabezpečení laboratoře je zpravidla popsáno v metrologickém řádu laboratoře, který je součástí dokumentace systému managementu laboratoře, anebo přímo v příslušném oddílu takové dokumentace. V chemické laboratoři by měla být v těchto dokumentech věnována RM taková pozornost, která odpovídá stěžejní roli, jakou mají RM v metrologii v chemii. Norma ČSN EN ISO/IEC 17025 ukládá laboratořím povinnost mít postupy pro bezpečnou manipulaci, přepravu, skladování a používání RM, aby se zabránilo jejich znečištění a znehodnocení a aby se uchránila jejich integrita. RM a CRM musí být zřetelně označeny, aby je bylo možno identifikovat a aby byla zjevná příslušnost k původním certifikátům nebo jiné dokumentaci. Pro používání RM musí být též k dispozici informace o skladovatelnosti, podmínkách uchovávání, použitelnosti a jejich omezeních, zejména např. o minimální navážce. Při manipulaci s RM a jeho uchování je nutno dodržet všechny pokyny výrobce. Je to podmínka pro platnost certifikovaných (a indikativních) hodnot a dalších vlastností materiálu, zejména je nutno respektovat deklarované minimální množství vzorku pro analýzu.

## 4.7 Informace o dostupnosti referenčních materiálů

Výběr vhodného referenčního materiálu pro danou aplikaci je odborně náročným úkolem, který laboratoř musí řešit a následně i zvážit finanční pokrytí případného nákupu. Nejčennějším zdrojem informací umožňujícím posoudit vhodnost daného materiálu pro zamýšlené použití v laboratoři jsou dokumenty k RM, certifikát a certifikační zpráva eventuálně informační list produktu u necertifikovaných RM. Tyto dokumenty lze u renomovaných výrobců RM získat z jejich webových stránek, ale nejdůležitějším jejich souhrnným zdrojem je nekomerční databáze referenčních materiálů COMAR, vytvářená pod záštitou ISO/REMCO od konce sedmdesátých let minulého tisíciletí. Databáze COMAR obsahuje hypertextové odkazy u mnoha RM, které vedou až k certifikátům či certifikačním zprávám, jež je možno ve formě pdf souborů stáhnout, pokud je výrobce zpřístupňuje. Databáze je volně přístupná na internetu na adrese [www.comar.bam.de](http://www.comar.bam.de) (po registraci, která je bezplatná). Vzhledem k tomu, že se informace v databázi jednotlivými kódovacími centry (jedním z dvaceti je i Český metrologický institut) a od roku 2008 i vybranými výrobci referenčních materiálů průběžně aktualizují a prověřují, získává uživatel převážně aktuální informace. Databáze COMAR obsahuje v současné době údaje o skoro deseti tisících převážně certifikovaných referenčních materiálů 250 výrobců z 26 zemí. Další informačními zdroji na internetu jsou databáze Mezinárodní agentury pro atomovou energii IAEA

[<https://nucleus.iaea.org/rpst/ReferenceProducts/ReferenceMaterials/index.htm>], pro oblast laboratorní medicíny je relevantní databáze JCTLM, která je součástí webových stránek BIPM [<http://www.bipm.org/jctlm/>]. Ovšem často jsou nejdůležitějším zdrojem informací rady a zkušenosti kolegů z oboru.

## 4.8 Vlastní příprava materiálů pro řízení kvality

Certifikované referenční materiály (CRM) jsou používány především pro validaci analytických postupů a kalibraci, tedy pro zajištění metrologické návaznosti. Referenční materiály, které jsou určeny pro metrologické řízení kvality měření, jsou materiály vhodné pro každodenní prokazování skutečnosti, že je měřicí systém pod statistickou kontrolou. Takové materiály nevyžadují charakterizaci metrologicky platným postupem a mohou být připraveny v dané laboratoři.

V roce 2014 komise ISO/REMCO po dlouhé diskusi vytvořila, po dlouhé diskusi, pokyn pro vlastní přípravu vnitrolaboratorních materiálů pro řízení kvality (QCM). Pokyn byl vydán pod označením ISO GUIDE 80 [7]. Laboratoře mohou připravovat tyto materiály pouze pro specifické potřeby a rozhodně nemohou nahradit certifikované referenční materiály (CRM).

Odůvodnění k výrobě materiálů pro řízení kvality (QCM) se může zakládat na kombinaci následujících potřeb:

- vlastnit RM odpovídající v nejvyšší možné míře rutinním vzorkům a vhodných pro řízení kvality,
- vlastnit RM pro každodenní použití, které by doplňovaly komerčně dostupné CRM,
- jestliže neexistuje vhodný CRM,
- aplikace nevyžaduje materiál, který by měl úplné charakteristiky CRM (např. návaznost a nejistotu).

Příprava QCM má ovšem vazbu k výrobě certifikovaných referenčních materiálů (CRM), a je tedy nutné při jejich výrobě respektovat Pokyn ISO 34 ev. normu ISO 17034 [4,5] a Pokyn ISO 35 [6]. Požadavky na QCM však mohou být méně náročné, např. nemusí splňovat požadavky na snadný transport apod.

Při přípravě v laboratoři se s výhodou mohou používat vzorky z reálných produktů, u kterých jsou k dispozici analytické údaje. Je třeba zdůraznit jednu důležitou okolnost: QCM nemohou být použity pro stanovení návaznosti, pro kalibraci a pro stanovení pravdivosti výsledků měření.

## 4.9 Použití referenčních materiálů v laboratorní medicíně

V principu platí při použití referenčních materiálů stejné zásady, jako při použití jiných referenčních materiálů chemického složení. Některé zvláštnosti použití ve zdravotnických laboratořích jsou dány specifickým charakterem oboru laboratorní medicíny. Mezi specifika referenčních materiálů pro tuto oblast patří zejména pojem komutability referenčních materiálů.

Referenční materiál je označován jako **komutabilní**, když při použití různých měřicích postupů jak pro materiál tak i soubor rutinních vzorků obsahujících měřenou veličinu je u nich pozorován stejný matematický poměr výsledků pro stanovovanou měřenou veličinu. Komutabilita RM má význam zejména v laboratorní medicíně, kde je používána řada měřicích postupů pro rutinní klinické zkoušky u daných měřených veličin ve vzorcích od pacientů. Tyto postupy vycházejí z řady různých fyzikálně-chemických a biochemických principů nebo jsou založeny na detekci a měření různých dílčích složek komplexních molekulárních systémů. Takové postupy jsou citlivé v různém stupni vůči interferencím majícím původ v **rozdílech mezi maticí referenčního materiálu a maticí klinických vzorků**, nebo vůči rozdílům v odezvě způsobenými změnami analytu (jako jsou denaturace, změny v agregaci, oligomerní stav, vazby na kov) a matrice během výroby referenčního materiálu. Nekomutabilní (nedostatečně komutabilní) referenční materiály bývají ve zdravotnických laboratořích jednou z nejčastějších příčin vychýlení výsledků (bias).

### Shrnutí:

- Hlavními typy referenčních materiálů chemického složení jsou čisté látky, standardní roztoky, směsi plynů a maticové referenční materiály. RM plní u chemických měření analogickou úlohu jako etalony u fyzikálních měření.
- Výběr referenčního materiálu představuje náročnou odbornou činnost. Při výběru RM chemického složení mohou mít charakter matrice a koncentrační úroveň větší důležitost než deklarovaná hodnota nejistoty. Při volbě výrobce RM může laboratoři nápomoci akreditace výrobců RM.
- Použití referenčních materiálů k hodnocení umožňuje test vychýlení postupu měření, uplatňuje se při validaci a verifikaci postupů měření a může významně přispět k vyhodnocení nejistoty měření.
- Referenční materiály při přenosu hodnot mají nezastupitelnou úlohu při kalibracích zařízení a měřicích postupů, pro zajištění metrologické návaznosti a pro přidělování hodnot dalším referenčním materiálům.
- Mezi nejdůležitější zdroje informací pro výběr RM patří kromě zkušeností kolegů z oboru mezinárodní databáze RM COMAR, volně dostupná na internetu a umožňující přístup k plným textům certifikátů a certifikačních zpráv, pokud je výrobce zpřístupnil.
- RM pro řízení kvality se používají ke sledování výkonnosti metod, které již byly validovány s cílem zjistit, zda se metoda se nevymyká statistické kontrole. Pokyn ISO 80 shrnuje požadavky na jejich přípravu v laboratoři.

- Principy, pracovní a výpočetní postupy používání RM v laboratorní medicíně jsou obdobné těm v analytických laboratořích. Mezi specifika patří důraz na komutabilitu referenčních materiálů.

#### **Literatura:**

1. TNI POKYN ISO 30:2016 *Referenční materiály - Vybrané termíny a definice*. ÚNMZ Praha.
2. TNI POKYN ISO 31:2017 *Referenční materiály - Obsah certifikátů, označení a doprovodných informací*. ÚNMZ Praha.
3. TNI Pokyn ISO 33:2016 *Referenční materiály - Správná praxe při jejich používání*. ÚNMZ Praha
4. TNI POKYN ISO 34:2013 *Obecné požadavky na způsobilost výrobců referenčních materiálů*. ÚNMZ Praha.
5. ČSN EN ISO 17034:2017 *Všeobecné požadavky na kompetenci výrobců referenčních materiálů*. ÚNMZ Praha.
6. ISO Guide 35:2017 *Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability* (Překlad TNI POKYN ISO 35 *Referenční materiály — Návod pro charakterizaci a hodnocení homogeneity a stability*. ÚNMZ Praha. Vydání se připravuje).
7. TNI POKYN ISO 80:2015 *Příručka pro vlastní přípravu materiálů pro řízení kvality (QCM)*. ÚNMZ Praha.
8. KVALIMETRIE 21. *Referenční materiály v chemické analýze*. EURACHEM-ČR, Praha 2016. (ISBN 978-80-86322-09-4).
9. TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM). ÚNMZ Praha.
10. Metodický list 3 - *Porovnání výsledků s certifikovanou hodnotou CRM*. EURACHEM-ČR 2018, <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>
11. ČSN EN ISO/IEC 17025:2018. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří. ÚNMZ Praha.

# 5 VALIDACE A VERIFIKACE POSTUPŮ MĚŘENÍ

## 5.1 Úvod

Laboratoř musí používat vhodné postupy měření, tedy takové, které umožňují zvládnout požadavky, jež jsou na měření stanoveny. Pokud zákazník nestanoví metodu, která má být použita, doporučuje se používat metody publikované buď v mezinárodních, regionálních nebo národních normách, nebo od renomovaných odborných organizací nebo v příslušných vědeckých publikacích a časopisech, případně specifikované výrobcem zařízení (tzv. aplikační listy). Tyto metody prošly procesem, definujícím analytické požadavky a experimentálně potvrzujícím, často i formou mezilaboratorní studie, že uvažovaná metoda je způsobilá zvládnout požadavky, které její použití vyžaduje, tedy **validací**. Validace postupu měření (metody<sup>3</sup>) tedy prokazuje, že postup je ‚vhodný pro daný účel‘, např. pro stanovení boritanů ve vodě v koncentračním rozsahu od 0,01 mg do 1 mg boru v litru s relativní rozšířenou nejistotou do 10 %. Norma ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 [1] uvádí v odstavci 7.2.1.5:

*7.2.1.5 Laboratoř musí před zavedením ověřit, zda je schopna řádně provádět metody tím, že zajistí, že je schopna dosahovat požadované výkonnosti.*

Tedy laboratoř si může osvojit validovaný postup měření, který byl např. publikován jako norma, nebo nakoupit kompletní měřicí systém pro specifické používání od komerčního výrobce. V obou těchto případech byla základní validace již provedena, ale laboratoř bude stejně muset potvrdit, že je schopna metodu aplikovat. A tato činnost se obvykle nazývá **verifikací**. Znamená to, že musí provést určité experimenty, které prokáží, že daná metoda funguje v laboratoři koncového uživatele. Vynaložená práce bude pravděpodobně významně menší ve srovnání s validací metody, která byla vyvinuta vlastními zdroji. Verifikace se též vyžaduje, pokud došlo k významné změně, jako je nový, avšak podobný přístroj, přemístění vybavení atd.

Laboratoř může použít také metody vyvinuté nebo modifikované v laboratoři. Ty se musí podrobit plné validaci, jak uvádí norma [1] v odstavci 7.2.2.1:

*7.2.2.1 Laboratoř musí validovat nestandardní metody, laboratorní metody vyvinuté laboratoří a standardní metody<sup>4</sup> používané mimo určený rozsah nebo jinak upravené. Validace musí být tak rozsáhlá, jak je to nezbytné pro splnění potřeb dané aplikace nebo oblasti použití.*

Termín **validace** je definován ve VIM 3 [2] jako „Ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.“ **Verifikace** (ověření) postupu je definována jako „Poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky.“ Vzhledem k tomu, že tyto definice jsou obecné a nezaměřují se primárně na validaci/verifikaci postupů měření, uvádíme je pouze pro úplnost. Oba termíny poukazují

---

<sup>3</sup> V této kapitole bude v některých případech používán výraz "metoda", který je považován za synonymum s pojmem "postup měření", dle nově vydané normy ČSN EN ISO 17025:2018.

<sup>4</sup> Standardní metody jsou metody vypracované normalizačním orgánem nebo jinou široce uznávanou organizací, jejíž metody jsou v dané odbornosti obecně akceptovány.

na proces ověření výkonnosti zkušební metody, abychom zjistili, zda je schopna poskytovat výsledky vhodné pro konkrétní účel.

Laboratoř musí rozhodnout, které výkonnostní charakteristiky (viz kapitola 5.2) se musí vyhodnocovat při validaci i verifikaci metody a v některých případech i jak detailní by mělo hodnocení jednotlivých výkonnostních charakteristik být. Norma ČSN EN ISO/IEC 17025 k tomu uvádí:

**7.2.2.3** *Výkonnostní charakteristiky validovaných metod posuzovaných pro zamýšlené použití musí odpovídat potřebám zákazníků a být v souladu se stanovenými požadavky.*

*POZNÁMKA: Výkonnostní charakteristiky mohou zahrnovat, ale nejsou omezeny na rozsah měření, přesnost, nejistotu měření výsledků, mez detekce, mez stanovitelnosti, selektivitu metody, linearitu, opakovatelnost nebo reprodukovatelnost, robustnost oproti vnějším vlivům nebo citlivost vůči interferencím z matrice vzorku nebo zkoušeného objektu a vychýlení (bias).*

Validace i verifikace má být plánovaný proces, kdy se před samotným prováděním validačních experimentů stanoví rozsah validace/verifikace (tj. které výkonnostní charakteristiky, počet opakovaných měření, koncentrační úrovně atd.). Všechny prvky validačního protokolu musí být zaznamenány a musí být součástí řízené dokumentace. Norma ČSN EN ISO 17025 přímo uvádí:

**7.2.2.4** *Laboratoř musí uchovávat následující záznamy o validaci:*

- a) použitý postup validace,*
- b) specifikaci požadavků,*
- c) stanovení výkonnostních charakteristik metody,*
- d) získané výsledky,*
- e) prohlášení o platnosti metody, podrobně popisující její vhodnost pro předpokládané použití.*

Jak správně provést validaci a verifikaci analytického postupu popisují podrobně příručky KVALIMETRIE 18 a 20 [3, 4].

K validaci metody se dá přistupovat dvojím způsobem. První přístup je založen na mezilaboratorním experimentu (**mezilaboratorní validace**) a druhý přístup na měření v jediné laboratoři (**vnitrolaboratorní validace**). První přístup se používá, pokud má vyvíjená metoda široké použití, např. je zamýšleno ji publikovat jako normu, pak je společná studie s účastí skupiny laboratoří preferovanou cestou. V druhém případě provádí validační studii ta laboratoř, která metodu potřebuje.

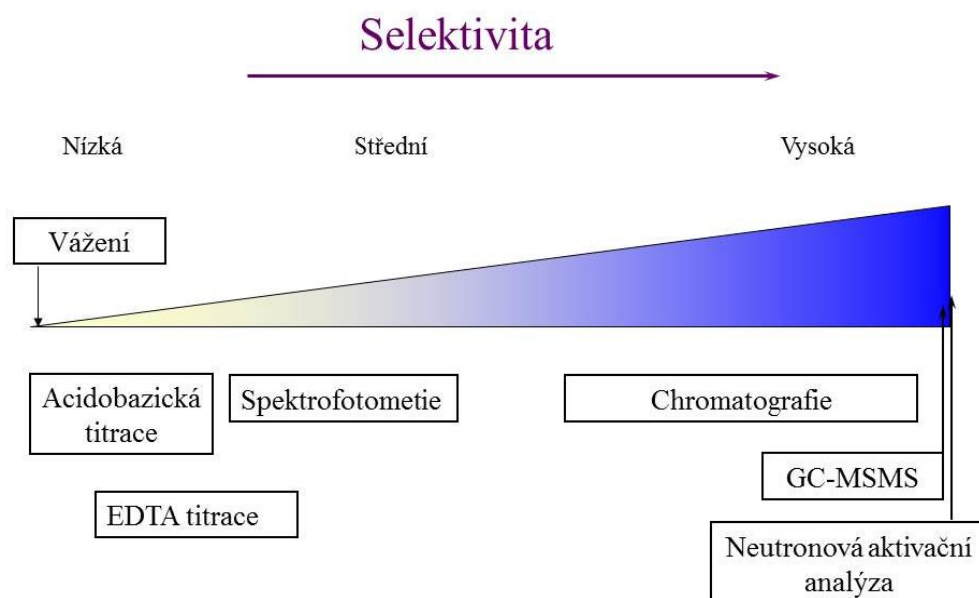
Pro názornost budou dále u rozboru jednotlivých výkonnostních charakteristik použity příklady při stanovení léčiv metodou kapalinové chromatografie s použitím hmotnostního detektoru (na bázi trojitého kvadrupólu).

## 5.2 Výkonnostní charakteristiky

### Selektivita

Selektivní metoda (postup měření) je taková metoda, kdy je výsledek stanovení analytu v určité matici nezávislý na přítomnosti omezeného množství určitých příměsí (interferentů). Selektivita metody se mění v závislosti na koncentraci stanovovaného analytu, v závislosti na koncentraci ostatních komponent matrice a někdy i v závislosti na nastavení parametrů metody (souvisí s robustností). Podle VIM 3 je selektivita „*taková vlastnost měřicího systému používajícího specifikovaný postup měření, pomocí něhož poskytuje naměřené hodnoty veličiny pro jednu nebo více měřených veličin, že hodnoty každé měřené veličiny jsou nezávislé na jiných měřených veličinách nebo jiných veličinách v rámci zkoumaného jevu, těles nebo látky*“ [2]. Mírou selektivity metody je kvantitativním způsobem vyjádřený vliv matrice, jednotlivé matriční efekty se zahrnují do výpočtu nejistoty výsledku. Míru selektivity určujeme buď metodou plánování pokusů s vyhodnocením analýzou rozptylu, nebo porovnáním výsledku analýzy získaného s čistým analytem a za přítomnosti všech předpokládaných rušivých složek v koncentracích odpovídajících reálné matici.

Příklady selektivity různých analytických metod jsou uvedeny na obr. 5.1. Například plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickým detektorem (GC-MS) je považována za selektivnější než plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID), protože hmotnostní spektrometr poskytuje doplňující informace, které pomáhají s konfirmací identity.



Obrázek 5.1 Míra selektivity některých postupů používaných v laboratoři (zdroj: TrainMiC)

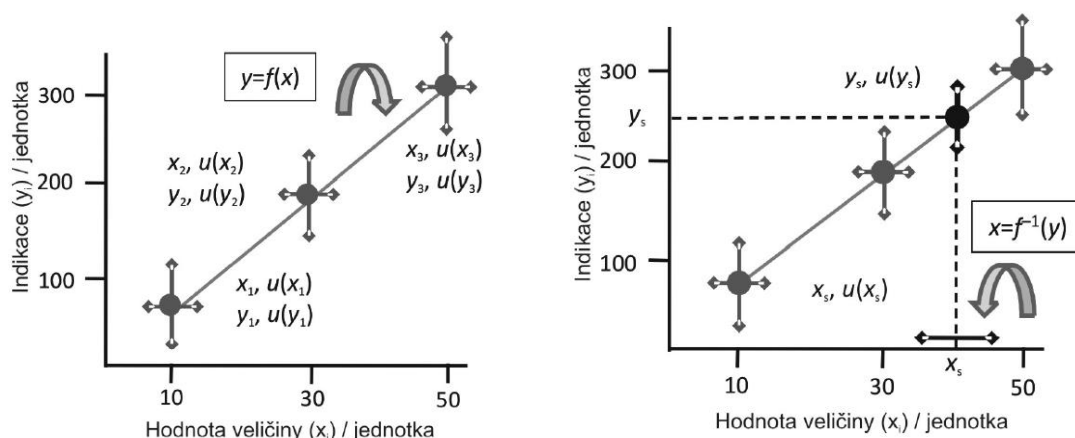
*Příklad:*

Možný postup pro stanovení selektivity při použití kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem pro stanovení léčiv: nkrát (alespoň 7krát) proměřit vzorek léčiva

v deionizované vodě a také nkrát léčivo v matrici, ve které budou prováděny běžně analýzy (odpadní vody, povrchové vody). Poté se výsledky vyhodnotí, např. analýzou rozptylu, kdy je nutné potvrdit, že koncentrace léčiv je nebo není shodná v reálné matrici a v deionizované vodě.

### Kalibrace – pracovní rozsah, linearita

Definice kalibrace z Mezinárodního metrologického slovníku je uvedena v kapitole 4.3.2. Tato definice dělí kalibraci do dvou kroků znázorněných na obrázku 5.2. První krok spočívá v konstrukci kalibrační závislosti, kdy na základě připravených kalibračních roztoků je proměřena odezva (obr. 5.2.A) a zkonstruována rovnice kalibrační křivky  $y_i = f(x_i)$ , kde  $y_i$  je indikace (signál na ose y) a  $x_i$  je měřená vlastnost (množství, koncentrace apod.). Ve druhém kroku se následně změří neznámý vzorek a použije se indikace ( $y_s$ ) k výpočtu odpovídající hodnoty veličiny ( $x_i$ ) z rovnice kalibrační křivky (obr. 5.2.B). Základním úkolem kalibrace obvykle je zjistit odpovídající obsah stanovované složky za současné eliminace soustavné chyby tak, aby se pokud možno nezvětšovala chyba náhodná. Výsledek měření je vždy doprovázen přidruženou nejistotou, která je dána i vlastním provedením kalibrace a nejistotou kalibračního modelu.

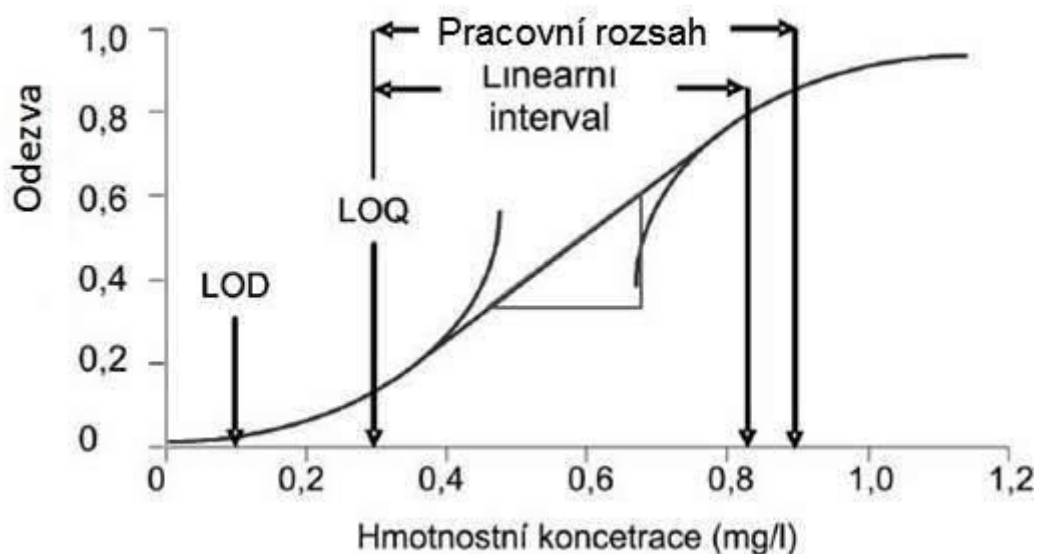


Obrázek 5.2.A (vlevo) Schéma prvního kroku v definici kalibrace. Indikace (signály  $y_i$ ) z etalonů (kalibrátorů) s hodnotami veličiny  $x_i$  poskytují vztah (funkci)  $y=f(x)$ . Vertikální a horizontální šipky ukazují standardní nejistoty indikací a hodnot veličiny (nejsou v poměru) [3]

Obrázek 5.2.B (vpravo) Schéma kalibračního diagramu ilustruje druhý krok definice kalibrace. Indikace (signály  $y_s$ ) vzorku odpovídá hodnotě veličiny  $x_s$ . Vertikální a horizontální šipky ukazují standardní nejistoty indikace a hodnoty veličiny [3]

Pracovní rozsah metody je rozsah koncentrace, ve kterém bylo demonstrováno, že metoda poskytuje výsledky vhodné pro zamýšlený účel. Ohraničení tvoří zdola nejčastěji mez stanovitelnosti (dolní hranice pracovního rozsahu nesmí být menší než mez stanovitelnosti). Horní konec se obvykle vyznačuje nedostačující změnou citlivosti (viz níže), platí na obr. 5.3. Pracovní rozsah postupu kvantitativní analýzy se stanoví měřením standardů s různou hodnotou obsahu (koncentrace) analytu. Rozsah, ve kterém je odezva

přímo úměrná změně koncentrace, nazýváme lineární interval. Obrázek 5.3 znázorňuje souvislost mezi klíčovými termíny, vztahujícími se ke kalibraci.



Obrázek 5.3 Kalibrační diagram ukazující závislost odezvy na koncentraci se znázorněním pracovního rozsahu, lineárního intervalu, LOD a LOQ. [3]

#### Příklad:

Pro zjištění pracovního rozsahu postupu se připraví alespoň 7 kalibračních roztoků o různé koncentraci a proměří se závislost analytického signálu na koncentraci léčiva v nejširším možném intervalu koncentrací včetně slepého pokusu. Závislost se zobrazí pomocí vhodného vyhodnocovacího softwaru. Na základě statistických testů linearit (v některých případech na základě subjektivní úvahy) se zvolí předpokládaný lineární interval. Pokud laboratoř měří reálné vzorky, velice záleží na matici. Jestliže je matrice vzorků výrazně odlišná od připravených kalibračních roztoků (pitné vody, povrchové vody, odpadní vody), je nutné připravit roztoky standardů (např. léčiv) do uvedené matrice nebo aplikovat techniku přidavků standardu.

#### Citlivost metody

Citlivost metody vyjadřuje *podíl změny indikace měřicího systému a odpovídající změny hodnoty veličiny, která je měřena* [2]. Citlivost metody je u metod s dostatečně lineárním kalibračním vztahem rovna směrnici kalibrační závislosti (tangenta směrového úhlu). Není-li kalibrační závislost lineární, může se měnit citlivost s koncentrací analytu či ovlivňující veličiny. Zkrácenou formu názvu, tj. citlivost (bez přívlastku např. analytická) lze užívat pouze v případech, kdy nehrozí záměna s klinickou citlivostí! Terminologicky není vhodné zaměňovat pojmy citlivost metody a mez detekce.

## Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mezí detekce (LOD, z anglického limit of detection) analytického postupu se rozumí nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutné kvantifikovatelné jako exaktní hodnota. Mez stanovitelnosti (LOQ, z anglického limit of quantification) analytického postupu se chápe nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností. VIM definuje mez detekce v termínech naměřené hodnoty veličiny jako *naměřenou hodnotu veličiny získanou daným postupem měření, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti složky v materiálu  $\beta$ , přičemž pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti je  $\alpha$* . Tato definice není konzistentní s definicí IUPAC, která se dnes v analytické chemii používá a která používá spíše pravou hodnotu veličiny než naměřenou hodnotu. Vysvětlení statistického pozadí této definice jakož i pozadí běžně používaného faktoru 3,29 (rovnice 5.1) lze nalézt v KVALIMETRII 18 [3].

K odhadu hodnoty meze detekce lze využít několika experimentálních přístupů<sup>5</sup>:

1. Odhad meze detekce na základě experimentálního vyhodnocení variability měření slepých vzorků ve formě směrodatné odchylky z opakovaných měření slepých vzorků nebo vzorků s velmi malým obsahem analytu.
2. Mez detekce může být vázána ke koncentraci analytu ve vzorku, který v použitém detekčním systému vykazuje zvolený poměr signál k šumu. Používá se hodnota poměru 2 až 5, nejčastěji 3. Vhodné zejména pro chromatografické techniky.
3. Odvozením parametrů detekční schopnosti metody nepřímo z parametrů kalibrační závislosti. Tento přístup předpokládá, že ke kalibraci byly použity standardy stejného matricového složení jako reálné vzorky (odpovídající komutability), což u mnohých kalibrací splněno není.

Stanovení meze detekce vycházející ze směrodatné odchylky výsledků měření slepého vzorku je nejčastějším přístupem používaným v analytické chemii.

Pro výpočet meze detekce (LOD) lze využít rovnici 5.1:

$$\text{LOD} = 3,29 \cdot s_{bl} \quad (5.1)$$

kde  $s_{bl}$  je směrodatná odchylka z opakovaných měření blanku – slepého pokusu. Obecně se uvažuje mez detekce jako  $3 \cdot s_{bl}$  (tedy zaokrouhlení čísla 3,29 na 3) až  $6 \cdot s_{bl}$  nebo  $3 \times$  poměr signál/šum. Vzhledem k různým používaným konvencím v analytické literatuře a praxi se doporučuje jasně specifikovat, který postup byl pro výpočet meze detekce použit.

Mez stanovitelnosti (LOQ) se obecně uvažuje jako  $10 \cdot s_{bl}$  (někdy  $6 \cdot s_{bl}$ ) nebo  $10 \times$  poměr signál/šum. Určení meze stanovitelnosti uvádí rovnice 5.2:

$$\text{LOQ} = k_Q \cdot s_Q \quad (5.2)$$

---

<sup>5</sup> Podrobnější informace k výpočtu LOD a LOQ včetně řešeného příkladu uvádí: Metodický list 7 – Detekční schopnost analytické metody, mez detekce, mez stanovitelnosti, EURACHEM-ČR 2011. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>

kde je  $k_Q$  koeficient, jehož převrácená hodnota je rovna zvolené hodnotě relativní směrodatné odchylky,  $s_Q$  směrodatná odchylka v bodě meze stanovitelnosti. Pro data s normálním rozdělením a konstantním rozptylem ( $s_Q = s_{bl}$ ) a pro doporučenou hodnotu nejistoty 10 % je  $k_Q = 10$ . Podle doporučení IUPAC se volí nejistota, vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka, rovna 10 %

Odhad směrodatné odchylky blanku by měl být stanoven za podmínek opakovatelnosti měření nebo tam, kde je to možné, za podmínek mezilehlé preciznosti měření. Doporučený počet hodnot pro výpočet  $s_{bl}$  je 10.

#### **Příklad:**

Pro výpočet LOD a LOQ byly použity hodnoty získané při proměření slepého pokusu (blanku). Roztok blanku byl během měsíce proměřen celkem desetkrát. Naměřené hodnoty signálu byly pomocí rovnice kalibrační přímky přeočteny na koncentraci a poskytly tyto hodnoty (v  $\text{ng l}^{-1}$ ): 0,34; 0,38; 0,31; 0,30; 0,29; 0,35; 0,32; 0,33; 0,31 a 0,38. Pomocí rovnice 11.2 byl vypočten odhad rozptylu a odmocněním odhad směrodatné odchylky  $s = 0,31 \text{ ng l}^{-1}$ . Tato hodnota se poté použije k dosazení do vztahu 5.1 a 5.2.

$$\text{LOD} = 3,29 \cdot 0,031 = 0,11 \text{ ng l}^{-1}$$

$$\text{LOQ} = 10 \cdot 0,031 = 0,31 \text{ ng l}^{-1}$$

#### **Preciznost**

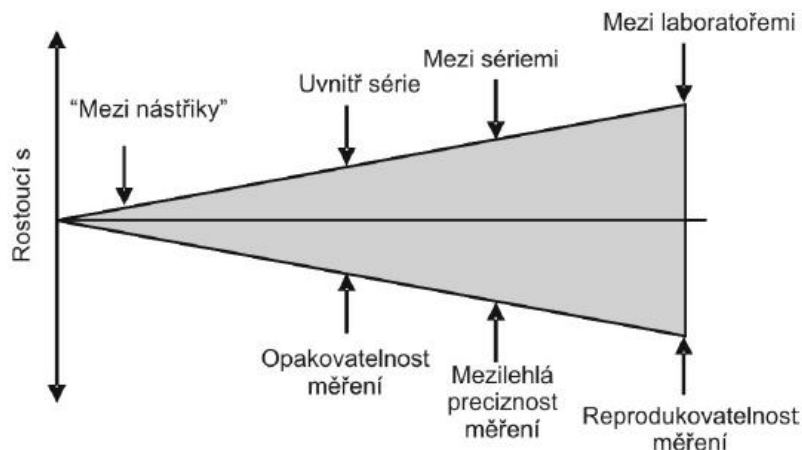
Definice preciznosti, opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti a reprodukovatelnosti podle VIM jsou uvedeny v kapitole 1.5.

Odhady opakovatelnosti měření a mezilehlé preciznosti měření lze získat v jedné laboratoři. Podmínka opakovatelnosti měření se vztahuje na měření uskutečněné na stejném materiálu jedním analytikem s použitím stejného postupu za stejných podmínek v krátkém časovém období. Za podmínky mezilehlé preciznosti se měření provádí na stejném materiálu s použitím stejného postupu, ale po delší dobu a s různými analytiky, kteří mohou používat různé vybavení. Podmínky mezilehlé preciznosti si definuje uživatel a použité podmínky se musí vždy zaznamenat. Reprodukovatelnost měření se dá zjistit při účasti v mezilaboratorním porovnávání (viz kapitola 9). Obrázek 5.4 ilustruje vztah mezi opakovatelností měření, mezilehlou precizností měření a reprodukovatelností měření.

#### *Příklad:*

Odhad opakovatelnosti měření se stanoví jako směrodatná nebo relativní směrodatná odchylka z opakovaného měření roztoku léčiva na konkrétní koncentrační hladině jedním analytikem v jedné sekvenci měření. Počet opakovaných měření 6 až 15. K odhadu mezilehlé preciznosti se použije roztok léčiva, který se proměří v téže laboratoři na stejném přístroji, např. 3 měsíce, různými analytiky, kteří běžně na přístroji měří. Opět se vypočítá směrodatná nebo relativní směrodatná odchylka. Počet opakovaných měření 6 až 15. Pokud chce laboratoř zjistit odhad reprodukovatelnosti měření, musí se přihlásit

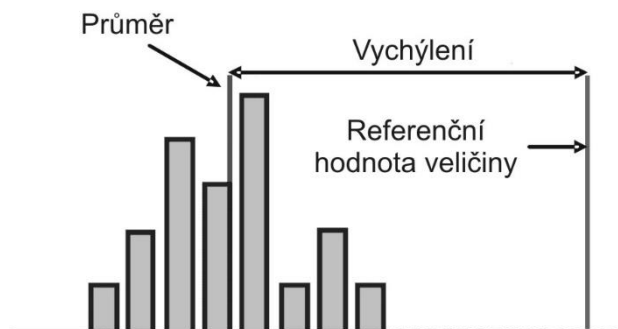
do mezilaboratorního porovnávání zkoušek, pokud je dostupný program zkoušení způsobilosti pro stanovení léčiv, např. ve vodách.



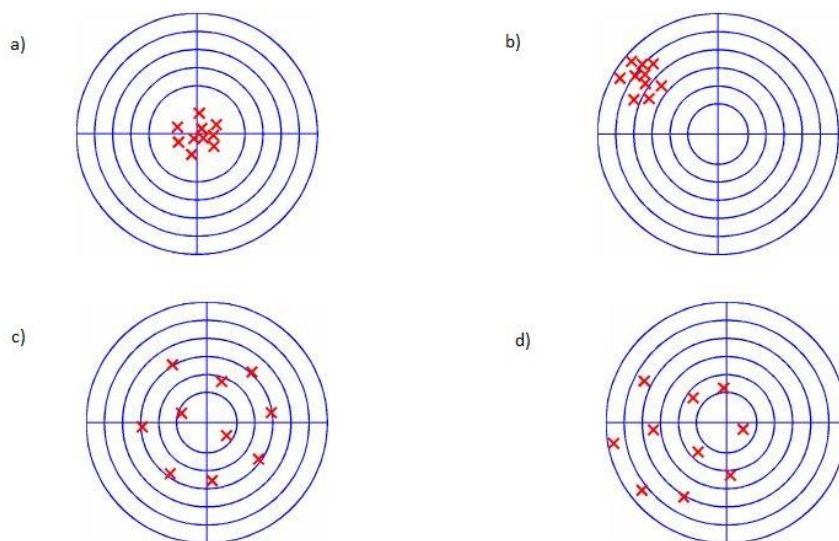
Obrázek 5.4 Schéma ilustrující očekávané souvislosti mezi odhady preciznosti získanými za různých podmínek měření, velikostně vyjádřené pozorovanou neprecizností ( $s$  ... směrodatná odchylka). [3]

## Pravdivost

Definice pravdivosti je uvedena v kapitole 1.5. Pravdivost měření není veličinou, a tudíž nemůže být vyjádřena číselně. Pravdivost je nepřímo úměrná systematické chybě měření, která může být odhadnuta vychýlením měření (bias). Příklad odhadu vychýlení jako rozdílu mezi průměrem z několika výsledků měření a referenční hodnotou veličiny je znázorněna na obrázku 5.5. Pravdivost měření vyjadřuje hypotetickou schopnost postupu měření (metody) dosáhnout výsledků blízko očekávané referenční hodnoty veličiny, jako je hodnota certifikovaného referenčního materiálu. Pojem "přesnost měření" nemá být používán pro "pravdivost měření" a naopak. Rozdíl mezi pravdivými a nepravdivými výsledky je zobrazen na obrázku 5.6.



Obrázek 5.5 Ilustrace odhadu vychýlení měření. [3]



Obrázek 5.6 Zobrazení precizních a pravdivých výsledků: a) výsledky precizní a pravdivé, b) výsledky precizní a nepravdivé, c) výsledky nepřecizní a pravdivé, d) nepřecizní a nepravdivé.

Vychýlení  $b$  se může vyjadřovat v absolutním měřítku (rovnice 5.3) nebo relativně v procentech (rovnice 5.4).

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (5.3)$$

$$b (\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (5.4)$$

Prakticky se stanovení vychýlení opírá o porovnání průměrné hodnoty výsledků  $\bar{x}$  kandidátské metody s vhodnou referenční hodnotou  $x_{ref}$ . K tomu se používají tři základní přístupy:

- a) analýza referenčních materiálů,
- b) zkoumání výtěžnosti za použití materiálů s přídatkem,
- c) porovnání s výsledky získanými jinou metodou.

Pro určení pravdivosti lze použít certifikovaný referenční materiál (CRM) s hodnotou vlastností v blízkosti hodnot předmětných zkušebních vzorků. Je-li k dispozici větší množství maticových CRM na různých koncentračních úrovních, je vhodné pro určení pravdivosti analyzovat všechny. Pokud nejsou vhodné CRM k dispozici, může se provést studie výtěžnosti (stanovení s přídatkem), poskytující údaje o pravděpodobné úrovni vychýlení. Jelikož obvykle není známo, kolik je přítomno určitého analytu ve zkoušeném vzorku, jak je vázán, nebo jak byla úspěšná extrakce z matrice vzorku, je možné přidat ke zkoušeným vzorkům analyt v různých koncentracích, extrahovat vzorky s přídatkem a změřit koncentraci. Podstatným problémem je, že dodávaný analyt nebude vázán v matrici stejně, takže tento způsob bude poskytovat nereálně vysokou představu o účinnosti extrakce.

**Výtěžnost** je podíl rozdílu mezi údaji měřicího systému při měření vzorku se známým přidaným množstvím analytu či složky a vzorku bez přídavku a přidaného množství. Udává míru schopnosti měřicí metody (postupu) postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku. Matematicky je výtěžnost  $R_f$  definována jako poměr (rovnice 5.5):

$$R_f = \frac{c_{obs}}{c_{ref}}, \quad (5.5)$$

kde  $c_{obs}$  odpovídá pozorovanému obsahu (množství, koncentraci),  $c_{ref}$  odpovídá skutečné hodnotě obsahu, množství či koncentraci získané z údajů o referenčním materiálu, změřené referenční metodou či zjištěné metodou přídavků standardu. Někdy se výraz uvádí relativně v procentech, pak je vzorec ve tvaru 5.6:

$$R_f(\%) = \frac{c_{obs}}{c_{ref}} \times 100 \quad (5.6)$$

Výtěžnost je vhodné ověřovat na několika koncentračních úrovních (alespoň na 2), tyto koncentrace by měly být zahrnuty v pracovním rozsahu metody. V ideálním případě by výtěžnost měla být 100 % a laboratoř si musí nastavit meze, ve kterých je hodnota výtěžnosti akceptovatelná. Běžně se meze nastavují v intervalu 80-120 %, ale závisí to na konkrétním případě a zejména na koncentrační úrovni. U stopové analýzy může být interval širší, naopak u hlavních složek užší.

#### **Příklad:**

Pokud laboratoř uvádí rozsah pracovní metody pro analyt od 10 do 1000 ng l<sup>-1</sup>, měla by se výtěžnost testovat na nízké koncentraci 50 ng l<sup>-1</sup> a také na vyšší koncentraci, třeba 500 ng l<sup>-1</sup>. Jelikož v některých případech není k dispozici CRM, spočívá postup v přídavku analytu o známé koncentraci do matricového slepého vzorku. Bohužel nastávají dva problémy. Za prvé analyt nemusí být vázán v matrici stejně pevně, jako je tomu v přirozené matrici. Za druhé často nelze získat přirozený matricový slepý vzorek, takže se daná matrice musí připravit uměle. Tento problém se dá obejít tak, že se obohatí („spikuje“) vzorek daného matricového složení o známém obsahu sledovaného analytu. V tomto případě nelze testovat výtěžnost pro nízké koncentrace.

Vzorek vody byl spikován standardem léčiva Venlafaxinu o koncentraci 50 ng l<sup>-1</sup>. Naměřené hodnoty byly následující: 52,7; 52,6; 52,7; 51,6; 52,5; 51,6; 53,5. Průměrná hodnota je 52,4 ng l<sup>-1</sup>. Výtěžnost Venlafaxinu je po dosazení do rovnice 5.6 rovna 104,8%:

$$R_f = \frac{52,4}{50} \cdot 100 = 104,8 \%$$

Dále je možné hodnotit vychýlení porovnáním výsledků validované metody s výsledky získanými alternativní metodou. Existují dva obecné typy alternativních metod: referenční metoda nebo metoda, která se té v době v laboratoři běžně používá. Účelem referenční metody je poskytnout "přijatou referenční hodnotu" měřené vlastnosti.

Obvykle poskytnete výsledky s menší nejistotou než kandidátská metoda. Druhý případ nastává, když je účelem validace prokázat, že kandidátská metoda poskytuje výsledky ekvivalentní výsledkům existující metody. Výhodou tohoto přístupu je, že měřené materiály nemusí být certifikované referenční materiály, protože alternativní metoda poskytuje referenční hodnotu.

Pro úplnost ještě uvedme, že pravdivost lze také určit z výsledků opakovaných účastí v mezilaboratorním porovnání zkoušek, jak je ilustrováno na příkladu v kapitole 7.3.

## **Robustnost**

Robustnost analytického postupu je míra jeho schopnosti zůstat neovlivněným malými změnami v parametrech postupu či složení vzorku. Udává jeho spolehlivost při běžném používání. I když používají různé laboratoře stejný postup měření, zavádějí do postupu nevyhnutelně malé odchylky, které mohou, ale nemusí mít významný vliv na výsledky měření (to souvisí zejména s používáním různé analytické měřicí techniky). Při testování robustnosti se matematicko-statistickým postupem zjišťuje, závislost analytického signálu na malých změnách parametrů, charakterizujících analytický postup. ‚*Test robustnosti*‘ zahrnuje provedení úmyslných změn do postupu a zkoumání následného vlivu na výkonnost. Následně je možné určit v měřicím postupu proměnné, které mají největší vliv, a tak zabezpečit, aby při jeho používání byly detailně kontrolovány. Robustnost postupu se musí zjišťovat u metod vyvíjených v laboratoři, u metod upravovaných z vědecké literatury a metod publikovaných normalizačními orgány, když se používají mimo oblast specifikovanou ve standardizované metodě. Jestliže jsou standardizované metody používány ve specifikovaném oboru metody, byla pravděpodobně robustnost studována jako součást standardizačního procesu. Z toho důvodu není studie robustnosti na úrovni jediné laboratoře ve většině případů nezbytná. Informace o robustnosti musí být uvedena v laboratorním postupu v podobě povolených tolerančních limitů pro kritické experimentální parametry.

Příklad testu robustnosti s využitím plánování experimentu podle Plackett-Burmana je uveden v kapitole 11.

## **Nejistota měření**

Nejistotou měření se podrobně zabývá kapitola 7 této příručky. Jedním ze základních požadavků je, aby bylo možné posoudit, zda je metoda vhodná pro daný účel. To musí zahrnovat požadovanou hodnotu nejistoty měření vyjádřenou jako standardní nejistota nebo rozšířená nejistota. Ovšem přesně vzato nejistota není výkonnostní charakteristikou měřicího postupu, ale vlastností výsledku, získaného pomocí tohoto měřicího postupu. Z výše uvedeného důvodu se mezi výkonnostní charakteristiky někdy řadí i nejistota měření. To je ale oprávněné jen tehdy, jedná-li se o popis konkrétní realizace měřicího systému. Nejistota je vlastností měření, tedy kombinace inherentních charakteristik analytické metody a jejího reálného provedení. Pokud by velikost nejistoty patřila do výkonnostních charakteristik metody, mohla by být uvedena předem (např. v normě) a laboratoř by ji z příslušného zdroje jen přebírala a nemusela se zabývat jejím výpočtem.

V současnosti se již v některých případech uvádí jako dodatečný požadavek k definovaným výkonnostním charakteristikám analytické metody i cílová nejistota měření, specifikovaná jako horní mez a stanovená na základě zamýšleného použití výsledků měření. Má výhodu v shrnutí požadavků pro všechny zdroje nejistoty do jednoho parametru.

Většinu informací požadovaných pro odhad nejistoty měření je možno získat během validace metody. Proto lze v příloze validační zprávy uvést data z provedené validace metody, analýzu rizik a výpočty nejistoty. Je třeba nalézt hlavní zdroje nejistoty vztahující se k metodě a uvést jejich hodnoty. Je třeba zmínit i nevýznamné příspěvky, které nejsou použity v závěrečném výpočtu.

### 5.3 Rozsah validace

Laboratoř musí rozhodnout, které výkonnostní charakteristiky se musí vyhodnocovat při validaci i verifikaci metody a v některých případech i jak detailní by mělo hodnocení jednotlivých výkonnostních charakteristik být. Návodem k tomu může být tabulka 5.1.

Tabulka 5.1 Výkonnostní charakteristiky používané při validaci různých metod [5]

Výkonnostní charakteristika	Kvalitativní analýza	Kvantitativní analýza hlavních složek	Kvantitativní analýza stopových složek	Fyzikální vlastnosti
Preciznost		+	+	+
Pravdivost (bias)		+	+	+
Selektivita	+	+	+	+
LOD	+		+	
LOQ			+	
Pracovní rozsah a linearita		+	+	+
Robustnost	+	+	+	+

Je důležité validovat celý měřicí postup, ne jen analytickou koncovku (měření připravených vzorků na přístroji). Validovat je potřebné celý rozsah uvažovaných koncentrací a vzít v úvahu všechny uvažované matrice.

#### Shrnutí:

- Validace a verifikace jsou nedílnou součástí správné laboratorní praxe v laboratoři. Validaci je nutné provést při zavádění nové analytické metody, verifikaci (tj. ověřování) při zavádění již existující metody.
- Validací se rozumí potvrzení platnosti vyhodnocením výkonnostních charakteristik postupu měření – selektivity, pracovního rozsahu a linearity, meze detekce, meze stanovitelnosti, pravdivosti, preciznosti, robustnosti a nejistoty měření.
- Validace se musí provést v takové šíři, jaká je třeba ke splnění požadavků na dané použití nebo oblast použití (různé matrice), vhodné je použít CRM nebo obohacené vzorky v dané matici.

- Všechny prvky validačního protokolu musí být zaznamenány a musí být součástí řízené dokumentace.

## **Literatura**

1. ČSN EN ISO/IEC 17025:2018: Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří.
2. TNI 01 0115:2009: Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM). ÚNMZ Praha, 2009.
3. KVALIMETRIE 18. Názvosloví analytického měření. Jak vyhovět požadavkům ISO 17025 na verifikaci metod. EURACHEM-ČR, Praha 2013.
4. KVALIMETRIE 20. Vhodnost analytických metod pro daný účel. EURACHEM-ČR, Praha 2015.
5. S.L.R. Ellison, V. Barwick, T.J.D. Farrant: Practical Statistics for Analytical Scientist, A Bench Guide, 2nd Ed. RSC, Cambridge, 2009. (ISBN 978-0-85404-131-2).

# 6 PŘÍSTROJE A DALŠÍ VYBAVENÍ ANALYTICKÉ LABORATOŘE

## 6.1 Úvod

V této kapitole se budeme zabývat vším, co je kromě chemikálií a dalších speciálních materiálů potřeba pro provádění analytického postupu. Bez instrumentace je moderní analytika nepředstavitelná, a to ať už se jedná o relativně jednoduché přístroje a vybavení až po sofistikovanou instrumentaci mnohdy řízenou počítačem. Je tedy logické, že stav používaných analytických měřicích přístrojů je významným faktorem ovlivňujícím kvalitu výsledků. Stanovit však univerzální postup péče o instrumentaci nejde, vzhledem k její různorodosti. Primární otázkou před prováděním analytických měření je prověřit, zda nástroje, které analytik má k dispozici – postup měření, instrumentace i softwarové vybavení – jsou vhodné pro daný účel, tj. fungují tak, jak očekává, tedy mají-li v konkrétním prostředí jeho laboratoře takové charakteristiky, výkonnostní parametry, že je možné s jejich pomocí provádět požadovaná analytická stanovení a že budou poskytovat výsledky očekávané kvality. Takové prověřování se nazývá validací. Validaci vlastního postupu analýzy musí předcházet nastavení – kalibrace instrumentace a validace používaného softwaru, která prověří, že výkonnostní parametry konkrétní přístrojové měřicí konfigurace v prostředí laboratoře jsou vhodné pro použití pro uvažované měření a zpracování dat.

Jak je podrobně rozvedeno v kapitole o návaznosti, zajištění metrologické návaznosti výsledků měření není v chemii realizováno jen kalibrací měřidel (tedy tak zvané analytické přístrojové koncovky). Chemická měření jsou takřka výhradně měření nepřímá, s často vlastním měření předcházejícím komplexním chemickým zpracováním vzorku. Zajištění návaznosti je tedy nutno v chemii vztahovat k celému měřicímu postupu, v němž přebírají úlohu etalonu (standardu) hlavně certifikované referenční materiály.

Způsob péče o přístroje a vybavení pro měření závisí u konkrétní položky přístrojů a vybavení na zodpovězení dvou obecných otázek:

1. Jak se má o položku pečovat?
2. Jak častá má být tato péče?

V analytické laboratoři do těchto odpovědí na rozdíl od jiných oblastí zasahuje jen výjimečně regulace, tedy existence právního předpisu, který tyto odpovědi stanovuje (proto se jedná o stanovená měřidla viz dále). Přesto je důležité vymezit, u které instrumentace a u kterého vybavení (v analytické laboratoři se může jednat o typicky se vyskytující základní položky) je způsob péče a její četnost stanovena a kde tato volba je v plné odpovědnosti laboratoře, a seznámit se s určitou terminologií.

## 6.2 Legální metrologie – stanovená měřidla a jejich ověřování

Zákonná národní úprava metrologie, daná v době vzniku tohoto dokumentu zákonem č. 505/1990 Sb. o metrologii, v platném znění, definuje kategorizaci měřidel (měřidly se míní všechny nástroje sloužící k určení hodnoty měřené veličiny) a předepisuje, zejména u stanovených měřidel, způsob zajištění metrologické návaznosti výsledků měření. Stanovená měřidla jsou měřidla, která Ministerstvo průmyslu a obchodu stanoví vyhláškou (v současnosti vyhláška MPO č. 345/2002 Sb. ve znění pozdějších předpisů) k povinnému ověřování s ohledem na jejich význam: v závazkových vztazích, například při prodeji, nájmu nebo darování věci, při poskytování služeb nebo při určení výše náhrady škody, popř. jiné majetkové újmy, pro stanovení sankcí, poplatků, tarifů a daní, pro ochranu zdraví, pro ochranu životního prostředí, pro bezpečnost při práci nebo při ochraně jiných veřejných zájmů chráněných zvláštními právními předpisy. Stanovenými měřidly jsou tedy ta, která stát podřídil regulaci v různém rozsahu, a to s ohledem na jejich společenský význam.

Úkonem nazývaným ověřením stanoveného měřidla se potvrzuje, že stanovené měřidlo má požadované metrologické vlastnosti, zpravidla stanovené tzv. Opatřením obecné povahy vydávaným Českým metrologickým institutem a dostupným na internetové adrese <https://www.cmi.cz/prirazeni%20OOP>. Ověřené stanovené měřidlo opatří Český metrologický institut nebo autorizované metrologické středisko úřední značkou nebo vydá ověřovací list, případně oboje. U nových měřidel se můžeme setkat i se značkami prvotního ověření (či ověřovacím listem) pocházejícími z jiného členského státu EU, ve kterém bylo měřidlo uvedeno na evropský trh, u některých měřidel též s označeními shody se směrnicemi EU. Aktuální a podrobnější informace o problematice ověřování stanovených měřidel lze nalézt na webových stránkách Českého metrologického institutu nebo částečně i v odkazu [1].

Z měřidel zastoupených ve zmíněné vyhlášce mohou být v chemické laboratoři nejčastěji stanoveným měřidlem, pokud se současně používají k účelům vyjmenovaným v zákoně o metrologii (viz předchozí odstavec), odměrné baňky, byrety a pipety a analytické váhy. U skleněného laboratorního nádobí je uvedena lhůta bez omezení, tedy po dobu životnosti, a patřičná předepsaná péče znamená tedy pouze vhodný nákup tohoto nádobí, při kterém je třeba dbát na to, aby budoucí uživatel pořídil provedení určené k použití v regulované oblasti (tedy prvotně ověřené) a zacházel s nádobím podle doporučení výrobce. Dalším typickým kandidátem na stanovené měřidlo jsou laboratorní analytické váhy, pokud jsou používány pro některý z účelů vyjmenovaných zákonem a uvedených výše. Jsou uvedeny v příslušné vyhlášce jako váhy s neautomatickou činností tř. I s lhůtou pro ověřování 2 roky. Tato lhůta se počítá od 1. ledna roku následujícího po roce, v němž bylo stanovené měřidlo ověřeno, a jehož poslední dvojčíslí je doplňkem úřední značky; v případě nových vah je dvojčíslí součástí doplňkového označení k označení shody. Výstupem ověření je konstatování shody se stanovenými požadavky prezentované umístěním úředních značek, a to v případě vah na několika „plombovacích“ místech, neboť jejich účelem je i zabezpečení měřidla proti nežádoucím vstupům. Výstup ověření tedy neobsahuje údaje o skutečných chybách měřidla a nejistotách, s jakými byly stanoveny, což však jsou údaje v analytické laboratoři nezbytné pro stanovení parametrů výsledků měření. Dosažení tohoto cíle je proto v současnosti možno řešit souběžným

provedením ověření (umístění úředních značek) a kalibrace (vydání kalibračního listu a případně umístění kalibrační značky), pro které se využijí tytéž zkoušky.

Naprostá většina instrumentace a dalšího vybavení analytických laboratoří nepatří do kategorie stanovených měřidel, ale dle terminologie zákona o metrologii do kategorie měřidel pracovních, a je tak odpovědností pracovníků laboratoře stanovit jednak vhodný způsob kalibrace a péče o tuto instrumentaci včetně softwarového vybavení, jednak frekvenci provádění těchto úkonů. Toto spolu s určením odpovědnosti jednotlivých pracovníků, evidencí měřidel (včetně referenčních materiálů) a schémat zajišťování metrologické návaznosti zachycují zejména akreditované laboratoře v dokumentaci svého systému managementu (někdy se tato část dokumentace nazývá metrologický řád laboratoře). Inventarizaci instrumentace a softwaru předepisuje i norma ČSN EN ISO/IEC 17025 [2] (obdobně i příslušná norma pro zdravotnické laboratoře) a uvádí, co a jak dokumentovat u přístrojové techniky. Pokyny pro stanovení kalibračních intervalů měřících přístrojů obsahuje dokument ILAC – G24:2007 a např. odkaz [3]. Další pojednání se tedy bude vztahovat k měřidlům pracovním, vzhledem k jejich dominanci v analytické laboratoři.

### 6.3 Kalibrace

Kalibrování přístroje nebo vybavení (např. odměrných pomůcek) představuje porovnání měřené veličiny s hodnotou reference. Abychom kalibrovali například odezvu spektrofotometru, vybereme vhodný referenční materiál a měříme za stanovených podmínek jeho odezvu a porovnáme naměřenou hodnotu s hodnotou uvedenou v literatuře. Někdy je zapotřebí několik měření, např. měření odezvy řady různých koncentrací. Z tohoto souboru výsledků lze sestavit kalibrační křivku (odezva proti koncentraci). Pak se měří odezva přístroje na neznámé množství a ke stanovení hodnoty neznámého množství se použije sestavená kalibrační křivka.

Proto chemické kalibrace dosahujeme dvěma cestami: za prvé použitím čistých chemických sloučenin, a za druhé použitím materiálů s typickou maticí, v nichž je množství přítomného analytu dostatečně určeno. Takové materiály jsou známy jako maticové referenční materiály. Při stanovení četnosti kalibrací používaného přístroje a rozsahu zadání kalibrace (počet a specifikace kalibračních bodů, požadovaná nejistota výsledků apod.) musí laboratoř zhodnotit dvě protichůdná hlediska. Nebezpečí, že měřicí zařízení, které se používá, přestane vyhovovat specifikaci a nebude vyhovovat pro daný účel, má být co nejmenší a současně, že náklady na kalibraci mají být minimální. Při volbě intervalu kalibrací, který nemusí být neměnný, by měla laboratoř zvážit doporučení výrobce, rozsah a náročnost používání, podmínky okolního prostředí (jedná-li se o mobilní jednotku – teplota, prašnost, vibrace, agresivní atmosféra, ...), přesnost požadovaných měření, údaje získané v předchozích záznamech o kalibracích a zaznamenaný průběh minulé údržby a servisu. Odpovědnost za to, že přístroj je správně používán a je ve vyhovujícím stavu, nese pracovník používající přístroj (event. pověřený pracovník) a jeho přímý nadřízený. V laboratořích se zavedeným systémem managementu musí být všechna měřidla vyžadující kalibraci označena tak, aby byl zřejmý stav kalibrace – datum, kdy měřidlo bylo kalibrováno a kdy končí platnost jeho

kalibrace. Obecně si musí laboratoř připravit pro každý přístroj plán kontrol výkonnosti, odůvodnit, proč jsou zapotřebí a uvést, jak se provádějí.

Kalibrace je nyní definována VIM3 [4] *jako činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony (standards) a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace*. Tato definice vyhovuje jak pro kalibraci přístroje používaného pro danou analýzu (tedy správné technické nastavení vlnové délky spektrofotometru nebo „naladění“ hmotnostního analyzátoru tandemových měřících technik), tak pro kalibraci analytickou, tedy celého analytického postupu jako každodenně opakovanou činnost zjištění nebo ověření charakteru závislosti mezi odezvou a koncentrací analytu znázorňovanou kalibrační křivkou.

Zajištění kalibrace analytické instrumentace a vybavení je možno řešit jako externí službu (prostřednictvím pracovišť Českého metrologického institutu, akreditovaných kalibračních laboratoří nebo servisu dodané instrumentace) nebo i vlastními prostředky, pokud je to technicky možné a laboratoř má k tomu prostředky a patřičně kvalifikovaný personál. Z pohledu akreditace se pak jedná o interní kalibrace. V případě, že zkušební laboratoř provádí interní kalibrace svých měřidel, měla by plnit technické požadavky jako kalibrační laboratoř, včetně pravidelné účasti ve vhodném mezilaboratorním porovnání. Kalibrace by se měla provádět podle dokumentovaných kalibračních postupů, měla by prokázat schopnost odhadnout nejistotu kalibrace a způsobilost pracovníků provádějících kalibrace by se měla prokazovat patřičným osvědčením.

## 6.4 Kvalifikace instrumentace

Z výše uvedeného víme, že, instrumentace analytické laboratoře má specifický charakter, na který se někdy obtížně aplikují obecné metrologické přístupy, často odvozené primárně pro přímá fyzikální měření. Typické přístrojové vybavení pro analytickou „koncovku“ je počítačem řízený přístrojový systém, který jak při instalaci, tak při údržbě vyžaduje speciální znalosti a nástroje, které analytik nemá. Je tedy nutností spolupráce dodavatele (výrobce, servisní organizace) a analytika. Vybavení nelze většinou někam odvézt a provést kalibraci a další úkony, jako je to typické u měření fyzikálních veličin.

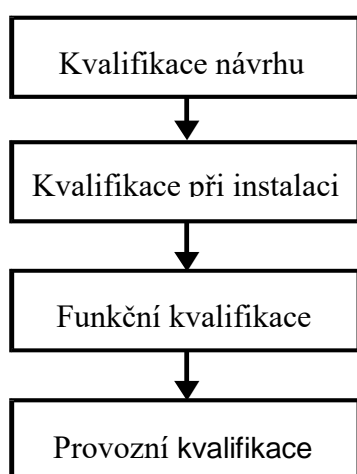
Proto zástupci analytické veřejnosti a předních výrobců analytické instrumentace vypracovali čtyřstupňové schéma péče o instrumentaci [5] speciálně vyvinuté pro tuto oblast – „Kvalifikace instrumentace“ (obr. 6.1). Toto schéma odráží typické etapy výběru instrumentace, její instalace, prokázání parametrů deklarovaných výrobcem a posouzení, zda je instrumentace v pořádku pro zamýšlenou analytickou aplikaci.

Tomu odpovídají jednotlivé etapy kvalifikace, které na sebe navazují:

1. **Kvalifikace návrhu (Design Qualification)** – definuje požadované funkční parametry přístroje a detaily postupu výběru dodavatele.
2. **Kvalifikace při instalaci (Installation Qualification)** – zahrnuje postupy instalace přístroje ve zvoleném prostředí. Potvrzuje, že přístroj byl v pořádku instalován a že vykazuje funkční schopnost ve zvoleném prostředí.

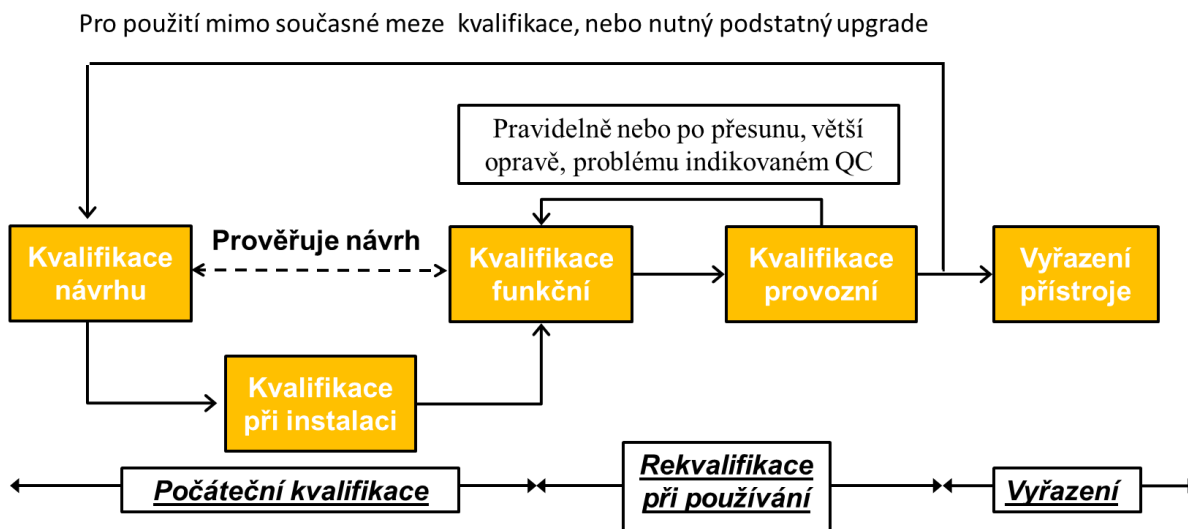
3. **Funkční kvalifikace (Operational Qualification)** – je proces, který demonstruje, že přístroj funguje a vykazuje parametry výkonnosti dle své specifikace v prostředí, ve kterém byl instalován.
4. **Provozní kvalifikace (Performance Qualification)** – je proces, který ověří, že přístroj spolehlivě funguje v souladu se svou specifikací při rutinním používání pro měření prováděná v laboratoři.

Toto schéma je hojně používáno jak výrobcí instrumentace, tak softwarového vybavení, v literatuře lze nalézt články zabývající se náplní jednotlivých kroků pro konkrétní typ analytické techniky. Vždy se doporučuje provést úkony funkční kvalifikace po návštěvě servisního technika. Někdy se tento model rozšiřuje na celkový životní cyklus instrumentace, včetně jejího vyřazení viz obrázek 6.2.



Obrázek 6.2 Kvalifikace instrumentace

Zejména v oblasti chromatografických technik se používá pojem *System suitability testing* – pro demonstraci celkové funkční způsobilosti analytického systému. Jedná se často o využití možností daných softwarovým vybavením, kdy i během vlastní analýzy lze prověřit, zda určité výkonnostní parametry měřicího systému (např. retenční čas, poměr S/N za definovaných podmínek, účinnost dělení jako počet teoretických pater nebo rozlišení dvou stanovených píků apod.) se pohybovaly během analýzy ve stanovených mezích.

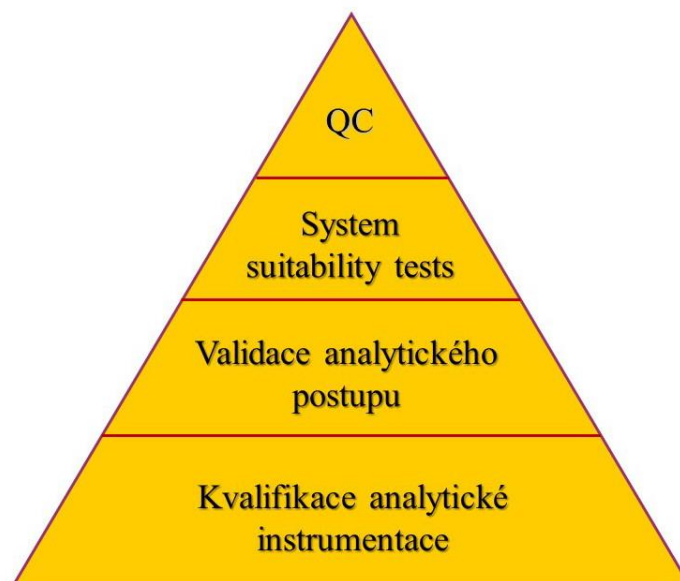


Obrázek 6.3 Životní cyklus instrumentace – 4Q model

## 6.5 Metrologická konfirmace a management měření

Pro úplnost je třeba podotknout, že norma ČSN EN ISO 10012 [6] používá pro péči o měřicí přístroje termín metrologická konfirmace. Definuje ji jako soubor činností požadovaných pro zajištění toho, aby měřicí vybavení bylo ve shodě s požadavky na jeho zamýšlené použití. Metrologická konfirmace obecně zahrnuje kalibraci a ověřování, jakékoli nezbytné seřízení nebo opravu a následnou rekvalifikaci, porovnání s metrologickými požadavky na zamýšlené použití vybavení, stejně jako jakékoli požadované zapečetění a označování štítkem. Jak je vidět, konfirmace je tím nejširším pojmem péče o měřicí vybavení, používá se v těch případech, kdy nelze přiměřeně použít termín kalibrace nebo zahrnuje-li jak kalibraci tak i další úkony, které se provádějí např. s elektrickými měřicími přístroji.

Významnou součástí managementu měření je posouzení potřeby, rozsahu a četnosti případných „mezilhůtových kontrol“ k průběžnému zjednodušenému potvrzení, že měřidlo se významně neuchýlilo mimo rámec specifikací. Zejména v oblasti stopových a ultrastopových analýz s využitím např. GC, HPLC, GC/MS a LC/MS je nutné brát v úvahu vývoj stavu analytického měřicího systému. Často se přístroje používají na hranici svých schopností. Za těchto okolností je pravděpodobné, že je jejich výkonnost nižší než ve středu pracovního rozpětí. Pravidelné a častější kontroly systému jsou pak nezbytností. Vlastní kontrolu lze provádět nástroji řízení kvality (QC) – typicky kontrolními vzorky jako prověrku výkonnosti celého měřicího analytického postupu nebo u některých analytických technik (např. hmotnostní spektrometrie) pomocí testovacích látek a postupů navržených speciálně k prověření technického nastavení dané instrumentace. Pokud jsou takovéto zkoušky-testování prováděny v pravidelných intervalech, je možné jejich výsledky a trendy výhodně vyhodnocovat pomocí vhodných typů regulačních diagramů. Hierarchii prověřování správné funkčnosti instrumentace znázorňuje obrázek 6.4.



Obrázek 6.4 Hierarchie nástrojů prověrky analytické instrumentace (podle odkazu [7])

## 6.6 Validace softwaru

U počítačových systémů spojených s analytickou instrumentací se očekává, že uživatel má počítačový systém pod kontrolou, systém otestoval a je schopen doložit, že má požadovanou funkčnost. Souhrnně je možno konstatovat, že pro tuto specifickou oblast neexistují standardní pravidla, přestože v rámci různých systémů managementu (ISO/IEC 17025, ISO 15189, GLP, GMP, GCP) byly formulovány dokumenty zabývající se tímto tématem. Je to důsledek rychlého vývoje této technické oblasti, kdy pracně vytvořené konsenzuální dokumenty jsou zastaralé již při svém vzniku.

Uživatel by však měl v každém případě

- mít počítačový systém pod kontrolou,
- formulovat požadovanou činnost, kterou má systém vykonávat,
- prověřit systém (formou kvalifikace při instalaci, funkčnost a při vlastním provozu),
- stanovit postupy údržby a zabezpečení změn.

V současné době se používaný software rozděluje do několika kategorií podle rizik, která jeho používání přináší, a tomu odpovídá i rozsah validace, která by před jeho použitím měla být v laboratoři provedena, viz např. [8,9]. Komerční běžně dostupný software (např. textový editor, tabulkový procesor), obecně používaný v rámci navrhovaného rozsahu jeho použití, lze považovat za dostatečně validovaný [2]. Komerční přístrojový software se považuje buď za validovaný výrobcem nebo dodavatelem instrumentace nebo se většinou jeho validace prověřuje v rámci celkové validace používaného analytického postupu v laboratoři.

## Shrnutí

- Péče o instrumentaci a další vybavení analytické laboratoře je jedním ze stěžejních vlivů jak zajistit kvalitu analytických výsledků.
- U převážné části instrumentace a vybavení analytické laboratoře je její odpovědností určit a zdokumentovat způsob péče a kalibrace těchto položek a četnost těchto úkonů. Pro tento účel laboratoř vychází především z informací dodaných výrobcem a způsobu použití.
- Mohou existovat i položky instrumentace a vybavení analytické laboratoře, které dle zákonných předpisů jsou charakterem a způsobem užití klasifikovány jako stanovená měřidla, například analytické váhy, odměrné nádoby i jiné. U nich zákonné předpisy a navazující dokumenty stanovují způsob péče a její četnost.
- Vzhledem ke specifické instrumentaci v analytické laboratoři se používá několikastupňový systém kvalifikace instrumentace, popisující opatření pro zajištění správné funkčnosti instrumentace od nákupu až k použití pro konkrétní analytický postup.
- U počítačových systémů spojených s analytickou instrumentací se očekává, že uživatel má počítačový systém pod kontrolou. Komerční běžně dostupný software, obecně používaný v rámci navrhovaného rozsahu jeho použití, se považuje za dostatečně validovaný.

## Literatura:

1. Metodický list 11 - Přístroje a další vybavení analytické laboratoře. EURACHEM-ČR 2014. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>.
2. ČSN EN ISO/IEC 17025:2018 Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří.
3. F. Jelínek: *Stanovování kalibračních intervalů*. Metrologie **21**(4), 18-21 (2012).
4. TNI 01 0115:2009 Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
5. P. Bedson, M. Sargent: *The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments*. Accred. Qual. Assur. **1**, 265 (1996).
6. ČSN EN ISO 10012: 2003. Systém managementu měření – Požadavky na proces měření a měřicí zařízení.
7. AMC Technical Brief No. 28: Using analytical instruments and systems in a regulated environment. Analytical Methods Committee, Royal Society of Chemistry 2007. ([www.rsc.org](http://www.rsc.org)).
8. *Pokyny pro management počítačů a softwaru v laboratořích se zřetelem k normě ISO/IEC 17025:2005*. EUROLAB Technická zpráva č. 2/2006. <http://www.eurolabcz.cz/data/dokumenty/EUROLABTZ2.pdf>, <http://www.4e.cz/dokumenty.htm>
9. *General Principles of Software Validation; Final Guidance for Industry and FDA Staff*. FDA 2002. <https://www.fda.gov/downloads/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm085371.pdf>

# 7 NEJISTOTA MĚŘENÍ

## 7.1 Úvod

Nejistota měření patří spolu s metrologickou návazností a validací postupu měření mezi tři základní pilíře zabezpečení kvality výsledků zkoušek. Její vyhodnocení není rutinní prací ani čistě matematickou záležitostí, ale závisí na detailní znalosti podstaty měřené veličiny, použité metody či metod a postupu měření. Kvalita a užitečnost nejistoty uváděné s výsledkem měření tedy zásadně závisí na pochopení, kritické analýze a souladu všech těch, kteří se podílejí na určení její hodnoty.

**Nejistota měření** poskytuje kvantitativní údaj o kvalitě výsledku měření. Základním předpokladem použití nejistoty měření je kvantitativní odhad její velikosti podle jednotné metodiky platné pro všechny obory měření. Její definice podle VIM 3 [1] zní „*nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace*“.

Definice je doplněna 4 poznámkami:

POZNÁMKA 1. Nejistota měření zahrnuje složky pocházející ze systematických vlivů, jako například složky související s korekcemi a přidělenými hodnotami veličiny etalonů, stejně jako definiční nejistotu. Někdy nejsou odhadnuté systematické vlivy korigovány, ale místo toho jsou začleněny jako složky přidružené nejistoty měření.

POZNÁMKA 2. Parametrem může být např. směrodatná odchylka nazvaná standardní nejistota měření (nebo její specifikovaný násobek), nebo polovina šířky intervalu, který má stanovenou pravděpodobnost pokrytí.

POZNÁMKA 3. Nejistota měření obecně sestává z mnoha složek. Některé z těchto složek smějí být vyhodnoceny vyhodnocením nejistoty měření způsobem A ze statistického rozdělení hodnot veličiny z řady měření a mohou být charakterizovány směrodatnými odchylkami. Jiné složky, které smějí být vyhodnoceny vyhodnocením nejistoty měření způsobem B, mohou být také charakterizovány směrodatnými odchylkami vypočtenými z funkcí hustoty pravděpodobností založených na zkušenosti nebo jiné informaci.

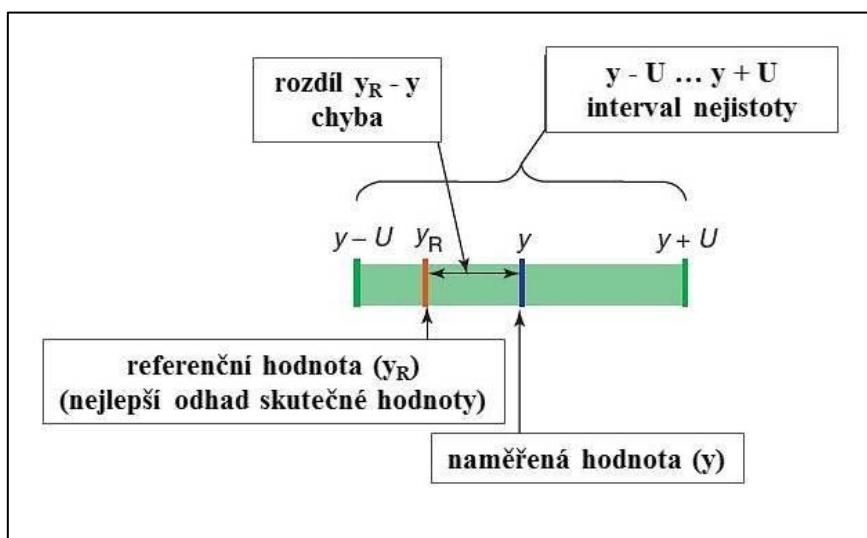
POZNÁMKA 4. Obecně se pro daný soubor informací předpokládá, že nejistota měření je přidružena ke stanovené hodnotě veličiny přiřazené k měřené veličině. Modifikace této hodnoty má za následek modifikaci přidružené nejistoty.

Nejistota je tedy parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, jež by mohly být důvodně prisuzovány měřené veličině. Parametrem může být směrodatná odchylka, její násobek nebo polovina šířky konfidenčního intervalu (intervalu spolehlivosti). Nejistota se obecně skládá z celé řady složek, proto je nezbytné uvést, co bylo použito při jejím odhadu. To neznamená, že můžeme vybrat, které složky zahrneme a které ne. Výsledek měření se skládá ze dvou kvantitativních částí: 1. naměřené hodnoty veličiny, často v podobě průměru nebo mediánu z jednotlivých měření; a 2. nejistoty měření.

Pokud je uváděn výsledek zahrnující i nejistotu, může být udán ve formátu (hodnota  $\pm$  nejistota) s jednotkami. Např.  $(5,5 \pm 0,5)$  ml odpovídá intervalu 5,0-6,0 ml. Nejistotu lze

interpretovat jako interval, ve kterém předpokládáme, že leží pravá hodnota měřené veličiny.

Důležité je rozlišovat mezi chybou a nejistotou (obr. 7.1). **Chyba** je definována jako *měřená hodnota veličiny mínus referenční hodnota veličiny* [1], tedy rozdíl mezi jednotlivým výsledkem a skutečnou hodnotou měřené veličiny. V praxi je pozorovaná chyba měření dána rozdílem mezi pozorovanou a referenční hodnotou. Jako taková – ať již teoretická či pozorovaná – má chyba diskrétní hodnotu. Nejistota má na druhé straně podobu rozsahu nebo intervalu a může se vztahovat ke všem stanovením, jestliže byla odhadnuta pro daný analytický postup a definovaný typ vzorku. Hodnota nejistoty nemůže být obecně použita ke korekci výsledku měření.



Obrázek 7.1. Vztah mezi měřenou hodnotou  $y$  s udanou nejistotou a referenční hodnotou

Původně vycházelo vyhodnocení nejistoty měření z předpokladu, že se při měření uplatňují pouze náhodné chyby, např. malé rozdíly při opakovaném odměřování objemu pipetou. Takto odhadnutá variabilita (ve formě konfidenčního intervalu průměrné hodnoty) neodráží všechny vlivy, které se v měřicím procesu uplatňují. Proto je třeba při vyhodnocování nejistoty vzít v úvahu i systematické vlivy, které způsobují odchýlení výsledků od pravé hodnoty vždy jedním směrem (např. chemikálie použitá pro přípravu standardu nemá předpokládanou čistotu). Někdy je možné systematické vlivy korigovat, tím odstranit nebo výrazně snížit systematickou chybu a také její příspěvek do nejistoty měření.

Nejistotou měření se zabývá i norma ČSN EN ISO 17025:2018, která v odstavci 7.6.3 uvádí: *Laboratoř provádějící zkoušení musí vyhodnocovat nejistoty měření. Tam, kde zkušební metoda neumožňuje rigorosní vyhodnocení nejistoty měření, musí se provést odhad na základě pochopení teoretických principů metody nebo praktických zkušeností z provádění dané zkušební metody.*

K odstavci je připojena poznámka 2, ze které je zřejmé, že nejistotu obvykle u rutinních analýz nevyhodnocujeme pro každý vzorek, ale pro danou stabilní konfiguraci měřicího systému (měřicí postup) a získaný odhad přiřazujeme každému výsledku.

*POZNÁMKA 2 U konkrétních metod, u kterých nejistota výsledků měření byla stanovena a ověřena, není třeba vyhodnocovat nejistotu měření pro každý výsledek, pokud laboratoř může prokázat, že identifikované kritické ovlivňující faktory jsou pod kontrolou.*

Pokud je nejistota měření vyjádřena jako směrodatná odchylka, nazýváme ji **standardní nejistotou** pro veličinu  $x_i$  a označujeme ji  $u(x_i)$ . Základním dokumentem popisujícím obecně způsoby vyhodnocení nejistoty měření nejen v chemických laboratořích je Pokyn ISO pro vyjádření nejistoty měření z roku 1995, tzv. GUM (z anglického Guide to the expression of uncertainty in measurement) [2]. Tento pokyn uvádí dva rozdílné způsoby vyhodnocení nejistoty. **Vyhodnocení způsobem A** používá statistickou analýzu opakovaných měření a **vyhodnocení způsobem B** používá jinou metodu. Například směrodatná odchylka vypočítaná z výsledků opakovaných měření jednoho vzorku (položky zkoušení) je příkladem vyhodnocení způsobem A. Použití nejistoty uvedené u certifikované hodnoty referenčního materiálu sloužícího ke kalibraci je příkladem vyhodnocení způsobem B. Nejdůležitějším bodem týkajícím se nejistoty vyhodnocené způsobem A či B je skutečnost, že bez ohledu na použitý způsob se při dalších výpočtech s nejistotami pracuje stejně, jsou převedeny na standardní nejistoty a kombinovány patřičným způsobem. Specifika chemických měření si vyžádala příručku, která by laboratořím usnadnila interpretaci ISO GUM v oblasti chemických měření. Její třetí vydání vyšlo v češtině jako KVALIMETRIE 19 [3].

## 7.2 Principy ISO GUM pro vyjadřování nejistoty měření

Základní kroky při vyhodnocení nejistoty měření lze popsat následovně [3]:

1. Specifikace měřené veličiny (jasný popis toho, co se bude měřit)
2. Identifikace zdrojů nejistoty (dle postupu měření a rovnice měření)
3. Kvantifikace složek nejistoty
4. Výpočet kombinované standardní nejistoty  $u_c(y)$  a rozšířené nejistoty  $U$

V následujícím textu se na jednotlivé kroky podíváme podrobněji.

### 7.2.1 Specifikace měřené veličiny

Měřenou veličinou je obvykle koncentrace studovaného analytu. Obvykle je důležité vyjasnit si, jestli studovanou veličinou je celkové množství analytu přítomného ve vzorku, nebo množství extrahované za použití specifikovaného postupu (např. je rozdíl mezi celkovým množstvím a extrahovatelným množstvím kadmia ve vzorku). Stejně tak je důležité, zda se výsledek má vztahovat pouze na laboratorní vzorek, nebo na větší sérii vzorků či plochu (např. sedimenty v přehradě). V takových případech je třeba zahrnout do vyhodnocování nejistoty i vlivy vzorkování, viz kapitola 10.

## 7.2.2 Identifikace zdrojů nejistoty

Většina analytických výsledků se vypočítá z jiných veličin, jako jsou hmotnost, objem, koncentrace či plocha píku. Začínáme tím, že si napíšeme rovnici použitou pro výpočet výsledku. Pokud najdeme další důležité vlivy, přidáme je do rovnice. Je-li například specifikován čas extrakce, který může ovlivnit výsledek, přidáme člen rozdíl od definovaného času extrakce. Tyto členy mohou být aditivní, anebo pokud vzorec zahrnuje násobení a dělení, mohou mít násobící efekt. V praxi dáváme těmto členům hodnotu 0 v případě aditivního vlivu nebo 1 v případě násobícího vlivu. Důležité však je, že započítáváme jejich nejistotu do celkové bilance. Tento celkový vzorec nazýváme rovnice měření a obecně jej píšeme

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n), \quad (7.1)$$

kde  $x_1, x_2, \dots$  jsou jednoduše veličiny ovlivňující výsledek  $y$  a  $f(\ )$  znázorňuje rovnici nebo funkci mezi těmito veličinami. Například, představme si, že chceme zjistit hustotu ethanolu  $\rho_{EtOH}$  při 25 °C zvážením známého objemu  $V$  ve vhodné odměrné nádobě uchovávané při 25 °C. Pro jednoduchost předpokládejme, že hustotu počítáme z čisté hmotnosti ethanolu  $m_{EtOH}$ , což běžně zahrnuje dvě vážení, ale pro zjednodušení budeme počítat pouze s čistou hmotností ethanolu, tedy rozdílem plné a prázdné odměrné nádoby. Předpokládejme také, že do odhadu nejistoty měření chceme zahrnout i preciznost, a proto provedeme několik opakovaných doplnění odměrné nádoby a zaznamenáme teplotu při každém vážení. Hustotu pak vypočítáme z rovnice 7.2:

$$\rho_{EtOH} = m_{EtOH}/V \quad (7.2)$$

Pro názornost budeme dále uvažovat pouze tři vlivy: kalibraci zařízení, teplotu kapaliny a preciznost stanovení. Kalibrace zařízení pro vážení a odměřování objemu v principu zahrnuje korekci nominálního objemu nebo indikované hmotnosti, tedy pro hmotnost malou aditivní korekci  $\delta_m$  a pro objem  $\delta_v$ . V běžné analytické praxi se tyto korekce obvykle neprovádí, protože se předpokládá, že jsou zanedbatelné a zahrnuté v nejistotě uvedené v kalibračním certifikátu. Pokud je třeba korekci zahrnout, není nutné měnit rovnici (7.2), kalibrační nejistoty hmotnosti a objemu se pouze zahrnou do rovnice (7.2). Je ale známo, že teplota může výsledek ovlivnit. Mohli bychom zahrnout jednoduchý násobící faktor, abychom zahrnuli vliv teploty. V tomto případě však známe přibližný vliv změny teploty na hustotu a víme, že zahrnuje koeficient tepelné roztažnosti ethanolu  $\alpha_{EtOH}$ . Rovnice (7.2) se pak změní

$$\rho_{EtOH} = m_{EtOH}/V / [1 - (t - 25) \alpha_{EtOH}], \quad (7.3)$$

kde  $t$  je aktuální teplota kapaliny ve °C. Očekáváme, že měření je prováděno při 25 °C, takže výsledek hustoty se nezmění, ale nejistota spojená s měřením teploty (zahrnující nejistotu teplotní kalibrace) může být zahrnuta do rozšířené podoby funkce měření (rovn. 7.3). Doposud jsme nezvažovali celkovou preciznost měření. V principu bychom mohli zahrnout preciznost měření hmotnosti, objemu a teploty do odhadované nejistoty pro každý z členů. Vzhledem k tomu, že chceme použít pozorovanou nejistotu měření, nebylo by to praktické. Místo toho rozšíříme rovnici 7.3 o člen popisující náhodnou variabilitu měření hustoty

$$\rho_{EtOH} = m_{EtOH}/V / [1 - (t - 25) \alpha_{EtOH}] + e_{\rho} \quad (7.4)$$

přičemž očekávaná hodnota  $e_{\rho}$  je nula, ale bude mít standardní nejistotu rovnou pozorované směrodatné odchylce z provedených opakovaných měření. Rozšířená rovnice (7.4) nyní ukazuje, jak jednotlivé složky nejistoty mohou ovlivnit celkový výsledek. Získali jsme funkci měření, kterou můžeme použít pro odhad nejistoty.

Mezi typické zdroje nejistoty patří:

- vzorkování,
- podmínky a doba skladování,
- vlivy přístrojů (meze přesnosti, kalibrace vah, regulace teploty),
- čistota chemikálií,
- uvažovaná stechiometrie (odchylky od předpokládané stechiometrie reakce),
- podmínky měření (např. vliv teploty při práci s odměrným sklem),
- vlivy vzorku (matrice, výtěžnost),
- vlivy výpočtu (volba kalibračního modelu, zaokrouhlování mezivýsledků),
- vlivy operátora,
- korekce na slepý pokus,
- náhodné vlivy.

Vhodným nástrojem pro grafické znázornění jednotlivých uvažovaných vlivů je **Ishikawův diagram**. Jedná se o jednoduchý grafický nástroj nazývaný též diagram příčin a následků nebo diagram rybí kost (fishbone) pro jeho vzhled, a ukázka je uvedena dále v textu, obr. 7.3.

### 7.2.3 Kvantifikace složek nejistoty

Dalším krokem je kvantifikování nejistoty z identifikovaných zdrojů. Toho lze dosáhnout [3]:

- Vyhodnocením nejistot pocházejících z každého jednotlivého zdroje a dále jejich sloučením. Tento přístup se také označuje „zdola nahoru“, přístup modelováním nebo složka po složce. Je založen na komplexním matematickém modelu postupu měření, kdy každý příspěvek k nejistotě se váže na určenou vstupní veličinu. Příspěvky k nejistotě se vyhodnocují jednotlivě a pak se slučují.
- Přímým stanovením kombinovaných příspěvků nejistoty výsledku z některých nebo ze všech zdrojů s využitím údajů o výkonnosti. Tento přístup bývá označován jako empirický nebo „shora dolů“. Využívají se údaje z validační studie (hlavně preciznost a vychýlení), z dlouhodobého sledování preciznosti postupu pomocí regulačních diagramů, z účasti laboratoře v mezilaboratorních porovnáních nebo mezilaboratorních validačních studií.

V praxi je obvykle výhodné oba přístupy kombinovat.

### Přístup „zdola nahoru“

Opakovaná pozorování (měření) lze využít k výpočtu směrodatných odchylek, které lze obvykle použít přímo jako odhad nejistoty (vyhodnocení typu A). Nicméně pro vyhodnocování typu B jsou obvykle používány informace v jiné podobě. Např. informace o nejistotě v kalibračních certifikátech nebo tolerance od výrobce se obvykle uvádějí v podobě limitů nebo intervalů spolehlivosti. Pro převod těchto údajů na standardní nejistotu  $u$  se používají následující pravidla:

- Směrodatná odchylka  $s$  z  $n$  pozorování, která jsou průměrována tak, aby poskytla střední hodnotu nebo pokud je výsledek převedený na standardní nejistotu střední hodnoty, což je směrodatná odchylka průměru, kterou získáme dělením směrodatné odchylky odmocninou z  $n$ , tedy  $s/\sqrt{n}$ .
- Nejistota příslušející náhodným změnám pro jedno pozorování musí být získána ze standardní nejistoty pro podobný materiál nebo z preciznosti během validační studie. Například pokud validace poskytne relativní směrodatnou odchylku  $s^*$ , nejistota jedné hodnoty  $x$  je vzhledem k náhodným změnám  $x \cdot s^*$ .
- Pro toleranci  $x \pm a$  je  $u_x = a/\sqrt{3}$ . Tento vztah je důsledkem předpokládaného rovnoměrného rozdělení, viz kapitola 11. Za předpokladu, že hodnoty leží s větší pravděpodobností blízko  $x$ , doporučuje GUM použít trojúhelníkové rozdělení a standardní nejistota se pak vypočítá  $u_x = a/\sqrt{6}$ .
- V případě intervalu spolehlivosti  $x \pm d$  vypočítaného s použitím oboustranného Studentova  $t$  rozdělení, se standardní nejistota vypočte  $u_x = d/t$ . V případě, že neznáme počet stupňů volnosti pro výpočet intervalu spolehlivosti, lze v případě 95 % intervalu spolehlivosti použít  $t = 1,96$  pro nekonečný počet stupňů volnosti.
- Pokud je uvedena rozšířená nejistota  $U$  ve formě  $x \pm U$ , získáme standardní nejistotu dělením koeficientem rozšíření, tedy  $u_x = U/k$ . Pokud není koeficient rozšíření znám, obvykle používáme  $k = 2$ .

Tato pravidla jsou shrnuta v tabulce 7.1. Statistické základy k jednotlivým pravděpodobnostním rozdělením jsou uvedeny v kapitole 11.

### **Příklady [4]:**

1. Čtyři výsledky stanovení aflatoxinu v potravině (2,1; 1,9; 2,2; 2,2 mg kg<sup>-1</sup>) jsou průměrovány a poskytly průměrnou hodnotu 2,10 mg kg<sup>-1</sup>. Směrodatná odchylka je 0,14 mg kg<sup>-1</sup>. Vzhledem k tomu, že výsledek je uváděn ve formě průměru, standardní nejistota je  $0,14/\sqrt{4} = 0,07$  mg kg<sup>-1</sup>.
2. Stupnice teploměru je dělena po celých °C, takže odečítání k nejbližšímu stupni bude vždy správné na  $\pm 0,5$  °C. To představuje rovnoměrné rozdělení, kde  $a = 0,5$  °C. Standardní nejistota přidružená k odečítání teploty z teploměru bude  $u = 0,5/\sqrt{3} = 0,29$  °C.
3. Certifikovaný kalibrační roztok má obsah olova 1000 mg l<sup>-1</sup> s 95% intervalem spolehlivosti  $1000 \pm 3$  mg l<sup>-1</sup>. Počet stupňů volnosti není uveden, standardní nejistota (za předpokladu nekonečného počtu stupňů volnosti) je  $3/1,96 = 1,53$  mg l<sup>-1</sup>.

Tabulka 7.1 Způsoby převodu údajů na standardní nejistotu [4]

Informace	Předpokládané rozdělení	Standardní nejistota
Směrodatná odchylka $s$ z opakovaných měření	normální	$s/\sqrt{n}$ , kde $n$ je počet opakování
Tolerance $x \pm a$ , neočekáváme s větší pravděpodobností hodnoty blízko $x$	rovnoměrné	$a/\sqrt{3}$
Tolerance $x \pm a$ , očekáváme s větší pravděpodobností hodnoty blízko $x$	Trojúhelníkové	$a/\sqrt{6}$
Interval spolehlivosti $x \pm d$ , pouze hladina spolehlivosti $1-\alpha$ je známa	normální	$d/z$ , kde $z$ je kvantil normálního rozdělení, pro $1-\alpha = 95\%$ je $z = 1,96$
Interval spolehlivosti $x \pm d$ , počet stupňů volnosti a hladina spolehlivosti $1-\alpha$ jsou známy	Studentovo $t$	$d/t$ , kde $t$ je hodnota Studentova rozdělení
Rozšířená nejistota $U$ s koeficientem rozšíření $k$	normální	$U/k$

### Přístup „shora dolů“

Stručně si představíme několik postupů, které se označují jako postupy shora dolů a patří v praxi chemických měření mezi hlavní nástroj vyhodnocování nejistot. Vycházejí z údajů, které jsou v laboratoři k dispozici. Lze je rozdělit do dvou skupin:

1. vnitrolaboratorní:
  - a) použití údajů z validační studie, kde se poměrně často používá analýza certifikovaných referenčních materiálů a nejistotu měření získáme propagováním údajů o pravdivosti (vychýlení) a preciznosti,
  - b) kombinace údajů z validační studie spolu s údaji o řízení kvality (např. z regulačních diagramů).
2. mezilaboratorní:
  - a) postup s použitím dat z mezilaboratorních zkoumání výkonnosti postupu měření (např. preciznost podle ISO 5725 a nejistota z vychýlení dalších faktorů nezohledněných v mezilaboratorním porovnávání podle ISO TS 21748),
  - b) postup s využitím údajů z mezilaboratorních zkoušení způsobilosti.

V některých nových normách ISO je uváděna nejistota měření přímo v normě. Laboratoři pak stačí prokázat, že její nejistota je obdobně velká nebo menší než hodnota uvedená v normě. V mnoha normách je uvedena hodnota směrodatné odchylky reprodukovatelnosti získaná mezilaboratorním porovnáním podle ISO 5725 a tuto směrodatnou odchylku lze použít jako odhad standardní nejistoty (podle ISO/TS 21748). Nicméně každá laboratoř musí provést odhad své vlastní nejistoty měření. Pro laboratoře, které měřicí postup rutinně používají, lze doporučit přístup s využitím dat z vnitrolaboratorní validace nebo kombinování údajů o mezilehlé preciznosti (někdy označované jako vnitrolaboratorní reprodukovatelnost) z interního řízení kvality a údajů o vychýlení získaných z výsledků zkoušení způsobilosti nebo v průběhu validace.

## 7.2.4 Výpočet kombinované a rozšířené nejistoty

### Výpočet kombinované nejistoty

Pokyn ISO GUM kombinuje standardní nejistoty s využitím zákona o propagaci, který se ve statistice běžně používá pro kombinování rozptylů. Obecným vztahem mezi **kombinovanou standardní nejistotou**  $u_c(y)$  hodnoty  $y$  a nejistotami navzájem nezávislých parametrů  $x_1, x_2, \dots, x_n$  na nichž závisí, uvádí rovnice (7.5)

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2}, \quad (7.5)$$

kde  $y(x_1, x_2, \dots)$  je funkcí několika proměnných  $x_1, x_2, \dots$ ,  $c_i$  je citlivostní koeficient vypočtený jako  $c_i = \partial y / \partial x_i$ , parciální diferenciál  $y$  podle  $x_i$ , a  $u(y, x_i)$  je nejistota  $y$  pocházející z nejistoty  $x_i$ . Příspěvek každé proměnné  $u(y, x_i)$  je pak čtvercem přidružené nejistoty vyjádřené ve formě směrodatné odchylky násobený čtvercem příslušného citlivostního koeficientu. Tyto citlivostní koeficienty vyjadřují, jak se mění hodnota  $y$  se změnou parametrů  $x_1, x_2$  atd.

Pro úplnost uvedme, že pokud nejsou proměnné nezávislé, je vztah složitější (rovn. 7.6):

$$u(y(x_i, x_j, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2 + \sum_{\substack{i, k=1, n \\ i \neq k}} c_i c_k \cdot u(x_i, x_k)}, \quad (7.6)$$

ve které  $u(x_i, x_k)$  je kovariance mezi  $x_i$  a  $x_k$ , a  $c_i$  a  $c_k$  jsou citlivostní koeficienty.

V některých případech se obecné výrazy pro kombinování nejistot redukuje do mnohem jednodušší formy. Uvádíme dvě jednoduchá pravidla pro slučování nejistot.

Pravidlo 1 pro modely, které zahrnují pouze sčítání nebo rozdíl veličin, například  $y = (p + q - r + \dots)$ , je kombinovaná nejistota  $u_c(y)$  dána (rovn. 7.7):

$$u_c(y) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + u(r)^2 + \dots} \quad (7.7)$$

Pravidlo 2 pro modely, které zahrnují pouze součin či podíl, např.  $y = (p \cdot q \cdot r \dots)$  nebo  $y = p / (q \cdot r \dots)$ , je kombinovaná standardní nejistota  $u_c(y)$  popsána rovnicí 7.8:

$$u_c(y) = y \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2 + \dots}, \quad (7.8)$$

kde  $(u(p)/p)$  atd. jsou nejistoty parametrů vyjádřené jako relativní směrodatné odchylky.

S odečítáním se zachází stejně jako se sčítáním a podobně s dělením stejně jako s násobením. Pravidlo 1 vyjádřené graficky není nic jiného než Pythagorova věta.

### Příklady:

1. Metoda požaduje 100 mg vnitřního standardu, který se váží na čtyřmístných analytických vahách. Kalibrační certifikát poskytuje údaj o standardní nejistotě 0,0002 g. Tento údaj nezahrnuje preciznost pro opakované vážení. Proto bylo několikrát zváženo 100 mg závaží a vypočtena směrodatná odchylka 0,000071 g, kterou lze použít přímo jako odhad standardní nejistoty přidružené preciznosti vážení. Máme tedy dva příspěvky přispívající svou nejistotou aditivně k celkové nejistotě vážení, proto použijeme pravidlo 1 kombinující absolutní nejistoty. Kombinovaná standardní nejistota vážení  $u_c(m)$  je proto

$$u_c(m) = \sqrt{0,0002^2 + 0,000071^2} = 0,00021 \text{ g}$$

2. Nominální koncentrace roztoku organické látky má být 1000 mg l<sup>-1</sup> a je vypočtena z hmotnosti analytu  $m$  a objemu odměrné baňky  $V$  použité pro přípravu roztoku standardu. Koncentraci vypočítáme ze vztahu  $c = 1000 \cdot m/V$  (pro jednoduchost zanedbáváme nejistotu molekulové hmotnosti organické látky). Bylo naváženo 100,4 mg látky se standardní nejistotou 0,21 mg a byla použita 100 ml odměrná baňka se standardní nejistotou 0,16 ml. Protože se ve vztahu jedná o násobení a dělení, použijeme pravidlo 2 kombinující relativní nejistoty. Kombinovanou standardní nejistotu koncentrace  $u_c(c)$  vypočteme následovně:

$$\frac{u_c(c)}{c} = \sqrt{\left(\frac{0,21}{100,4}\right)^2 + \left(\frac{0,16}{100}\right)^2} = 0,0026$$

a protože koncentrace  $c = 1000 \cdot 100,4/100 = 1004 \text{ mg l}^{-1}$ , je  $u_c(c) = 0,0026 \cdot 1004 = 2,6 \text{ mg l}^{-1}$ .

Pro výpočet kombinované nejistoty složitých modelů měření lze provést výpočet popsany Kragtenem s využitím běžně dostupného tabulkového procesoru (např. Microsoft Excel), ten je včetně příkladu popsán v kapitole 11 nebo pomocí simulační metody Monte-Carlo. Podrobnosti o metodě Monte-Carlo lze nalézt v KVALIMETRII 19 [3].

### Výpočet rozšířené nejistoty

Obvykle se s výsledkem uvádí **rozšířená nejistota**  $U$ , definovaná ve VIM 3 jako *součin kombinované standardní nejistoty měření a koeficientu většího než číslo 1*. Rozšířená nejistota poskytuje interval, ve kterém s vysokou mírou spolehlivosti leží hodnota měřené veličiny. Hodnotu  $U$  získáme vynásobením kombinované standardní nejistoty měření  $u_c(y)$  koeficientem rozšíření  $k$ , tedy  $U = k \cdot u_c$ . Volba koeficientu  $k$  vychází z požadované konfidenční úrovně, pro 95% úroveň je  $k = 2$ . Pokyn ISO GUM pro případy náročných měření doporučuje používat efektivní počet stupňů volnosti a místo  $k = 2$  příslušnou hodnotu Studentova  $t$ . Obecně pro veličinu  $Y$  se výsledek uvádí  $Y = y \pm U$ , přičemž údaj za  $\pm$  je právě rozšířená nejistota, což je třeba pro jednoznačnost uvést. Některé laboratoře zavedly udávání nejistoty relativně v procentech. V praxi je pouze zřídka prospěšné uvádět nejistotu na více než 2 platné číslice. Výsledek se pak také patřičně zaokrouhlí v souladu s udávanou nejistotou.

Závěrem je vhodné poznamenat, že pro většinu instrumentálních metod je nejistota úměrná koncentraci, a proto se obvykle pro koncentrace dostatečně vysoko nad mezí stanovitelnosti (LOQ) uvádí **relativní nejistota** v procentech, zatímco na úrovni LOQ je vhodnější uvádět **absolutní nejistotu**, tedy v jednotkách koncentrace.

#### **Příklad:**

Koncentrace  $1004 \text{ mg l}^{-1}$  vypočtená výše má standardní nejistotu  $2,6 \text{ mg l}^{-1}$ . Pro přibližně 95%-ní spolehlivost je koeficient rozšíření  $k = 2$ . Rozšířená nejistota je tedy  $2 \cdot 2,6 = 5,2 \text{ mg l}^{-1}$ . Po zaokrouhlení bychom výsledek uvedli  $1004 \pm 5 \text{ mg l}^{-1}$ . (Poznamenejme ještě, že při zaokrouhlování nejistoty se z důvodu opatrnosti zaokrouhluje nahoru, tedy výsledek je  $1004 \pm 6 \text{ mg l}^{-1}$ .)

### **7.3 Příklady pro přístupy „zdola nahoru“ a „shora dolů“**

**Příklad** odhadu nejistoty **přístup zdola nahoru** je výpočet nejistoty hmotnostní koncentrace kalibračního standardu kadmia. Tento příklad je převzat z KVALIMETRIE 19 [3], kde lze najít řadu dalších příkladů. Současně představíme způsob výpočtu nejistoty základních operací (vážení a odměřování objemu<sup>6</sup>). Příprava standardního roztoku je znázorněna na obrázku 7.2.



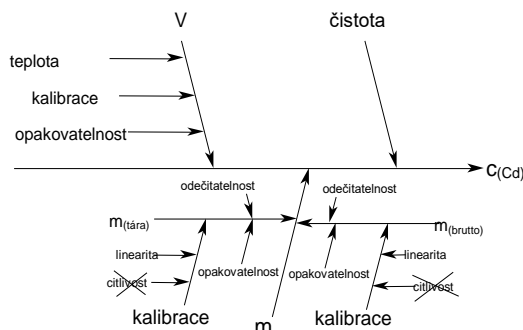
Obrázek 7.2. Příprava standardního roztoku kadmia

Měřenou veličinou je v tomto příkladu koncentrace standardního kalibračního roztoku, která závisí na navážce vysoce čistého kovu (Cd), jeho čistotě a objemu kapaliny, ve které byl rozpuštěn. Koncentrace je dána rovnicí 7.9

$$c_{\text{Cd}} = \frac{1000 \cdot m \cdot P}{V} \text{ mg l}^{-1}, \quad (7.9)$$

<sup>6</sup> Detaily k odhadu nejistoty objemových operací včetně MS Excel souboru, který výpočty umožňuje provést, uvádí: Metodický list 1 – Odhad nejistoty objemových operací. EURACHEM-ČR 2018. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>

kde  $c_{Cd}$  je koncentrace kalibračního standardu ( $\text{mg l}^{-1}$ ), 1000 převodní faktor z ml na l,  $m$  hmotnost vysoce čistého kovu v mg,  $P$  čistota kovu jako hmotnostní zlomek a  $V$  objem roztoku kalibračního standardu v ml. Identifikace a rozbor zdrojů nejistoty je znázorněna na obrázku 7.3.



Obrázek 7.3. Nejistoty při přípravě standardu Cd (Ishikawův diagram)

Cílem tohoto kroku je vyjmenovat všechny zdroje nejistoty pro každý z parametrů ovlivňujících hodnotu měřené veličiny. Čistota kovu (Cd) je uvedena v certifikátu výrobce jako  $(99,99 \pm 0,01) \%$ .  $P$  je tudíž  $(0,9999 \pm 0,0001)$ . Druhý krok přípravy spočívá v navážení velmi čistého kovu. Je třeba připravit 100 ml roztoku kadmia o koncentraci  $1000 \text{ mg l}^{-1}$ . Odpovídající hmotnost kadmia se určí diferenčním vážením, které poskytlo  $m = 0,10028 \text{ g}$ . V literatuře výrobce se uvádějí tři zdroje nejistoty pro diferenční vážení: opakovatelnost, odečitelnost (digitální rozlišení) stupnice vah a příspěvek pocházející z nejistoty kalibrační závislosti vah. S objemem roztoku odměřovaným v odměrné baňce jsou spojeny tři hlavní zdroje nejistoty: nejistota certifikovaného vnitřního objemu baňky, variabilita doplňování baňky po značku, rozdíl teplot roztoku a baňky od teploty, při níž byl obsah baňky kalibrován.

V dalším kroku je velikost každého potenciálního zdroje nejistoty buď přímo změřena, nebo odhadnuta na základě předchozích experimentálních výsledků, nebo odvozena na základě teoretické analýzy.

1. Čistota kadmia je deklarována v certifikátu jako  $0,9999 \pm 0,0001$ . Jelikož neexistuje žádná další informace o hodnotě uváděné nejistoty, předpokládá se rovnoměrné rozdělení.

$$u(P) = \frac{0,0001}{\sqrt{3}} = 0,000058$$

2. Nejistotu spojenou s hmotností kadmia lze odhadnout s použitím údajů kalibračního certifikátu (typ B, rovnoměrné rozdělení) a nejistotou opakovatelnosti vážení (typ A, normální rozdělení) na  $0,05 \text{ mg}$ .
3. Objem ovlivňují tři hlavní vlivy: kalibrace, opakovatelnost a teplota.

*Kalibrace:* Výrobce deklaruje hodnotu objemu baňky ( $100 \pm 0,1$ ) ml, měřeno při teplotě  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . Hodnota nejistoty je uvedena bez konfidenční úrovně nebo informace o rozdělení, je tedy nutné učinit předpoklad o rozdělení. Pro tento případ je standardní nejistota vypočtena za předpokladu trojúhelníkového rozdělení.

$$\frac{0,1 \text{ ml}}{\sqrt{6}} = 0,04 \text{ ml}$$

*Opakovatelnost:* Nejistota spojená s variabilitou doplňování může být odhadnuta z experimentů opakovatelnosti s typickým vzorkem použité baňky. Série 10 experimentů doplnění a zvažení typické 100 ml baňky poskytla směrodatnou odchylku 0,02 ml. Ta může být přímo použita jako standardní nejistota.

*Teplota:* Podle výrobce byla baňka kalibrována při teplotě 20 °C, zatímco teplota v laboratoři se mění v rozmezí ±4 °C. Nejistota odpovídající tomuto vlivu může být vypočtena z odhadu teplotního rozsahu a koeficientu objemové roztažnosti. Objemová roztažnost kapaliny je mnohem větší než objemová roztažnost baňky a je proto možné uvažovat jen tu první. Koeficient objemové roztažnosti vody je  $2,1 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ , což vede ke změnám objemu rovnajícím se

$$\pm (100 \cdot 4 \cdot 2,1 \cdot 10^{-4}) = \pm 0,084 \text{ ml}$$

Standardní nejistota se vypočte za předpokladu rovnoměrného rozdělení změn teploty, tedy

$$\frac{0,084 \text{ ml}}{\sqrt{3}} = 0,05 \text{ ml}$$

Abychom získali standardní nejistotu  $u(V)$  objemu  $V$ , je třeba tyto tři příspěvky sloučit

$$u(V) = \sqrt{0,04^2 + 0,02^2 + 0,05^2} = 0,07 \text{ ml}$$

#### *Výpočet kombinované standardní nejistoty*

Koncentrace  $c_{Cd}$  je dána rovnicí 7.9. Mezivýsledky, jejich standardní nejistoty a relativní standardní nejistoty jsou shrnuty v tabulce 7.2. Vycházejíce z těchto hodnot je koncentrace kalibračního standardu rovna

$$c_{Cd} = \frac{1000 \times 100,28 \times 0,9999}{100,0} = 1002,7 \text{ mg l}^{-1}.$$

Pro tento jednoduchý multiplikativní výraz se nejistoty jednotlivých komponent slučují podle rovnice 7.8:

$$\begin{aligned} \frac{u_c(c_{Cd})}{c_{Cd}} &= \sqrt{\left(\frac{u(P)}{P}\right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V)}{V}\right)^2} \\ &= \sqrt{0,000058^2 + 0,0005^2 + 0,0007^2} = 0,0009 \end{aligned}$$

$$u_c(c_{Cd}) = c_{Cd} \cdot 0,0009 = 1002,7 \cdot 0,0009 = 0,9 \text{ mg l}^{-1}$$

Rozšířená nejistota  $U_{(c_{Cd})}$  se získá vynásobením kombinované standardní nejistoty koeficientem rozšíření 2.  $U_{(c_{Cd})} = 2 \cdot 0,9 = 1,8 \text{ mg l}^{-1}$ .

Tabulka 7.2. Hodnoty a nejistoty k příkladu

Popis	Hodnota $x$	$u(x)$	$u(x)/x$
Čistota kovu $P$	0,9999	0,000058	0,000058
Hmotnost vzorku $m$ (mg)	100,28	0,05 mg	0,0005
Objem vzorku $V$ (ml)	100,0	0,07 ml	0,0007

Možnosti vyhodnocení nejistoty měření **přístupem shora dolů** si ukážeme na využití vnitrolaboratorních údajů jednak z validace, jednak z řízení kvality a zkoušení způsobilosti.

Vraťme se k vyhodnocení nejistoty pro vnitrolaboratorní validaci, kde může být nejistota odhadnuta jako odmocnina součtu čtverců směrodatné odchylky  $s_{RW}$ , charakterizující preciznost měření a odhadu vychýlení  $b$  (z anglického bias) podle rovnice 7.10

$$u = \sqrt{s_{RW}^2 + u_b^2} \quad (7.10)$$

V nejjednodušším případě, kdy je k dispozici pouze jeden výsledek zkoušení způsobilosti (PT), může být počáteční odhad nejistoty vytvořen ze zjištěné odchylky a vnitrolaboratorní preciznosti. Zlepšení lze pak provést na základě výsledků z dalších účastí v PT. Pokud při validaci používáme matricový CRM, lze nejistotu vychýlení vypočítat z rovnice 7.11:

$$u_b = \sqrt{\Delta^2 + u_{ref}^2 + \frac{s^2}{n}}, \text{ kde} \quad (7.11)$$

$\Delta$  je rozdíl průměru z opakovaných měření CRM a certifikované hodnoty,  $u_{ref}$  standardní nejistota certifikované hodnoty CRM a  $s$  představuje směrodatnou odchylku z  $n$  opakovaných měření CRM.

**Příklad [5]:** V průběhu validace postupu měření na stanovení PCB v sedimentech pomocí GC/MS byl opakovaně analyzován kontrolní vzorek na koncentrační úrovni  $150 \mu\text{g kg}^{-1}$  a poskytl  $s_{RW} = 9 \%$ . Měření kontrolního vzorku zahrnovalo všechny kroky postupu s výjimkou sušení vzorků sedimentu. Dále byl analyzován CRM s certifikovanou hodnotou  $152 \pm 14 \mu\text{g kg}^{-1}$  (rozšířená nejistota,  $k = 2$ ). Bylo provedeno 22 analýz tohoto CRM s průměrnou hodnotou  $144 \mu\text{g kg}^{-1}$  a směrodatnou odchylkou  $s = 8 \%$ . Naším úkolem je vypočítat rozšířenou nejistotu výsledků tohoto měřicího postupu.

Začneme výpočtem  $u_b$ :  $\Delta = 152 - 144 = 8 \mu\text{g kg}^{-1}$ , relativně  $5,3 \%$  ( $8/152 = 0,053$ , tj.  $5,3 \%$ ),  $u_{ref} = 14/2 = 7 \mu\text{g kg}^{-1}$ , relativně  $4,6 \%$  ( $7/152 = 0,046$ , tj.  $4,6 \%$ ).

$$u_b = \sqrt{5,3^2 + 4,6^2 + \frac{8^2}{22}} = 7,22$$

Kombinovanou standardní nejistotu pak vypočítáme

$$u = \sqrt{9^2 + 7,22^2} = 11,5 \%$$

Rozšířená nejistota je pak rovna  $U = 2 \cdot u = 2 \cdot 11,5 = 23 \%$ .

**Příklad [5]:** Laboratoř potřebuje vyhodnotit nejistotu stanovení amonných iontů ve vodě, které provádí podle normy ČSN EN ISO 11732. Pro tento analyt není dostupný žádný CRM, a proto bylo k vyhodnocení vychýlení přistoupeno na základě výsledků laboratoře ve zkoušení způsobilosti (PT), které jsou shrnuty v tabulce 7.3. Jednotlivých zkoušení způsobilosti se zúčastnilo průměrně 34 laboratoří. Laboratoř dále opakovaně měří kontrolní vzorek a v regulačním diagramu pro tento kontrolní zlomek má pro koncentrační úroveň  $200 \mu\text{g l}^{-1}$  varovné meze nastaveny na  $\pm 3,34 \%$ .

Tabulka 7.3. Výsledky z účasti v PT použité pro odhad nejistoty měření

PT, rok	Vztažná hodnota ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Výsledek laboratoře ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Vychýlení (%)	$s_R$ (%)
1999	81	83	2,5	10
1999	73	75	2,7	7
2000	264	269	1,9	8
2000	210	213	1,4	10
2001	110	112	1,8	7
2001	140	144	2,9	11

Nejistotu měření vypočteme opět propagováním složky vychýlení a preciznosti. V tomto případě získáme údaj o preciznosti snadno z údajů v regulačním diagramu,  $s_{RW} = 3,34/2 = 1,67 \%$ . V tabulce 3 vidíme, že se laboratoř zúčastnila 6 zkoušení způsobilosti a ve všech případech měla mírně vyšší výsledky než uvedené vztažné hodnoty. To by bylo možné považovat za možné vychýlení, ale vzhledem k tomu, že nemáme k dispozici žádné metrologicky návazné vztažné hodnoty, žádná korekce nebyla použita. Nejistotu vychýlení vypočteme v tomto případě podle rovnice 7.12:

$$u_b = \sqrt{\Delta^2 + u_{ref}^2} \quad (7.12)$$

Vychýlení  $\Delta$  a  $u_{ref}$  vypočteme ze vzorců:

$$\Delta = \sqrt{\frac{\sum(\text{vychýlení})^2}{n}} = \sqrt{\frac{(2,5^2 + 2,7^2 + 1,9^2 + 1,4^2 + 1,8^2 + 2,9^2)}{6}} = 2,26 \%$$

$$u_{ref} = \frac{\bar{s}_R}{\sqrt{n_{lab}}} = \frac{8,8}{\sqrt{34}} = 1,51 \%$$

Hodnota 8,8 je průměr z hodnot v posledním sloupci z tabulky 3. Následně pak  $u_b = \sqrt{2,26^2 + 1,51^2} = 2,72 \%$ . Kombinovanou standardní nejistotu lze vypočítat obdobně jako v předchozím příkladu:

$$u = \sqrt{s_{RW}^2 + u_b^2} = \sqrt{1,67^2 + 2,72^2} = 3,19 \%$$

Rozšířená nejistota  $U = 2 \cdot u = 2 \cdot 3,19 = 6,38 \approx 7 \%$ .

Nahlédnutím do tabulky B1 v normě ČSN EN ISO 11732 zjistíme, že relativní směrodatná odchylka reprodukovatelnosti ( $RSD_R$ ) pro stanovení amonných iontů v pitné vodě na koncentrační hladině  $280 \mu\text{g l}^{-1}$  je 9,81 %. Pokud byla mezilaboratorní studie provedena v souladu s ISO 5725 a podle ISO/TS 21748, můžeme vypočítat standardní kombinovanou nejistotu  $u_c = RSD_R = 9,81 \%$ . Rozšířená nejistota pak je přibližně 20 % ( $U = 2 \cdot u_c = 2 \cdot 9,81 = 19,62 \approx 20 \%$ ). Dokument Nordtest TR 537 [5] uvádí pro tento příklad i hodnotu rozšířené nejistoty zjištěné modelovacím přístupem, a to 6 % (včetně způsobu odhadu této nejistoty). Vidíme tedy, že nejistota měření se liší podle použitých informací k jejímu získání, což je v souladu s definicí podle VIM 3. Pro praktické použití je pak třeba zvolit přístup, který poskytne odhad nejistoty měření v souladu s počátečním požadavkem vycházejícím z legislativy nebo dle požadavku zákazníka. V případě, že zákazník požaduje výsledek s rozšířenou nejistotou  $\pm 10 \%$ , by hodnota z mezilaboratorní studie nevyhovovala a laboratoř by musela přistoupit k vlastnímu vyhodnocení nejistoty buď modelovacím přístupem nebo z údajů z validační studie či řízení kvality.

## 7.4 Uvádění nejistoty

Přestože je možné uvádět výsledek a nejistotu několika způsoby, nejčastější je uvádění výsledku  $x$  spolu s rozšířenou nejistotou  $U$  vypočtenou s použitím koeficientu rozšíření  $k = 2$  (což odpovídá konfidenční úrovni přibližně 95 %). Doporučuje se následující forma zápisu:

Výsledek:  $(x \pm U)$  (jednotek)

Pro konkrétní příklad, který jsme počítali v kapitole 7.2.4, by výsledek byl uveden následovně:

$$1004 \pm 6 \text{ mg l}^{-1} (*)$$

(\*) uvedená nejistota je rozšířená nejistota, která byla vypočtena s použitím koeficientu rozšíření 2, což odpovídá konfidenční úrovni přibližně 95 %.

## 7.5 Přezkum bilance nejistoty

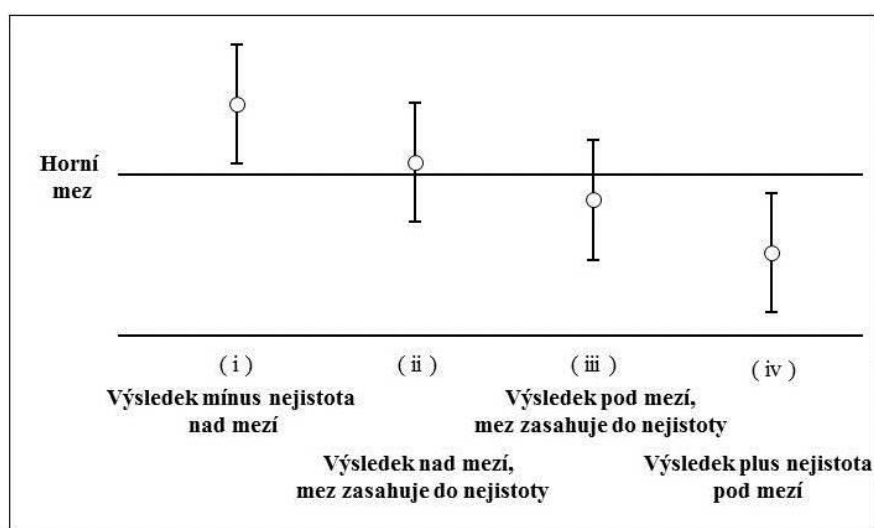
Při výpočtech nejistoty měření obvykle shromáždíme řadu standardních nejistot pro jednotlivé složky obsažené v rovnici měření. Pouze malá část zdrojů nejistot se bude uplatňovat významně, v praxi často postačí detailně se zabývat pouze několika největšími příspěvky do celkové nejistoty. Pokud chceme odhadnutou hodnotu nejistoty měření snížit, tedy zlepšit kvalitu výsledku měření, musíme se nejprve věnovat složkám, které přispívají k celkové nejistotě největší mírou. Zmenšení dominantní složky (složek) nejistoty bude mít největší pozitivní vliv na celkovou hodnotu nejistoty měření. K podstatnému zmenšení celkové nejistoty nevede snižování těch složek, které do celkové bilance přispívají méně než 20 %.

K přezkumu bilance nejistoty je vhodné přistoupit vždy, je-li třeba získat přehled o dominantních složkách. Tedy ne pouze v případě, kdy jsme na základě požadavku zákazníka nebo nesplnění požadavku legislativního předpisu k tomu nuceni.

## 7.6 Nejistota měření a posuzování shody

Představme si situaci, že jsme zodpovědní za přijetí nebo odmítnutí dodávky výrobku na trh a rozhodnutí činíme na základě chemické analýzy výrobku a hlavním kritériem je, jestli koncentrace sloučeniny X ve výrobku překročí limitní koncentraci (horní mez). Máme výsledky chemické analýzy spolu s nejistotou měření. Mohou nastat čtyři různé situace znázorněné na obrázku 7.4.

Je zřejmé, že situace (i) a (iv) je snadné interpretovat. Příklad (i), kde naměřená koncentrace sloučeniny X i její nejistota je nad horní mezí (limitní koncentrací) znamená, že výrobek na trh propustit nemůžeme. Naopak situace (iv), kde naměřená koncentrace je včetně nejistoty pod mezí, značí, že výrobek vyhovuje požadavku. Případy (ii) a (iii) je obtížné interpretovat. Nejistota měření má v této souvislosti zřejmé důsledky na interpretaci analytických výsledků. Níže si ukážeme, jak lze v tomto případě postupovat při posuzování shody s limitní hodnotou. Důležité je však upozornit, že v běžné praxi je rozhodování ovlivněno legislativními požadavky. V této oblasti, tzv. regulované sféře je třeba při posuzování shody brát v úvahu nejistotu analytického výsledku a v některých případech mohou být limitní hodnoty stanoveny tak, že berou ohled na nejistotu měření. Při jakémkoliv posuzování je třeba uvážit obě možnosti.



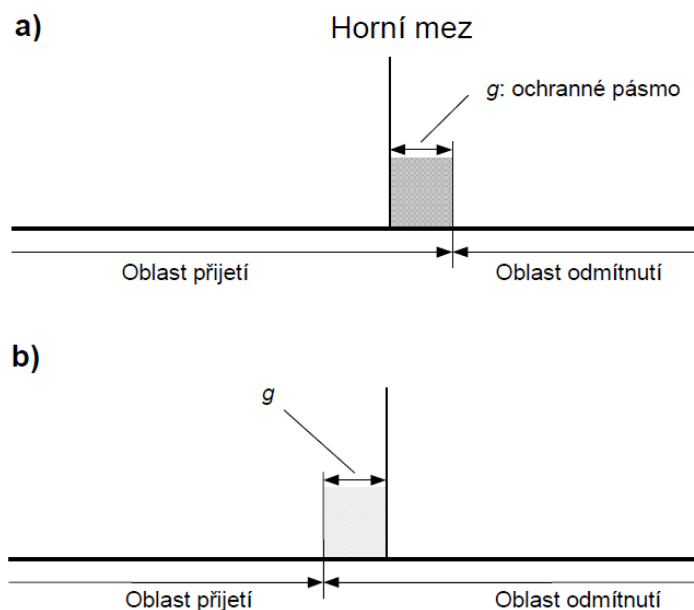
Obrázek 7.4. Posuzování shody s horní mezí

Základními náležitostmi k rozhodnutí, zda či nikoliv přijmout zkoušenou položku jsou:

- specifikace uvádějící horní (nebo dolní) dovolenou mez měřené veličiny, která se kontroluje,
- rozhodovací pravidlo, které popisuje, jak nejistotu měření brát v úvahu při přijímání či odmítání výrobku dle jeho specifikace a výsledku měření,

- meze oblasti přijetí a oblasti odmítnutí (tj. rozsah výsledků), odvozený z rozhodovacího pravidla, které vedou k přijetí nebo odmítnutí, když výsledek měření leží uvnitř příslušné oblasti.

Na základě specifikace (meze) a rozhodovacího pravidla se vypočte rozhodovací mez a určí „oblast přijetí“ a „oblast odmítnutí“, což je znázorněno na obrázku 7.5. Úsek  $g$  na obrázku se často nazývá ochranné pásmo. Rozhodovací mez pro případ a) na obr. 7.5 je „horní mez +  $g$ “ a pro případ b) je „horní mez -  $g$ “.



Obrázek 7.5. Oblasti přijetí a odmítnutí pro horní mez. Obrázek ukazuje relativní pozice oblastí přijetí a odmítnutí pro a) vysokou spolehlivost správného odmítnutí, b) vysokou spolehlivost správného přijetí.

Ochranné pásmo  $g$  se volí tak, aby vyhovovalo požadavkům rozhodovacího pravidla. Vypočítá se podle rovnice 7.13 a závisí:

- na hodnotě nejistoty,
- na minimální přijatelné hladině pravděpodobnosti  $P$ , že měřená veličina leží uvnitř mezí specifikace,
- na dostupné znalosti rozdělení pravděpodobných hodnot měřené veličiny.

$$g = k \cdot u, \quad (7.13)$$

kde  $k$  je jednostranný kvantil normálního rozdělení (např. pro 95 % je  $k = 1,64$ ; pro 99 % je  $k = 2,33$ ; pro 99,9 % je  $k = 3,09$ ) a  $u$  je standardní nejistota na hladině meze.

#### Příklad [6]:

(Případ (iii) z obr. 7.4 – horní mez a rozhodovací pravidlo zaměřené na správné odmítnutí.) Dle zákona je důležité, aby nebyla potrestána nevinná osoba. Rozhodovací mez je možno nastavit tak, aby se snížila možnost, že se tak stane. Zde je uveden případ

měření alkoholu v krvi (EtOH) ve vzorku odebraného řidiči ve Švédsku, který vykazoval pozitivní výsledek při prověřovací zkoušce. Měřená veličina – hmotnostní zlomek celkového EtOH ve vzorku krve dodaného do laboratoře. Řešíme konkrétní případ řidiče:

- analytický výsledek – hmotnostní zlomek (EtOH) = 0,221 mg g<sup>-1</sup>,
- nejistota –  $U = 0,013 \text{ mg g}^{-1}$ ,  $k = 2$  (95 %).
- právní předpis – horní dovolená mez 0,200 mg g<sup>-1</sup>.
- rozhodovací pravidlo – rozhodovací mezí je hmotnostní zlomek, od kterého lze rozhodnout na konfidenční úrovni přibližně 99,9 %, že dovolená mez byla opravdu překročena.

Ochranné pásmo se vypočítá jako  $3,10 \cdot u = 0,020 \text{ mg g}^{-1}$ . Standardní nejistota,  $u = 0,013/2 = 0,0065 \text{ mg g}^{-1}$ . Tato nejistota zahrnuje jak nejistotu vzorkování, tak i analýzy. Rozhodovací mez bude  $0,200 + 0,020 = 0,220 \text{ mg g}^{-1}$ . Všechny hodnoty nižší než tato hodnota patří do oblasti přijetí (tedy přijetí skutečnosti, že výsledek neopravňuje k závěru, že daná mez byla překročena). V případě konkrétního řidiče našeho příkladu je rozhodovací mez překročena a řidič bude potrestán.

## 7.7 Cílová nejistota měření

Výsledek měření je vhodný pro zamýšlené použití, pokud je nejistota měření spolehlivá a má dostatečně malou hodnotu. V některých případech se proto v legislativě používá **cílová nejistota měření**, která je definována jako „*nejistota měření specifikovaná jako horní mez a stanovená na základě zamýšleného použití výsledků měření*“ [1]. Cílová nejistota měření je tedy maximální přípustná hodnota nejistoty pro konkrétní cíl měření. Například při posuzování shody, by nejistota měření měla být dostatečně malá, aby umožnila identifikaci odchylek od mezní hodnoty. Příliš velká hodnota nejistoty neposkytuje dostatečnou ochranu (např. lidského zdraví při konzumaci nějaké potraviny), na druhou stranu příliš malá nejistota by mohla znamenat použití zbytečně drahého měření. Podrobnosti lze nalézt v KVALIMETRII 21 [7].

### Shrnutí:

- Nejistota měření je číslo za  $\pm$  při uvádění výsledků kvantitativních zkoušek. Vzhledem k tomu, že každé měření je zatíženo určitou „chybou“, je nejistota výsledku důležitou částí poskytující informaci o jeho kvalitě.
- Základní pojmy: standardní nejistota  $u(x_i)$ , kombinovaná standardní nejistota  $u_c(y)$ , rozšířená nejistota  $U$ .
- Dva základní přístupy k vyhodnocení nejistoty měření jsou „zdola nahoru“ a „shora dolů“. Praktické příklady odhadu nejistoty lze najít v KVALIMETRII 19 [3].
- Nejistota měření se obvykle uvádí ve formě rozšířené nejistoty  $U$  spolu s hodnotou koeficientu rozšíření  $k$ .
- Odhad nejistoty, vypracovaný pro daný postup v určité laboratoři, je možno spolehlivě použít pro další měření tímto postupem za předpokladu, že k tomu opravňují odpovídající údaje o řízení kvality. Nejistotu obvykle u rutinních analýz

nevyhodnocujeme pro každý vzorek, ale pro danou stabilní konfiguraci měřicího systému (měřicí postup).

- Zákazník či uživatel výsledku potřebuje hodnotu nejistoty, aby mohl provést správné rozhodnutí, což je důležité zejména pro srovnávání výsledku s limitní hodnotou nebo pro srovnávání výsledků mezi laboratořemi.

#### **Literatura:**

1. TNI 01 0115:2009. Mezinárodní metrologický slovník - Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM). ÚNMZ Praha 2009.
2. TNI 01 4109–3:2011. Nejistoty měření – Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) (Pokyn ISO/IEC 98-3). ÚNMZ Praha 2011.
3. KVALIMETRIE 19. Stanovení nejistoty analytického měření. Pokyn EURACHEM/CITAC, 4. české rozšířené vydání, EURACHEM-ČR, Praha 2014 (ISBN 978-80-86322-07-0).
4. S.L.R. Ellison, V. Barwick, T.J.D. Farrant: Practical Statistics for Analytical Scientist, A Bench Guide, 2nd Ed. RSC, Cambridge, 2009. (ISBN 978-0-85404-131-2).
5. B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell, E. Sahlin, Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Nordtest Report 537, ed. 4, 2017.
6. Metodický list 9 – Eurachem Leaflet: Použití informace o nejistotě při posuzování shody (český překlad), EURACHEM-ČR 2012. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>.
7. KVALIMETRIE 21. Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních. Pokyn EURACHEM/CITAC. EURACHEM-ČR 2016, Praha 2016. (ISBN 978-80-86322-09-4).

## 8 INTERNÍ ŘÍZENÍ KVALITY

System řízení kvality (Quality Control, QC) patří k nedílným součástem zabezpečení kvality analytických výsledků. Po provedení validace nebo verifikace zaváděného měřicího (analytického) postupu je v laboratoři během používání schváleného postupu nutné poskytovat průběžně doklady o tom, že celý postup pracuje při dodržení stanovených validačních parametrů, např. nejistota měření, mez stanovitelnosti, čili je ve stavu statistické regulace. K tomu slouží právě opatření interního systému řízení kvality, která spočívají mj. v měření a vyhodnocování kontrolních vzorků a slepých vzorků, jejichž výsledky se vynášejí do regulačních diagramů. Je možné tak posoudit a rozhodnout, zda výsledky naměřené laboratoří jsou vyhovující a je možné je předat zákazníkovi, nebo je nutné analýzu opakovat a případně upravit podmínky měření. Vedle interního systému řízení kvality se provádějí i opatření externího systému řízení kvality – zkoušení způsobilosti, mezilaboratorní porovnávání odběrů vzorků, porovnávání výsledků mezi laboratořemi atd. (viz kap. 9).

Mezi nejčastější nástroje interního řízení kvality se řadí analýzy kontrolních vzorků, slepých vzorků a duplikátní analýzy reálných vzorků. K dalším významným součástem interního systému řízení kvality patří:

- pravidelné ověřování kalibračních funkcí,
- ověřování základních charakteristik analytických metod (kontrola platnosti meze stanovitelnosti a nejistoty měření),
- pravidelná konfirmace funkčnosti používaných přístrojů,
- pravidelné měření terénních duplikátů (dva vzorky se odebírají vedle sebe a analyzují nezávisle, součást zabezpečení kvality vzorkování),
- pravidelná měření reálné matrice s přidavkem standardu (kontrola stability výtěžnosti),
- pravidelné měření slepého vzorku s přidavkem standardu,
- pravidelné měření referenčních materiálů (často po opravě přístroje nebo po odstávce metody).

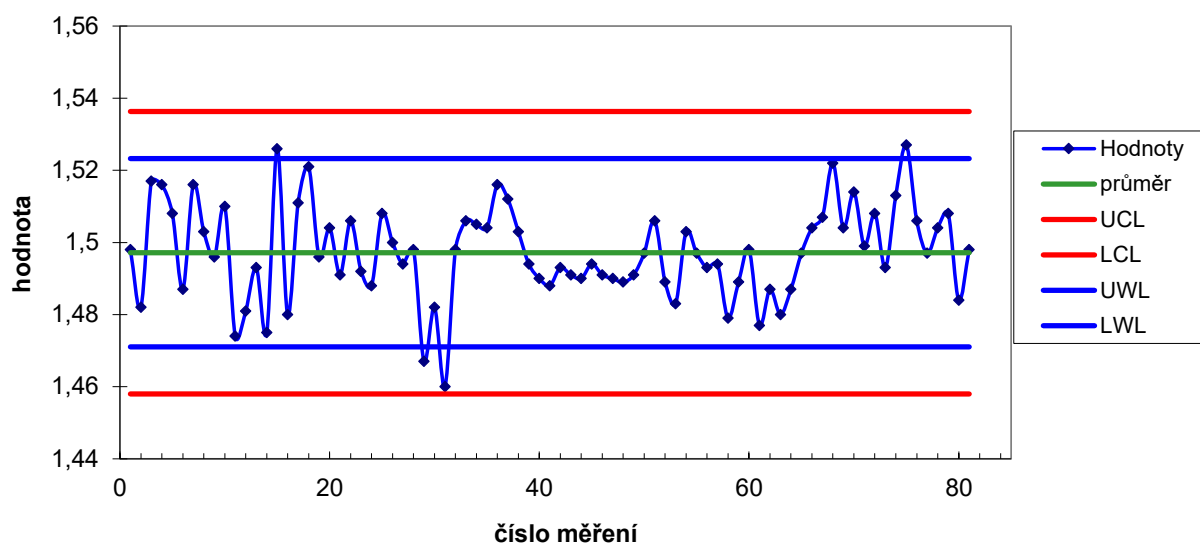
Jako kontrolní vzorky můžeme používat různé typy materiálů. Často se využívají kontrolní vzorky namíchané z čistých složek, kde je sice dobře známá koncentrace stanovovaného analytu, ale výsledek nevypovídá o vlivech přírodní matrice. Jinou variantu představují certifikované referenční materiály, u nichž je dobře dokumentována certifikovaná hodnota i s přidruženou nejistotou, jsou ovšem výrazně dražší a množství dostupných typů matric a koncentrací je omezeno. Levnější variantu představují materiály pro řízení kvality (někdy označované pracovní referenční materiály) vhodného typu a stability dle Pokynu ISO 80 [1], které lze připravit v laboratoři a jejichž vztažené hodnoty se získají např. analýzami v několika laboratořích nebo srovnáním s vhodným CRM. Pokud je k dispozici vhodná stabilní matrice se zanedbatelnou koncentrací sledovaného analytu, lze připravit kontrolní vzorek také přidavkem standardu do této matrice.

## 8.1 Regulační diagramy

Nejvýznamnějším pomůckou pro interní řízení kvality jsou regulační diagramy. Nejvíce se využívají Shewhartovy regulační diagramy [2] pro průměr  $\bar{x}$  a směrodatnou odchylku  $s$  sloužící k podchycení každodenní variability analytického procesu. Výsledky individuálních měření kontrolního vzorku se vynášejí na osu  $y$  proti datu měření nebo číslu kontrolního vzorku. Příklad takového regulačního diagramu je na obrázku 8.1. Osu  $y$  protíná několik rovnoběžek s osou  $x$ . Je to centrální linie (zelená čára), která odpovídá průměrné koncentraci kontrolního vzorku a dále dva páry čar nazývaných regulační (akční) a varovné meze. Červené regulační meze se vynášejí ve vzdálenosti  $\pm 3s$  od centrální linie, za předpokladu normálního rozdělení sledované veličiny se výsledek měření dostane mimo tyto čáry s pravděpodobností 0,3 %. Modré varovné meze se vynášejí ve vzdálenosti  $\pm 2s$  od centrální linie, pravděpodobnost změření výsledku mimo varovné meze je mnohem vyšší, 4,5 %. Vysvětlení statistických základů pro konstrukci těchto diagramů je uvedeno v kapitole 11. Pro konstrukci regulačního diagramu je nutné nejprve nasbírat dostatečně velký soubor naměřených hodnot (20-25), pro tento soubor vypočítat průměrnou hodnotu  $\bar{x}$  a (výběrový) odhad směrodatné odchylky  $s$ . Pomocí vhodného software (LIMS, programy pro laboratorní statistiku) se zkonstruuje regulační diagram s vyznačenými varovnými a regulačními mezemi a v něm se dále vynášejí naměřené hodnoty. Takto vypočtené meze je třeba reálně zhodnotit, protože ryze statistický přístup obvykle přináší příliš nízkou hodnotu směrodatné odchylky a vypočtené meze by mohly být příliš úzké a v reálném provozu metody by docházelo k častému výskytu mimo varovné meze. Lze tedy jen doporučit meze rozumně rozšířit tak, aby nemohlo dojít k překročení validované nejistoty měření a zároveň se minimálně 95 % naměřených hodnot pohybovalo mezi varovnými mezemi. Po roce je pak vhodné, např. z posledních naměřených 60 výsledků, průměr a směrodatnou odchylku přepočítat a meze upravit. Jestliže se při přípravě regulačních mezí objeví naměřený vzorek s koncentrací odlišnou více než čtyřnásobek směrodatné odchylky, lze ho vyloučit jako odlehlý (počet takových hodnot je menší než 0,01 %). Pro posuzování statistické regulace platí řada pravidel, nejvýznamnější z běžného laboratorního hlediska jsou 3:

1. Výsledek měření kontrolního vzorku překročí regulační mez (musí následovat okamžité přerušení měření, hledání a odstranění příčiny).
2. 2 hodnoty ze 3 po sobě následujících měření leží mimo varovné meze (obdobná opatření jako u 1).
3. 4 z 5 následujících bodů leží mimo středovou oblast regulačního diagramu (pás vymezený liniemi  $\pm 2s$ ) (opatření jako u 1, i když se nejedná o tak kritickou situaci).

Další pravidla jsou uvedena v příslušných normách [2]. Pravidla vyhodnocování regulačních diagramů v laboratoři musí být samozřejmě popsána v příručce kvality nebo v souvisejících dokumentech.



Obrázek 8.1 Regulační diagram individuálních hodnot stanovení.  $UCL$  (upper control limit, horní regulační mez) =  $\bar{x} + 3s$ ;  $LCL$  (lower control limit, dolní regulační mez) =  $\bar{x} - 3s$ ;  $UWL$  (upper warning limit, horní varovná mez) =  $\bar{x} + 2s$ ;  $LWL$  (lower warning limit, dolní varovná mez) =  $\bar{x} - 2s$

Pokud se mění kontrolní vzorek (např. kvůli změně dodavatele chemikálie), je třeba měřit v sérii vedle sebe starý i nový kontrolní vzorek, aby se mohly projevit případné rozdíly. Jsou-li koncentrace v obou vzorcích podobné, lze použít očekávanou koncentraci v novém vzorku jako hodnotu nové centrální linie. Je možné také pro začátek využít hodnotu směrodatné odchylky starého vzorku pro nastavení varovných a regulačních mezí.

Z výsledků duplikátních analýz reálných vzorků lze pak vynášet regulační diagramy rozpětí  $R$  (rozdíl mezi dvěma naměřenými výsledky). Jako střední linie se vynáší opět průměrná hodnota rozpětí  $\bar{R}$  výsledků získaná při měření úvodní sady duplikátních analýz, dolní mez může být 0 (při použití absolutní hodnoty rozpětí) a horní mez se získá vynásobením hodnoty  $\bar{R}$  tabelovaným koeficientem 3,267. Regulační diagramy duplikátních měření charakterizují preciznost měření, a kromě této veličiny mohou pomáhat např. i při sledování dosažení dostatečné homogenity při dělení vzorků na dva podíly.

Analýzy slepých vzorků pak slouží k ujištění, že v žádné části měřicího procesu nedochází k falešně pozitivní či negativní odchylce měření. Slepý vzorek by měl obsahovat všechny součásti jako měřený vzorek s výjimkou měřeného analytu. Často se připravuje např. přidávkem všech používaných činidel do deionizované vody. Jako sledovaná veličina se může namísto měřené koncentrace, která je obvykle pod mezí stanovitelnosti, používat hodnota naměřeného signálu (hodnota absorbance, intenzita čáry, plocha píku). Obvykle se sleduje jen překročení maximální hodnoty získané opět proměřením vstupní sady slepých vzorků, která by neměla překračovat úroveň signálu právě pro mez stanovitelnosti. Náhlé zvýšení naměřených hodnot může signalizovat výskyt kontaminace, např. v některém používaném činidle, nedostatečnou čistotou

používaného nádobí nebo nedostatečný proplach přístroje po měření vzorku s vyšší koncentrací analyzované složky (cross-contamination).

Praktické uplatňování řízení kvality vyžaduje samozřejmě řádné proškolení všech pracovníků laboratoře v této problematice, aby vše neprobíhalo jen formálně a veškeré úsilí spojené s přípravou a měřením kontrolních vzorků nebylo promrháno. Je nutné, aby všichni pracovníci laboratoře znali kritéria pro hodnocení regulačních diagramů a sami je průběžně vyhodnocovali. Vedle toho je také nutná častá kontrola regulačních diagramů manažerem kvality a vedoucím laboratoře. Po delší době, obvykle jednou za rok, je třeba přehodnotit regulační meze a zjistit, zda nedošlo k nějakému posunu danému například opotřebením měřicích čidel apod. Při pravidelné kontrole validačních výkonnostních charakteristik může nastat nutnost některé z nich mírně změnit. Pokud dojde k porušení pravidel pro hodnocení regulačních diagramů, je třeba celý problém vyhodnotit, zjistit, zda přijatá opatření stačí k jeho vyřešení a pokud laboratoř není schopná v dané chvíli měření provádět, je nutné zadat vzorky k analýze do subdodavatelské laboratoře. Takto zjištěné neshodné práce se samozřejmě musí důkladně popsat a řešení celého problému musí mít laboratoř zachyceno v řízené dokumentaci. Mimo kontrolních vzorků připravených z čistých složek v deionizované vodě je vhodné vést regulační diagramy i pro kontrolní vzorky s vlivem matrice (referenční materiály, vhodné stabilní reálné vzorky). Pokud se objeví v laboratoři vzorek s neznámým původem a je podezření na možné rušivé vlivy, je třeba před tímto vzorkem zařadit do analytické série matricový referenční materiál nebo kontrolní vzorek o známém složení, aby bylo průkazné, že daný postup je pro takový vzorek dobře připraven.

Doporučovaná četnost kontrolních vzorků pro interní řízení kvality se obvykle udává kolem 5 %, tzn. série každých 20 vzorků by měla obsahovat 1 kontrolní vzorek. U jednoduchých metod s vysokým počtem vzorků může být četnost kontrolních vzorků i nižší. Naopak u složitých matic v případě např. stopové analýzy se doporučuje četnost kontrolních vzorků vyšší (20 %, někdy až 50 %). Pokud se metoda používá po delší přestávce (např. jednou za čtvrtletí), je nutné metodu během přestávky udržovat – měřit pravidelně kontrolní vzorky a reálné vzorky s přidavkem standardu, nebo ji při každém obnoveném použití zkráceně validovat.

### **Literatura:**

1. TNI 015246:2015. Příručka pro vlastní přípravu materiálů pro řízení kvality (QCM), Pokyn ISO 80.
2. ČSN ISO 7870-2. Regulační diagramy – Část 2: Shewhartovy regulační diagramy.

## 9 MEZILABORATORNÍ POROVNÁVÁNÍ

### 9.1 Úvod

Mezilaboratorní porovnání je podle definice ČSN EN ISO/IEC 17043 [1] „*organizování, provádění a vyhodnocení měření nebo zkoušek stejné nebo podobné položky dvěma nebo více laboratořemi za předem stanovených podmínek*“. Mezilaboratorní porovnávání se využívá v mnoha oblastech měření a zkoušení.

V chemických, biochemických a klinických laboratořích můžeme identifikovat tři hlavní oblasti použití mezilaboratorního porovnávání [2]:

- a) studie výkonnosti laboratoře,
- b) studie výkonnosti měřicí metody či postupu,
- c) certifikace referenčního materiálu.

#### a) Studie výkonnosti laboratoře

Tato oblast použití mezilaboratorního porovnávání se používá nejčastěji. Jedná se o tzv. **zkoušení způsobilosti** laboratoře, pro které se ustálilo používání zkratky PT (z anglického proficiency testing). Účast laboratoř v programech zkoušení způsobilosti (PT) je dána mnoha okolnostmi, z nichž nejdůležitější jsou tyto:

- požadavky národních akreditačních orgánů,
- požadavky zákazníků,
- identifikace problémů v laboratořích,
- identifikace rozdílů mezi laboratořemi,
- porovnatelnost výsledků různých měřicích postupů,
- validace bilance nejistot v jednotlivých laboratořích.

#### b) Studie výkonnosti metody

Výkonnost metody, resp. výkonnost měřicího postupu, se může určit mezilaboratorní validací. Cílem mezilaboratorní validace je odhad směrodatné odchylky reprodukovatelnosti a opakovatelnosti. Statistické vyhodnocení mezilaboratorní validace je popsáno v normě ISO 5725-2 [3].

#### c) Certifikace referenčního materiálu

Referenční materiál musí být charakterizován referenční hodnotou s prokázanou návazností a deklarovanou nejistotou referenční hodnoty. Pro jejich určení se může použít mezilaboratorního porovnávání.

### 9.2 Definice

Dále uvedené definice jsou převzaty z normy ČSN EN ISO/IEC 17043:2010 [1].

**Mezilaboratorní porovnání (interlaboratory comparison)** je *organizování, provádění a vyhodnocení měření nebo zkoušek stejné nebo podobné položky dvěma nebo více laboratořemi za předem stanovených podmínek*.

**Zkoušení způsobilosti (proficiency testing) je**

*vyhodnocení výkonnosti účastníka vůči předem stanoveným kritériím pomocí mezilaboratorního porovnání.*

**Poskytovatel zkoušení způsobilosti je**

*organizace, která odpovídá za všechny úkony při přípravě a provádění programu zkoušení způsobilosti*

**Program zkoušení způsobilosti (proficiency testing scheme) je**

*zkoušení způsobilosti navržené a prováděné pro specifickou oblast zkoušení, měření, kalibrace nebo inspekce v jednom či více cyklech.*

**Účastník (participant) je**

*laboratoř, organizace či fyzická osoba, která obdrží položky zkoušky způsobilosti a předá poskytovateli zkoušení způsobilosti výsledky k posouzení.*

**Vztažná hodnota (assigned value) je**

*hodnota přiřazená konkrétní vlastnosti položky zkoušky způsobilosti.*

**Směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti (standard deviation for proficiency assessment) je**

*míra rozptýlení používaná při vyhodnocení výsledků zkoušení způsobilosti vycházející z dostupných informací.*

### **9.3 Zkoušení způsobilosti (externí hodnocení kvality)**

Zkoušení způsobilosti laboratoří je definováno [1] jako hodnocení výkonnosti účastníka vůči předem stanoveným kritériím pomocí mezilaboratorního porovnávání.

Pravidelná účast ve zkoušení způsobilosti (PT), známá také jako externí hodnocení kvality (EHK nebo External Quality Assessment – EQA), je důležitou součástí zabezpečování kvality výsledků zkoušek, dále uznávaným způsobem, jak může laboratoř sledovat svou výkonnost, a to na základě svých vlastních požadavků i ve srovnání s dalšími účastníky se laboratořemi. PT pomáhá odhalit variabilitu mezi laboratořemi (reprodukovatelnost) a za určitých okolností i systematické chyby (bias). Programy PT a další typy mezilaboratorních porovnávání jsou považovány za důležitý prostředek ke sledování míry rovnocennosti výsledků měření na národní a mezinárodní úrovni.

Účast v programech zkoušení způsobilosti vyžadují akreditační orgány, orgány státní správy a ve zdravotnictví i zdravotní pojišťovny. Obecně řečeno je výkonnost laboratoře důležitým indikátorem při posuzování spolehlivosti laboratoře.

Zkoušení způsobilosti je jedním ze způsobů, jak v laboratoři odhalit neshodnou práci a přijetím vhodných nápravných opatření zabránit poškození zákazníka.

### 9.3.1 Druhy programů zkoušení způsobilosti

K dispozici jsou různé druhy programů zkoušení způsobilosti, každý z nich je založen na nejméně jednom prvku z následujících čtyř kategorií [2]:

1. a) Kvalitativní: Výsledky kvalitativních zkoušek jsou popisné a uvádějí se v nominálním kategorickém nebo pořadovém měřítku např. identita mikroorganismů nebo určení přítomnosti specifické měřené veličiny (jako jsou léky či drogy).  
b) Kvantitativní: Výsledky kvantitativních měření jsou číselné a udávají se v intervalové nebo poměrné míře.  
c) Interpretační: Neobsahují žádná měření. Položkou zkoušení způsobilosti je výsledek měření, soubor dat nebo nějaký soubor informací týkající se interpretačního rysu způsobilosti účastníka.
2. a) Příležitostné: Položky zkoušení způsobilosti se poskytují pro jednu příležitost.  
b) Kontinuální: Položky zkoušení způsobilosti jsou poskytovány pravidelně.
3. a) Sekvenční: Měřená položka zkoušení způsobilosti koluje postupně od jednoho účastníka k dalšímu. V tomto případě se může položka zkoušení způsobilosti před předáním dalšímu účastníku vracet k poskytovateli zkoušení způsobilosti pro určení, zda nedošlo k nějakým změnám položky zkoušení způsobilosti.  
b) Simultánní: Při nejběžnějším takovém zkoušení způsobilosti náhodně vybrané podíly vzorků (podvzorky) z homogenního zdrojového materiálu jsou současně rozepisovány účastníkům pro souběžné měření. Poskytovatel zkoušení způsobilosti vyhodnotí po přijetí výsledku výkonnost každého jednotlivého účastníka a skupiny jako celku pomocí statistických technik.
4. a) Předběžné měření: U tohoto druhu programu zkoušení způsobilosti položka zkoušení způsobilosti může být položkou (např. hračka), u níž účastník musí rozhodnout, jaká měření by se měla provést, nebo soubor dat nebo jiná informace, např. případová studie.  
b) Měření: Zkoušení způsobilosti se zaměřuje výslovně na měřicí proces.  
c) Po měření: U tohoto druhu programu zkoušení způsobilosti položka zkoušení způsobilosti může být soubor dat, u kterých se vyžaduje od účastníka, aby poskytl stanovisko nebo interpretaci.

Speciální použití zkoušení způsobilosti, často nazývaná slepé zkoušení způsobilosti, spočívá v tom, že položka zkoušení způsobilosti je nerozlišitelná od běžných položek zákazníků nebo vzorků, které obdrží účastník. Tohoto PT může použít zákazník při kontrole laboratoře. Všechny shora zmíněné druhy programů zkoušení způsobilosti mohou být organizovány jako slepé zkoušení způsobilosti.

### 9.3.2 Účast ve zkoušení způsobilosti (PT)

Účastníkem je laboratoř, organizace nebo fyzická osoba, která obdrží položky zkoušky způsobilosti a předá poskytovateli zkoušení způsobilosti výsledky k posouzení. Protože účast v programech stojí laboratoř mnoho času, úsilí a peněz, měla by laboratoř pečlivě zvážit, kterých programů se zúčastní.

Položky zkoušení způsobilosti by měly být homogenní a stabilní. Matrice, analyty anebo koncentrační úrovně zkušebních položek nabízených v programech PT by se měly podobat těm, které se vyskytují u reálných vzorků z každodenní praxe laboratoře. Každá laboratoř má určit svou vlastní úroveň a četnost účasti v PT po důkladné analýze vlastních opatření pro zajišťování kvality [4].

Při plánování účasti v PT zahajuje laboratoř plánovací proces přehledem oblastí své **odborné kompetence**, kterou definuje prostřednictvím tří parametrů [5]:

- měřicí techniky např. ICP-OES,
- vlastnosti např. koncentrace Ca,
- předmětu např. pitná voda.

Příkladem je stanovení koncentrace vápníku v pitné vodě optickou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem.

Pokud jsou vhodné programy PT k dispozici, očekává se, že se laboratoř bude zúčastňovat zkoušení způsobilosti přinejmenším pro každou ze svých oblastí odborné kompetence. Aby bylo možné rozhodnout o vhodném rozsahu a četnosti účasti v PT, měla by laboratoř provést jednoduché posouzení rizik, přičemž by měla brát v úvahu například:

- omezení daná metodologií, např. nestabilita instrumentace nebo interference ze složek matrice,
- zkušenosti, znalosti a fluktuaci odborného personálu,
- kvalitu a dostupnost referenčních materiálů atd.,
- způsob použití výsledků (např. forenzní analýza a monitorování životního prostředí) a důsledky, pokud se zákazníkovi předá chybný výsledek,
- počet zkoušek/kalibrací/měření vykonávaných mezi jednotlivými cykly PT,
- komplexnost postupu zkoušky a změny v požadavcích, např. nižší meze při posuzování shody.

Jakmile se stanoví úroveň a četnost účasti, je strategie PT dokončena jako součást celkového plánování řízení kvality laboratoře. Strategie PT by měla zahrnovat alespoň období mezi dvěma opětovnými akreditacemi a měla by být každoročně revidována. Při auditech by laboratoř měla být připravena odůvodnit odbornými argumenty, co ji vedlo k jejím rozhodnutím o „rozsahu“ a „četnosti“ účasti v PT.

Informace o poskytovatelích zkoušení způsobilosti a programech PT jsou dostupné u národního akreditačního orgánu, na webových stránkách EPTIS ([www.eptis.org](http://www.eptis.org)) nebo dalších národních a mezinárodních organizací.

Při výběru poskytovatele by laboratoř měla vzít v úvahu následující faktory [4]:

- popis použitého statistického zpracování,
- počet analyzovaných položek a/nebo počet požadovaných opakování,

- postup sběru dat od účastníků, např. zasílání faxem, emailem nebo přes webový portál,
- postupy porovnávání získaných výsledků získaných různými metodami/technikami,
- počet a působiště účastníků,
- počet účastníků používajících stejnou metodu/techniku jako laboratoř,
- používané metody a kritéria posuzování výkonnosti.

Laboratoř může dále hodnotit způsobilost poskytovatele PT podle:

- shody s požadavky ČSN EN ISO/IEC 17043, např. prokázanou akreditací,
- zkušenosti,
- spolehlivosti vztažných hodnot,
- vhodnosti kritérií pro posuzování způsobilosti.

Důležité je, aby laboratoře zacházely se vzorky programu zkoušení způsobilosti jako s běžnými vzorky, které laboratoř zpracovává. Analýzy by měli provádět pracovníci, kteří běžně podobné vzorky v laboratoři zpracovávají, metodami, které jsou v laboratoři zavedeny a využívány.

Účastníci programů zkoušení způsobilosti by měli uchovávat svoje záznamy o výkonnosti ve zkoušení způsobilosti včetně výstupů zkoumání všech nevyhovujících výsledků a všech následujících nápravných a preventivních opatření. Důležité je také sledování trendů u souboru výsledků laboratoře.

### 9.3.3 Využívání PT při akreditaci laboratoří

Požadavek na pravidelnou účast v programech zkoušení způsobilosti je uveden v normě ČSN EN ISO/IEC 17025 pro zkušební a kalibrační laboratoře i v normě ČSN EN ISO 15 189 pro zdravotnické laboratoře.

V normě ČSN EN ISO/IEC 17025 [8] je uvedeno:

*7.7.2 Laboratoř musí sledovat svou výkonnost porovnáváním s výsledky jiných laboratoří tam, kde je to možné a potřebné. Takové sledování musí být plánováno a přezkoumáváno a musí zahrnovat, ale neomezuje se pouze na jednu nebo obě následující možnosti:*

*a) účast ve zkoušení způsobilosti,*

*POZNÁMKA ČSN ISO/IEC 17043 obsahuje další informace o zkoušení způsobilosti a poskytovatelích zkoušení způsobilosti. Poskytovatelé zkoušení způsobilosti, kteří splňují požadavky normy ČSN ISO/IEC 17043 jsou považováni za kompetentní (odborně způsobilé).*

*b) účast v mezilaboratorních porovnáních jiných než je zkoušení způsobilosti.*

Obecné požadavky výše uvedených norem na účast laboratoře v programech zkoušení způsobilosti jsou pak pro účely posuzování odborné způsobilosti laboratoří upřesněny v dalších mezinárodních dokumentech a metodických pokynech Českého institutu pro akreditaci, o.p.s. (dále jen ČIA).

V případě, že akreditace je udělena laboratoři s více pracovišti, která provádějí stejné zkoušky, vyšetření nebo kalibrace, požadavek účasti v programech PT se týká každého pracoviště [2].

Při akreditaci je nutné respektovat, že existují odvětví, ve kterých je účast ve zkoušení způsobilosti obtížná. Pak je vhodné dávat přednost jiným způsobům zajištění kvality (používání certifikovaných referenčních materiálů, porovnání výsledků získaných různými technikami měření, využívání interních kontrolních vzorků apod.).

Akreditační orgány by měly informovat své akreditované subjekty, jaké jsou možné závěry z nevyhovujícího výkonu v programu zkoušení způsobilosti. Ty mohou sahat od pokračující akreditace s podmínkou úspěšné péče o nápravná opatření v dohodnutém časovém rámci, dočasného pozastavení akreditace pro příslušné zkoušky, které budou předmětem nápravných opatření, až po odnětí akreditace pro příslušné zkoušky. Možnost zvolená akreditačním orgánem bude záviset na historii výkonnosti účastníka v průběhu času a na posledních posuzováních na místě.

### **9.3.4 Požadavky na poskytovatele PT (ČSN EN ISO/IEC 17043:2010)**

Poskytovatel zkoušení způsobilosti je organizace, která odpovídá za všechny úkoly při přípravě a provádění programu zkoušení způsobilosti.

Poskytovatelé mohou využívat subdodávky, ale musí přitom prokázat, že zkušenosti subdodavatelů a jejich odborná způsobilost jsou pro stanovené úkoly dostačující a že subdodavatelé jsou schopni plnit odpovídající články normy ČSN EN ISO/IEC 17043. Některé specifické činnosti musí ale vždy zabezpečovat poskytovatel programů zkoušení způsobilosti vlastními silami a nesmí je získávat subdodávkou. Jedná se o navrhování, resp. plánování programů zkoušení způsobilosti, hodnocení výkonnosti účastníků a autorizaci závěrečné zprávy.

Poskytovatelé zkoušení způsobilosti by měli usilovat o potvrzení shody s normou ČSN EN ISO 17043 akreditačním orgánem (v České republice ČIA). Pouze posouzení třetí nezávislou stranou, která je kompetentní a odborně způsobilá provést audit, může potvrdit, že poskytovatel programů zkoušení způsobilosti požadavky normy pro programy zkoušení způsobilosti splňuje. Pokud akreditované laboratoře využívají služeb neakreditovaného poskytovatele, měly by se samy přesvědčit o jeho odborné způsobilosti.

### **9.3.5 Statistické vyhodnocování PT**

Výsledky z programů zkoušení způsobilosti mohou nabývat různých forem. Nyní se dává přednost robustní statistice, jak to doporučuje ČSN ISO 13528 [6]. Robustní statistika má výhodu v tom, že snižuje příspěvek odlehlých hodnot na vypočtené statistické parametry, např. střední hodnotu a směrodatnou odchylku.

Hlavními statistickými parametry při vyhodnocování a interpretaci jsou:

- a) určení vztažné hodnoty vlastnosti vzorku a její nejistoty,
- b) určení směrodatné odchylky pro posuzování způsobilosti,

c) určení výkonových statistik, charakterizující účast laboratoří v PT.

### Stanovení vztažné hodnoty a její nejistoty ( $X$ , $u_x$ )

Existuje pět způsobů, jak získat vztažnou hodnotu a k ní přidruženou standardní nejistotu:

#### 1. Příprava

Přídavek známého množství analytu k základnímu materiálu, který analyt neobsahuje. Standardní nejistota se odhadne sloučením nejistot s použitím postupů popsaných v Guide to the expression of Uncertainty in Measurement (GUM).

#### 2. Certifikovaná referenční hodnota

V případě, kdy položkou zkoušení způsobilosti je certifikovaný referenční materiál (CRM), použije se jeho referenční hodnota jako vztažná hodnota. Výhodou tohoto způsobu je, že poskytuje návaznou vztažnou hodnotu, je však nákladný a vhodné certifikované referenční materiály nejsou často dostupné. Nevýhodou je možná informace o existenci takového referenčního materiálu, a tedy jeho hodnoty, a nemožnost takovou hodnotu v jednotlivých cyklech PT měnit. Standardní nejistota je odvozena z údaje o nejistotě obsažené v certifikátu certifikovaného referenčního materiálu.

#### 3. Referenční hodnoty

Vybrané připravené položky zkoušení způsobilosti jsou změřeny ve vybrané laboratoři za použití primární metody, popř. souběžně s certifikovaným referenčním materiálem. Vztažná hodnota se získá přímo použitou primární metodou z kalibrace za použití certifikované hodnoty certifikovaného referenčního materiálu (CRM). Získá se tak návazná hodnota prostřednictvím primární metody nebo použitého CRM, opírá se však o výsledky jediné laboratoře. Vhodné primární metody nebo CRM nemusí být dostupné. Standardní nejistota se odvodí z výsledků zkoušky vybrané laboratoře a nejistot certifikovaných hodnot použitých CRM.

#### 4. Konsenzuální hodnoty z expertních laboratoří

Stanovení konsenzuální hodnoty získané z výstupů skupiny expertních či referenčních laboratoří, které dobře zvládají použitou analytickou metodu, je pravděpodobně nejvěrohodnější způsob, jak získat odhad pravé hodnoty položky zkoušení způsobilosti, ale může to být způsob značně nákladný. Výsledky takové skupiny expertních laboratoří mohou vykazovat neznámé vychýlení (bias). Expertní laboratoře a použité metody by se měly zveřejnit před zahájením zkoušení způsobilosti. Tento přístup je často využíván např. při biologických či mikrobiologických stanoveních, kdy je kladen velký důraz na vysokou odbornost pracovníků expertních laboratoří. Jestliže každá z expertních laboratoří uvádí odhad standardní nejistoty, je pak standardní nejistota může být odhadnuta z rovnice (9.1):

$$u_x = \frac{1,25}{p} \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^p u_i^2} \quad (9.1)$$

kde  $u_i$  je standardní nejistota expertní laboratoře a  $p$  je počet expertních laboratoří.

## 5. Konsenzuální hodnoty účastníků

Další možností je použití konsenzuální hodnoty, dosažené v každém cyklu zkoušení způsobilosti a založené na výsledcích jednotlivých účastníků. V případě použití vzorků s přírodní matricí je jediným způsobem, jak stanovit odhad pravé hodnoty. Standardní nejistota může být odhadnuta z rovnice (9.2):

$$u_x = 1,25 \cdot s^* / \sqrt{p} \quad (9.2)$$

kde  $s^*$  je robustní směrodatná odchylka výsledků účastníků a  $p$  je počet účastníků.

### Směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti ( $\hat{\sigma}$ )

Existuje v podstatě pět metod [6], jak stanovit směrodatnou odchylku pro posuzování způsobilosti, tedy přijatelného rozpětí výsledků účastníků.

#### 1. Předepsaná hodnota

Směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti se může nastavit na hodnotu požadovanou pro specifický úkol interpretace dat nebo může být odvozena z požadavku formulovaného v legislativě (regulativní požadavek).

#### 2. Na základě představy

Směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti se může nastavit na hodnotu odpovídající úrovni výkonnosti, které by laboratoře měly být schopny dosáhnout.

#### 3. Na základě obecného modelu

Hodnota směrodatné odchylky pro posuzování způsobilosti se může odvodit z obecného modelu reprodukovatelnosti měřicí metody.

#### 4. Z výsledků mezilaboratorní studie preciznosti metody měření

Je-li metoda použitá v programu zkoušení způsobilosti standardizována a jsou-li dostupné informace o její opakovatelnosti a reprodukovatelnosti, může se směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti vypočítat z těchto údajů.

#### 5. Z údajů získaných v cyklu programu zkoušení způsobilosti

Podle tohoto postupu se směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti používaná v daném cyklu programu odvodí z výsledků udávaných účastníky v rámci stejného cyklu. Měla by to být robustní směrodatná odchylka výsledků uváděných všemi účastníky. Nevýhodou tohoto přístupu je to, že taková hodnota se může významně lišit od jednoho cyklu k druhému, což činí obtíž, pokud laboratoř chce za použití hodnot z-skóre hledat trendy, které se projevují v průběhu několika cyklů.

### 9.3.6 Hodnocení výkonnosti

Vzhledem k rozmanitým účelům programů zkoušení způsobilosti není možné určit jedinou univerzální metodu hodnocení. Vyhodnocení výkonnosti (nebo z-skóre) poskytovatelem PT zpracovává původní analytické výsledky účastníka a provádí se normalizovaným způsobem, aby se všechny výsledky staly srovnatelné a účastník mohl okamžitě pochopit smysl ohodnocení [2].

Četnost používání nejistot měření při hodnocení výkonnosti se zvyšuje s narůstajícím porozuměním tomuto parametru. V úvahu připadají dva druhy nejistoty měření: nejistota měření vztažné hodnoty a nejistota měření výsledků účastníků.

a) **z skóre** (používá se nejčastěji, s nejistotou měření nepočítá), uvádí rovnice (9.3)

$$z = \frac{(x - X)}{\hat{\sigma}} \quad (9.3)$$

ve které  $x$  je výsledek uváděný účastníkem,  $X$  je vztažná hodnota,  $\hat{\sigma}$  představuje směrodatnou odchylku pro posuzování způsobilosti.

b) **z' skóre** (bere v úvahu standardní nejistotu vztažné hodnoty), uvádí rovnice (9.4)

$$z' = \frac{(x - X)}{\sqrt{\hat{\sigma}^2 + u_X^2}} \quad (9.4)$$

ve které  $x$  je výsledek uváděný účastníkem,  $X$  vztažná hodnota,  $\hat{\sigma}$  směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti a  $u_X$  je standardní nejistota vztažné hodnoty  $X$ .

Při rozhodování, zda použít z-skóre či z'-skóre musí poskytovatel zkoušení způsobilosti uvážit následující hlediska:

- jestliže je  $u_X \leq 0,3 \hat{\sigma}$ , pak je standardní nejistota vztažné hodnoty zanedbatelná a použití z'-skóre nebude mít pravděpodobně žádný přínos,
- jestliže je  $u_X \geq 0,3 \hat{\sigma}$ , standardní nejistota vztažné hodnoty není zanedbatelná a doporučuje se použít z'-skóre.

c) **zeta skóre** (bere v úvahu standardní nejistotu vztažné hodnoty a výsledku účastníka), uvádí rovnice (9.5)

$$\zeta = \frac{(x - X)}{\sqrt{u_x^2 + u_X^2}} \quad (9.5)$$

ve které  $x$  je výsledek uváděný účastníkem,  $X$  vztažná hodnota,  $u_X$  je standardní nejistota vztažné hodnoty  $X$  a  $u_x$  vlastní odhad standardní nejistoty výsledku účastníka  $x$ .

d)  **$E_n$  číslo** (bere v úvahu rozšířenou nejistotu vztažné hodnoty a výsledku účastníka), uvádí rovnice (9.6)

$$E_n = \frac{(x - X)}{\sqrt{U_x^2 + U_{ref}^2}} \quad (9.6)$$

ve které  $x$  je výsledek uváděný účastníkem,  $X$  vztažná hodnota,  $U_x$  je rozšířená nejistota výsledku účastníka  $x$  a  $U_{ref}$  rozšířená nejistota vztažné hodnoty ( $X$ ) stanovené referenční laboratoří.

Běžně se používá následující klasifikace  $z$ ,  $z'$  a zeta skóre:

- $|z| \leq 2,0$  takové skóre znamená „vyhovující“ výkonnost a neposkytuje žádný podnět.

- $2,0 < |z| < 3,0$  skóre poukazuje na „problematickou“ výkonnost a signalizuje varování.
- $|z| \geq 3,0$  takové skóre ukazuje na „nevyhovující“ výkonnost a vytváří podnět k akci.

Klasifikace čísla  $E_n$ :

- $|E_n| \leq 1,0$  takové skóre znamená „vyhovující“ výkonnost a neposkytuje žádný podnět.
- $|E_n| > 1,0$  takové skóre ukazuje na „nevyhovující“ výkonnost a vytváří podnět k akci.

Interpretace výkonnosti ve zkoušení způsobilosti se týká všech úrovní managementu laboratoře od techniků až po vrcholové vedení. Protože laboratoř by měla používat validované postupy měření spolu s interním řízením kvality, nevyhovující výkonnost je tedy indikací, že existuje nějaký problém s validací a/nebo interním řízením kvality a tento problém by měl být brán vážně. Po pečlivém hodnocení výsledků jednotlivých cyklů by mělo následovat sledování výkonnosti ve zkoušení způsobilosti v delším časovém úseku, aby se rozpoznaly potenciální problémy ve vztahu k špatné preciznosti, systematickým chybám nebo chybám obsluhy. Velmi užitečné pro sledování výkonnosti ve zkoušení způsobilosti je grafické vynesení skóre výkonnosti v jednotlivých cyklech. Zeta-skóre nebo  $E_n$  čísla může napomoci při kontrole věrohodnosti odhadu nejistoty měření laboratoře.

### Příklad:

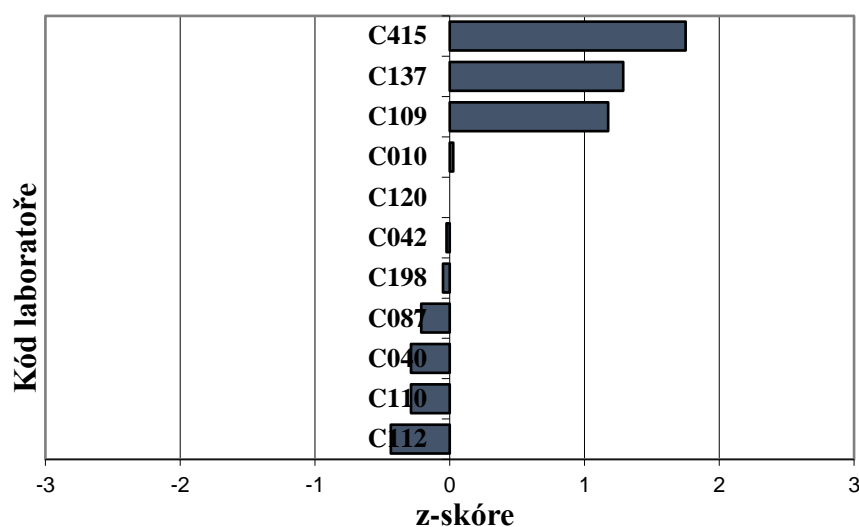
Programu zkoušení způsobilosti zaměřeného na stanovení chlorečnanů v pitné vodě se zúčastnilo 11 laboratoří. Vztažná hodnota byla  $80,0 \mu\text{g l}^{-1}$  a směrodatná odchylka pro posuzování způsobilosti  $8,0 \mu\text{g l}^{-1}$ . Posuďte výkonnost laboratoří pomocí z-skóre.

Označení laboratoře	Výsledek ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	z-skóre
C112	76,5	-0,44
C110	77,7	-0,29
C040	77,7	-0,29
C087	78,3	-0,21
C198	79,6	-0,05
C042	79,8	-0,03
C120	80,0	0,00
C010	80,2	0,03
C109	89,4	1,18
C137	90,3	1,29
C415	94,0	1,75

Ilustrační výpočet z-skóre pro laboratoř C112 (použit vztah 9.3):

$$z = \frac{(x - X)}{\hat{\sigma}} = \frac{(76,5 - 80,0)}{8,0} = -0,44$$

Grafické znázornění výsledků tohoto programu zkoušení způsobilosti je na obr. 9.1.



Obrázek 9.1 Grafické znázornění výsledků programu zkoušení způsobilosti na stanovení chlorečnanů v pitné vodě

Všechny laboratoře, které se zúčastnily tohoto programu zkoušení způsobilosti, mají vyhovující výsledky.

### 9.3.7 Kvalitativní programy zkoušení způsobilosti

Pro tyto programy zkoušení způsobilosti neexistuje obecně přijímané statistické hodnocení, ledaže poskytovatel zkoušení způsobilosti stanoví skóre výkonnosti porovnáním výsledků laboratoří se vztažnou hodnotou na základě transformace kvalitativních výsledků na kvantitativní údaje, která je založena na předem stanovených kritériích. Pokud se nestanoví skóre výkonnosti, jsou výsledky převážně ve formě „ano/ne“ nebo výsledku „zjištěno/nezjištěno“, „přítomen/nepřítomen“. Pro tento druh výsledků neexistuje v současnosti obecně uznávaný přístup.

### 9.3.8 Zkoušení způsobilosti v oblasti vzorkování

Protože správný odběr vzorku je kritickým krokem pro platnost dané analýzy, legislativní předpisy vyžadují akreditované pracovní postupy i pro vzorkování. Na tento požadavek reagují zkušební laboratoře a mají akreditované pracovní postupy včetně vzorkování. Proto vyvstal požadavek na akreditaci zkoušení způsobilosti v oblasti vzorkování. V České republice někteří poskytovatele nabízejí takové programy např. v oblasti životního prostředí.

Cílem zkoušení způsobilosti v oblasti vzorkování je porovnat výsledky analýz vzorků, které si účastníci sami odeberou, a zároveň porovnat i práci jednotlivých odběrových skupin.

Zkoušení způsobilosti vzorkování zahrnuje: posouzení provedení odběru včetně připravenosti odběrové skupiny k odběru a stanovení vybraných analytů.

Pro zkoušení způsobilosti odběrů vzorků je důležitá odběrová technika, zručnost odběrové skupiny a v neposlední řadě i připravenost dokumentace. Proto součástí zkoušení způsobilosti je kontrola dokumentace, plánu a záznamu o odběru, další vzdělávání, znalosti legislativy a postupů odběrů vzorků, vybavení, posouzení vlastního odběru a úpravy vzorku provedené na lokalitě, jeho uložení do přepravního boxu, kontrola transportu vzorku a jeho předání do laboratoře. Odběrovou skupinu hodnotí posuzovatelé dle právních předpisů. Posuzovatele vše zaznamenávají např. do kontrolních listů, které slouží k vyhodnocení úspěšnosti práce odběrových skupin. Součástí kontrolního listu jsou i údaje z normy ČSN EN ISO 5667-3, například údaje o sledování teploty chladicího systému během dopravy. Vzorkovací skupina si odebere vzorek a na místě nebo v laboratoři provede analýzy. Výsledky analýz zašle poskytovateli.

Vyhodnocení výkonnosti se skládá ze dvou částí (hodnocena je vzorkovací skupina a analytické výsledky):

- Účastník obdrží certifikát, kde je uvedena identifikace účastníka včetně jmen vzorkařů s hodnocením (vyhověl/nevyhověl).
- Účastník obdrží závěrečnou zprávu a např. osvědčení o účasti ve zkoušení způsobilosti, kde je vyhodnocena výkonnost pomocí z skóre.

Výsledky ze zkoušení způsobilosti v oblasti vzorkování mohou být využity i pro výpočet stanovení nejistot měření včetně vzorkování.

### **9.3.9 Zkoušení způsobilosti s malým počtem účastníků**

Neexistuje jednoznačný postup pro organizování a vyhodnocení výkonnosti takovýchto PT. Někteří poskytovatelé využívají Hornův postup [9]. Tento postup je použitelný pro 4 až 20 platných měření. Statistické zpracování vychází z pořádkové statistiky souboru. Podle počtu měření se určí hloubka pivotů, pivotová polosuma (odhad střední hodnoty) a pivotové rozpětí.

Nejnovější dokument vydaný v této oblasti je EA-4/21 INF:2018 Guidelines for the assessment of the appropriateness of small interlaboratory comparisons within the process of laboratory accreditation [10].

#### **Literatura:**

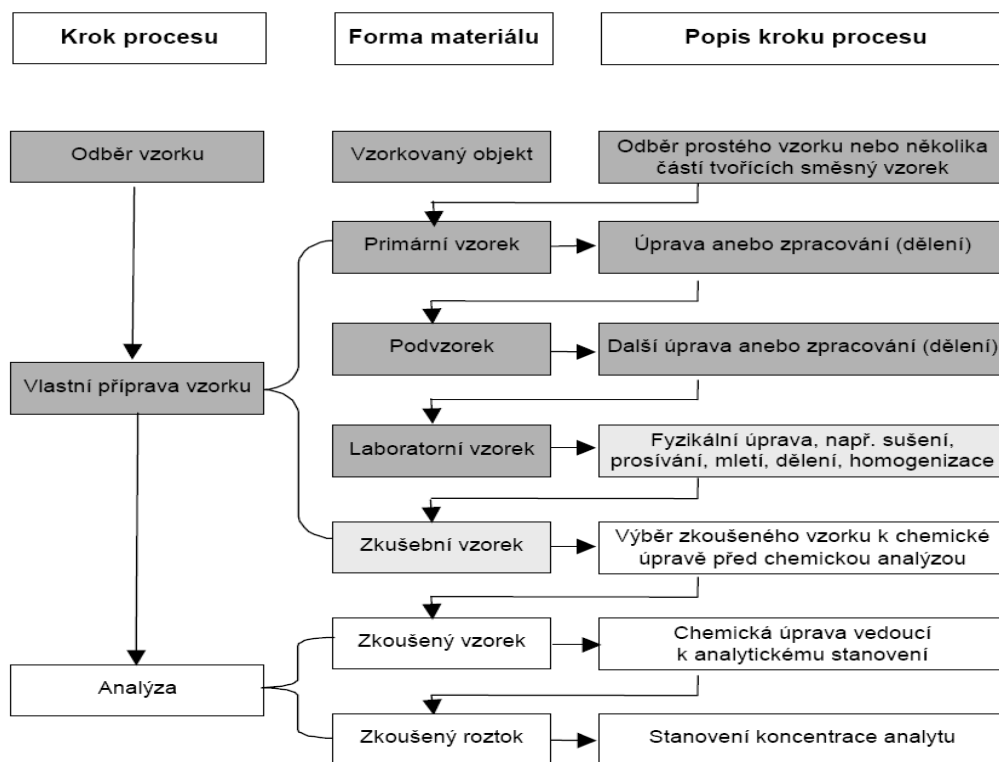
1. ČSN EN ISO/IEC 17043:2010. Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti.
2. KVALIMETRIE 17. Mezilaboratorní porovnávání a zkoušení způsobilosti: Pomůcka k zajišťování kvality v chemických, biochemických a klinických laboratořích. EURACHEM-ČR, Praha 2010 (ISBN 80-86322-05-X).

3. ČSN ISO 5725-2:1997. Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření – Část 2: Základní metoda pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované metody měření.
4. EA-4/18:2010 – Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation, [www.european-accreditation.org](http://www.european-accreditation.org), český překlad viz <http://www.cia.cz/dokumenty.aspx>
5. Metodický list 19 - Eurachem Leaflet: *Zkoušení způsobilosti – které a jak často?* (český překlad) EURACHEM-ČR 2018. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>.
6. ČSN ISO 13528:2017. Statistické metody používané při zkoušení způsobilosti mezilaboratorním porovnáváním.
7. Metodický list 14 - Eurachem Leaflet: *Výběr správného programu zkoušení způsobilosti pro moji laboratoř* (český překlad) EURACHEM-ČR 2015. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>.
8. ČSN EN ISO/IEC 17025: 2018. Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří.
9. M. Meloun, J. Militký.: Statistické zpracování experimentálních dat. Plus Praha, 1994.
10. EA-4/21:INF:2018. Guidelines for the assessment of the appropriateness of small interlaboratory comparisons within the process of laboratory accreditation (<http://www.european-accreditation.org>).

## 10 VZORKOVÁNÍ

Vzorkování je nedílnou součástí procesu analýzy vzorku. Patří sem všechny činnosti související s přípravou a zpracováním plánu vzorkování, s vlastním odběrem vzorku a dalším nakládáním se vzorkem a činnosti související se zpracováním příslušné dokumentace [1].

Při každém odběru vzorků je nutné si uvědomit, že odběr vzorku je rozhodujícím faktorem pro vypovídací schopnost výsledků analýzy. Pokud nesprávně odebraný vzorek nereprezentuje situaci ve vzorkovaném objektu, nemusejí výsledky velmi přesných analýz prováděných ve špičkové a akreditované laboratoři vést ke správným závěrům. Hlavním účelem odběru vzorků je získání reprezentativního vzorku zkoumaného objektu k analýze. Reprezentativní vzorek představuje ideální stav, kterému se v provozní praxi nejvíce přibližuje **směsný vzorek**, což je směs prostých vzorků odebraných ze vzorkovaného objektu tak, aby celkové složení výsledného vzorku co nejlépe vystihovalo průměrnou hodnotu měřeného ukazatele. **Prostý vzorek** je možno definovat jako množství materiálu předepsané hmotnosti, objemu nebo velikosti, odebrané jednorázově v daném čase a místě ze vzorkovaného objektu, např. trvale homogenní objekt se může charakterizovat jediným prostým vzorkem. Při analýzách odebraných vzorků se zjišťuje jejich chemické složení, fyzikální vlastnosti, někdy se provádí též jejich biologické a mikrobiologické analýzy. Výsledky analýz prováděné v akreditovaných laboratořích se pak používají k hodnocení stavu životního prostředí, úpravě technologií, výpočtu poplatků za znečištění apod. Názorný příklad postupu analýzy od odběru vzorku až po získání výsledku je zachycen na obrázku 10.1.



Obrázek 10.1 Proces analýzy od odběru vzorku až po získání analytického výsledku [2]

Základní otázky, z nichž je třeba vycházet při sestavování vhodné strategie vzorkování a plánu vzorkování, jsou uvedeny ve schématu na obrázku 10.2.

Vzorkování	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Místo vzorkování</li> <li>• Postup odběru vzorků (normovaný?)</li> <li>• Četnost vzorkování</li> <li>• Množství vzorku</li> <li>• Odběrové zařízení (jednoduché nebo automatický vzorkovač)</li> <li>• Vzorkovnice (typ, materiál, objem)</li> <li>• Označení vzorkovnic</li> <li>• Uchovávání a transport vzorků do laboratoře</li> <li>• Příslušná analytická laboratoř</li> </ul>
Laboratoř	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zápis vzorků</li> <li>• Příjem vzorků</li> <li>• Typ vzorku</li> <li>• Homogenita vzorku</li> <li>• Stabilita vzorku</li> <li>• Měření (analyt, matrice)</li> <li>• Koncentrace</li> <li>• Potřebná měřicí schopnost metody</li> </ul>

Obrázek 10.2 Hlavní aspekty, k nimž je třeba přihlížet při sestavování strategie a plánu vzorkování

Řada významných oblastí vzorkování je podchycena závaznými normami s popisem různých typů vzorkování pro různé typy sledovaných matic. Určitý přehled o komplexnosti celé problematiky poskytuje tabulka 10.1.

Tabulka 10.1 Orientační přehled organizací vydávajících normy o vzorkování základních matic a konkrétních typů matic, pro něž se normy vydávají

Organizace vydávající normy o vzorkování	Matrice	Konkrétní typy (příklady)
Mezinárodní: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ISO, CEN, ASTM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potraviny</li> <li>- Voda</li> <li>- Půdy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rostlinné a živočišné</li> <li>- Pitná voda, odpadní voda</li> <li>- Půda, odpady</li> </ul>
Národní: <ul style="list-style-type: none"> <li>• ČAS, DIN, BSI, SÚTN atd.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovzduší</li> <li>- Materiály</li> <li>- Chemikálie</li> <li>- Biochemické</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Částice, plyny</li> <li>- Fosilní paliva, polymery</li> <li>- Drogy, hnojiva, léčiva</li> <li>- Sérum, krev, moč</li> </ul>

Pozn.: ISO – International Organization for Standardization; CEN – Evropský výbor pro normalizaci; ASTM – American Society for Testing and Materials; ČAS – Česká agentura pro standardizaci; DIN – Deutsches Institut für Normung; BSI – British Standards; SÚTN – Slovenský ústav technickej normalizácie

## Nejistota vzorkování

Součástí celkové nejistoty měření je také příspěvek pocházející ze vzorkování. Postupy jeho výpočtu a výpočty celkové nejistoty měření zahrnující tento příspěvek jsou obsaženy ve [2]. Zjednodušeně lze příspěvek nejistoty vzorkování k celkové nejistotě  $u_{celk}$  popsat rovnicí 10.1

$$u_{celk}^2 = u_{vz}^2 + u_{an}^2, \text{ kde} \quad (10.1)$$

$u_{vz}$  je nejistota vzorkování a  $u_{an}$  je nejistota analýzy.

## Dokumentace vzorkování

Podle základní rozvahy a volby strategie vzorkování se připravuje plán vzorkování, který obsahuje všechny technické údaje o místě, čase, způsobu a personálním zabezpečení odběru vzorků. Zahrnuje též zásady ochrany zdraví a bezpečnosti práce. K další dokumentaci vzorkování obvykle patří:

- pracovní deník vedený osobou zajišťující odběry vzorků,
- dokumentace odběrných míst (katalog – fotodokumentace, náčrt v plánu nebo mapě a nejlépe fyzické označení míst v provozu značkami – tabulkami),
- záznam nebo protokol o odběru vzorku. Jeho náležitosti upravuje Metodický pokyn pro akreditaci ČIA MPA 01-15 a patří sem: název dokumentu (Protokol či Záznam o odběru vzorku), název a adresa subjektu provádějícího odběr vzorku, jednoznačná identifikace dokumentu – pořadové číslo, číslování stránek 1,2.../z X, zřetelný konec protokolu, název a adresa zákazníka, datum a čas (doba) odběru vzorku, intervaly odběru, místo odběru (i náčrt, fotografie), identifikace materiálu, z něhož byl odebrán vzorek, popis a identifikace vzorku, včetně odebraného množství, odkaz na použitý plán a postupy vzorkování, podrobnosti o podmínkách prostředí v průběhu odběru (vliv na zkoušky), jméno osoby provádějící odběr, způsob předběžné úpravy vzorku, konzervace či stabilizace odebraného vzorku (cezení...), výsledky zkoušek provedených v místě odběru nebo odkaz na ně, podmínky transportu vzorku z místa odběru do laboratoře, případně při předání vzorku, datum a čas předání vzorku do laboratoře, identifikace laboratoře, jméno, funkce a podpis osoby, která potvrzuje protokol o odběru, případně osoby přítomné při odběru a rovněž norma či jiná specifikace týkající se metody nebo postupu vzorkování a odchylky, dodatky nebo výjimky od příslušné specifikace.
- protokol o uchování a předání vzorku do laboratoře (vyplňuje zpravidla pracovník laboratoře za přítomnosti osob, které vzorky odebíraly – jako přijímací protokol).

## Transport vzorků

Po odběru vzorků je třeba vzorky dopravit za vhodných podmínek do laboratoře. Přitom je třeba respektovat níže uvedená obecná doporučení:

1. Vzorky se ukládají do suchých vzorkovnic, které se plní dle doporučení laboratoře.
2. Vzorky je třeba chránit před světlem a teplem (obvykle je k přechovávání ideální nižší teplota, např. 4 °C).

3. Vzorky (vzorkovnice) je třeba při přepravě zajistit proti nežádoucímu pohybu, rozbití a ztrátám obsahu.
4. Čas mezi odběrem vzorku a jeho analýzou je vhodné minimalizovat, především u méně stabilních vzorků.
5. V potřebných případech je někdy nutné vzorek uměle stabilizovat – konzervovat (např. přidávkem vhodného konzervačního činidla, při nechemické stabilizaci se vzorky chladí nebo zmrazují).

### **Zajištění srovnatelnosti vzorkování**

Obdobně jako při zabezpečení kvality měření v analytické laboratoři se realizuje i systém zabezpečení srovnatelného vzorkování. K tomu slouží tři základní přístupy: akreditace vzorkování prováděná Českým institutem pro akreditaci, zavedení systému zabezpečení kvality vzorkování v jednotlivých laboratořích a mezilaboratorní porovnání odběrů.

Při akreditaci vzorkování se posuzuje systém vzorkování v laboratoři, vycházející z dobře sestavených standardních pracovních postupů pro různé vzorkované matrice, postupů pro sestavování plánu vzorkování či programu vzorkování a vyškoleného zkušeného personálu, z hlediska plnění požadavků na vzorkování podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025. Udělení akreditace vzorkování znamená splnění požadavků této normy.

Podobně jako při provádění interní kontroly kvality analýz se v laboratoři pro systém zabezpečení kvality vzorkování odebírají slepé vzorky pro ověření možné kontaminace vzorků, provádějí se opakované odběry a dělí se vzorky pro opakovaná souběžná stanovení (více např. v ČSN EN ISO 5667-14).

Externí formu zabezpečení kvality vzorkování pak představují mezilaboratorní porovnání odběrů (viz také kap. 9.3.8), kdy se u vhodného vzorkovaného objektu scházejí vzorkovací skupiny, které vlastními postupy v souladu s legislativou odeberou ve stejném čase vlastní vzorky a ty nechají analyzovat ve své laboratoři. Výsledky se pak vyhodnocují obdobně jako u zkoušení způsobilosti; vedle srovnatelnosti výsledků laboratoří se uplatňují i odchylky způsobené postupem odběru vzorku konkrétními vzorkaři.

### **Literatura:**

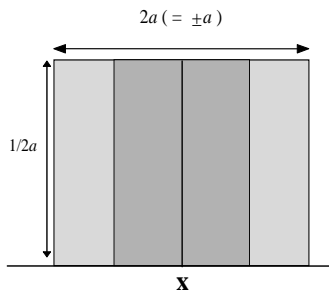
1. Metodický list 4 – *Terminologie vzorkování*. EURACHEM-ČR 2018. <http://www.eurachem.cz/metodicke-listy.php>
2. KVALIMETRIE 15. Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků: Metodická příručka s postupy. Použití informace o nejistotě k posuzování shody. EURACHEM-ČR, Praha 2008 (ISBN 80-86322-03-3).

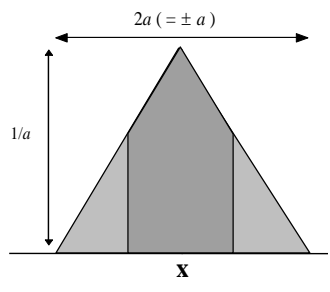
# 11 VYBRANÉ APLIKACE STATISTIKY

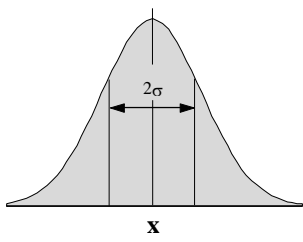
## Distribuční funkce

O nejistotě výsledku pojednává kapitola 7 této příručky. Důležitým momentem při odhadu nejistoty je praktický výpočet nejistoty výsledků z experimentálních hodnot vstupních parametrů a jejich nejistot či z hodnot vstupních parametrů a jejich nejistot získaných jiným způsobem.

Odhad nejistot vstupních parametrů závisí na typu rozdělení vstupní hodnoty a na dalších informacích, které se ke vstupní hodnotě váží. Při odhadu nejistoty vstupních veličin, které souvisí s chemickými měřeními, se nejčastěji používají **normální, rovnoměrné a trojúhelníkové rozdělení**. Následující text ukazuje, jak postupovat při výpočtu standardní nejistoty z parametrů tří typů nejdůležitějších distribučních funkcí, a uvádí, za jakých okolností se mají používat.

Rovnoměrné rozdělení		
Tvar	Použití	Nejistota
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• V certifikátu nebo jiné specifikaci jsou uvedeny meze bez udání konfidenční úrovně (např. 25 ml ± 0,05 ml).</li> <li>• Odhad ve formě rozpětí (<math>\pm a</math>) bez udání tvaru distribuční funkce.</li> </ul>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{3}}$

Trojúhelníkové rozdělení		
Tvar	Použití	Nejistota
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Informace, která je o <math>x</math> k dispozici, je více určující než u rovnoměrného rozdělení. Hodnoty těsně kolem <math>x</math> jsou pravděpodobnější než v blízkosti hranic.</li> <li>• Odhad ve formě maximálního rozpětí (<math>\pm a</math>) popsaného symetrickou distribucí.</li> </ul>	$u(x) = \frac{a}{\sqrt{6}}$

Normální rozdělení		
Tvar	Použití	Nejistota
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Odhad je učiněn z opakovaných pozorování náhodného procesu</li> <li>• Nejistota je uvedena ve formě směrodatné odchylky <math>s</math>, relativní směrodatné odchylky <math>s/\bar{x}</math></li> <li>• Nejistota je uvedena ve formě 95 % (nebo jiného) intervalu spolehlivosti <math>x \pm d</math> bez specifikace rozdělení</li> </ul>	$u(x) = s$  $u(x) = s$ $u(x) = x \cdot (s/\bar{x})$  $u(x) = d/2$ (pro $d$ při 95 %)

## Statistika opakovaných měření, náhodný výběr

**Základní soubor** je množina hodnot náhodné veličiny s daným rozdělením pravděpodobností, z níž se vybírají pozorované hodnoty této veličiny. Základní soubor obsahuje hodnoty náhodné veličiny skutečně pozorované a teoreticky možné. Teoreticky proto, že nemáme technické, časové nebo jiné možnosti pozorování uskutečnit, ale víme, jak bychom každé jednotlivé pozorování mohli uskutečnit. Vlastnosti základního souboru poznáváme jen do určité míry prostřednictvím **náhodného výběru**. Příkladem základního souboru mohou být např. výsledky všech možných analýz stejného vzorku (nekonečně velký soubor), všechny možné koncentrace  $H_2SO_4$ , které můžeme obdržet od výrobce (nekonečný), dodávka 5 vagónů železné rudy (konečný) apod. Náhodný výběr je potom např. 5 analýz stejného vzorku, 10 různých koncentrací  $H_2SO_4$ , 5 vzorků po 1 kg odebraných náhodně z každého vagónu atd.

Uvažujme náhodný pokus, jehož výsledkem je hodnota  $x$  náhodné veličiny  $\xi$ , která má distribuční funkci  $F(x)$ . Opakujeme-li náhodný pokus nezávisle  $n$ -krát, dostaneme hodnoty  $x_1, x_2, \dots, x_n$ . Množina těchto hodnot se nazývá náhodným výběrem rozsahu  $n$  z rozdělení, majícího distribuční funkci  $F(x)$ . Vzhledem k tomu, že hodnoty náhodného výběru pocházejí z téhož základního souboru, mají stejnou střední hodnotu a stejný rozptyl.

K charakterizaci náhodného výběru používáme charakteristik, které nazýváme výběrovými charakteristikami. Zmíníme se hlavně o dvou – výběrovém průměru a výběrovém rozptylu.

Výběrový průměr (**aritmetický průměr**) je definován jako (11.1)

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (11.1)$$

Střední hodnota výběrového průměru je  $\mu$ , rozptyl je  $\sigma^2/n$ . Střední hodnota výběrového průměru je tedy stejná jako střední hodnota základního souboru, zatímco rozptyl výběrového průměru je roven  $n$ -tině rozptylu rozdělení, z něhož pochází.

**Výběrový rozptyl** (odhad rozptylu) je definován vztahem (11.2)

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (11.2)$$

Podobně jako v případě výběrového průměru se dá dokázat, že očekávaná hodnota výběrového rozptylu je  $\sigma^2$ .

**Výběrová směrodatná odchylka**,  $s$ , je druhá odmocnina výběrového rozptylu.

**Rozpětí**,  $R$ , definované jako rozdíl mezi nejvyšší ( $x_n$ ) a nejnižší ( $x_1$ ) hodnotou jednotlivých výsledků v sérii měření (rovnice 11.3):

$$R = x_n - x_1 \quad (11.3)$$

## Testování robustnosti

Testování robustnosti může být provedeno posuzováním vlivu každého parametru samostatně, což je pracné, vyžaduje velký počet experimentů a některé parametry mohou být opomenuty. Vzhledem k tomu, že u vyvinuté a optimalizované metody můžeme předpokládat, že vliv jednotlivých parametrů na výsledek bude malý, lze provádět změny několika parametrů současně. Obvykle se k testování robustnosti používají zkrácený faktoriální pokus. Youden popsal poměrně jednoduché plánování pokusů, při kterém se ověřuje vliv sedmi parametrů pomocí osmi experimentů. Pokud jsou identifikovány významné parametry na výsledek měření, je třeba je podrobně studovat a případně provést další vývoj metody.

**Youdenův test** využívá tzv. Plackett-Burmanovo plánování pokusů, které je znázorněno v tabulce 11.1 [1]. K prozkoumání vlivu parametru se vypočte rozdíl mezi průměrem výsledků získaných s parametrem na normální úrovni a průměrem výsledků s parametrem na alternativní úrovni.

Tabulka 11.1 Plackett-Burmanovo plánování pokusů pro studování 7 vlivů (parametrů)

Parametr	Číslo pokusu							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A nebo a	A	A	A	A	a	a	a	a
B nebo b	B	B	b	b	B	B	b	b
C nebo c	C	c	C	c	C	c	C	c
D nebo d	D	D	d	d	d	d	D	D
E nebo e	E	e	E	e	e	E	e	E
F nebo f	F	f	f	F	F	f	f	F
G nebo g	G	g	g	G	g	G	G	g
<b>Výsledek měření</b>	<b>r</b>	<b>t</b>	<b>u</b>	<b>v</b>	<b>w</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>

Následující příklad, na kterém si ukážeme postup, je převzat z KVALIMETRIE 10 [2]. V návodu analytické metody bylo určeno 5 kritických parametrů, které by mohly mít vliv na robustnost. Vzhledem k tomu, že Youdenův test vyžaduje 7 parametrů, byly náhodně vybrány parametry C a E jako prázdné, tj. parametry, které by neměly ovlivňovat výsledek měření.

- A pH mobilní fáze
- B koncentrace tlumivého roztoku
- C okno v laboratoři
- D koncentrace přídavného činidla (např. pro tvorbu iontových párů)
- E přítomnost vedoucího laboratoře
- F průtoková rychlost
- G stáří kolony

Nominální a alternativní hodnoty parametrů shrnuje tabulka 11.2:

Tabulka 11.2 Nominální a alternativní hodnoty parametrů A-G

Parametr	Nominální úroveň	Alternativní úroveň
A	6,5	7,1
B	0,2 mol l <sup>-1</sup>	0,3 mol l <sup>-1</sup>
C	zavřené	otevřené
D	1 mol l <sup>-1</sup>	1,5 mol l <sup>-1</sup>
E	nepřítomen	přítomen
F	1,4 ml min <sup>-1</sup>	1,6 ml min <sup>-1</sup>
G	nová	používaná 6 měsíců

V tabulce 11.3 níže jsou uvedeny výsledky měření analytického signálu. Např. měření označené jako t (tj. hodnota signálu 1,65) bylo získáno pro toto nastavení parametrů: pH = 6,5, koncentrace tlumivého roztoku 0,2 mol l<sup>-1</sup>, otevřené okno, koncentrace přídavného činidla 1 mol l<sup>-1</sup>, vedoucí laboratoře přítomen, průtoková rychlost 1,6 ml min<sup>-1</sup> a kolona používaná 6 měsíců.

Tabulka 11.3 Výsledky měření testu robustnosti

r	t	u	v	w	x	y	z
1,64	1,65	1,69	1,70	1,32	1,35	1,50	1,45

Z výsledků měření v tabulce vypočteme výběrovou směrodatnou odchylku s použitím vztahu 11.2 a odmocněním výběrového rozptylu s<sup>2</sup>. Pro naše data s = 0,153.

Hodnota Δ se vypočte ze vztahu 11.4

$$\Delta = t_{(0,975;7)} \frac{s}{\sqrt{2}} \quad (11.4)$$

kde t je tabelovaný kvantil Studentova rozdělení pro 7 stupňů volnosti, tedy t<sub>(0,975;7)</sub> = 2,365.

Kontrasty jednotlivých parametrů se vypočtou z následujících rovnic:

$$V_A = 1/4(r + t + u + v) - 1/4(w + x + y + z)$$

$$V_B = 1/4(r + t + w + x) - 1/4(u + v + y + z)$$

$$V_C = 1/4(r + u + w + y) - 1/4(t + v + x + z)$$

$$V_D = 1/4(r + t + y + z) - 1/4(u + v + w + x)$$

$$V_E = 1/4(r + u + x + z) - 1/4(t + v + w + y)$$

$$V_F = 1/4(r + v + w + z) - 1/4(t + u + x + y)$$

$$V_G = 1/4(r + v + x + y) - 1/4(t + u + w + z)$$

Test robustnosti spočívá v testu hypotézy  $H_0: V_i = 0$  předpokládající, že všechny kontrasty jsou nulové oproti  $H_1: V_i \neq 0$ . Test provedeme vypočtením konfidenčního intervalu kontrastu (rovnice 11.5):

$$L_{12} = V_i \pm t_{(0,975;7)} \frac{s}{\sqrt{2}} = V_i \pm \Delta \quad (11.5)$$

Hodnoty vypočtených kontrastů pro náš příklad jsou:

$$V_A = 0,265 \quad V_B = -0,095 \quad V_C = 0,005 \quad V_D = 0,045$$

$$V_E = -0,005 \quad V_F = -0,025 \quad V_G = 0,015$$

Konfidenční interval je  $L_{1,2} = V_i \pm 0,256$  (tedy  $\Delta = 0,256$ ). Obsahuje-li konfidenční interval bod 0, potom je kontrast statisticky nevýznamný a měřicí postup je pro daný parametr robustní. V našem příkladu je postup robustní pro všechny parametry s výjimkou parametru A (pH mobilní fáze). V návodu musíme na tento fakt upozornit a pečlivě hodnotu pH kontrolovat.

### Kragtenův algoritmus

Při odhadu kombinované nejistoty používáme různé výpočetní postupy, z nichž nejvhodnější je tzv. Kragtenovo schéma (algoritmus), které bylo publikováno např. v KVALIMETRII 16 a 19 [3, 4].

Odhad hodnoty  $y$  veličiny  $\psi$  (výsledek) pomocí odhadů hodnot  $x_1$  až  $x_n$  (vstupní parametry) je dán rovnicí měření (11.6)

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_n), \quad (11.6)$$

Vztah mezi kombinovanou standardní nejistotou  $u_c(y)$  hodnoty  $y$  veličiny  $\psi$  a standardními nejistotami  $u(x_i)$  hodnot  $x_i$  veličin  $\xi_i$  vychází ze zákona propagace nejistot.

Pro nezávislé veličiny  $x_i$  má rovnice tvar (11.7)

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2}, \quad (11.7)$$

ve které

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

je citlivost (selektivitní koeficient) měřené hodnoty  $y$  vzhledem k hodnotám jednotlivých vstupních veličin. Jednotlivé citlivosti mohou být získány experimentálně. Je třeba připomenout, že uvedený vztah je vztahem aproximativním, ve kterém jsou vynechány

členy s parciálními derivacemi vyšších řádů. V chemických měřeních je tato aproximace dostačující. Parciální derivace můžeme aproximovat vztahem (11.8):

$$\frac{\partial y}{\partial x_i} \cong \frac{y(x_i + u(x_i)) - y(x_i)}{u(x_i)} \quad (11.8)$$

a dílčí příspěvek jednotlivé vstupní veličiny k celkové nejistotě aproximovat vztahem (11.9)

$$u(y, x_i) = y(x_1, x_2, \dots, (x_i + u(x_i)), \dots, x_n) - y(x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n) \quad (11.9)$$

Na základě této aproximace je vytvořen algoritmus výpočtu:

- formulování modelu měření  $y = f(x_i)$ ,  $i = 1, \dots, p$  ( $p$  je počet vstupních veličin)
- vložení sloupců hodnot vstupních veličin a jejich standardních nejistot
- zkopírování sloupce hodnot do matice  $p \times p$  pomocí F4 (\$ před označením sloupce)
- zvětšení diagonálních prvků o standardní nejistotu příslušných veličin
- výpočet výstupní veličinu pod sloupcem původních hodnot
- zkopírování vzorce (model měření) do řádků pod matici
- výpočet diference hodnoty výstupní veličiny nezměněné a změněné
- výpočet druhé mocniny diferencí
- výpočet sumy mocnin diferencí
- odmocnina ze sumy je kombinovaná standardní nejistota
- výpočet příspěvků jednotlivých veličin k celkové nejistotě

**Příklad** s využitím MS Excel:

1. Model měření:  $y = \frac{x_1 \cdot x_2}{x_3 \cdot x_4}$

2. Vstupní veličiny a jejich standardní nejistoty:

veličina	hodnoty	Stu	Rsu
x1	2,46	0,02	0,81%
x2	4,32	0,13	3,01%
x3	6,38	0,11	1,72%
x4	2,99	0,07	2,34%

3. Vytvořit matici  $p \times p$  ( $4 \times 4$ ) a zkopírovat sloupec hodnot do celé matice pomocí F2 a F4 (string \$ před označením sloupce)

4. Na diagonálu vložíme jiné prvky: hodnota + standardní nejistota Stu

veličina	hodnoty	Stu	Rsu
x1	2,46	0,02	0,81%
x2	4,32	0,13	3,01%
x3	6,38	0,11	1,72%
x4	2,99	0,07	2,34%
y	<b>0,557</b>	<b>0,024</b>	<b>4,22%</b>

	x1	x2	x3	x4	
	2,48	2,46	2,46	2,46	
	4,32	4,45	4,32	4,32	
	6,38	6,38	6,49	6,38	
	2,99	2,99	2,99	3,06	
	<b>0,562</b>	<b>0,574</b>	<b>0,548</b>	<b>0,544</b>	
	0,004529	0,016764	-0,009442	-0,012744	diff
	2,05137E-05	0,000281	8,916E-05	0,0001624	diff^2
				0,0005531	sum(diff^2)

5. Zkopírujeme model měření do řádku pod maticí 4×4; jsou zde hodnoty  $y$  vypočtené ze změněných hodnot  $x$
6. Vypočteme diference, *diff*, původní hodnoty (0,557) a změněných hodnot
7. Vypočteme druhé mocniny diferencí, *diff*<sup>2</sup>
8. Vypočteme sumu druhých mocnin, *sum(diff*<sup>2</sup>)
9. Vypočteme kombinovanou nejistotu (odmocninu ze sumy) a relativní kombinovanou nejistotu
10. Vypočteme příspěvky jednotlivých vstupních veličin k celkové nejistotě jako podíl jednotlivých druhých mocnin diferencí k sumě diferencí:

x1	x2	x3	x4
3,7 %	50,8 %	16,1 %	29,4 %

### Testování hypotéz

Testování hypotéz je důležitou součástí interpretace výsledků měření. Postup spočívá v tom, že nejprve vytvoříme tzv. nulovou hypotézu, tj. hypotézu, která vychází z požadavků na interpretaci. Jsou to obvykle hypotézy o základních parametrech rozdělení pravděpodobnosti měřené veličiny. Hypotézy vždy testujeme na určité hladině významnosti  $\alpha$ , obvykle volíme hodnotu  $\alpha = 0,05$ . Tradiční, klasický způsob testování hypotéz vychází pouze z dat získaných opakovaným měřením. Je to však způsob velice ilustrativní a slouží i k pochopení testování hypotéz datových souborů, u kterých známe nejistotu měření.

Testy hypotéz pro opakované pokusy neberou v úvahu nejistotu výsledku. Mírou proměnlivosti je pouze výběrová směrodatná odchylka opakovatelnosti nebo reprodukovatelnosti. Vstupními hodnotami pro všechny testy jsou hodnoty některých charakteristik výběru: aritmetický průměr, směrodatná odchylka výběru,  $s$ , rozsah měření,  $n$ , kvantily  $t$  a  $F$  rozdělení pro určitý počet stupňů volnosti a hladinu významnosti  $\alpha$ . Zde se zaměříme pouze na testování, zda střední hodnota náhodné veličiny nabývá určité hodnoty anebo je větší či menší než tato určitá hodnota.

*Test hypotézy*  $H_0: \mu = \mu_0$

Testujeme hypotézu o tom, že střední hodnota náhodné veličiny nabývá určité hodnoty.  $H_0$  platí, jestliže hodnota  $\mu_0$  je uvnitř oboustranného konfidenčního intervalu (intervalu spolehlivosti)  $L_{12}$  (11.10):

$$L_{12} = \bar{x} \pm t_{(1-\frac{\alpha}{2}; n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (11.10)$$

kde  $t_{(1-\frac{\alpha}{2}; n-1)}$  je kvantil Studentova rozdělení.

*Test hypotézy*  $H_0: \mu < \mu_0$

Testujeme hypotézu o tom, že střední hodnota náhodné veličiny nabývá hodnot menších než je určitá hodnota.  $H_0$  platí, jestliže hodnota  $\mu_0$  je uvnitř jednostranného intervalu  $\langle L_1; \infty \rangle$ .  $L_1$  je vypočten rovnicí (11.11):

$$L_1 = \bar{x} - t_{(1-\alpha; n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (11.11)$$

kde  $t_{(1-\alpha; n-1)}$  je kvantil Studentova rozdělení.

*Test hypotézy*  $H_0: \mu > \mu_0$

Testujeme hypotézu o tom, že střední hodnota náhodné veličiny nabývá hodnot větších než je určitá hodnota.  $H_0$  platí, jestliže hodnota  $\mu_0$  je uvnitř jednostranného intervalu  $\langle -\infty; L_2 \rangle$ .  $L_2$  je vypočten rovnicí (11.12):

$$L_2 = \bar{x} + t_{(1-\alpha; n-1)} \frac{s}{\sqrt{n}}, \quad (11.12)$$

### **Testování hypotéz s použitím nejistoty výsledku**

Předpokladem vhodnosti těchto testů je znalost standardní kombinované nejistoty výsledku. Ve všech testech je  $u$  standardní kombinovaná nejistota a  $U$  je rozšířená nejistota  $U = k \cdot u$ . Pro 5% hladinu významnosti volíme  $k = 2$ .

*Test hypotézy*  $H_0: \mu = \mu_0$

Hypotéza  $H_0$  platí, jestliže

$$\frac{|x - \mu_0|}{u} \leq 1,96, \quad (11.13)$$

kde  $x$  je výsledek měření a hodnota 1,96 je kvantil normovaného normálního rozdělení.

*Test hypotézy*  $H_0: \mu < \mu_0$

Hypotéza  $H_0$  platí, jestliže  $x \leq (\mu_0 + 1,64 \cdot u)$   $x$  je výsledek měření (11.14)

*Test hypotézy*  $H_0: \mu > \mu_0$

Hypotéza platí, jestliže  $x \geq (\mu_0 - 1,64 \cdot u)$   $x$  je výsledek měření (11.15)

*Test hypotézy*  $H_0: \mu_1 = \mu_2$

Hypotéza platí, jestliže

$$\frac{|x_1 - x_2|}{\sqrt{u_1^2 + u_2^2}} \leq 1,96, \quad (11.16)$$

kde  $x_1$  a  $x_2$  jsou výsledky měření dvou nezávislých souborů,  $u_1$  a  $u_2$  jsou příslušné standardní kombinované nejistoty.

## Nejistota hodnoty odečtené z lineární kalibrace

V případě, že kalibrační závislost je proložena přímkou  $y = b_0 + b_1x$ , kde  $b_0$  je úsek na ose  $y$  a  $b_1$  směrnice, se koncentrace analytu v neznámém vzorku  $x_{vz}$  vypočte

$$x_{vz} = \frac{y_{vz} - b_0}{b_1} \quad (11.17)$$

Standardní nejistota hodnoty vzorku  $u(x_{vz})$  je potom

$$u(x_{vz}) = \frac{s_{yx}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{n} + \frac{(y_{vz} - \bar{y})^2}{b_1^2 \cdot Q_{xx}}}, \quad (11.18)$$

kde  $\bar{y}$  je průměrná hodnota signálu kalibračních standardů,  $N$  je počet opakování, z nichž se počítá průměrná hodnota  $y_{vz}$ ,  $n$  je počet kalibračních bodů,  $Q_{xx}$  je definovaný jako  $Q_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$  a reziduální směrodatná odchylka  $s_{yx}$  se vypočte z rovnice (11.19)

$$s_{yx}^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(y_i - b_0 - b_1 \cdot x_i)^2}{n - 2} \quad (11.19)$$

Podrobnosti lze nalézt v KVALIMETRII 16 [3], ze které je převzat i následující příklad.

**Příklad:** Na základě dat ze spektrofotometrického měření v tabulce 11.4 sestrojte lineární kalibrační závislost a vypočtete koncentraci analytu ve vzorku a její nejistotu, jestliže neznámý vzorek poskytl absorbanci 0,512 a byl měřen pouze jednou.

Tabulka 11.4:

c (mg l <sup>-1</sup> )	1,03	2,22	3,15	4,14	5,49
Abs	0,169	0,317	0,473	0,625	0,821

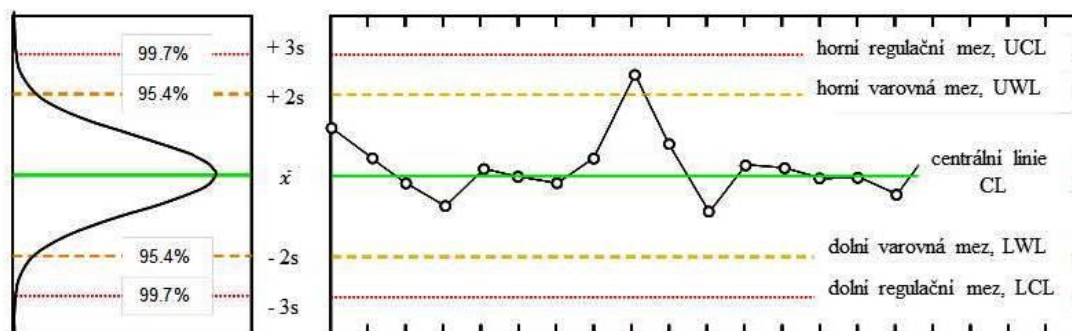
Pomocí statistického software byla vypočtena rovnice přímky  $\text{Abs} = 0,0049 + 0,1485c$  (obecně  $y = b_0 + b_1x$ ). Z rovnice 11.14 získáme koncentraci vzorku  $c_{vz} = 3,41 \text{ mg l}^{-1}$ . Vhodný statistický software vypočte i směrodatnou odchylku z rovnice 11.16, kde  $s_{yx} = 0,0124$ . Standardní nejistotu pak vypočteme dosazením do rovnice 11.15

$$u(c_{vz}) = \frac{0,0124}{0,1485} \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{5} + \frac{(0,512 - 0,481)^2}{0,1485^2 \cdot 11,7993}} = 0,09 \text{ mg l}^{-1}$$

## Statistické základy Shewhartových regulačních diagramů

Regulační diagram pro průměr (někdy označovaný  $\bar{x}$  s pruhem) je založen na statistických charakteristikách náhodné proměnlivosti definované normálním rozdělením. Vztah mezi

grafem hustoty pravděpodobnosti normálního rozdělení a regulačním diagramem pro průměr je ilustrován na obrázku 11.1. Centrální linie (CL), na obr. 11.1 znázorněna zeleně, představuje střední hodnotu (aritmetický průměr) získanou z dostatečného počtu měření kontrolního vzorku. Dále jsou znázorněny čtyři čáry, dvě pod a dvě nad centrální linií. Dvě z nich, nazývané varovné meze, jsou znázorněny na obr. 11.1 oranžově a jsou umístěny ve vzdálenosti  $\pm 2 \times$  směrodatná odchylka od centrální linie. Za předpokladu, že data pocházejí z normálního rozdělení, bude v těchto mezích 95,4 % výsledků. Další dvě čáry, nazývané regulační meze, jsou na obr. 11.1 znázorněny červeně a jsou umístěny ve vzdálenosti  $\pm 3 \times$  směrodatná odchylka od centrální linie. Je-li splněn předpoklad normálního rozdělení dat, bude se v těchto mezích nacházet 99,7 % výsledků. Tedy pouze 3 výsledky z 1000 jsou umístěny mimo regulační meze, to znamená, že pokud se objeví výsledek mimo regulační meze, je s velkou pravděpodobností analýza mimo stav statistické regulace. Použití aritmetického průměru a směrodatné odchylky je vázáno na statistický předpoklad, že vyhodnocovaná data pocházejí z normálního rozdělení.



Obrázek 11.1 Shewhartův regulační digram pro aritmetický průměr a jeho souvislost s grafem hustoty pravděpodobnosti normálního rozdělení

## Literatura:

1. S.L.R. Ellison, V. Barwick, T.J.D. Farrant: Practical Statistics for Analytical Scientist, A Bench Guide, 2nd Ed. RSC, Cambridge, 2009. (ISBN 978-0-85404-131-2).
2. KVALIMETRIE 10. Jakost v analytické laboratoři 2000, odpovědi manažerům jakosti. EURACHEM-ČR, Praha 2000. (ISBN 80-901868-8-2).
3. KVALIMETRIE 16. Statistické metody v metrologii a analytické chemii. EURACHEM-ČR, Praha 2009. (ISBN 80-86322-04-1).
4. KVALIMETRIE 19. Stanovení nejistoty analytického měření. Pokyn EURACHEM/CITAC, 4. české rozšířené vydání, EURACHEM-ČR, Praha 2014 (ISBN 978-80-86322-07-0).



## **Řada příruček KVALIMETRIE**

### **V prodeji jsou následující tituly:**

13. Odhad nejistot chemických a mikrobiologických měření. Metodická příručka. (2003).
15. a) Použití informací o nejistotě k posuzování shody (překlad anglického vydání, EURACHEM/CITAC Guide 2007).  
b) Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků: Metodická příručka s postupy (překlad anglického vydání, EURACHEM/CITAC 2007) (2008).
17. Mezilaboratorní porovnávání a zkoušení způsobilosti. (2010).
19. Stanovení nejistoty analytického měření. Pokyn EURACHEM/CITAC. (4. rozšířené vydání 2014).
20. Vhodnost analytických metod pro daný účel. Pokyn EURACHEM. (2. přepracované vydání 2015).
21. a) Referenční materiály v chemické analýze (2. přepracované vydání 2016).  
b) Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních. Pokyn EURACHEM/CITAC 2015.

### **Ke stažení na webových stránkách [www.eurachem.cz](http://www.eurachem.cz) jsou následující tituly:**

16. Statistické metody v metrologii a analytické chemii. (2009).
18. a) Názvosloví analytického měření. Úvod do 3. vydání Mezinárodního metrologického slovníku.  
b) Jak vyhovět požadavkům ISO 17025 na verifikaci metod. (2013).
22. Průvodce kvalitou v analytické chemii Pomůcka k akreditaci. Pokyn EURACHEM/CITAC (3. vydání 2016).

**ISBN 978-80-86322-11-7**