
Eurachem 

Řada příruček pro laboratoře

KVALIMETRIE

30

Validace postupů měření

EDITOR: David Milde

První část:

Vhodnost analytických metod pro daný účel, 3. vydání

Pokyn pro laboratoře k validaci metod a souvisejícím činnostem

Přeloženo z: H. Cantwell (ed.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, 3rd ed., Eurachem (2025).

Překlad: Zbyněk Plzák a David Milde

Druhá část:

Validace postupů měření, které zahrnují odběr vzorků

Doplněk k pokynům Eurachem Vhodnost analytických metod pro daný účel a Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků

Přeloženo z: M. H. Ramsey, P. D. Rostron, F. C. Raposo (eds.) Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Validation of Measurement Procedures that Include Sampling, Eurachem (2024).

Překlad: David Milde a Zbyněk Plzák

Editor: David Milde

Poděkování za finanční podporu patří ÚNMZ v rámci projektu PRM 2025 VII/6/25.

Vydal Eurachem-ČR, z.s., Pasteurova 3544/1, 400 01 Ústí nad Labem, jako 30. publikaci v řadě příruček KVALIMETRIE.

První vydání, Ústí nad Labem 2025

Copyright © Eurachem-ČR 2025

ISBN 978-80-86322-19-3

KVALIMETRIE

30

1. část

Vhodnost analytických metod pro daný účel
Pokyn pro laboratoře k validaci metod a souvisejícím
činnostem

Pokyn Eurachem

Pokyn Eurachem

Vhodnost analytických metod pro daný účel

Pokyn pro laboratoře k validaci metod a souvisejícím činnostem

Třetí vydání

Poděkování

Tento dokument byl vytvořen členy pracovní skupiny Eurachem pro validaci metod. Členové pracovní skupiny odpovědní za toto vydání jsou uvedeni níže.

Projektová skupina

Fatma Akcadag	UME (TR)
Vicki Barwick	LGC (UK)
Burcu Binici	UME (TR)
Helen Cantwell (redaktorka, předsedkyně)	The State Laboratory (IE)
Pieter Dehouck	Evropská komise (EU)
Helen Gika	Aristotle University (GR)
Emanuela Gregori	Istituto Superiore di Sanità (IT)
Marios Kostakis	National & Kapodistrian University of Athens (GR)
Guy Lamon	SGS (BE)
Ulf Örnemark	Emendo Dokumentgranskning (SE)
Barbara Pohl	Gesellschaft Deutscher Chemiker (DE)
Francisco Raposo	CSIC (ES)
Lorens P. Sibbesen	Labquality International (DK)
Perihan Yolci Omeroglu	Bursa Uludag University (TR)

Copyright ©

Autorská práva na tento dokument náleží přispívajícím autorům. Jakékoliv dotazy týkající se rozšiřování na jakémkoliv mediu, včetně překladů, by měly být adresovány sekretariátu Eurachem. Tento text nesmí být kopírován za účelem dalšího prodeje.

Doporučená forma citace

Tato publikace by měla být citována* jako: "H. Cantwell (ed.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (3rd ed. 2025). Dostupné na www.eurachem.org."

**na citaci se vztahují požadavky jednotlivých časopisů*

Obsah

<i>Úvod k třetímu vydání</i>	9
<i>Úvod k druhému vydání</i>	10
<i>Úvod k prvnímu vydání</i>	11
<i>Zkratky a symboly</i>	12
1 Úvod	14
1.1 Důvod vzniku tohoto Pokynu a oblast jeho působnosti	14
1.2 Poznámky k používání tohoto Pokynu	14
1.2.1 Terminologie	14
1.2.2 Stručné návody	15
2 Důležitost vhodnosti pro daný účel	16
2.1 Důležitost analytických měření	16
2.2 Profesionální povinnosti analytického chemika	16
2.3 Vývoj metody	16
3 Validace metody a verifikace metody	18
3.1 Definice	18
3.2 Základní pojmy	18
3.3 Validace metody	19
3.4 Verifikace metody	19
4 Jak mají být metody validovány?	22
4.1 Přístupy k validaci metod	22
4.1.1 Obecně	22
4.1.2 Přístup s využitím mezilaboratorního experimentu	22
4.1.3 Přístup v jediné laboratoři	22
4.1.4 Validace zkušebních souprav	22
4.2 Rozsah validačních studií	22
4.3 Validační plán a zpráva	24
4.4 Prostředky validace	24
4.4.1 Slepé vzorky	24
4.4.2 Rutinní zkušební vzorky	25
4.4.3 Materiály/roztoky s přídavkem	25
4.4.4 Přirozeně kontaminované materiály	25
4.4.5 Standardy měření	25
4.4.6 Statistika	26
4.5 Požadavky na validaci	26
4.6 Proces validace metody	26
4.7 Vzorkování a manipulace se vzorkem ve vztahu k validaci metody	26
4.7.1 Význam zvažování vzorkování a manipulace se vzorkem při plánování validace metody	26
4.7.2 Laboratoř neodpovídá za odběr vzorků	27
4.7.3 Laboratoř odpovídá za odběr vzorků v rámci metody	27
4.7.4 Zkoušky v terénu	28
4.7.5 Příjem a manipulace se vzorkem	28
5 Výkonnostní charakteristiky metody a související témata	31
5.1 Selektivita	31
5.1.1 Pojmy a definice	31
5.1.2 Vlivy interferencí	31
5.1.3 Posuzování selektivity	31
5.1.4 Potvrzení identity	32
5.2 Kalibrační funkce	34
5.2.1 Definice	34

5.2.2	Kalibrační postupy	35
5.2.3	Matricové vlivy	36
5.2.4	Posouzení kalibrační funkce.....	37
5.3	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	39
5.3.1	Termíny a definice	39
5.3.2	Stanovení směrodatné odchylky při nízkých úrovních.....	39
5.3.3	Odhad LOD.....	42
5.3.4	Odhad LOQ.....	42
5.3.5	Alternativní postupy.....	43
5.4	Pracovní rozsah	45
5.4.1	Definice.....	45
5.4.2	Pokyny pro validační/verifikační studii.....	45
5.4.3	Posouzení pracovního rozsahu	45
5.5	Analytická citlivost	47
5.5.1	Definice.....	47
5.5.2	Použití	47
5.5.3	Posouzení analytické citlivosti	47
5.6	Pravdivost.....	47
5.6.1	Terminologie pro popis kvality měření	47
5.6.2	Stanovení vychýlení (bias).....	49
5.6.3	Interpretace měření vychýlení	53
5.7	Preciznost	55
5.7.1	Opakování	55
5.7.2	Podmínky preciznosti.....	55
5.7.4	Meze preciznosti	56
5.7.5	Současné stanovení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti	56
5.8	Nejistota měření.....	58
5.9	Robustnost.....	58
5.9.1	Definice.....	58
5.9.2	Test robustnosti	58
6	Používání validovaných metod.....	60
7	Využití validačních dat k návrhu řízení kvality.....	62
7.1	Úvod.....	62
7.2	Interní řízení kvality.....	62
7.3	Externí řízení kvality.....	63
8	Dokumentace validovaných metod	64
8.1	Od návrhu ke konečné verzi	64
8.2	Doporučení	64
8.2.1	Kontrola instrukcí	64
8.2.2	Doporučení v normách.....	64
8.2.3	Řízení dokumentů	64
9	Dopady validačních dat pro rutinní používání analytických metod a uvádění výsledků	66
Příloha A – Protokol dokumentace metod.....		67
Příloha B – Statistické základy pro výpočet meze detekce.....		71
Příloha C – Analýza rozptylu (ANOVA).....		72
Příloha D – Jak vybrat a zajistit platnost zkušební soupravy		74
Literatura.....		79

Úvod k třetímu vydání

První vydání této příručky vyšlo v roce 1998 po stanovení šesti principů analytické praxe. Když bylo v roce 2014 zveřejněno druhé vydání, dospělo se k závěru, že těchto šest zásad stále platí a že odpovídají požadavkům mezinárodních norem, jako je ISO/IEC 17025. Od té doby byla ISO/IEC 17025 revidována a došlo k novému vydání, ale zmíněných šest zásad zůstává stále v platnosti jako v roce 1998.

ISO/IEC 17025:2017 zavedla zaměření na vzorkování spojené se zkoušením nebo kalibrací prováděné laboratoří, proto byl do tohoto vydání příručky zahrnut i oddíl o vzorkování a manipulaci se vzorkem ve vztahu k validaci metody. Kromě toho byly přidány další pokyny pro hodnocení kalibrační funkce, a bylo rozhodnuto zaměřit se na validaci kvantitativních metod, takže odkazy na kvalitativní analýzu byly odstraněny. Ti, kteří se zabývají kvalitativní analýzou, mohou vycházet z Pokynu Eurachem *Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis* [R Bettencourt da Silva and S L R Ellison (eds.) Eurachem/CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. První vydání, Eurachem (2021). ISBN 978-0-948926-39-6. Dostupné na www.eurachem.org].

A konečně, příručka je nyní podpořena řadou doplňujících návodů. Jsou určeny k použití ve spojení s touto příručkou a poskytují další pokyny k vybraným tématům. Ve vývoji je ještě celá řada doplňků. Ty aktuálně publikované zahrnují:

- Planning and reporting method validation studies [V. Barwick (ed.), Planning and Reporting Method Validation Studies – Supplement to Eurachem Guide on the Fitness for Purpose of Analytical Methods (2019). Dostupné na www.eurachem.org].
- Blanks in method validation [H. Cantwell (ed.) Blanks in Method Validation – Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods, (1. vydání 2019). Dostupné na www.eurachem.org].

Úvod k druhému vydání

V oblasti kvality analýz došlo od prvního vydání tohoto Pokynu v roce 1998 k mnoha významným posunům. Zaprvé byla revidována série norem ISO 9000, které představují základy systému managementu kvality. Jejich koncepce je integrální součástí mezinárodních norem a směrnic posuzování shody, je základem požadavků na kompetenci laboratoří, poskytovatelů zkoušení způsobilosti (PT) a výrobců referenčních materiálů (RM). Všechny tyto dokumenty zdůrazňují význam používání validovaných metod.

Zadruhé bylo revidováno nebo vytvořeno několik obecných nebo oborově specifických pokynů pro validaci metod. Legislativa EU obsahuje v mnoha oborech povinné požadavky na analytická měření.

Zatřetí bylo v analytické komunitě vynaloženo značné úsilí na zavedení konceptu nejistoty. Například IUPAC ve svých Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (2002) předpovídá, že „...se zvyšujícím se důrazem na nejistotu měření jako klíčový indikátor jak vhodnosti pro daný účel, tak i spolehlivosti výsledků, analytičtí chemici budou ve zvýšené míře provádět validaci měření jako podklad pro odhad nejistoty...“ V následujících letech zavedly akreditační orgány obecné zásady a směrnice jasně uznávající použití validace metod při procesu odhadu nejistoty měření.

Dále byl zásadním způsobem revidován Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM) zahrnující chemická a biologická měření. I když terminologie vztahující se k validaci metod je ještě vzdálena od harmonizované, situace se zlepšila. VIM je též normativním dokumentem pro laboratoře akreditované podle např. ISO/IEC 17025 a ISO 15189.

Druhé vydání tohoto pokynu si klade za cíl zohlednit změny v mezinárodních normách a směrnicích klade menší důraz na termíny a definice. Místo toho odkazuje na VIM a další snadno dostupné zdroje. V důsledku toho byl z příloh vynechán seznam termínů a definic. Literatura citovaná v tomto vydání pokynu je uvedena v bibliografii na konci dokumentu. Další zdroje a literatura vztahující se k vývoji metod a jejich validaci je uváděna jako „Reading list“ v menu „Publications“ na webové stránce Eurachem na www.eurachem.org. Příloha A je přepracována jako důsledek změn v ISO 78-2. Toto vydání bylo rovněž rozšířeno o informace o statistickém základu výpočtu meze detekce (příloha B), analýzu rozptylu (příloha C) a kvalitativní analýzu (příloha D).

Ve zvyšující se míře je u rutinních laboratoří, zejména v odvětví zdravotnictví, běžné používání komerčně dostupných měřicích systémů. To znamená, že odpovědnost za validaci leží převážně na výrobcích. V laboratoři se činnost zaměřuje na verifikaci výkonnostních dat publikovaných výrobcem a důkaz, že metoda funguje v prostorách koncového uživatele.

Pokud se však podíváme zpět na úvod k prvnímu vydání, docházíme k závěru, že šest zásad v něm uvedených stále platí a odpovídá požadavkům mezinárodních norem jako je ISO/IEC 17025.

Úvod k prvnímu vydání*

V rámci britského programu podporujícího správné provádění analytických měření bylo stanoveno šest zásad analytické práce, které jsou dohromady považovány za nejlepší přístup pro praxi. Těchto šest zásad, které jsou podrobně popsány v jiné příručce[†], zní:

1. „Analýzy je třeba provádět tak, aby byly splněny dohodnuté požadavky“ (tj. definované cíle).
2. „K analytickým měřením se mají používat metody a zařízení, u nichž bylo vyzkoušeno a ověřeno, že jsou vhodné pro daný účel.“
3. „Pracovníci provádějící analýzy mají být jak kvalifikovaní, tak i kompetentní pro daný úkol.“ (a mají prokázat, že dovedou provádět analýzu patřičným způsobem).
4. „Laboratoř se má pravidelně podrobovat nezávislému posuzování technické výkonnosti.“
5. „Analytická měření prováděná v jedné laboratoři mají být ve shodě s měřeními prováděnými jinde.“
6. „Organizace provádějící analytická měření má používat dostatečně definované postupy řízení a zajišťování kvality.“

Uvedené zásady jsou platné jak pro laboratoře, které pracují izolovaně, tak pro laboratoře, jejichž výsledky je třeba porovnávat s výsledky jiných laboratoří.

Hlavním záměrem tohoto dokumentu je pomoci laboratořím při uplatňování zásady číslo 2 tím, že poskytuje návod k zhodnocení zkušebních metod s cílem prokázat, že jsou vhodné pro daný účel.

* První vydání (1998) této příručky vypracovala pracovní skupina Eurachem na základě návrhu původně vytvořeného v LGC. Členy skupiny Eurachem byli v té době:

D. Holcombe, P. De Bièvre, D. Böttger, C. Eastwood, J. Hlavay, M. Holmgren, W. Horwitz, M. Lauwaars, B. Lundgren, L. Massart, J. Miller, J. Morkowski, B. te Nijenhuis, B. Nyeland, R. Philipp, P. Radvila, J. Smeyers-Verbeke, R. Stephany, M. Suchanek, C. Vandervorst, H. Verplaetse, H. Wallien, M. Walsh, W. Wegscheider, D. Westwood, H. J. van de Wiel.

[†] The manager's guide to VAM, UK Department of Trade and Industry, Valid Analytical Measurement Programme. Published as VAM Principles M. Sargent. Anal. Proc., 1995, 32, 201-202.

Zkratky a symboly

V této příručce se používají následující zkratky a symboly.

AMC	Analytical Methods Committee
ANOVA	analýza rozptylu
AOAC International	celosvětově uznávaná organizace vyvíjející standardní postupy
ASTM International	celosvětově uznávaná organizace vyvíjející standardní postupy
BIPM	Mezinárodní úřad pro váhy a míry
CCQM	poradní výbor látkového množství – metrologie v chemii
CEN	Evropský výbor pro normalizaci
CITAC	Spolupráce při mezinárodní návaznosti v analytické chemii
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRM	certifikovaný referenční materiál
EA	Evropská spolupráce v akreditaci
EC	Evropská komise
EPA	Environmental Protection Agency
EQA (EHK)	externí hodnocení kvality
EU	Evropská unie
GUM	Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IEC	Mezinárodní elektrotechnická komise
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
JCGM	Joint Committee for Guides in Metrology
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
ME	matricový vliv
NATA	National Association of Testing Authorities
QA	zajišťování (prokazování) kvality
QC	řízení kvality
RSC	Royal Society of Chemistry
SANCO	European Commission's Directorate-General for Health and Consumers
SOP	standardní pracovní postup
PT	zkoušení způsobilosti
RM	referenční materiál
RSD	relativní směrodatná odchylka
UV/VIS	ultrafialová/viditelná
VIM	Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny

b	absolutní vychýlení (bias)
$b(\%)$	relativní vychýlení v %
k_Q	násobitel používaný při výpočtu meze stanovitelnosti
m	počet měření
n	počet opakovaných pozorování použitých k zprůměrování při uvádění výsledků
n_b	počet pozorování slepého pokusu použitých k zprůměrování při výpočtu korekce na slepý pokus (blank)
r	mez opakovatelnosti
R	mez reprodukovatelnosti
$R(\%)$	relativní výtěžnost (zjevná výtěžnost) v procentech
$R'(\%)$	relativní výtěžnost přídatku (spiku) v procentech
s	směrodatná odchylka
s_0	odhad směrodatné odchylky pro jednotlivé výsledky při nebo blízko nulové koncentrace
s'_0	směrodatná odchylka použitá při výpočtu meze detekce nebo meze stanovitelnosti
s_I	směrodatná odchylka mezilehlé preciznosti
s_r	směrodatná odchylka opakovatelnosti
s_R	směrodatná odchylka reprodukovatelnosti
u	standardní nejistota
\bar{x}	střední hodnota (aritmetický průměr)
x_{ref}	referenční hodnota
\bar{x}_{ref}	střední hodnota měření alternativní metodou, např. referenční metodou
\bar{x}'	střední hodnota vzorku s přídatkem při stanovení výtěžnosti
x_{spike}	přidaná koncentrace při stanovení výtěžnosti

1 Úvod

1.1 Důvod vzniku tohoto Pokynu a oblast jeho působnosti

V analytické praxi je základním požadavkem, aby použité metody prošly řádnou validační studií. Dnes si většina analytiků, zejména těch v akreditovaných laboratořích, dobře uvědomuje její význam. Problém spočívá spíše v praktické stránce plánování a provádění efektivní validační (nebo verifikační) studie a hodnocení vhodnosti pro daný účel. Požadavky norem jako ISO/IEC 17025 [1], ISO 15189 [2] a ISO 15195 [3] zdůrazňují důležitost toho, aby metody byly platné. Například článek 7.2.1 normy ISO/IEC 17025 zdůrazňuje potřebu prokázat, že metody vyhovují danému účelu:

„Laboratoř musí používat vhodné metody a postupy pro všechny laboratorní činnosti...“

a dále: *„Pokud zákazník nestanoví metodu, která má být použita, musí laboratoř zvolit vhodnou metodu sama...“*

Tento Pokyn si klade za cíl pojednat o otázkách souvisejících s validací metod a zvýšit tak u čtenářů povědomí o tom, co validace zahrnuje, proč je důležitá a poskytnout představu, jak je možné ji provést.

Očekává se, že Pokyn bude především užitečný pro a) manažery laboratoří, kteří odpovídají za to, že metody pod jejich dohledem jsou platné a b) analytiky, kteří odpovídají za plánování a provádění studií metod za účelem jejich validace nebo verifikace. Další pracovníci mohou používat tento pokyn jako zdroj podkladových informací – vedoucí pracovníci z pohledu managementu a mladší pracovníci z technického hlediska nebo pro vzdělávání.

Pokyn se zaměřuje spíše na validaci v jedné laboratoři než na mezilaboratorní přístup (viz oddíl 4.1). Klade si za cíl nasměrovat čtenáře na zavedené postupy tam, kde existují a pokud neexistují, pak podat jednoduché zasvěcení do procesů při validaci a poskytnout základní představu, která by umožnila čtenáři navrhnout svoji vlastní strategii validace nebo verifikace. Obsahuje i odkazy na další materiál o jednotlivých technických aspektech validace.

Pokyn se zaměřuje na validaci kvantitativních metod. K dispozici je Pokyn Eurachem/CITAC, který klade zvláštní důraz na hodnocení

výkonnosti a nejistoty v kvalitativní chemické analýze [4].

Pokyn se vyhýbá důrazu na používání statistiky, ačkoliv nepochybně pro ty, kteří mají praktické znalosti základní statistiky, bude pochopení a zavádění procesů validace metod snazší. Uvádíme několik odkazů na publikace o základní statistice pro analytiku [5, 6].

Pochopení validace metod u analytiků může bránit skutečnost, že v různých oblastech analytických měření se někdy používá odlišná terminologie pro popis různých aspektů stanovení výkonnosti metody. Tento Pokyn se snaží dodržovat terminologii 3. vydání VIM (viz oddíl 1.2.1), ale uznává, že se běžně používají i jiné termíny, a pokud je to možné, poskytuje jejich vysvětlení. Nejlepší radou při použití termínu, který může být chápán mylně, je definovat zdroj a konvenci, která je použita.

U procesu validace metod se předpokládá, že při studii určení výkonnostních charakteristik* se používá přístrojové vybavení, které vyhovuje specifikaci, pracuje správně a je odpovídajícím způsobem kalibrováno. Tento Pokyn se tudíž nezaměřuje na pojmy ‚kvalifikace vybavení‘ nebo ‚kvalifikace instrumentace‘. Podobně analytik, který provádí zmíněné studie, musí být kompetentní v předmětné pracovní oblasti a musí mít dostatečné znalosti o prováděné práci, aby mohl činit patřičná rozhodnutí ze získávaných pozorování tak, jak studie pokračuje.

1.2 Poznámky k používání tohoto Pokynu

1.2.1 Terminologie

Tam, kde je to možné, tento Pokyn vychází z terminologie 3. vydání VIM [7, 8]. V případě potřeby byla doplněna terminologií používanou ISO/IEC 17025 [1], dalšími ISO dokumenty [9, 10, 11] a IUPAC Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation [12], aby se zohlednily termíny běžně používané v analytických laboratořích.

Používá-li se několik podobných termínů, může být v některých případech obtížné rozhodnout, který termín použít. Pro srozumitelnost jsme považovali za důležité používat termín konzistentně v celém Pokynu. Jedním z příkladů je termín používaný pro dokument, který

* Běžně používaná synonyma pro výkonnostní charakteristiky metody jsou ‚parametry výkonnosti

metody‘, ‚metrologické charakteristiky‘ a ‚výkonnostní vlastnosti‘.

poskytuje detailní popis metody, která bude validována prostřednictvím pracovníků a vybavení dané laboratoře. U kvantitativních analýz VIM uvádí *postup měření (measurement procedure)*, v ISO/IEC 17025 je to *metoda (method)*, v ISO 15189 je to *postup laboratorního vyšetření (examination procedure)* a mnoho laboratoří odkazuje na svůj *standardní pracovní postup (standard operating procedure) (SOP)*. Pracovní skupina se rozhodla přidržet se ISO/IEC 17025 a používat generický termín *metoda*. V důsledku toho používá tento Pokyn běžně uznávaný termín *validace metody* ačkoliv *validace postupu* by byla správnější.

Termínům *robustnost* (ruggedness) a *selektivita* (selectivity) je dáována přednost před *robustness* a *specifičností* (specificity) [13] protože ty prvé používá IUPAC [12]. Robustnost (robustness a ruggedness) se používá k označení řady různých věcí v analytických laboratořích a v publikacích [14]. Například ISO/IEC 17025:2017 odkazuje na robustnost *zkušební metody prostřednictvím změny kontrolovaných parametrů, jako je teplota inkubátoru, dávkovaný objem a robustnost proti vnějším vlivům* v ustanoveních týkajících se validace metody. V tomto Pokynu se posuzování robustnosti vztahuje k záměrným malým změnám parametrů zkušební metody, např. teploty, pH, doby inkubace atd., a ke stanovení jejich vlivu na výkonnost zkušební metody. Další podrobnosti jsou uvedeny v oddíle 5.9.

Různé termíny jako např. *kalibrace*, *měření*, *zkoušení*, *analýza* a *vyšetření* se užívají k popisu laboratorních prací. V tomto Pokynu se používá *analýza* v obecném slova smyslu a v případě potřeby se její okolnosti specifikují. Obdobně se v tomto pokynu hovoří o měřené

koncentraci, ačkoliv v chemické laboratoři se běžně určuje několik dalších veličin [15].

Při procesech vzorkování, úpravy vzorků a analýze se mohou používat termíny jako *cíl odběru vzorků* (sampling target), *primární vzorek* (primary sample), *dílčí vzorek* (increment), *směsný vzorek* (composite sample), *podvzorek* (subsample), *laboratorní vzorek* (laboratory sample), *zkušební vzorek* (test sample), *zkušební podíl* (test portion) a *zkušební roztok* (test solution) [16, 17]. V tomto Pokynu používáme obvykle obecný termín *vzorek* nebo *zkušební vzorek* [18].* Ty nejdůležitější termíny používané v tomto Pokynu jsou definovány v textu. Definice z VIM, ISO 9000 [9;] a IUPAC [18, 19] se uvádějí všude, kde je to možné. Termíny z VIM mající vztah k analytické chemii dále vysvětluje pokyn Eurachem Guide „Terminology in analytical measurement“ [8]. Uživatelé by si měli uvědomit, že dosud neexistuje obecná shoda na definicích některých termínů, které používá validace metod.

1.2.2 Stručné návody

V oddíle 5 jsou ve stínovaných rámečcích uvedeny *Stručné návody* týkající se specifické výkonnostní charakteristiky metody. Je však zřejmé, že v mnohých laboratořích není čas a nejsou zdroje pro provedení experimentů tak, jak jsou tam popsány. Provedení operací popsaných v rámečcích s použitím menšího počtu opakování, než je doporučováno, přesto poskytne užitečné informace a je určitě lepší než nedělat vůbec nic. Získané informace budou však méně spolehlivé, než kdyby se provedl plný počet opakování.

* Zkušební vzorek: Vzorek připravený z laboratorního vzorku, ze kterého se odebírají zkušební podíly pro zkoušení nebo analýzu [18].

2 Důležitost vhodnosti pro daný účel

2.1 Důležitost analytických měření

Každý den se provádí v tisících laboratořích na celém světě miliony zkoušek, měření a vyšetření. Je to pro bezpočet důvodů, například jako způsob oceňování zboží pro obchodní účely, podpora péče o zdraví a stavebnictví, kontrola kvality a bezpečnosti potravin a krmiv, forenzní analýza a monitorování životního prostředí. Prakticky každá oblast společnosti se nějakým způsobem opírá o práci analytika.

Náklady na provádění těchto měření jsou vysoké a další náklady mohou vzniknout z rozhodnutí, která jsou na základě těchto výsledků činěna. Například zkoušky prokazující, že potravina není vhodná pro spotřebu, mohou vést ke vzniku nároků na odškodnění. Kromě toho testy potvrzující přítomnost zakázaných drog mohou mít za následek pokuty, uvěznění nebo v některých zemích i popravu. Je tedy zřejmé, jak důležité je provádění správných měření a jak důležité je být schopni prokázat, že výsledek je správný.

2.2 Profesionální povinnosti analytického chemika

Nelze-li důvěřovat výsledku analýzy, je jeho hodnota velmi malá a takovou analýzu je lépe neprovádět vůbec. Když zákazníci pověřují laboratoř analytickou činností, předpokládají, že laboratoř disponuje odbornými znalostmi na takovém stupni, který jim není vlastní. Zákazník očekává, že bude moci důvěřovat dodaným výsledkům a obvykle je napadá jen tehdy, když vznikne spor. A tak laboratoř a její pracovníci jsou zřejmě odpovědní za oprávněnou důvěru zákazníka tím, že poskytují správnou odpověď na analytickou část problému, jinými slovy poskytují výsledky, které jsou prokazatelně „vhodné pro daný účel“. Rozumí se tím tedy, že prováděné zkoušky odpovídají analytické části problému, který si zákazník přeje řešit a že konečná zpráva uvádí analytické údaje takovým způsobem, aby mu zákazník snadno rozuměl a mohl vyvodit patřičné závěry. Validace metody umožňuje analytikům prokázat, že metoda je „vhodná pro daný účel“.

Má-li být analytický výsledek vhodný pro zamýšlené použití, musí být dostatečně spolehlivý, aby na jeho základě bylo možné s důvěrou přijmout veškerá rozhodnutí. Výkonnost metody musí být tedy validována a odhadnuta nejistota výsledku na dané konfidenční úrovni. Nejistota má být vyhodnocena a uváděna způsobem, který je široce

uznáván, vnitřně konzistentní a snadno interpretovatelný [20]. Většinu informací požadovaných pro odhad nejistoty je možno získat během validace metody. Tímto tématem se stručně zabývá oddíl 5.8 a podrobněji řada pokynů Eurachem a spolupracujících organizací [4, 16, 21].

Bez ohledu na to, jak kvalitní je metoda a jak kvalifikovaně se používá, lze analytický problém vyřešit analýzou takových vzorků, které jsou pro daný problém vhodné. Odebírání vhodných vzorků je odborná práce vyžadující porozumění problému a chemii, která s ním souvisí. Laboratoř by měla nabízet, pokud je to možné, zákazníkovi odborné poradenství pro odebírání vzorků v rámci své péče o zákazníka. Jsou však zřejmě situace, ve kterých laboratoř nemůže sama odebírat vzorky, nebo mít na odběr vliv. V těchto případech je třeba uvádět výsledky analýz vzorků tak, jak byly doručeny a ve zprávě by to mělo být jasně uvedeno. Další podrobnosti o vzorkování jsou uvedeny v oddíle 4.7.

Dosud jsme se zaměřovali většinou (a správně) na celkový cíl validace metod, tj. prokázání, že takové metody jsou „vhodné pro daný účel“. Má však být zřejmé, že validační/verifikační studie metody přináší laboratoři provádějící validaci/verifikaci další výhody. Poskytuje důkladné znalosti a zkušenosti s praktickými podrobnostmi provádění metody, včetně uvědomění si kritických kroků tohoto procesu. Validace/verifikace umožňuje laboratoři a jejím pracovníkům získat vyšší důvěru ve své výsledky.

2.3 Vývoj metody

Validaci může předcházet vývojová fáze, na které se mohou podílet jiní pracovníci a která může nabývat různých forem.

V krajním případě může jít o přizpůsobení stávající metody drobnými změnami tak, aby byla vhodná pro nové použití. Například metoda pro stanovení toluenu ve vodě může být upravena podle zavedené metody pro stanovení benzenu ve vodě. Matrice je stejná a tyto dva analyty mají vcelku obdobné vlastnosti. Je pravděpodobné, že principy izolace, identifikace a kvantifikace, které se používají pro benzen, mohou se též použít pro toluen. Jestliže je na druhou stranu požadována metoda pro stanovení benzenu v půdě, nemusí být adaptace z metody pro benzen ve vodě nejlepší volbou. Úprava nějaké jiné metody pro stanovení organických sloučenin v půdě je možná lepším východiskem.

V jiné mezní situaci může analytik začít jen s nástinem představy a k návrhu vhodné metody využít své odborné znalosti a zkušenosti. To samozřejmě znamená mnohem více práce a větší pochybnosti, zda finální metoda bude úspěšná. Při vývoji metod není neobvyklé pracovat současně na několika různých představách, než se vybere jeden finální přístup.

Bez ohledu na to, kolik úsilí se věnovalo vývoji metody, není žádná záruka, že metoda bude plnohodnotně fungovat při validaci (nebo za rutinních podmínek v laboratoři). Pokud se na fázi vývoje a validace podílejí různí zaměstnanci, je možné zkontrolovat, zda jsou pokyny (metoda) srozumitelné a zda je lze řádně realizovat.

3 Validace metody a verifikace metody

3.1 Definice

Definice *validace* ve čtyřech mezinárodních dokumentech uvádí tabulka 1. *Validace metody* je v podstatě proces definující analytické požadavky a potvrzující, že uvažovaná metoda je způsobilá zvládnout požadavky, která daná aplikace vyžaduje. Zahrnuje potřebu vyhodnotit výkonnost metody. Rozhodování o vhodnosti metody je důležité, v minulosti byla tendence zaměřit validaci metody pouze na vyhodnocení jejích výkonnostních charakteristik.

Validace metody je obvykle úzce svázaná s vývojem metody. Mnohé z výkonnostních charakteristik metody (tabulka 2), které se pojí s validací metody, se obvykle vyhodnocují, přinejmenším přibližně, i v rámci vývoje metody. Je však důležité připomenout, že formální validace se má týkat konečné verze metody (zdokumentovaného postupu).

Pojem ‚*kvalifikace*‘ též patrně zahrnuje verifikaci (tabulka 1). Poznámka: kvalifikace v tomto případě souvisí s validací/verifikací metody a nevztahuje se na procesní kvalifikaci ve farmaceutickém průmyslu.

ISO 9000 [9] definuje verifikaci (ověřování) jako „*potvrzování prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že specifikované požadavky byly splněny*“. To se velmi podobá definici validace uvedené v tabulce 1. Ve VIM [7] se uvádí, že verifikace (ověřování) je „*poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky*“ a validace znamená „*ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití*“.

ISO/IEC 17000:2020 [22] uvádí, že verifikace (ověřování) má prokázat *pravdivost prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů a že specifikované požadavky byly splněny*.

3.2 Základní pojmy

Různé způsoby definování validace a verifikace v tabulce 1 mohou být zavádějící, ale ilustrují některé důležité aspekty těchto základních pojmů. Definice z ISO/IEC 17000:2020 má dva body stojící za povšimnutí:

- definuje dva pojmy nezávisle na sobě;
- používá termíny *potvrzení věrohodnosti* a *potvrzení pravdivosti*.

Tyto pojmy naznačují, že vždy bude existovat určitá míra rizika, tj. že metoda, která je vhodná pro daný účel, nemusí vždy přinést výsledky,

kteří jsou zcela spolehlivé. Toto pojetí rizika je v souladu s novým zaměřením na hodnocení rizik v ISO/IEC 17025:2017 [1].

Existují některé pojmy, které jsou ústředním bodem všech definic v tabulce 1. Patří sem:

- zamýšlené použití;
- specifikované požadavky;
- objektivní důkaz.

S těmito pojmy bude vždy spojeno riziko. Proto je třeba zohlednit při určování rozsahu prací nezbytných k získání *objektivních důkazů* o vhodnosti metody pro daný účel zamýšlené použití zkušební metody a riziko, které jsou laboratoř a zákazník ochotni přijmout, pokud jde o spolehlivost výsledků zkoušek.

Při pohledu na tyto tři pojmy z hlediska hodnocení rizik je třeba zvážit některé důležité aspekty, které mohou mít dopad na obsah a rozsah dané validační/verifikační studie.

- **Zamýšlené použití**
Zkušební metoda je vybrána nebo vyvinuta s ohledem na konkrétní rozsah použití, tj. pro konkrétní analyty v konkrétních maticích s určitým rozsahem koncentrací. Vlastní vyvinutá metoda bude mít rozsah použití, který přesně odpovídá potřebám zákazníka. Standardní metoda může mít obecnější rozsah a existuje riziko, že obecný rozsah nemusí plně zahrnovat potřeby zákazníka.
Riziko: Pravděpodobnost, že zamýšlené použití nebude dostatečně řešeno.
- **Specifikované požadavky**
Jedná se o požadovanou výkonnost metody v rámci jejího rozsahu použití a prokazuje se prostřednictvím procesu validace/verifikace. Specifikované požadavky mohou být vyjádřeny jako požadavky na příslušné výkonnostní charakteristiky nebo alternativně jako obecná cílová nejistota měření.
Riziko: Specifikované požadavky, které mají zajistit, že metoda je vhodná pro daný účel, pro který má být použita v laboratoři, nemusí být plně pochopeny nebo popsány.
- **Objektivní důkaz**
Jedná se o údaje z validační nebo verifikační studie, která tvoří základ k určení, zda je zkušební metoda vhodná pro účel jejího zamýšleného použití v laboratoři. Ve validační studii tato data ukazují, zda zkušební metoda splňuje specifikované požadavky na příslušné výkonnostní charakteristiky. Ve studii

verifikace tyto údaje ukazují, zda lze dosáhnout výkonnostních charakteristik spojených se standardní metodou, když je standardní metoda prováděna v laboratoři a pro v laboratoři zamýšlené použití.

Riziko: Verifikační studie nemusí být dostatečně důkladná, aby poskytla dostatečné objektivní důkazy ve vztahu ke skutečnému používání metody.

Tabulka 3 uvádí, jak jsou základní pojmy zahrnuty do určování, jaké validační nebo verifikační studie by měly být provedeny, aby se stanovilo, zda je metoda vhodná pro daný účel.

3.3 Validace metody

Metoda by měla být validována, když je třeba prokázat, že jsou její výkonnostní charakteristiky dostačující pro použití k určitému účelu. Jak je například uvedeno v článku 7.2.2.1 v ISO/IEC 17025 [1], laboratoř musí validovat:

- nestandardní metody;
- laboratorní metody vyvinuté laboratoří;
- standardní metody používané mimo zamýšlený rozsah použití nebo jinak upravené.

Validace se musí provést v rozsahu nezbytném ke splnění požadavků na stanovené používání nebo oblasti použití [23]. Rozsah validace („měřicí rozsah“, „zaměření“) bude záviset na aplikaci metody, podstatě uskutečněných změn a podmínkách, za kterých se metoda bude používat. Norma dále uvádí (v kapitole 7.2.2.2), že při změnách validované metody se stanoví vliv těchto změn a pokud se zjistí, že ovlivňují původní validaci, musí se provést nová validace metody. To je podrobněji řešeno v oddíle 4.2.

Validace je též nezbytná, když je nutné prokázat ekvivalenci výsledků získaných dvěma metodami, např. nově vyvinutou metodou a existující standardní/právně přijímanou metodou.

3.4 Verifikace metody

U standardních metod, jako jsou např. metody publikované ISO nebo ASTM, není validace v laboratoři, která je používá, nutná. Avšak laboratoř musí verifikovat výkonnost metody v laboratoři za skutečných podmínek používání. Tato verifikace metody má být provedena předtím, než je metoda uvedena do rutinního používání, aby se prokázalo, že laboratoř je schopna dosáhnout výkonnostních charakteristik

metody, jak je to podrobně popsáno v článku 7.2.1.5 normy ISO/IEC 17025:

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

Verifikace se též vyžaduje, pokud došlo k významné změně, jako je nový, avšak podobný přístroj, přemístění vybavení atd.

Ve zdravotnických a klinických laboratořích se většina měření a zkoušek provádí komerčními postupy, u nichž již provedl validaci výrobce, ale které se musí verifikovat koncovým uživatelem [24]. ISO 15189 v článku 7.3.2 [2] zdůrazňuje, že *laboratoř musí mít postup pro ověření, zda je schopna správně provádět metody laboratorních vyšetření před jejich uvedením do provozu, a to zajištěním toho, že je schopna dosahovat požadované výkonnosti, jak je specifikována výrobcem nebo metodou a že laboratoř musí zajistit, aby rozsah verifikace metod laboratorních vyšetření byl dostatečný k zajištění platnosti výsledků relevantních pro klinické rozhodování.* Toto může zahrnovat i situaci, když přístroj je doplněn o nový software, nebo když z řízení kvality vyplývá, že výkonnost zavedené metody se časem mění. Kontrolní seznam *Jak vybrat a zajistit platnost zkušební soupravy* je k dispozici v příloze D.

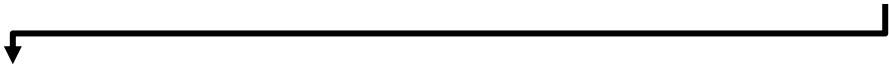
Tabulka 1 – Definice pojmů ‚verifikace‘ and ‚validace‘ v ISO 9000, ISO/IEC 17025, ISO/IEC 17000 a VIM

Definice	Odkaz
<p>Verifikace, ověřování – potvrzování prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že specifikované požadavky byly splněny.</p> <p>Validace – potvrzení prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že požadavky na specifické zamýšlené použití nebo na specifickou aplikaci byly splněny.</p>	ISO 9000:2015 ^a [9]
<p>Verifikace, ověřování – poskytnutí objektivního důkazu, že daná položka splňuje specifikované požadavky.</p> <p>Validace – ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití.</p>	ISO/IEC 17025:2017 ^b [1]
<p>Verifikace, ověřování – potvrzení pravdivosti prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že byly specifikované požadavky splněny.</p> <p>Validace – potvrzení věrohodnosti prostřednictvím poskytnutí objektivních důkazů, že byly specifikované požadavky na specifické zamýšlené použití nebo specifickou aplikaci splněny.</p>	ISO/IEC 17000:2020 [22]
<p>^a ISO 9000 poznamenává, že činnosti prováděné při verifikaci (ověřování) se někdy nazývají kvalifikační proces.</p> <p>^b ISO/IEC 17025:2017 odkazuje na VIM [7] při definování validace a ověření.</p>	

Tabulka 2 — Přehled výkonnostních charakteristik, které se obvykle vyhodnocují při validaci metody

Výkonnostní charakteristika
Selektivita
Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)
Pracovní rozsah
Analytická citlivost
Pravdivost <ul style="list-style-type: none"> • vychýlení (bias), výtěžnost
Preciznost <ul style="list-style-type: none"> • opakovatelnost, mezilehlá preciznost a reprodukovatelnost
Robustnost
Nejistota měření
<p>^a Přesně řečeno, nejistota měření není výkonnostní charakteristikou daného měřicího postupu, ale vlastností výsledku, získaného pomocí tohoto měřicího postupu. Nejistota měření je klíčovou součástí každého výsledku měření a odráží účinky výkonnostních charakteristik.</p> <p>Kalibrační funkce je nedílnou součástí kvantitativní metody a jako taková není považována za funkční charakteristiku. Kalibrační funkce je však zahrnuta v oddíle 5 této příručky, protože je považována za klíčový předpoklad pro validaci/verifikaci různých výkonnostních charakteristik.</p>

Tabulka 3 – Základní pojmy

	Dostupná metoda	Proces k zajištění platnosti	Kritéria	Výsledek procesu
	Nově vyvinutá metoda se specifikovaným (obecným) rozsahem použití	Validace	Specifikované požadavky pro zamýšlené použití	<u>Objektivní důkaz</u> , že metoda splňuje požadavky a <u>specifikace</u> pro (příslušné) stanovené výkonnostní charakteristiky
				
	Platná metoda se specifikacemi (příslušných) výkonnostních charakteristik (např. standardní metoda)	Verifikace	Specifikace výkonnostních charakteristik (relevantní pro skutečné rutinní použití metody)	<u>Objektivní důkaz</u> že metoda je vhodná pro skutečný účel, při použití v dané laboratoři <u>Zkušenosti</u> s prováděním metody (možno doplňkové SOP)
...nebo...				
	Stejně jako výše, ale s nutností některých úprav	Validace + Verifikace (výkonnostních charakteristik neovlivněných úpravami)	Dodatečné <u>specifikované požadavky</u> pro jednu nebo více výkonnostních charakteristik s ohledem na skutečné použití již validované metody.	Jako výše

4 Jak mají být metody validovány?

4.1 Přístupy k validaci metod

4.1.1 Obecně

Jakmile se ukončí počáteční vývoj metody, laboratoř by měla podrobně zdokumentovat měřicí postup (viz příloha A). Právě tento zdokumentovaný postup dále podléhá formální validaci.

Existují dva zásadní přístupy k validaci metody, přístup na základě mezilaboratorního experimentu a přístup v jediné laboratoři. Bez ohledu na uvedený přístup je to laboratoř, která metodu používá, která je odpovědná za zajištění, že metoda je vhodná pro zamýšlené použití a v případě potřeby za provedení dalších prací k doplnění stávajících validačních údajů.

4.1.2 Přístup s využitím mezilaboratorního experimentu

O metodě validace metod pomocí cíleného mezilaboratorního experimentu, často uváděného jako společné studie („collaborative studies“ nebo „cooperative studies“), pojednává mnoho publikací. Existuje řada návodů pro tento typ validace [25, 26, 27, 28] a rovněž také normy ISO 5725 [29], které lze považovat za obecně nejvhodnější. Pokud má vyvíjená metoda široké použití, třeba jako publikovaný standardní (normovaný) postup, pak je pravděpodobně pro validaci společná studie s účastí skupiny laboratoří preferovaným způsobem. Publikovaná metoda validovaná tímto způsobem se považuje za robustní. Publikované informace obvykle zahrnují preciznost (opakovatelnost, reprodukovatelnost a/nebo odpovídající meze preciznosti) a někdy odhady vychýlení (bias). Jestliže byla metoda validována některou z normalizačních organizací, jako je ISO, CEN nebo AOAC International, uživatel obvykle potřebuje pouze ověřit údaje publikované o výkonnosti a/nebo stanovit údaje o výkonnosti pro vlastní používání metody. Tento přístup tedy snižuje pracovní zátěž laboratoře, která tuto metodu používá.

4.1.3 Přístup v jediné laboratoři

Laboratoře čas od času zjistí, že potřebují metodu, která není dostupná jako publikovaná norma (standard). Pokud se metoda vyvíjí pro použití jen v jedné laboratoři, například protože neexistuje její obecná potřeba nebo protože další laboratoře jsou konkurenty, je přístup validace v jediné laboratoři na místě [12].

Zda budou metody validované v jedné laboratoři přijatelné pro regulační účely, může záviset na směrnících nebo právních předpisech platných v dané oblasti měření. Obvykle je možné od příslušného regulačního orgánu získat jasné prohlášení o jeho politice (uplatňovaných obecných zásadách).

4.1.4 Validace zkušebních souprav

V některých případech může být v postupu měření použita zkušební souprava (test kit), např. když je třeba měření dokončit v krátkém čase nebo udržet nízké náklady na měření nebo kde to z různých důvodů může být nejlepší volbou.

Pro zajištění spolehlivosti měření je důležité správně vybrat zkušební soupravu a vyhodnotit její vhodnost. Jelikož je analytická metoda silně integrována do funkce zkušební soupravy a není to vždy pro uživatele zřejmé, validace těchto metod je často prováděna dodavatelem soupravy a musí být zohledněna při hodnocení vhodnosti zkušební soupravy. Systematický přístup usnadní výběr a hodnocení a zajistí, že se provede správně. Kontrolní seznam *Jak vybrat a zajistit platnost zkušební soupravy* je k dispozici v příloze D.

4.2 Rozsah validačních studií

Laboratoř musí rozhodnout, které výkonnostní charakteristiky (viz tabulka 2 a oddíl 5) je třeba při validaci zkoumat, a v některých případech, v závislosti na tom, k čemu má být zkušební metoda použita, i jak podrobně má být prošetřování jednotlivých výkonnostních charakteristik. IUPAC protokol [12] uvádí několik situací, které připadají v úvahu, mezi jinými charakter metody a kompetenci laboratoře.

Jestliže je rozsah analytické činnosti dobře definován a použití je v průběhu času podobné, může se v organizaci nebo pro odvětví vydat pro rozsah validačních studií obecná směrnice. Příklady takových specifických pokynů jsou uvedeny v tabulce 4 (farmaceutický obor) a tabulce 5 (analýza reziduí veterinárních léčiv v potravinách živočišného původu).

Každá laboratoř, která chce prokázat vhodnost určité analytické metody pro daný účel, by měla pečlivě naplánovat studii validace metody, která má být provedena. Plánování zahrnuje vhodný návrh sady experimentů, které by měly poskytnout dostatečné objektivní důkazy o příslušných výkonnostních charakteristikách,

aby bylo možné posoudit, zda je konkrétní metoda vhodná pro daný účel.

Dobrým základem pro plánování validačního procesu je začít od důkladně zvážené analytické specifikace uvedené v předmětu dokumentovaného postupu (viz A.5 v příloze A), ale je zřejmé, že ne vždy je tento postup v praxi možný. Posuzování výkonnosti metody může mít svá omezení. To bere na vědomí verze ISO/IEC 17025 z roku 2005 (článek 5.4.5.3, poznámka 3: *Validace je vždy rovnováhou mezi náklady, riziky a technickými možnostmi*), zatímco podle verze normy z roku 2017 by měl být k určení rozsahu validace metody použit přístup založený na rizicích.

Laboratoř volí to nejlepší v rámci svých omezení, bere v úvahu požadavky zákazníka a regulační

požadavky, stávající zkušenosti s metodou, dostupné prostředky (oddíl 4.4) a potřebu metrologické slučitelnosti [7] s dalšími podobnými, již v laboratoři používanými metodami, nebo metodami používanými v ostatních laboratořích. Některé výkonnostní charakteristiky se mohou určit přibližně během vývoje metody nebo v průběhu zavádění metody. Často příslušný soubor experimentů poskytne informace o několika výkonnostních charakteristikách, takže pečlivé plánování a (pokud je to možné) použití vhodného plánu pokusů může minimalizovat úsilí potřebné k získání hledaných informací.

Další pokyny k plánování validace a verifikace jsou uvedeny v dodatku Eurachem *Planning & reporting validation studies* [30]).

Tabulka 4 – Rozsah činnosti při validaci čtyř typů analytických aplikací. Příklad z oboru farmacie [13]. „x“ označuje výkonnostní charakteristiku, která se obvykle validuje

Výkonnostní charakteristika	Typ analytické aplikace			
	Identifikační zkouška	Kvantitativní zkouška na nečistotu	Limitní test na nečistotu	Stanovení hlavní složky
Selektivita	x	x	x	x
Mez detekce			x	
Mez stanovitelnosti		x		
Pracovní rozsah včetně linearitu		x		x
Pravdivost (vychýlení, bias)		x		x
Preciznost (opakovatelnost a mezilehlá preciznost)		x		x
POZNÁMKA Tabulka je zjednodušena a byla upravena, aby vyhovovala struktuře a terminologii použitým v tomto pokynu.				

Tabulka 5 – Klasifikace analytických metod výkonnostními charakteristikami, které musí být stanoveny pro kvantitativní analýzu v oblasti zkoušení potravin živočišného původu na rezidua léčiv [31]

	Mez detekce CC β ¹	Rozhodovací limit CC α ¹	Pravdivost /Výtěžnost	Preciznost	Selektivita /specifita	Robustnost
Screeningové metody	+	-	-	+	+	+
Potvrzující metody	+	+	+	+	+	+
¹ Další informace viz oddíl 5.3.5.2						

Důsledky výše uvedených omezení jsou obzvláště kritické v případech, kdy se tato metoda nebude používat rutinně. Proces validace metod, které se

budou používat rutinně, je poměrně dobře definován. Nepochybně tytéž principy jako pro rutinní zkoušení se vztahují na *ad hoc* analýzu

(analýzu jen pro tento případ). Je potřeba mít k získaným výsledkům odpovídající stupeň důvěry. Stanovení rovnováhy mezi časovými a finančními omezeními a potřebou validovat metodu lze dosáhnout pomocí přístupu založeného na rizicích. Za určitých okolností může toto posouzení rizik ukázat, že je vhodnější zadat analýzy v jiné laboratoři, kde mohou být prováděny rutinně.

4.3 Validační plán a zpráva

Validační činnosti se musí provádět a výsledky se musí uvádět v souladu s dokumentovaným postupem.

Takový postup musí:

- zajistit, aby byly vyhodnoceny výkonnostní charakteristiky potřebné k prokázání, že metoda je vhodná pro zamýšlený účel;
- dokumentovat kritéria přijatelnosti pro každou výkonnostní charakteristiku;
- navrhnout experimenty nezbytné k získání údajů umožňujících určit vhodnost pro daný účel.

Nástin validačního plánu („validační protokol“) a validační zpráva může být obsahem oborových směrnic (viz oddíl 4.5).

ISO/IEC 17025 [1] v článku 7.2.2.4 popisuje minimální záznamy o validaci, které musí laboratoř uchovávat. Národní akreditační orgány mohou navíc poukázat na minimální požadavky na takovou dokumentaci [23]. Jednoduchou šablonu pro kombinovaný plán validace a validační zprávu lze nalézt v dodatku Eurachem *Planning & reporting validation studies* [30]. Obecný přístup použitý v tomto dodatku je popsán níže.

- **Titulní strana.** Obsahuje název a odkaz na metodu a přehled charakteru metody a účelu studie.
- **Analytické požadavky.** Informuje o požadovaném rozsahu metody a jejím použití, účelu studie, charakteristikách výkonnosti, které mají být studovány, požadavcích na výkonnost metody, všech dostupných údajích o výkonnosti a materiálech dostupných pro studii.
- **Výkonnostní charakteristiky.** Každé výkonnostní charakteristice má být věnován samostatný oddíl. V něm má být stručně popsána charakteristika výkonnosti, zopakovány všechny specifické požadavky, nastíněny experimenty, které budou provedeny, a způsob hodnocení výsledků. Je

třeba uvést výsledky a konstatovat závěry z experimentů. Pořadí, ve kterém jsou jednotlivé výkonnostní charakteristiky studovány, může v některých případech vyžadovat zvážení (viz oddíl 3.5 doplňku Eurachem *Planning & reporting method validation studies*).

- **Shrnutí.** V poslední části mají být shrnuty výsledky a veškeré další informace získané pro každou výkonnostní charakteristiku. Uvedou se důsledky pro rutinní používání metody a interní a externí řízení kvality. Nejdůležitější je uvést závěrečné prohlášení, zda je metoda vhodná pro daný účel. Je to požadavek normy ISO/IEC 17025 [1].

4.4 Prostředky validace

4.4.1 Slepé vzorky

Použití různých druhů slepých vzorků (blanků) umožňuje posoudit jakou měrou lze přiřadit měřený signál analytu a jakou měrou jiným příčinám. Analytik má k dispozici různé druhy slepých vzorků:

- **Slepé vzorky (sample blanks).** Jedná se v podstatě o matrice vzorků bez přítomnosti sledovaného analytu v detekovatelných úrovních (nebo s velmi nízkými, ale dobře známými koncentracemi sledovaných analytů), např. vzorek lidské moči bez specifické návykové látky nebo vzorek masa bez reziduí hormonů. Slepé vzorky může být obtížné získat, ale takové materiály jsou potřebné pro získání reálného odhadu interferencí, které by se mohly vyskytovat při analýze zkušebních vzorků.
- **Kalibrační slepé vzorky.** Kalibrační slepý vzorek je kalibrační standard, který neobsahuje sledovaný analyt (analyty) na detekovatelné úrovni.
- **Procedurální slepý vzorek.** Procedurální slepý vzorek je vzorek, který neobsahuje matici, prochází celým postupem měření a je analyzován stejným způsobem jako zkušební vzorek.
- **Slepé vzorky reagensů.** Slepý vzorek reagensů je směs jakéhokoli rozpouštědla (rozpouštědel) a/nebo reagensie (reagensů), která se dostává do detektoru při analýze zkušebního vzorku.
- **Slepý vzorek rozpouštědla.** Slepý vzorek rozpouštědla se skládá z rozpouštědla (rozpouštědel) obsaženého v roztoku předkládaném měřicímu přístroji.

Další pokyny k tomu, jak definovat a zacházet se slepými vzorky ve validační nebo verifikační

studii, lze nalézt v dodatku Eurachem *Blanks in method validation* [32].

4.4.2 Rutinní zkušební vzorky

Rutinní zkušební vzorky jsou užitečné, protože poskytují informace o preciznosti, interferencích atd., se kterými se lze setkávat při každodenní práci. Pokud byla stanovena koncentrace sledovaného analytu (analytů) ve zkušebním vzorku, např. použitím vhodné referenční metody, lze ji použít k posouzení vychýlení (bias) měření. Takové metody nejsou vždy k dispozici. Alternativně lze spolu se zkušebním vzorkem analyzovat vhodný CRM (se stejnou maticí a podobnou koncentrací analytu), je-li k dispozici, a stanovit tak koncentraci přítomného analytu (analytů).

4.4.3 Materiály/roztoky s přídavkem

Představují materiály nebo roztoky, ke kterým byl analyt (analyty) záměrně přidán. Přednostně jsou ze stejné matrice jako vzorky běžně analyzované pomocí zkušební metody. Tyto materiály nebo roztoky již mohou obsahovat sledovaný analyt, je tedy třeba věnovat pozornost tomu, aby přídavek (spike) nevedl k úrovním analytu, které by přesahovaly pracovní rozsah metody. Přidávky (spikování) o známém množství analytu umožňují zvýšit odezvu měřeného analytu a zvýšení vypočítat na základě přidaného množství, i když absolutní množství analytu přítomného před a po přidání přídavku není známo. Všimněme si, že u mnohých metod je přídavek přidáván takovým způsobem, že není vázán na matici vzorku tak těsně, jak by tomu bylo, kdyby byl přítomen přirozeným způsobem. To platí zejména pro pevné vzorky. Tudíž odhady vychýlení (bias) získané na základě přídavku (spikování) mohou být příliš optimistické.

Přidávky (spikování) se nemusí omezovat jen na analyty, které jsou předmětem zájmu. Mohou se týkat čehokoliv, co je přidáno ke vzorku, aby se přezkoušel vliv přídavku. Například ke vzorku mohou být přidána různá množství příslušné potenciální interference, aby se odhadla koncentrace interferentu, při které je již stanovení analytu nepříznivě ovlivňováno. Je třeba obvykle přesně určit povahu přídavku (spiku).

4.4.4 Přirozeně kontaminované materiály

Jsou to materiály, ve kterých je analyt, který je předmětem zájmu, v podstatě cizí složkou, která se dostala do výchozího materiálu někdy před vzorkováním. Analyt má tedy k matici těsnější vazbu, než kdyby byl přidán jako přídavek (spikování). Odpovídající hodnota obsahu

analytu bude záviset na množství analytu, které bylo ve styku s materiálem, rychlosti přejímání maticí a jeho ztrátám a dalším ztrátám prostřednictvím metabolismu, rozkladu nebo dalším chemickým a fyzikálním procesům. Přirozeně kontaminované materiály mohou být rutinními zkušebními vzorky a mohou také tvořit základ certifikovaných referenčních materiálů. Jejich užitečnost při validačních studiích závisí na tom, jak dobře může být hodnota analytu charakterizována. Pro studie vychýlení je nutná přesně známá koncentrace analytu, ale pro studie preciznosti to neplatí. Mezi příklady přirozeně kontaminovaných materiálů patří:

1. Herbicidy v mouce vyrobené z obilí, které bylo ošetřeno herbicidy v průběhu růstu.
2. Aktivní složky ve farmaceutických preparátech přidávaných ve stádiu výroby farmaceutického přípravku.
3. Práškový vaječný bílek (se známým obsahem proteinu) přidávaný k těstu na cukroví před pečením, při zjišťování alergenů.

4.4.5 Standardy měření

Musí se pečlivě zvažovat použití slova ‚standards‘ (v angličtině pozn. překl.), jelikož se tento termín vztahuje též na psané dokumenty, jakými jsou normy ISO. Když se tento termín vztahuje k látkám používaným pro kalibraci nebo pro účely identifikace je výhodné se odvolávat na ně jako na standardy měření (etalony) nebo kalibrátory [7]. Tradičně se za ně považují roztoky jednotlivých látek, ale v praxi to může být cokoli, v čem byl určitý parametr nebo vlastnost charakterizována do té míry, že může sloužit jako metrologická reference.

Je důležité rozlišovat mezi referenčními materiály (RM) a certifikovanými referenčními materiály (CRM) [7, 33], protože existuje významný rozdíl v jejich používání v procesu validace metody (5.6.2). Referenčními materiály mohou být ve skutečnosti jakékoliv materiály používané jako reference a mohou zahrnovat laboratorní reagentie známé čistoty, průmyslové chemikálie nebo jiné artefakty. Vlastnost nebo předmětný analyt musí být stabilní a homogenní, ale dotyčný materiál nevyžaduje, aby měl vysoký stupeň charakterizace, metrologické návaznosti, nebo prohlášení o nejistotě měření, které jsou vyžadovány u certifikovaných referenčních materiálů.

Obecně je charakterizace předmětného parametru u CRM pod důkladnější kontrolou než u RM, a navíc je charakterizovaná hodnota certifikována s dokumentovanou metrologickou návazností a nejistotou. Charakterizace se obvykle provádí

několika odlišnými metodami, nebo jediným primárním měřicím postupem tak, aby bylo vychýlení (bias) při charakterizaci pokud možno redukováno nebo i dokonce eliminováno.

Posuzování vychýlení (bias) vyžaduje spolehlivý referenční bod, nejlépe CRM se stejnou matricí a koncentrací analytu jako u zkušebních vzorků.

4.4.6 Statistika

Statistické metody jsou nezbytné pro shrnutí údajů a k činění objektivních závěrů o odlišnostech mezi soubory dat (statistické testy významnosti). Analytici by se měli seznámit přinejmenším se základními prvky statistické teorie, zejména těmi sloužícími k vyhodnocování preciznosti, vychýlení (bias), lineárního rozsahu, meze detekce (LOD), meze stanovitelnosti (LOQ) a nejistoty měření. Řada užitečných knih seznamujících se statistikou pro analytická měření je uvedena v seznamu literatury Eurachem reading list (najdete jej na webových stránkách Eurachemu v části *Publications* na webu Eurachem, www.eurachem.org).

4.5 Požadavky na validaci

Požadavky, jak provádět validaci metod, mohou být specifikovány v odvětvových směrnících odpovídajících zaměření dané metody [například 13, 25, 31, 34-37]. Pokud takové směrnice existují, doporučuje se podle nich postupovat. To zaručí, že jak příslušná terminologie validace, tak i použitá statistika jsou vykládány způsobem odpovídajícím zvyklostem příslušného odvětví. Oficiální uznání metody může vyžadovat charakterizaci vyžadující mezilaboratorní studii.

4.6 Proces validace metody

Má-li řešit konkrétní problém zákazníka, musí laboratoř nejprve stanovit analytický požadavek, který definuje výkonnostní charakteristiky, které musí metoda k vyřešení daného problému splňovat (Obrázek 1).

V reakci na tyto požadavky musí laboratoř identifikovat vhodnou existující metodu nebo podle potřeby vyvinout/modifikovat vlastní metodu. Všimněte si, že některé správní předpisy mohou vyžadovat použití určité metody. Tabulka 6 uvádí typy otázek, které by mohly vyvstat při formulování analytických požadavků (sloupec 1) a odpovídající výkonnostní charakteristiky metody, které může být potřeba vyhodnocovat (sloupec 2). Laboratoř pak stanoví a vyhodnotí odpovídající výkonnostní charakteristiky a zkonfrontuje je s analytickými požadavky. Proces validace končí závěrem a prohlášením, zda je analytický požadavek splněn či nikoliv. Pokud

analytický požadavek není splněn, je nutný další vývoj metody. Tento proces vývoje a hodnocení pokračuje, dokud není metoda považována za schopnou splnit požadavek (pokud je to ekonomicky proveditelné) nebo dokud není rozhodnuto, že metoda je nevhodná a je třeba zvolit jiný přístup.

Ve skutečnosti je analytický požadavek málokdy předem dohodnut se zákazníkem takto formálně. Zákazníci obvykle vymezují své požadavky ve formě ceny a/nebo doby a obvykle neznají potřebnou výkonnost metod. Požadavky na výkonnost metod však mohou být stanoveny v případech, kdy se metody opírají o regulační požadavky nebo shodu se specifikací. Evropská unie publikovala například požadavky pro analýzu pitné vody [38], na analýzy prováděné v rámci směrnice o vodě [39], pro stanovení úrovní reziduí veterinárních léčiv v potravinách živočišného původu [31] a pro rezidua pesticidů v potravinách a krmivech [35].

Obvykle je však ponecháváno na úvaze analytika, aby rozhodl, jaká výkonnost je potřeba. Velmi často to znamená porovnání analytického požadavku se známou schopností metody (např. publikovanou u standardních (normovaných) metod, zjištěnou v programech zkoušení způsobilosti (PT) nebo odhadnutou z matematických modelů, jakým je Horwitzova funkce [40]).

Finanční omezení mohou způsobit, že vývoj metody nebo další vývoj, pokud validace metody nebyla úspěšná, který splňuje určitý analytický požadavek, není ekonomicky proveditelný, a v takovém případě je třeba rozhodnout, zda požadavek zmírnit na dostupnější úroveň, nebo přehodnotit odůvodnění analýzy.

4.7 Vzorkování a manipulace se vzorkem ve vztahu k validaci metody

4.7.1 Význam zvážení vzorkování a manipulace se vzorkem při plánování validace metody

Zajištění vhodnosti analytických výsledků pro daný účel nezávisí pouze na platnosti analytické zkušební metody, ale ve většině případů také na platnosti odběru vzorků a manipulaci se vzorky před analytickým zkoušením. To potvrzuje skutečnost, že nejistota měření vyplývající z odběru vzorků je často výrazně vyšší než příspěvek nejistoty z následných analytických postupů. V revidované verzi normy ISO/IEC 17025 z roku 2017 [1] je kladen zvýšený důraz na vzorkování. Norma vyžaduje, že se při odhadu

nejistoty měření musí vzít v úvahu všechny příspěvky, které jsou významné, včetně těch, které vyplývají z odběru vzorků. Rovněž uvádí, že validace může zahrnovat postupy pro odběr vzorků, manipulaci a přepravu zkoušených položek, a požaduje, aby ve zprávách o zkouškách byl uveden „...*odkaz na plán odběru vzorků a metodu odběru vzorků použitou laboratoří nebo jinými subjekty, pokud jsou tyto odkazy relevantní pro platnost nebo použití výsledků*“.

Otázkou je, co lze udělat pro zajištění platnosti postupů odběru vzorků – a kdo je za to odpovědný? V mnoha případech primární odběr vzorků provádí zákazník nebo nezávislý subjekt specializovaný na odběr vzorků. V této situaci nemá laboratoř žádnou možnost, jak provést přímou validaci postupu odběru vzorků. Laboratoř však může provést ověření platnosti vzorků předkládaných laboratoři (dále jen „laboratorní vzorek“, viz oddíl 4.7.5). Naproti tomu v případech, kdy je odběr vzorků nedílnou součástí zkušební metody, mají být počáteční kroky odběru vzorků v procesu součástí validační studie. Zvláštním případem je situace, kdy je laboratoř odpovědná za zkoušení v terénu, a to buď pomocí přímo měřících senzorů (kde není odebrán žádný fyzický vzorek), nebo kde se zkoušení provádí „na místě“, a to bezprostředně po odběru vzorku.

Dále je třeba také zvážit manipulaci se vzorky po jejich přijetí do laboratoře. Odběr podvzorků (po vhodné homogenizaci) a skladování vzorků nebo podvzorků před zahájením zkušebního procesu může mít významný dopad na povahu zkušební vzorku a obsah analytu. Tyto kroky proto mají být součástí validační studie.

V některých oblastech (např. zkoušení krmiv a potravin v rámci EU [41]) existují zvláštní pravidla a předpisy, které musí laboratoře pracující v těchto oblastech dodržovat. Nicméně v následujících pododdílech tento Pokyn poskytne některá obecná doporučení k tomuto tématu.

Validace postupu odběru vzorků by měla usnadnit odhad nejistoty z odběru vzorků. Příručka „Measurement uncertainty arising from sampling – A guide to methods and approaches“ [16] ukazuje, jak může odhad nejistoty během validace postupu vzorkování přispět k určení vhodnosti pro účel celé zkušební metody. Vzhledem k tomu, že podmínky odběru vzorků během rutinního zkoušení se mohou lišit od podmínek převažujících během validace a že podmínky odběru vzorků a objekt vzorkování se často významně liší od úkolu k úkolu, zdůrazňuje

příručka význam validace postupu odběru vzorků a nutnost zavedení řízení kvality pro průběžné sledování výkonnosti celé metody, včetně postupu odběru vzorků.

Vlastní manipulace a příprava vzorků v laboratoři má být zahrnuta do validace/verifikace zkušební metody podle zásad popsaných v této příručce (viz také oddíl 4.7.5). Validace nebo verifikace postupů primárního (nebo terénního) odběru vzorků je mimo rozsah této příručky, ale postupy jsou popsány jinde [42]. V následujících pododdílech je popsána odpovědnost laboratoře za zajištění toho, aby byl používán platný postup odběru vzorků.

4.7.2 Laboratoř neodpovídá za odběr vzorků

Pokud je vzorek přivezen až k „laboratorním dveřím“ někým mimo laboratoř, nemůže být laboratoř odpovědná za platnost procesu odběru vzorků. V takových případech ISO/IEC17025:2017 [1] vyžaduje, aby laboratoř ve svém protokolu o zkoušce uvedla „...*prohlášení o tom, že výsledky se vztahují pouze ke zkoušeným položkám*“.

Laboratoř však má převzít odpovědnost za informování vzorkaře o otázkách, které mohou ovlivnit platnost laboratorního vzorku a jeho následnou vhodnost pro zkoušení. Při komunikaci se zákazníkem a vzorkařem je důležité zdůraznit kritické body v krocích odběru a přepravy vzorků a případně doporučit provedení a dokumentaci příslušné validace.

Po obdržení laboratorního vzorku by laboratoř měla vyhodnotit procesy odběru a přepravy vzorků přezkoumáním dokumentace, která je přiložena ke vzorku a samotného vzorku. Pokud je to možné, měly by určit, zda daný plán vzorkování má poskytovat dostatečně reprezentativní vzorek. Měly by určit, zda podmínky skladování a přepravy, jako je teplota a balení, by mohly ovlivnit integritu vzorku (viz oddíl 4.7.5).

4.7.3 Laboratoř odpovídá za odběr vzorků v rámci metody

V případech, kdy je laboratoř odpovědná za výjezd do terénu (ať už se jedná doslova o pole, jezero nebo o výrobní linku) a za získání dostatečně reprezentativních vzorků pro zkoušení v laboratoři, je třeba provést úplnou validaci celého procesu. Pokud se používají dobře popsané a validované postupy odběru vzorků, má je laboratoř verifikovat, aby se ujistila, že jejich

použití splňuje účel získat laboratorní vzorky vhodné pro zkoušení.

4.7.4 Zkoušky v terénu

Pokud je laboratoř odpovědná za přemístění zkušebního zařízení na místo odběru vzorků (např. na pole, jezero nebo do míst výrobního procesu), analytická metoda se provádí mimo prostory laboratoře, je třeba provést důkladnou validaci/verifikaci. Tato validace/verifikace má zohlednit všechny příslušné zvláštní podmínky v místě odběru vzorků/zkoušení, které mohou ovlivnit platnost konečných výsledků. V takových případech je však odběr vzorků úzce integrován do celkového procesu měření. Může se jednat buď o přímé měření, kdy se zařízení dostane do kontaktu s původním materiálem a měření se provádí přímo (měření *in situ*), nebo se vzorek odebere, a ihned se zkouší na stejném místě (měření na místě [43]).

V obou případech se obvykle nevyžaduje žádná nebo jen velmi omezená manipulace se vzorkem nebo jeho příprava.

Validace/verifikace těchto metod má být provedena pokud možno srovnáním s výkonností interně používané („*ex situ*“) metody nebo srovnatelné metody. Zejména v případě měřicích zařízení *in situ* je důležité ověřit dokumentaci poskytnutou výrobcem a jako takovou lze validaci/verifikaci považovat za období kvalifikace přístroje.

4.7.5 Příjem a manipulace se vzorkem

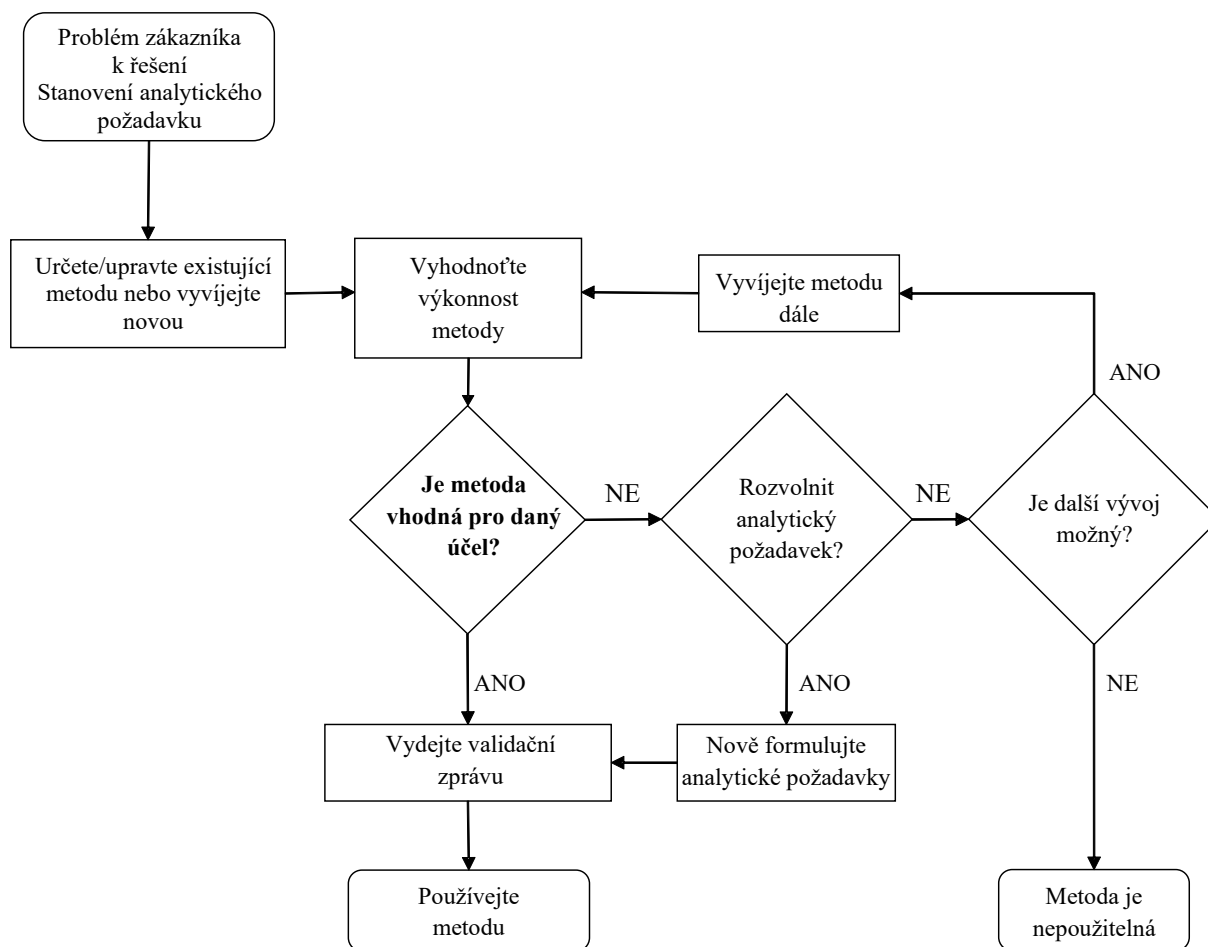
Vzorek dodaný do laboratoře buď zákazníkem, nebo profesionálním vzorkářem se obvykle nazývá „laboratorní vzorek“. Vhodnost laboratorního vzorku pro zkoušení by měla

posoudit laboratoř po obdržení vzorku. Toto hodnocení má být založeno na okamžitém vzhledu vzorku, případném balení vzorku a na tom, jak byl vzorek dodán do laboratoře (např. zda byl uchováván při nižší než určité teplotě). Kromě toho musí laboratoř také posoudit plán odběru vzorků a metodu, zda „...jsou relevantní pro platnost nebo použití výsledků“ (citace z normy ISO/IEC 17025:2017 [1]).

Někdy lze laboratorní vzorek zkoušet pomocí analytické metody bez jakéhokoli zpoždění nebo rozdělení, ale v mnoha případech musí být vzorky dodané do laboratoře před zahájením zkoušení skladovány (za vhodných podmínek). Kromě toho může být množství laboratorního vzorku příliš velké na to, aby bylo vhodné pro počáteční kroky analytického procesu, jak je uvedeno v metodě. Například procesem homogenizace a odběru podvzorků může být vzorek zmenšen na vhodnou velikost, která se nazývá „zkušební vzorek“.

V případech, kdy analytická metoda začíná u zkušebních vzorků, tj. není popsán postup odběru podvzorků, je laboratoř stále odpovědná za kvalitu/platnost zkušebního vzorku. Veškeré kroky předcházející výchozímu bodu analytické metody (přechod od "laboratorního vzorku" ke "zkušebnímu vzorku") musí laboratoř pečlivě vyhodnotit.

Laboratoř musí tyto počáteční kroky zahrnout do opakovaných zkoušek, které se obvykle provádějí jako součást validace nebo verifikace metody pro každou z příslušných charakteristik výkonnosti. U některých z těchto počátečních postupů, jako je skladování a homogenizace, může být vhodné provést specifický test robustnosti (např. změnou parametrů, jako je teplota, čas atd.). Více informací o testování robustnosti naleznete v oddíle 5.9.2.



Obrázek 1 – Proces validace metody od problému zákazníka až k rozhodnutí, zda či nikoliv může být požadavek zákazníka řešen určenou metodou. Poznámka: Validace metody sestává z fáze, ve které se výkonnostní charakteristiky vyhodnocují a následně porovnávají s analytickými požadavky. Bez ohledu na to, jaké údaje o výkonnosti mohou být pro metodu k dispozici, se vhodnost pro daný účel určí podle toho, jak metoda funguje, když ji určený analytik použije s dostupným vybavením/zařízením.

Tabulka 6 – Otázky, které mohou vyvstávat při formulování analytického požadavku a související výkonnostní charakteristiky s odkazy na příslušné oddíly tohoto pokynu

Dotaz	Výkonnostní charakteristika	Oddíl	Poznámka
Existují nějaká omezení zdrojů, Jaká – lidé, čas, finance, vybavení a reagentie, laboratorní prostory?	-	-	a)
Vyžaduje se vzorkování a rozdělování vzorků (a bude se to provádět v laboratoři)?			
Existují nějaká omezení týkající se dostupnosti a velikosti vzorku?			
Jaká je chemická, biologická a fyzikální podstata matrice?			
Je analyt dispergován nebo lokalizován?			
Jsou analyty v matrici stabilní?			
Je požadován kvalitativní či kvantitativní výsledek?	Selektivita LOD a LOQ	5.1 5.3	
Které analyty jsou předmětem zájmu a na jaké úrovni jsou pravděpodobně přítomny (% , µg/g, ng/g, atd.....)?	Selektivita LOD a LOQ Pracovní rozsah Kalibrační funkce	5.1 5.3 5.4 5.2	b)
Jsou analyty přítomny ve více než jedné chemické formě (např. oxidační stavy, stereoizomery) a je nutné umět jednotlivé formy rozlišit?	Selektivita	5.1	
Jaká veličina se má měřit (,měřená veličina‘)? Zajímá vás ‚celková‘ koncentrace přítomného analytu, nebo ‚extrahované množství‘ za specifikovaných podmínek?	Výtěžnost	5.6	
Jaká se požaduje pravdivost a preciznost?	Pravdivost a výtěžnost Opakovatelnost, mezilehlá preciznost reprodukovatelnost	5.6 5.7	c)
Jaká je cílová nejistota a jak má být vyjádřena?	Nejistota	5.8	
Jaké jsou pravděpodobné interference s analytem (analyty)?	Selektivita	5.1	
Byly stanoveny toleranční meze pro všechny parametry, které jsou pro provedení analýzy kritické (např. doba extrakce, inkubační teplota)?	Robustnost	5.9	d)
Mají být výsledky porovnávány s výsledky dalších laboratoří?	Nejistota	5.8	c)
Mají být výsledky porovnávány s externími specifikacemi?	Nejistota	5.8	c)
<p>a) Ne všechny prvky analytického požadavku mají přímý vztah k požadavkům validace metody, ale v obecnější rovině určují, zda je příslušný přístup aplikovatelný. Například je možno volit různé přístupy podle toho, zda je analyt dispergován ve vzorku nebo izolován na jeho povrchu.</p> <p>b) Kalibrační funkce je nedílnou součástí kvantitativní metody, a tudíž není považována za výkonnostní charakteristiku. Kalibrační funkce je však zahrnuta v oddíle 5 této příručky, protože je považována za klíčový předpoklad pro validaci/verifikaci různých výkonnostních charakteristik.</p> <p>c) Jedním ze základních prvků analytického požadavku je to, aby bylo možné posoudit, zda je či není metoda vhodná pro daný účel, a tedy musí zahrnovat požadovanou nejistotu vyjádřenou jako standardní nejistota nebo rozšířená nejistota.</p> <p>d) U publikovaných normovaných (standardních) postupů se obvykle ukázalo, že jsou robustní v rámci rozsahu postupu, tj. typů matric a pracovního rozsahu. A tedy verifikace prováděná v rámci jediné laboratoře při zavádění publikované normované (standardní) metody nevyžaduje zkoumání robustnosti.</p>			

5 Výkonnostní charakteristiky metody a související témata

Tato kapitola se zabývá každou z výkonnostních charakteristik, které mohou být posuzovány jako součást validační nebo ověřovací studie metody. Jsou zde zahrnuta související témata kalibrační funkce a nejistoty měření. Stanovení kalibrační funkce je součástí vývoje metody. Posouzení této kalibrační funkce však má patřit mezi součásti validační nebo verifikační studie. Představuje stěžejní předpoklad pro posouzení výkonnostních charakteristik, a tedy i pro posouzení vhodnosti metody pro daný účel. Ačkoliv nejistota měření není výkonnostní charakteristikou daného měřicího postupu, ale vlastností výsledků, získaných pomocí tohoto měřicího postupu, nejistota měření je důležitou součástí každého výsledku měření a odráží vliv výkonnostních charakteristik. Proto byla zařazena do této kapitoly.

5.1 Selektivita

5.1.1 Pojmy a definice

Analytická selektivita se vztahuje k „*míře, ve které může být metoda použita pro stanovení příslušných analytů ve směsích nebo maticích bez interferencí od ostatních složek majících podobné chování*“ [44].

Definice v jiných dokumentech [7, 19, 45] víceméně odpovídají této interpretaci. Zatímco IUPAC doporučuje termín „selektivita“, v jiných oblastech, např. farmaceutickém sektoru [13], se používá „specifičnost“ nebo „analytická specifičnost“. U posledního termínu se doporučuje vyvarovat se záměny s „diagnostickou specifičností“ používanou v laboratorní medicíně [46].

5.1.2 Vlivy interferencí

Obecně lze říci, že analytické metody sestávají z měřicí etapy, které může, ale nemusí předcházet etapa izolace. Selektivita má být formálně zkoumána již na počátku procesu vývoje/validace metody, protože přítomnost interferencí ovlivní výkonnost metody [14]. V měřicí etapě se koncentrace analytu obvykle neměří přímo. Namísto toho se kvantitativně určuje specifická vlastnost (např. intenzita světla). Je tudíž zásadní zabezpečit, aby měřená vlastnost odpovídala pouze analytu a ne něčemu, co je chemicky nebo fyzikálně podobné, nebo nevznikala náhodně a nevedla tak ke vzniku vychýlení (bias) výsledku měření.

Typy přítomných interferencí mohou záviset na použité analytické technice. Kromě toho mohou

interference pocházet z matrice (vnitřní-endogenní) nebo mohou být vneseny během analytického postupu (z činidel, použitých materiálů atd.).

Interference mohou zapříčinit vychýlení (bias) tím, že zvyšují nebo snižují signál přičítaný měřené veličině. Velikost vlivu u dané matrice je obvykle úměrná signálu a je tedy někdy nazývána „proporcionálním“ vlivem. Mění směrnici kalibrační funkce, ale nikoliv úsek. Tento vliv se také nazývá „úhlový“ (rotational) [47].

„Translační“ (translational) nebo „fixní vliv“ pochází ze signálu vznikajícího působením interferencí ve zkušebním roztoku. Nezávisí tudíž na koncentraci analytu. Často se uvádí jako „pozadí“ nebo interference v „základní čáře“. Mění úsek kalibrační funkce, ale nikoliv její směrnici.

Není neobvyklé, že se oba, jak proporcionální, tak translační vlivy uplatňují současně. Metoda přídatků standardů může korigovat pouze proporcionální vlivy.

5.1.3 Posuzování selektivity

Selektivita postupu se musí stanovit u doma vyvinutých metod, metod převzatých z vědecké literatury a metod publikovaných normalizačními orgány používanými mimo rozsah, pro který je standardní metoda specifikována. Pokud se metody publikované normalizačními orgány používají v rámci deklarovaného rozsahu, selektivita se obvykle zkoumá v rámci procesu standardizace a laboratoř by již neměla provádět další šetření, pokud nelze předvídat další problémy s interferencí v souvislosti s použitím metody v laboratoři.

Selektivitu metody lze považovat za výkonnostní charakteristiku, jejíž posouzení závisí na použité analytické technice. Selektivita metody se obvykle zkoumá jako schopnost dané analytické techniky měřit předmětný analyt ve vzorcích, ke kterým byly záměrně přidány specifické interference (ty, které se pravděpodobně mohou vyskytovat ve vzorcích). Tam, kde není zřejmé, zda interference jsou již přítomny, selektivita se vyhodnocuje jako schopnost měřit analyt ve srovnání s jinými nezávislými metodami.

Důležitým hlediskem u selektivity, které se musí zvážit, je skutečnost, zda se analyt může vyskytovat ve vzorku ve více než jediné formě, např. vázaná či nevázaná, anorganická či organokovová nebo různé oxidační stavy. Je tedy rozhodující definovat měřenou veličinu, aby se

předešlo nejasnostem. Příklad 1, 2 a 3 níže a Stručný návod 1 ilustrují praktické úvahy, týkající se selektivity.

5.1.4 Potvrzení identity

Konfirmační techniky mohou být užitečné pro ověřování identity. Čím více důkazů lze shromáždit, tím lépe. Nevyhnutelně existuje kompromis mezi náklady a vynaloženým časem na identifikaci analytů a jistotou domněnky, že identifikace byla provedena správně. Zásady hodnocení rizik mohou být použity jako pomůcka při určování, zda je použití konfirmační techniky vhodné.

Potvrzení identity analytu je úzce spjato s posouzením selektivity metody. V obou případech analytik vyhodnocuje výstup z detektoru, aby zjistil, zda je přítomen signál, a pokud ano, zda lze tento signál spolehlivě přiřadit stanovovanému analytu.

Konfirmace zvyšuje důvěru ve zkoumanou techniku a je zvláště užitečná, pokud použité techniky konfirmace jsou založeny na významně odlišných principech. Je-li vyhodnocovaná měřící metoda vysoce selektivní, nemusí být použití dalších konfirmačních technik potřeba [31].

V současné době se k potvrzení identity na základě poměru hmotnosti a náboje (m/z) molekulárních iontů nebo fragmentačních schémat a relativní četnosti (intenzitivy iontů používají přístroje hmotnostní spektrometrie (MS), (např. ICP, plynová a kapalinová chromatografie spojená s MS). Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (HRMS) může poskytnout vysokou míru jistoty při konfirmaci na základě vysoce přesné hmotnosti dat MS/MS, která lze získat.

Příklad 1 – Chromatografie. Pík v chromatografickém záznamu lze přiřadit předmětnému analytu na základě toho, že RM obsahující takový analyt vykazuje signál na stejném místě chromatogramu. Náleží ale signál analytu, nebo něčemu, co se shodou okolností současně eluuje, tj. nějakému stabilnímu vlivu? Může to být jedno ale i obojí. Identifikace analytu pouze takovým způsobem je nespolehlivá a je nutná jiná forma podpůrného důkazu.

V případech, kdy se chromatografický systém používá s neselektivním detektorem (např. UV-Vis, FID atd.), lze selektivitu posílit opakováním chromatografického stanovení s použitím kolony s jinou polaritou nebo použitím jiného nebo ortogonálního principu separace, aby se zjistilo, zda se signály stále objevují ve stejném retenčním čase (v rámci tolerančního okna přijatelnosti).

Experimentální parametry, jako je separační faktor (α) a rozlišení (R_s), lze použít k charakterizaci toho, jak dobře jsou chromatografické píky odděleny/rozlišeny.

Přístroje pro hmotnostní spektrometrii mohou nabídnout vysokou selektivitu a úplná spektrální data mohou poskytnout důkazy o přítomnosti interferencí.

Příklad 2 – Spektroskopie. U ICP-AES se doporučuje, aby se na začátku a v pravidelných intervalech během šarže prováděla systémová mezivprvková korekce a korekce pozadí jako opatření pro řízení kvality.

U infračervené spektroskopie lze identifikaci neznámé látky provádět na základě souladu signálu absorbance („píků“) s jejich polohou v referenčním spektru knihovny spekter. Jakmile jsme přesvědčeni o provedení správné identifikace, mělo by se zaznamenat spektrum RM za přesně stejných podmínek jako u zkušebního podílu. Čím vyšší je počet píků, které se u analytu a RM shodují, tím vyšší je přesvědčení ve správnosti identifikace. Bylo by též užitečné stanovit, jak tvar spektra závisí na způsobu izolace analytu a jeho přípravy k infračervené analýze. Například, pokud se spektrum zaznamenává z tablety soli, může rozdělení velikosti částic ve zkušebním podílu ovlivňovat tvar spektra.

Příklad 3 – Hmotnostní spektrometrie. U ICP-MS se mohou vyskytnout izobarické a polyatomické interference. Izobarické interference se týkají různých prvků, jejichž izotopy mají stejnou hmotnost, jak Fe, tak Ni mají izotopy o hmotnosti 58, proto každý signál měřený při m/z 58 má potenciálně příspěvky z obou prvků. Polyatomické interference jsou výsledkem kombinace dvou nebo více izotopů z různých prvků, které se obvykle vyskytují v plazmatu. Řešením může být měření izotopu, který nemá izobarickou interferenci. Alternativně může být možné aplikovat matematické korekce a jsou k dispozici instrumentální technologie, které mohou účinně odstraňovat interference.

V LC-MS nebo GC-MS mohou být interference způsobeny, když jsou izobarické složky z extraktu vzorku eluovány společně s analytem. Měření více analyticky specifických iontů v jednoduchých kvadrupólových hmotnostních spektrometrech nebo měření analyticky specifického produktového iontu (iontů) pomocí druhého kvadrupólu v trojitých kvadrupólových hmotnostních spektrometrech může zvýšit selektivitu detekce. Obecně lze říci, že u metod tandemové hmotnostní spektrometrie může strategický výběr prekurzorového a produktového iontu (iontů) specifických pro analyt poskytnout větší jistotu v selektivitě detekce. V případech, kdy se používá izotopem značený vnitřní standard, který je eluován v těsné blízkosti analytu, je třeba zkontrolovat interference způsobené nečistotami přirozeného izotopového analytu. Může také docházet k překrývání signálu mezi kanály (cross talk). Cross-talk (překrývání signálu mezi kanály) je označení pro jev, kdy dva prekurzorové ionty v hmotnostní spektrometrii vedou ke vzniku stejného produktového iontu. Pokud kolizní cela není schopna zcela odstranit fragmentační ionty prvního prekurzoru před zahájením fragmentace druhého prekurzoru, mohou se v chromatogramu druhého prekurzoru objevit produktové ionty prvního prekurzoru. Účinky matrice způsobené interferencemi, které mění účinnost iontů analytu a/nebo iontů vnitřního standardu, aby dosáhly detektoru MS, zejména v platformách ESI-MS, mohou ohrozit detekci.

Stručný návod 1 – Selektivita

Co dělat	Kolikrát	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
Analyzujte zkušební vzorky a referenční materiály kandidátskou a dalšími nezávislými metodami.	1	Použijte výsledky konfirmačních technik k posouzení schopnosti dané metody prokazovat identitu analytu odděleně od jiných interferencí.	Rozhodněte, jaká je rozumná potřeba dalších důkazů, aby se dosáhlo postačující spolehlivosti.
Analyzujte zkušební vzorky obsahující různé očekávané interference spolu s předmětnými analyty.	1	Vyhodnoťte vliv interferencí. Omezuje přítomnost interferentu detekci nebo kvantifikaci analytů?	Pokud interference snižuje nebo zvyšuje detekci či kvantifikaci analytů, je další vývoj metody nutností.
Analyzujte slepé vzorky příslušné matrice.	1	Zkoumejte přítomnost endogenních interferencí pocházejících z matrice hledáním nežádoucích signálů, např. u chromatografických technik zkontrolujte, zda se nějaké píky vyskytují v retenčním čase analytu.	Pokud budou zjištěny nežádoucí signály, bude nutné provést další vývoj metody.
Analyzujte procedurální slepý vzorek	1	Vyšetřete přítomnost exogenních interferencí pocházejících z analytického postupu, činidel, rozpouštědel, použitých materiálů atd.	Pokud budou zjištěny nežádoucí signály, bude nutné provést další vývoj metody.

5.2 Kalibrační funkce

Většina moderních, instrumentálních metod jsou „srovnávací metody“, založené na porovnání signálu, nebo jiného druhu indikace z měřicího zařízení, získaného z měření reference se známou hodnotou veličiny, se signálem získaným z měření zkušební vzorku. Tento způsob kvantifikace vyžaduje kalibrační funkci a je v protikladu k „absolutním metodám“, kde je obsah analytu stanovován přímo (např. gravimetrie nebo volumetrie). Kvantitativní srovnávací metody musí být vyvinuty se spolehlivou kalibrační funkcí. Předpokladem všech experimentů doporučených v této příručce je vhodný mechanismus kvantifikace, takže součástí validační/verifikační studie má vždy být důkladné posouzení kalibrační funkce metody.

Kalibrační funkce je nedílnou součástí kvantitativní metody a stanovení této funkce (včetně popisu potřebných měřicích standardů, měření atd.) proto musí být součástí vývoje metody. Jakmile se stanoví, dokumentuje se jako součást metody, která se následně validuje. Vhodnost kalibrační funkce pro daný účel musí laboratoř prokázat před jakoukoli validací/verifikací různých výkonnostních charakteristik, které vyžadují kvantifikaci.

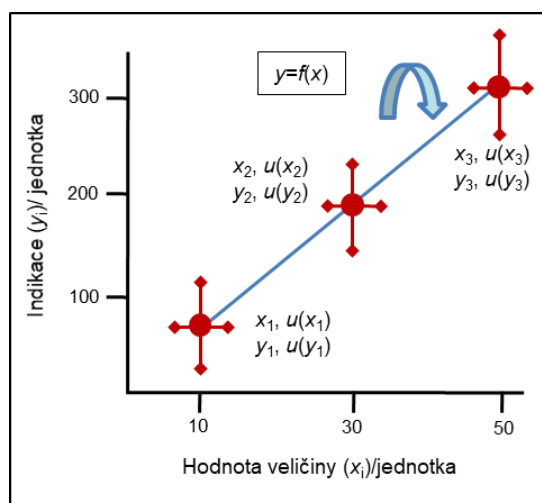
Pokud se v laboratoři používá standardní metoda, má laboratoř vždy použít v ní zdokumentovaný kalibrační postup (pokud není nutná úprava pro splnění konkrétního analytického požadavku). Laboratoř však musí prokázat, že kalibrační funkce je i nadále vhodná pro daný účel. Pro správné rutinní provádění metody je rovněž důležitá dobrá znalost „chování“ kalibrační funkce v konkrétní laboratoři (při specifických podmínkách a použití přístrojů atd.). Kromě toho je předpokladem pro to, aby bylo možné bezpečně provést dvoubodovou kalibraci při rutinním provádění metody (nebo případně jednobodovou kalibraci, pokud lze prokázat, že kalibrace prochází počátkem (0,0)).

5.2.1 Definice

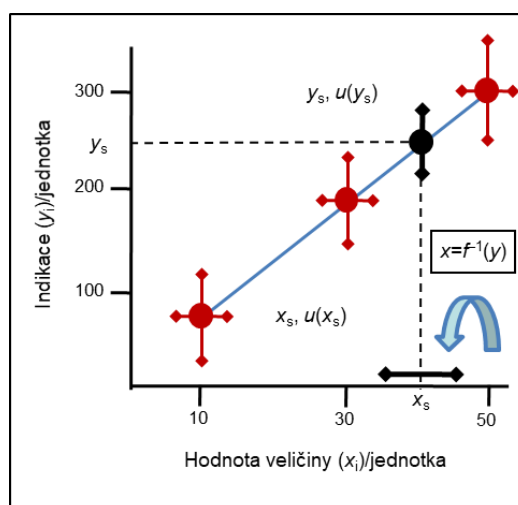
Kalibrace je ve VIM3 [7] definována jako „činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu

pro získání výsledku měření z indikace“.* Tato definice je znázorněna na obrázcích 2 a 3 níže. (Další podrobnosti k tomuto pojmu naleznete

v příručce Eurachem „Terminology in analytical measurement“ [8]).



Obrázek 2 – Ilustrace prvního kroku v definici kalibrace, stanovení kalibrační funkce $y=f(x)$. (Všimněte si, že svislé a vodorovné šipky označující standardní nejistotu indikace a hodnoty veličin nejsou v měřítku) Odkaz [8]



Obrázek 3 – Znázornění druhého kroku definice kalibrace, kdy indikace (signál) z měření vzorku odpovídá hodnotě veličiny, kterou lze rovněž vypočítat pomocí inverzní kalibrační funkce $x=f^{-1}(y)$ Odkaz [8]

*Poznámka k definici také uvádí: „Kalibrace může být vyjádřena údajem, kalibrační funkcí, kalibračním diagramem, kalibrační křivkou nebo kalibrační tabulkou. V některých případech se může skládat ze součtových nebo násobných korekcí indikace s přidruženou nejistotou měření“.

5.2.2 Kalibrační postupy

V mnoha různých analytických metodách, které se denně provádějí v tisících analytických

laboratořích po celém světě, se kalibrační funkce stanovuje mnoha různými způsoby, z nichž nejběžnější jsou:

- Externí kalibrace
Měřicí přístroj (používaný na konci analytického procesu) se kalibruje samostatně pomocí čistých kalibračních standardů (případně včetně činidel z přípravných kroků).
- Přídavek standardu
Do vzorku se přidá známé množství daného analytu v různých množstvích a množství analytu ve vzorku lze určit extrapolací kalibrační funkce.
- Standardy s odpovídající maticí
Alikvótní části matrice se obohacují analytem v několika koncentracích pokrývajících očekávaný rozsah měření metody.
Pokud je to možné, jeden z těchto maticových standardů by měl být porovnán s CRM (i když je na úrovni mimo kalibrační interval).
- Vnitřní standard
Ke všem kalibračním standardům a vzorku, který má být měřen, se přidá sloučenina odlišná od analytu (ale s podobným analytickým chováním, např. izotopicky značená forma analytu). Kalibrační funkce je založena na relativních odezvách mezi oběma sloučeninami.

V některých případech je rozhodující linearita kalibračního intervalu, zatímco v jiných případech jsou vhodné nelineární kalibrační funkce. U absolutních metod nejsou stanovení závislá na žádné kalibrační funkci.

Často nelze získat matici bez analytu (slepý vzorek), která se používá k vytvoření referenčních vzorků nebo standardů odpovídající maticí, například při kvantifikaci endogenní biomolekuly v biologických maticích.

V těchto případech lze použít korekci slepého vzorku, externí kalibrační křivku, simulovanou maticovou křivku nebo náhradní (surrogate) analyt jako kalibrátor v matici (viz dodatek Eurachem Blanks in Method Validation [32]).

Bez ohledu na použitý přístup by mělo být prokázáno, že odezva použitých kalibrátorů skutečně představuje odezvu autentického analytu v matici vzorku, která je předmětem zájmu, v celém kalibračním rozsahu.

Endogenní koncentrace matrice vzorku extrapolovaná z přídatku standardu by měla souhlasit s endogenní koncentrací interpolovanou z kalibrační křivky náhradní matrice nebo náhradního analytu. Proto mají být provedena nezávislá stanovení, která prokážou rovnocennost přístupů a skutečnost, že soubor kalibračních

standardů odráží odezvu autentické analyzované látky v matici.

5.2.3 Maticové vlivy

Je důležité zdůraznit, že žádná metoda by neměla být v laboratoři použita bez důkladného vyhodnocení maticových vlivů během validace metody.

Terminologie týkající se maticových vlivů není zcela harmonizována. Jedná se o koncept s různými významy, který lze interpretovat různými způsoby v závislosti na konkrétním analytickém oboru. Na jedné straně jsou interference a vlivy matrice související pojmy a často se používají zaměnitelně kvůli nejasnosti pojmů. IUPAC však rozlišuje mezi těmito dvěma pojmy v definici vlivu matrice: „Kombinovaný vliv všech složek vzorku kromě analytu na měření množství. Pokud lze určit konkrétní složku, která způsobuje určitý vliv, pak se jedná o interferenci.“ [18] (viz také oddíl 5.1.2).

Vlivy matrice mohou ovlivnit výsledek analytické metody mnoha různými způsoby a ovlivnit různé kroky analytického procesu v závislosti na typu matrice a principech použité analytické metody. Vliv matrice může mít také vliv na kalibrační funkci metody, která má být posuzována.

Teoreticky by měl být vliv matrice na experimentální výsledky zcela eliminován. To je však obtížný úkol vzhledem k obrovské rozmanitosti matic a nepředvídatelným účinkům, které by mohly mít. Proto nemusí být možné vlivy matrice zcela odstranit. Strategie navržené k překonání vlivu matrice jsou založeny na dvou hlavních přístupech:

- snížení primárních příčin, jako jsou maticové komponenty odpovědné za maticové vlivy;
- kompenzace účinku maticových vlivů v kalibračních funkcích používaných pro kvantifikaci. K dosažení tohoto cíle lze použít kalibrace pomocí externího standardu s odpovídající maticí, vnitřního standardu a přídatku standardu.

Různé vlivy matrice mohou mít významný dopad na kalibrační funkci a její vhodnost pro kvantifikaci. Některé z různých přístupů ke stanovení kalibrační funkce, které jsou uvedeny v oddíle 5.2.2, představují různé pokusy o překonání tohoto dopadu a zohlednění vlivů matrice by mělo být vždy součástí posouzení kalibrační funkce během verifikace/validace metody.

Běžnou praxí je porovnání kalibrační křivky pro čisté roztoky s kalibrační křivkou pro maticové odpovídající standardy. Je třeba provést vizuální

porovnání křivek a doplňkové výpočty/testy k určení možných matricových vlivů.

5.2.4 Posouzení kalibrační funkce

Bez ohledu na kalibrační postup předepsaný analytickou metodou musí laboratoř používající tuto metodu prokázat, že postup je vhodný pro daný účel.

Během verifikace/validace metody je nutné potvrdit kalibrační funkci popsanou v metodě (v celém intervalu); prokázat, že kalibrační interval je kompatibilní s intervalem uvedeným v rozsahu platnosti metody pro příslušné matrice vzorků; a potvrdit, že navrhovaný rutinní analytický kalibrační postup (jednobodový, ohraničením nebo vícebodový) je vhodný.

Aby se potvrdilo, že kalibrační funkce je vhodná pro požadovaný rozsah, mají se předepsané kalibrační standardy s rozsahem koncentrací, který překračuje rozsah koncentrací očekávaný ve zkušebních vzorcích o $\pm 10\%$ nebo dokonce $\pm 20\%$, změřit třikrát a signály (jednotlivé hodnoty i průměrné hodnoty při každé koncentraci) zaznamenat do grafu (viz Stručný návod 2, krok 1). (Např. pokud se v zkušebních vzorcích očekává rozsah 1 až 100 mg l⁻¹, pak by se při verifikaci/validaci měl posoudit rozsah širší o $\pm 20\%$, tj. od 0,8 do 120 mg l⁻¹). Zvolené koncentrace mají být rovnoměrně rozmístěny v celém rozsahu. Počáteční posouzení kalibrační funkce by mělo spočívat ve vizuální kontrole křivky odezvy pro průměrné hodnoty, hledání potenciálních odlehklých hodnot a zjištění, zda se křivka zdá být lineární, či nikoli. Dalším krokem je vyhodnocení, zda se jeví rozptýlení jednotlivých bodů úměrné koncentraci v celém rozsahu (tj. nedostatečná homogenita rozptylu).

Pro potvrzení vztahu mezi danými standardními koncentracemi (x-hodnotami) a odezvami měřeného přístroje (y-hodnotami) je nutná statistická analýza.

Velmi častým přístupem je výpočet (a vyhodnocení) *koeficientu determinace* R^2 , ale důrazně se nedoporučuje používat pouze tento přístup.

Spolehlivějším statistickým přístupem je aplikace regresních principů, které poskytují nejlepší regresní křivku (lineární nebo kvadratickou). Regresní křivka je základem pro sestavení grafu reziduí pro vyhodnocení správného proložení kalibrační křivky (viz Stručný návod 2, krok 2). Posouzení může zahrnovat také speciální statistické metody, jako jsou testy „dobré shody“ [48, 49].

V případech, kdy existuje „nedostatek homogenity rozptylu“, může být *vážená regrese* vhodným řešením.

Na základě odezvy křivky a podpůrných statistických údajů získaných pro kalibrační interval může analytik posoudit, zda je kalibrační postup uvedený v metodě vhodný pro daný účel. Kromě toho lze provést posouzení vhodnosti zjednodušené kalibrace, například jednobodové nebo dvoubodové kalibrace, pro daný účel při běžném používání metody.

Jak je uvedeno v oddíle 5.2.3, na kalibrační funkci mohou mít vliv také matricové vlivy vyplývající ze složení vzorku, a to v závislosti na typu měřicího zařízení používaného metodou.

Stručný návod 2 – Kalibrační funkce

Co dělat	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
1. Změřte slepý vzorek a kalibrační standardy v 6-10 koncentracích rovnoměrně rozložených v předmětném rozsahu.	Vyneste odezvu (osa y) vůči koncentraci (osa x). Vizuálně zhodnoťte a stanovte přibližný lineární rozsah a horní a dolní mez pracovního rozsahu instrumentace. Pak přejděte k bodu 2).	Toto vizuálně potvrdí, zda či nikoliv je pracovní rozsah u instrumentace lineární. Poznámka: Tam, kde signál není přímo úměrný koncentraci, např. u pH nebo při práci s dalšími iontově selektivními elektrodami nebo u imunometrických metod, je třeba před posuzováním linearitu provést transformaci hodnot.
2. Změřte slepé vzorky a kalibrační standardy 2-3krát při 6-10 koncentracích rovnoměrně rozvržených v celém lineárním rozsahu.	Vyneste odezvu (osa y) vůči koncentraci (osa x). Vizuálně zhodnoťte přítomnost vybočujících hodnot, které se nemusí zahrnout do regrese. Vypočtete příslušné regresní statistiky. Vypočtete a vyneste rezidua (rozdíly mezi pozorovanou hodnotou y a vypočtenou hodnotou y odpovídající přímce pro každou z hodnot x). Náhodné rozdělení reziduí okolo nuly potvrzuje linearitu. Systematické tendence naznačují nelinearitu nebo změnu rozptylu v závislosti na úrovni.	Tato etapa je nezbytná k zhodnocení pracovního rozsahu, u něhož se předpokládá linearita, zvláště když metoda používá dvoubodovou kalibraci. Pokud je směrodatná odchylka úměrná koncentraci, pak uvažte spíše výpočet váženou regresí než jednoduchou neváženou lineární regresí. Je nebezpečné vylučovat odlehle hodnoty bez jejich předchozí kontroly dalším měřením při blízkých koncentracích. Za určitých okolností může být pro kalibraci přístroje lepším řešením pokusit se proložit daná data nelineární křivkou. Počet vzorků je pak třeba zvýšit. Použití funkcí vyšších, než kvadratická se obecně nedoporučuje.

5.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

5.3.1 Termíny a definice

Při měření nízkých koncentrací je třeba vzít v úvahu tři obecné koncepce. Zaprvé je třeba určit hodnotu výsledku, který se považuje za indikaci úrovně analytu významně odlišné od nuly. Často se požaduje nějaká reakce na úroveň analytu, jako prohlášení, že materiál je kontaminovaný. Tato úroveň je známa v klinické chemii jako ‚kritická úroveň‘, ‚rozhodovací mez‘, nebo ‚mez blanku‘ [50].

Zadruhé je důležité znát nejnižší koncentraci analytu, která může být metodou detekována na stanovené konfidenční úrovni. Tedy při jaké skutečné koncentraci překročíme s jistotou kritickou úroveň popsanou výše? Pro tento pojem se používají termíny jako ‚mez detekce‘ (LOD), ‚minimální detekovatelná hodnota‘ a ‚detekční mez‘.

V některých směrnících EU se používají termíny $CC\alpha$ a $CC\beta$ [31]. Další informace o těchto pojmech naleznete v oddíle 5.3.5.2.

Zatřetí je důležité stanovit nejnižší úroveň, při které typická aplikace vykazuje přijatelnou výkonnost. Tento třetí pojem se obvykle uvádí jako mez stanovitelnosti (LOQ)*.

Terminologie týkající se všech těchto pojmů je velmi různorodá a liší se podle odvětví. Například termíny ‚mez detekce‘ (LOD) nebo ‚detekční mez‘ (DL) se dříve nepřijímaly obecně, i když byly používány v některých oborových dokumentech [51]. Nyní však byly začleněny do VIM [7] a IUPAC Gold Book [18]. ISO používá obecný termín ‚minimální detekovatelná hodnota redukované stavové proměnné‘ (‚minimum detectable value of the net state variable‘), který se pro chemii převádí na ‚minimální detekovatelná redukovaná koncentrace‘ (‚minimum detectable net concentration‘) [52, 53, 54, 55]. V tomto pokynu se používají termíny ‚kritická úroveň‘, ‚mez detekce‘ (LOD) a ‚mez stanovitelnosti‘ (LOQ) pro všechny tři výše uvedené pojmy. Při validaci metody to jsou LOD a LOQ, které se obvykle stanovují.

Je též nutné odlišovat mezi detekční mezí instrumentace a detekční mezí metody. Detekční mez instrumentace může vycházet z analýzy vzorků, často slepých vzorků reagentií, přímo vkládaných do přístroje (tj. s vynecháním všech

kroků přípravy vzorků) nebo na základě poměru signálu k šumu, např. v chromatogramu. K získání detekční meze metody musí LOD vycházet z analýzy vzorků, které byly podrobeny celému měřicímu postupu a výsledky byly vypočteny podle stejného vztahu jako u zkušebních vzorků. Detekční mez metody je tedy jedním z nejužitečnějších parametrů pro validaci metody, a proto se na něj tento pokyn zaměřuje.

Následující odstavce popisují experimentální odhad LOD a LOQ. Statistické základy výpočtů LOD uvádí příloha B. Protože jak LOD, tak i LOQ závisí na preciznosti při nule nebo v její blízkosti, popisuje oddíl 5.3.2 nejprve experimentální odhad směrodatné odchylky výsledků v blízkosti nuly.

5.3.2 Stanovení směrodatné odchylky při nízkých úrovních

Jak LOD, tak i LOQ se obvykle vypočítávají vynásobením směrodatné odchylky (s'_0) vhodným faktorem. Je důležité, aby tato směrodatná odchylka odpovídala preciznosti pozorované pro typické zkušební vzorky s koncentrací blízkou nule a aby byl pro získání spolehlivého odhadu proveden dostatečný počet opakovaných měření. V tomto oddíle je směrodatná odchylka s'_0 založena na směrodatné odchylce s_0 pro jednotlivé výsledky v blízkosti nuly, upravené o případné průměrování nebo korekci na slepý pokus používané v praxi (viz níže). O alternativních přístupech pojednává oddíl 5.3.5.

Při určování LOD a LOQ experimenty s jednoduchou replikací je třeba zohlednit následující problémy.

Vhodné vzorky pro odhad LOD a LOQ:

Takovými vzorky by měly být především buď a) slepé vzorky, tj. matrice neobsahující detekovatelné množství analytu nebo b) zkušební vzorky s koncentrací analytu blízkou nebo nižší než je očekávaná LOD. Slepé vzorky fungují dobře u metod, kde slepý vzorek vykazuje měřitelný signál, jako jsou spektrofotometrie a atomová spektroskopie. Avšak techniky jako jsou chromatografie, které vychází z detekce píku převyšujícího šum, vyžadují vzorky o koncentrační úrovni v blízkosti nebo nad LOD. Takové vzorky lze připravit například pomocí přídavek (spikování) ke slepému vzorku (viz oddíl 4.4).

* Mezi používaná synonyma patří ‚mez stanovitelnosti‘, ‚kvantifikační mez‘, ‚mez kvantifikace‘, ‚mez ohlášení‘ a ‚mez použití‘.

Když slepé vzorky nebo zkušební vzorky s nízkou koncentrací nejsou dostupné, mohou se často použít slepé vzorky reagentů*. Tam, kde tyto slepé vzorky reagentů neprocházejí celým postupem měření a dávají se přímo do přístroje, poskytnete výpočet založený na takových měřeních LOD/LOQ instrumentace.

Pokrytí rozsahu metody: U metod použitelných pro různé matrice, může být nutné stanovit směrodatnou odchylku odděleně pro každou matici.

Zabezpečení reprezentativních opakování: Získaná směrodatná odchylka by měla odpovídat výkonnosti metody používané v dané laboratoři, tj. směrodatná odchylka by se měla počítat z výsledků zkoušek, kde analýzy jsou prováděny přesně podle celého dokumentovaného postupu, včetně kroků pro přípravu vzorků. Hodnoty použité pro výpočet směrodatné odchylky s_0 by měly být v jednotkách měření uvedených v postupu.

Podmínky měření: Směrodatná odchylka se obvykle získává za podmínek opakovatelnosti a takový postup je popsán v této části. Spolehlivější odhad však lze získat při použití podmínek mezilehlé preciznosti. Tento přístup je popsán dále v oddíle 5.3.5

Počet pozorování: Počet opakování (m) k získání odpovídajícího odhadu směrodatné odchylky má být dostačující. Běžně se považuje za potřebné provést mezi 6 a 15 opakováními; ve validačních zprávách/protokolech se často doporučuje 10 opakování (viz oddíl 5.3.6).

Průměrování: U mnoha postupů měření se při rutinním používání metody vykazuje průměr z jednotlivých opakování, kdy se každý replikát získává celým měřicím postupem. V takovém případě by se měla upravit směrodatná odchylka jednotlivých výsledků s_0 vydělením odmocninou n , kde n je počet opakování průměrovaných při rutinním používání.

Korekce na vliv slepého pokusu: Pokud je korekce na slepý pokus součástí postupu měření, je nutno věnovat pozornost určování směrodatné odchylky pro výpočet LOD a LOQ. Pokud byly všechny výsledky získávané v průběhu validační studie korigovány stejnou hodnotou slepého pokusu – zde preferovaný přístup pro svou

jednoduchost – bude směrodatná odchylka výsledků menší než odchylka pozorovaná v praxi, kdy jsou výsledky korigovány na různé hodnoty slepých pokusů získaných v rámci jednotlivých sérií.

V tomto případě by se měla s_0 opravit vynásobením $\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$, kde n je počet opakování průměrovaných při uvádění výsledků, kde byl každý replikát získán celým měřicím postupem, a n_b je počet slepých pokusů použitých k výpočtu korekce na slepý pokus.

Poznamenejme, že za podmínek mezilehlé preciznosti budou výsledky korigovány různými hodnotami slepého pokusu, takže není nutná žádná úprava směrodatné odchylky (viz oddíl 5.3.5).

Příklad 4 uvádí příklad takového výpočtu a postupový diagram na Obrázek 4 shrnuje úpravy vyžadované při průměrování a korekci na slepý pokus.

Příklad 4 – Validační úloha vychází z analýzy slepého vzorku. Je provedeno deset (m) nezávislých měření slepého vzorku za podmínek opakovatelnosti. Výsledky poskytly průměrnou hodnotu 2 mg/kg se směrodatnou odchylkou s_0 1 mg/kg.

Případ 1 – V měřicím postupu se uvádí, že zkušební vzorky se mají měřit jednou ($n=1$) a výsledky se mají korigovat jediným vzorkem slepého vzorku ($n_b=1$). V sérii měření se každá série skládá z jednotlivých opakování rutinních vzorků a jednoho slepého vzorku (n_b). Směrodatná odchylka pro výpočet LOD/LOQ je pak podle obrázku 4 rovna:

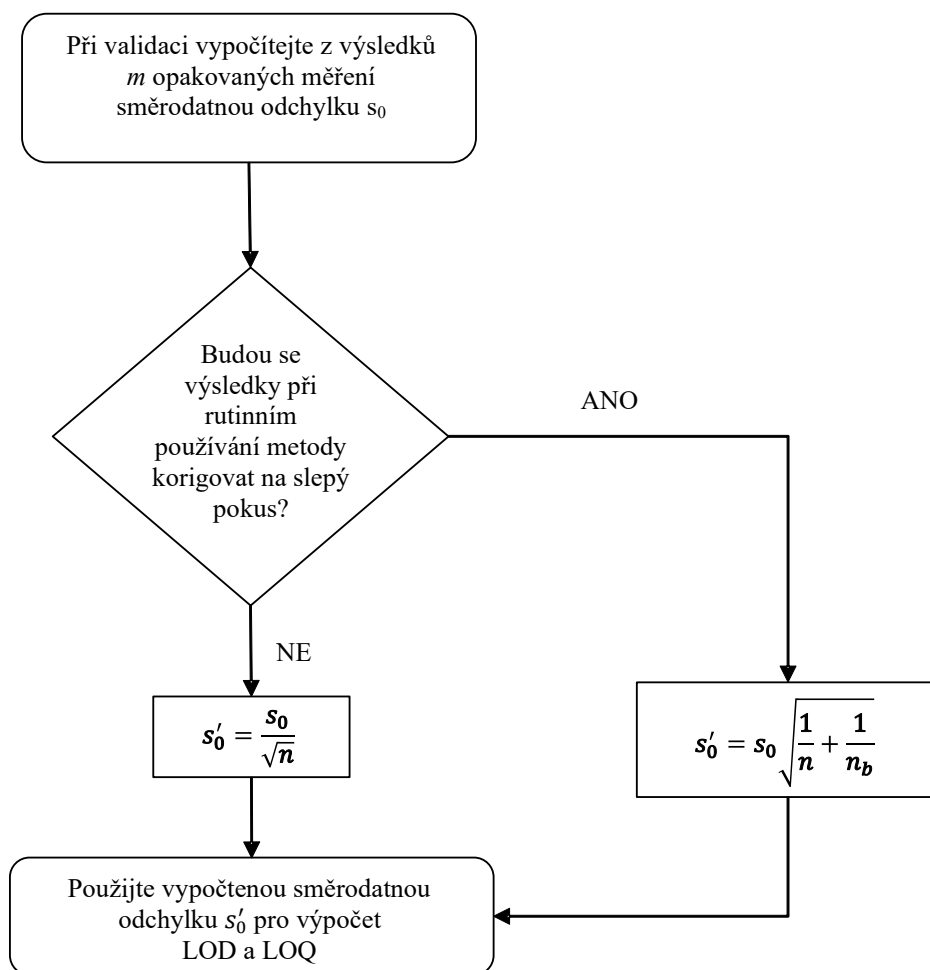
$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{1}} = 1\sqrt{2} = 1,4 \text{ mg/kg}$$

Případ 2 – V měřicím postupu se uvádí, že zkušební vzorky se mají měřit dvakrát ($n=2$) a též slepý vzorek by se měl analyzovat duplikátně. V sériích měření sestává každá série z duplikátů ($n=2$) rutinních vzorků a dvou (n_b) slepých vzorků. Koncentrace nalezená pro rutinní vzorky se koriguje odečtením průměrné hodnoty ze dvou slepých vzorků. Směrodatná odchylka pro výpočet LOD/LOQ je pak podle obrázku 4 rovna:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2}} = 1 \text{ mg/kg}$$

* V terminologii týkající se slepých vzorků panuje značná nejednotnost – další informace naleznete v

příloze Eurachem Supplement Blanks in Method Validation [32].



s_0 je odhad směrodatné odchylky z m jednotlivých výsledků při nulové koncentraci nebo v její blízkosti.

s'_0 je směrodatná odchylka použitá při výpočtu LOD a LOQ.

n je počet opakovaných pozorování s vyhodnocením průměru při uvádění výsledků, kdy každý replikát se získává za použití celého měřicího postupu.

n_b je počet pozorování slepého pokusu použitých k zprůměrování při výpočtu korekce na slepý pokus podle postupu měření.

Obrázek 4 – Výpočet směrodatné odchylky s'_0 pro určení odhadu LOD a LOQ. Postupový diagram vychází z experimentální směrodatné odchylky, s_0 vypočtené z výsledků opakovaných měření vzorků s koncentrací blízko nuly za podmínek opakovatelnosti, a to buď s korekcí všech výsledků na slepý pokus, nebo bez ní, podle toho, jak je stanoveno metodou. Tato korekce na slepý pokus může být založena na jediném měření slepého pokusu nebo na průměru několika měření slepých pokusů.

5.3.3 Odhad LOD

Pro účely validace obvykle postačuje zjistit přibližnou hodnotu LOD, tj. úroveň, při které se stává detekce problematickou. Pro tento účel obvykle postačuje „3s“ přístup uvedený ve Stručný návod 3.

Jestliže činnost souvisí s podporou souladu s předpisy nebo specifikacemi, je na místě exaktnější přístup beroucí v úvahu především stupně volnosti náležející k s_0 . To podrobně popisuje IUPAC [56] a další zdroje [57, 58]. Když se k rozhodování používá kritická hodnota a/nebo LOD, měla by se preciznost sledovat a čas od času může být nutné meze přepočítat. Různá odvětví a/nebo předpisy mohou vyžadovat pro odhad LOD různé přístupy. Doporučuje se připojit při uvádění meze detekce použitou konvenci. Pokud neexistují pro odhad LOD žádné odvětvové směrnice, je možno použít

přístup uvedený ve Stručném návodu 3 jako obecný návod.

5.3.4 Odhad LOQ

LOQ je nejnižší úroveň analytu, která může být stanovena při zachování přijatelné výkonnosti. Za „přijatelnou výkonnost“ se v jednotlivých směrnících různě považují preciznost, preciznost a pravdivost nebo nejistota měření [59]. Podle většiny konvencí se LOQ však v praxi počítá jako koncentrace analytu odpovídající získané směrodatné odchylce (s'_0) při nízkých úrovních vynásobených koeficientem k_Q . Podle IUPAC je standardní hodnotou pro k_Q 10 [56] a pokud je směrodatná odchylka při nízkých koncentracích přibližně konstantní, odpovídá tento násobitel relativní směrodatné odchylce (RSD) rovné 10 %. Někdy se též používají násobky 5 a 6, což odpovídá hodnotám RSD 20 % a 17 % v uvedeném pořadí [60, 61, 62]. Viz dále odkaz [58] a Stručný návod 4.

Stručný návod 3 – Mez detekce (LOD)

Co dělat	Kolikrát	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
1. Opakujte měření slepých vzorků, tj. matric neobsahujících žádný detekovatelný analyt. nebo Opakujte měření zkušebních vzorků s nízkou koncentrací analytu.	10	Vypočtete směrodatnou odchylku s_0 výsledků. Vypočtete s'_0 z s_0 podle postupového diagramu na obrázku 4. Vypočtete LOD jako $LOD = 3 \times s'_0$.	
2. Opakujte měření reagenčních slepých pokusů. nebo Opakujte měření reagenčních slepých pokusů s přídávkem o nízké koncentraci analytu.	10	Vypočtete směrodatnou odchylku s_0 výsledků. Vypočtete s'_0 z s_0 podle postupového diagramu na obrázku 4. Vypočtete LOD jako $LOD = 3 \times s'_0$.	Postup 2. je přijatelný, pokud nelze získat slepé vzorky nebo zkušební vzorky s nízkou koncentrací. Když tyto slepé vzorky reagenční neprocházejí celým měřicím procesem a přímo se dávkuje do přístroje, poskytně výpočet založený na takových měřeních LOD instrumentace.
Poznámky			
<ol style="list-style-type: none"> 1) U některých analytických technik, např. chromatografie, zkušební vzorky s příliš nízkou koncentrací analytu nebo slepé vzorky činidel se budou muset upravit přídávkem, aby se získala nenulová směrodatná odchylka. 2) U každého stanovení se má opakovat úplný měřicí postup. 3) Směrodatná odchylka se vyjadřuje v jednotkách koncentrace. Pokud se směrodatná odchylka vyjádří v signální doméně, LOD je koncentrace odpovídající odezvě slepého pokusu $y_B + 3 \times s'_0$. Stručný příklad výpočtů LOD v signální doméně uvádí též odkaz [5]. 			

Stručný návod 4 – Mez stanovitelnosti (LOQ)

Co dělat	Kolikrát	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
1. Opakujte měření slepých vzorků, tj. matric neobsahujících žádný detekovatelný analyt. nebo Opakujte měření zkušebních vzorků s nízkou koncentrací analytu.	10	Vypočítejte směrodatnou odchylku s_0 výsledků. Vypočítejte s'_0 z s_0 podle postupového diagramu na obrázku 4. Vypočítejte LOQ jako $LOQ = k_Q \times s'_0$.	Hodnota používaná obvykle pro koeficient k_Q je obvykle 10, ale i jiné hodnoty jako 5 nebo 6 se běžně používají (v závislosti na 'vhodnosti pro daný účel').
2. Opakujte měření reagenčních slepých pokusů. nebo Opakujte měření reagenčních slepých pokusů s přidavkem nízké koncentrace analytu.	10	Vypočítejte směrodatnou odchylku s_0 výsledků. Vypočítejte s'_0 z s_0 podle postupového diagramu na obrázku 4. Vypočítejte LOQ jako $LOQ = k_Q \times s'_0$.	Postup 2. je přijatelný, pokud nelze získat slepé vzorky nebo zkušební vzorky s nízkou koncentrací. Když tyto slepé vzorky reagentů neprocházejí celým měřicím procesem a přímo se dávkuje do přístroje, poskytnete výpočet LOQ instrumentace.
3. Experimentální potvrzení Opakujte měření slepých vzorků reagentů nebo slepých vzorků matrice s koncentrací analytu blízkou LOQ stanovenou pomocí přístupu a) nebo b) nebo LOQ specifikovaného zákazníkem/předpisy regulace.	5	Potvrzení, že jsou splněna kritéria pravdivosti a přesnosti.	Přístup 3. se navrhuje v případě, že mohou být obdrženy zkušební vzorky obsahující koncentrace analytu na úrovni LOQ nebo v jejím okolí.
Poznámky			
<ol style="list-style-type: none"> 1) U některých analytických technik, např. chromatografie, zkušební vzorky s příliš nízkou koncentrací analytu nebo slepé vzorky činidel se budou muset upravit přidavkem, aby se získala nenulová směrodatná odchylka. 2) U každého stanovení by se měl opakovat úplný měřicí postup. 3) Směrodatná odchylka se vyjadřuje v jednotkách koncentrace. 			

5.3.5 Alternativní postupy

5.3.5.1 Obecné

V předchozích odstavcích je uveden obecný přístup pro odhad LOD a LOQ, vycházející ze směrodatné odchylky výsledků při koncentracích v blízkosti nuly získané za podmínek opakovatelnosti. Tento postup se všeobecně používá, ale jiné normy a protokoly uvádějí alternativní postupy.

V některých případech, např. když se hodnoty slepých pokusů den ode dne významně odlišují, se dává přednost podmínkám mezilehlé preciznosti před podmínkami opakovatelnosti. Jsou-li například dostupné výsledky řízení kvality pro zkušební vzorky s nízkou koncentrací, může se použít pro odhad LOD a LOQ směrodatná odchylka těchto výsledků. Když se pro výpočet LOD a LOQ použije směrodatná odchylka za podmínek mezilehlé preciznosti, není potřeba brát v úvahu korekci na slepý pokus znázorněnou na

obrázku 4. Tedy pro výpočet LOD a LOQ se použije experimentální směrodatná odchylka získaná z vnitřního řízení kvality rovná směrodatné odchylce s'_0 . ISO 11843-2 [53] popisuje, jak lze instrumentální LOD získat přímo z kalibrační křivky. Alternativní přístupy k odhadu LOD a LOQ jsou navrženy v odvětvových specifických pokynech [62].

5.3.5.2 CC α /CC β

V nařízení EU 2002/657 (nahrazeném nařízením 2021/808) pro veterinární rezidua byly zavedeny dva analytické pojmy, Rozhodovací mez nebo Kritická koncentrace při riziku alfa (CC α) a Detekční schopnost nebo Kritická koncentrace při riziku beta (CC β) [31, 63]. Koncepty CC α a CC β jsou založeny na přístupech ISO a IUPAC pro kritické úrovně [53, 56]. Výhodou konceptu CC α /CC β je absence nejednoznačnosti ohledně spolehlivosti výsledků (falešně pozitivní/falešně negativní) [64, 65]. Na druhou stranu, složitost výpočtů a nejasnosti ohledně použití jsou nevýhodou. Například, zatímco CC α a CC β jsou často považovány za synonyma LOD a LOQ pro látky bez povoleného limitu (viz oddíl 5.3.1), u látek se stanoveným limitem nesouvisí s mezí detekce, ale s pravidly shody.

5.3.6 Spolehlivost odhadů LOD a LOQ

Je třeba poznamenat, že i při 10 opakováních podle Stručný návod 3 a Stručný návod 4, jsou

odhady směrodatné odchylky přirozeně proměnlivé. Odhady LOD/LOQ získané během validace se mají tedy brát jako orientační hodnoty. To bude postačovat v případě, kdy odhady LOD/LOQ vyžadují pro průkaz, že koncentrace vzorků budou výrazně vyšší nad LOD/LOQ. Pokud se očekává, že laboratorní vzorky budou obsahovat nízké koncentrace analytu, mají se LOD/LOQ sledovat pravidelně. Bez ohledu na přístup použitý k odhadu LOD/LOQ musí být LOD/LOQ potvrzena experimentálně (viz Stručný návod 4c).

Přestože jsou přístupy k odhadu LOD/LOQ definovány, dobře známy a přijaty, způsobují tyto termíny stále nejasnosti a často jsou nesprávně používány nebo interpretovány, zejména pokud se výsledek blíží nule [58]. V některých předpisech EU je LOQ definována jako nejnižší koncentrace analyzované látky s přijatelnou přesností nebo konzistentní odchylkou [35, 62], přičemž se uznává skutečnost, že relativní nejistota v blízkosti nuly je nepříjemně vysoká [66, 67]. V pokynech EU pro rezidua pesticidů je ‚mez pro uvádění‘ (reporting limit) definována jako nejnižší úroveň, při které se rezidua uvádějí jako absolutní hodnoty, a je rovná nebo vyšší než LOQ [35].

5.4 Pracovní rozsah

5.4.1 Definice

„Pracovní rozsah“* je intervalem, ve kterém daná metoda poskytuje výsledky s přijatelnou nejistotou. Pracovní rozsah je zdola ohraničený mezi stanovitelností LOQ. Horní ohraničení pracovního rozsahu tvoří koncentrace, při které se projevují významné anomálie analytické citlivosti. To může být způsobeno nasycením detektoru, problémy s interferencí při vysokých koncentracích nebo jinými jevy způsobujícími špatnou výtěžnost.

5.4.2 Pokyny pro validační/verifikační studii

Pracovní rozsah validované metody má být uveden v rozsahu dokumentovaného postupu (viz A. 5 v příloze A) V průběhu validace je nutné potvrdit, že danou metodu lze použít ke stanovení sledovaného analytu (analytů) v tomto očekávaném rozsahu úrovní analytu v reálných vzorcích s přijatelnou nejistotou. Pro posouzení pracovního rozsahu musí laboratoř zohlednit vztah mezi známými a naměřenými hodnotami pomocí úplného analytického postupu, včetně kalibrační funkce stanovené jako základ pro určení těchto naměřených hodnot (viz oddíl 5.2).

V závislosti na očekávaných úrovních analytů ve vzorcích přijatých laboratoří k analýze může být nutné tyto úrovně upravit tak, aby spadaly do rozsahu kalibrace. To se provádí buď zakoncentrováním (u nízkých úrovní analytu) nebo ředěním (u vysokých úrovní). Zda se ředění provede před nebo po přípravě vzorků pro konečné měření, bude záviset na povaze vzorků, ale v obou případech musí být tyto počáteční kroky analytického procesu zahrnuty do validačních experimentů.

Je důležité zvážit účinky jakéhokoli počátečního ředění, koncentrace a/nebo přípravy ve vztahu k matici vzorků. Toto musí být nedílnou součástí validační/verifikační studie.

5.4.3 Posouzení pracovního rozsahu

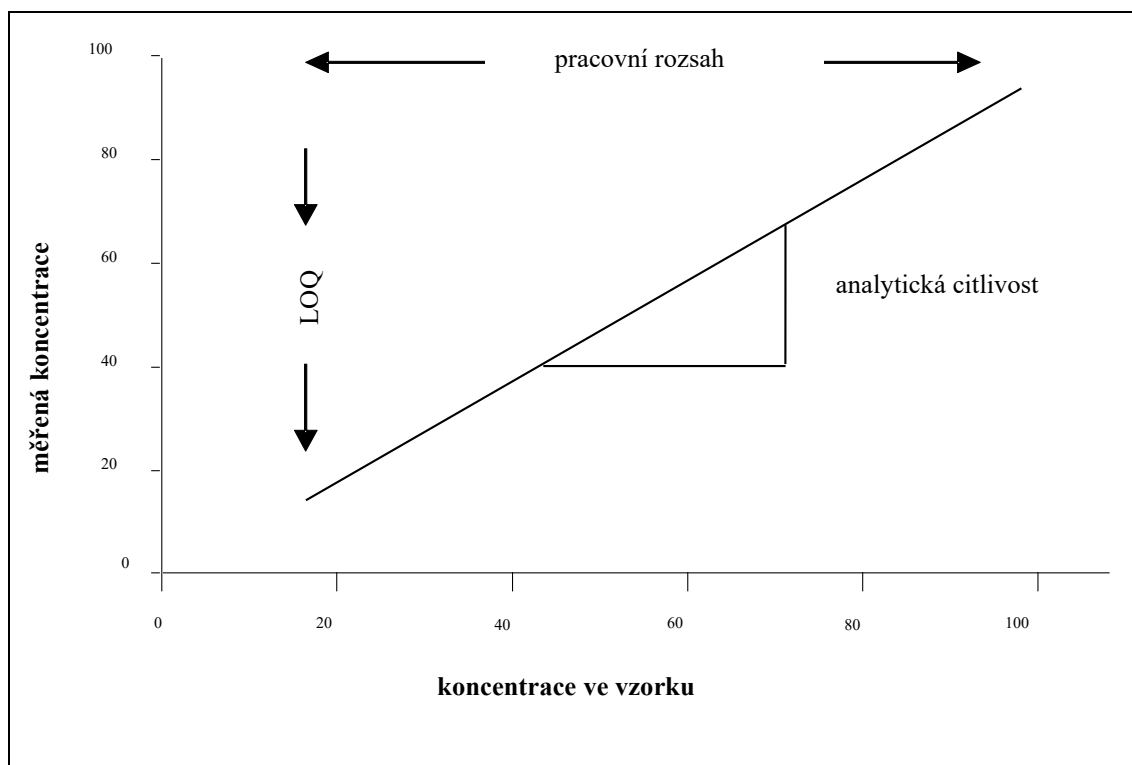
Pro posouzení pracovního rozsahu metody by měly: 1. být k dispozici vzorky se známými koncentracemi (nejlépe referenční materiály s podobnými maticemi jako zkušební vzorky nebo materiály s přídavkem, pokud nejsou k dispozici vhodné referenční materiály) a slepé vzorky; 2. použité vzorky se mají podrobit celému měřicímu postupu, včetně všech počátečních

zakoncentrování nebo ředění; 3. koncentrace jednotlivých vzorků mají pokud možno pokrývat celý předmětný rozsah a 4. přístroj by měl být kalibrován podle doporučeného kalibračního postupu. Výsledek měření každého zkušebního vzorku se vypočítává popsaným postupem. Tyto hodnoty se pak vynášejí na osu y vůči známým koncentracím pro vzorky (osa x) jako na obrázku Obrázek 5. Pracovní rozsah metody a linearita se stanoví na základě vizuálního zhodnocení grafu. Jakákoli významná odchylka od linearity nebo směrnice od 1 pro křivku by měla být vyšetřena. Například mohou existovat možné problémy s interferencí a aplikací metody na danou matici vzorku, což může znamenat, že kalibrační funkce není u této matrice vhodná pro daný účel. Tento problém lze řešit použitím standardů s odpovídající maticí (viz oddíl 5.2). V případech, kdy je křivka lineární až do určité úrovně koncentrace, po které se začne vychylovat, může být vhodné zúžení rozsahu.

Pracovní rozsah metody se musí stanovit pro každou matici uvedenou v rozsahu použití metody. Je to proto, že interference mohou být příčinou nelineární odezvy a schopnosti metody extrahovat/izolovat analyt se pro různé matrice vzorků mohou lišit.

Stanovení pracovního rozsahu se bude dále opírat o údaje studií preciznosti a pravdivosti (viz oddíly 5.6 a 5.7) za předpokladu, že tyto studie pokrývají koncentrace v celém pracovním rozsahu metody. Na základě těchto studií může být pracovní rozsah omezen, pokud se pravdivost nebo přesnost na dolním nebo horním konci rozsahu bude jevit jako nepřijatelná.

* Termín VIM [7] používá termín „měřicí interval“ nebo „pracovní interval“.



Obrázek 5 – Typický příklad křivky pro měřicí postup, kdy se naměřená koncentrace vynáší proti koncentraci vzorku. Znázorněny jsou výkonnostní charakteristiky ‚pracovní rozsah‘, ‚analytická citlivost‘ a ‚LOQ‘

Stručný návod 5 – Pracovní rozsah

Co dělat	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
Kalibrujte přístroj podle navrhovaného kalibračního postupu. Změřte v souladu s popsanou metodou slepé vzorky a referenční materiály nebo slepé vzorky s přísávkem, a to 2-3krát při 6-10 koncentracích náhodně rozvržených v celém předmětném rozsahu.	Vyneste naměřenou koncentraci (osa y) vůči koncentraci zkušebních vzorků (osa x). Vizuálně zkontrolujte a stanovte přibližný lineární rozsah a horní a dolní meze pracovního rozsahu. Vypočítejte příslušné regresní statistiky. Vypočítejte a vyneste rezidua (rozdíly mezi pozorovanou hodnotou y a vypočtenou hodnotou y odpovídající přímce pro každou z hodnot x). Náhodné rozdělení reziduí okolo nuly potvrzuje linearitu. Systematické trendy signalizují nelinearitu.	Tento krok je potřeba pro posouzení, zda jsou navrhovaný rozsah instrumentace a kalibračního postupu vhodné pro daný účel. Pokud jsou k dispozici údaje ze studií preciznosti a vychýlení (bias), které pokrývají předmětný rozsah, nemusí být nutná samostatná studie pracovního rozsahu metody.

5.5 Analytická citlivost

5.5.1 Definice

Analytická citlivost představuje změnu odezvy přístroje, která odpovídá změně měřené veličiny (např. koncentraci analytu) tj. směrnice křivky odezvy [7, 19]. Má být vyjádřena jako vztah mezi změnou signálu z přístroje a odpovídající změnou hodnoty měřené veličiny [7].

Aby byla zohledněna citlivost metody jako celku (tj. včetně všech přípravných kroků, a nikoli pouze konečného měření provedeného přístrojem), měly by vzorky měřené pro stanovení křivky odezvy představovat standardy s odpovídající maticí.

Označení ‚analytická‘ se doporučuje proto, aby se vyloučila záměna s ‚diagnostickou citlivostí‘ používanou v laboratorní medicíně [45]. Termín ‚citlivost‘ se někdy používá k označení meze detekce, ale toto použití VIM nedoporučuje.

5.5.2 Použití

Analytická citlivost nepatří mezi zvláště významné výkonnostní charakteristiky. Existují však některé její užitečné aplikace:

1. Pokud se analytická metoda provádí za účelem sledování malých změn koncentrace analytu.
2. Někdy je známa teoretická analytická citlivost. Mnoho iontově selektivních elektrod vykazuje chování podle Nernstovy rovnice, např. odezva dobře fungující skleněné elektrody se mění o 59 mV/pH.
3. U spektrofotometrických měřicích systémů se může absorbance předpovědět pomocí Beer-Lambertova zákona. To může posloužit pro kontrolu funkčnosti instrumentace a někdy

normy provádění takových kontrol vyžadují [68].

5.5.3 Posouzení analytické citlivosti

Pokud je účelem sledování malých změn koncentrace analytu, měla by být stanovena křivka odezvy metody na příslušné úrovni a mělo by být provedeno opakované měření vzorků se známou koncentrací těsně pod a nad touto úrovní.

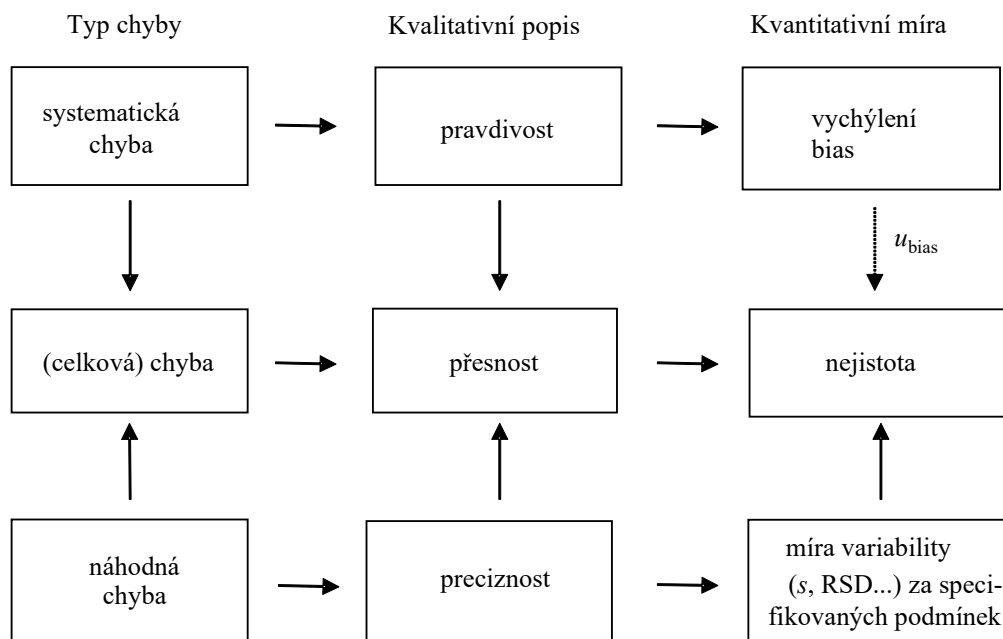
Na základě těchto výsledků lze stanovit lineární regresní křivku (a její směrnici) pro úzký interval. V závislosti na šířce tohoto ‚úzkého intervalu‘ to lze dokonce provést i pro nelineární vztah.

5.6 Pravdivost

5.6.1 Terminologie pro popis kvality měření

V tomto pokynu používáme pro popis kvality výsledků získaných danou metodou tři příbuzné výkonnostní charakteristiky *pravdivost*, *preciznost* a *nejistota*. Vědečtí pracovníci však často používají odlišné koncepty, jako jsou druhy chyb (náhodné, systematické a hrubé chyby), přesnost (pravdivost a preciznost) a nejistota. Některé z těchto konceptů mají kvalitativní význam, jiné jsou kvantitativní. V průběhu let se termíny stejně jako jejich definice změnilly a zavedly se nové termíny. Kromě toho se v různých oborech dává přednost odlišným termínům, to vše způsobuje řadu nejasností. Obrázek 6 znázorňuje souvislosti mezi některými základními termíny a o dalších podrobnostech

pojďnává VIM [7] a pokyn Eurachem o terminologii [8].



Obrázek 6 – Znázornění souvislostí mezi některými základními pojmy používanými pro popis kvality výsledků měření (podle práce Menditta et al. [69]). Hodnocení nejistoty podle GUM [20] předpokládá korekci známého prakticky významného vychýlení a zahrnutí nejistoty korekce vychýlení (bias) u_{bias} do konečného vyjádření nejistoty. To je naznačeno čárkovanou šipkou pod políčkem ‚vychýlení‘ (bias). Jak pojetí přesnosti, tak i nejistoty předpokládají, že měření jsou prováděna podle zdokumentovaného postupu a že nejsou zahrnuty vlivy ‚hrubých chyb‘ (omylů).

„Přesnost“ měření vyjadřuje těsnost jednotlivého výsledku k referenční hodnotě *[29, 55]. (Exaktní definici uvádí VIM 2.13). Validace metod se snaží zkoumat přesnost výsledků pomocí hodnocení jak systematických, tak náhodných vlivů na jednotlivé výsledky. Přesnost se tedy normálně studuje pomocí dvou komponent: „pravdivosti“ a „preciznosti“. Kromě toho je stále častěji vyjádřením přesnosti „nejistota měření“, která představuje jediný údaj. Vyhodnocení pravdivosti je popsáno níže, zatímco preciznosti je věnován oddíl 5.7 a nejistotě oddíl 5.8.

„Pravdivost“ měření vyjadřuje těsnost průměru nekonečného počtu výsledků (získaných danou metodou) k referenční hodnotě. Protože není možné získat nekonečný počet měření, pravdivost nelze měřit. Praktické posouzení pravdivosti lze však provést stanovením vychýlení (bias) měření.

5.6.2 Stanovení vychýlení (bias)

5.6.2.1 Přehled

Prakticky se stanovení vychýlení (bias) opírá o porovnání průměrné hodnoty výsledků (\bar{x}) kandidátské metody s vhodnou referenční hodnotou (x_{ref}).^{*} K dispozici jsou tři obecné přístupy: a) analýza referenčních materiálů, b) zkoumání výtěžnosti za použití vzorků s přídavkem a c) porovnání s výsledky získanými jinou metodou – viz Stručný návod 6. Studie vychýlení mají pokrývat celý rozsah použití metody a vyžadují tedy analýzu různých typů vzorků a/nebo vzorků s různou úrovní analytu. Aby toho bylo dosaženo, může být třeba kombinovat tyto různé přístupy.

Vychýlení se může vyjadřovat v absolutním měřítku

$$b = \bar{x} - x_{\text{ref}} \quad (\text{Rov. 1})$$

nebo v relativně v procentech

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{Rov. 2})$$

nebo jako relativní výtěžnost přídavku (spiku)

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{spike}}} \times 100 \quad (\text{Rov. 3})$$

kde \bar{x}' je průměrná hodnota vzorku s přídavkem a x_{spike} je přidaná koncentrace.

V některých oblastech analytických měření se však také používá relativní výtěžnost v procentech („zjevná výtěžnost“) [70].

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (\text{Rov. 4})$$

5.6.2.2 Analýza referenčních materiálů

Pro stanovení vychýlení pomocí RM se stanoví průměrná hodnota a směrodatná odchylka série opakovaných měření a výsledky se porovnají s přidělenou hodnotou vlastnosti RM. Ideální RM představuje certifikovaný matricový referenční materiál s hodnotami vlastností blízkými hodnotám zkoušených vzorků. Certifikované referenční materiály jsou obecně uznávány jako materiály poskytující návazné hodnoty. [71, 72]. Je také důležité připomenout, že daný RM se má používat během validační studie pouze pro jeden účel. Například RM použitý pro kalibraci se nesmí použít též k vyhodnocení vychýlení.

Ve srovnání se širokým spektrem typů vzorků a analytů, se kterými se laboratoře setkávají, je dostupnost RM omezená, ale je důležité, aby vybraný materiál byl *vhodný pro dané použití*. Může se ukázat potřebné zvážit, jak byl daný RM charakterizován, např. zda nebyla příprava vzorku v rámci charakterizace materiálu určena na poskytnutí celkové koncentrace analytu, ale na množství, které se extrahuje za určitých podmínek. Při činnostech v regulované oblasti se má používat odpovídající certifikovaný referenční materiál, v ideálním případě s odpovídající maticí, pokud je dostupný. Pro dlouhodobé sledování vychýlení v rámci vnitřních postupů řízení kvality laboratoře lze použít jakýkoli relevantní dostatečně stabilní materiál, ale pro počáteční posouzení se má použít CRM.

5.6.2.3 Experimenty s výtěžností pomocí vzorků s přídavkem

Pokud nejsou vhodné referenční materiály k dispozici, může se použít studie výtěžnosti (experimenty s přídavkem), poskytující údaje o pravděpodobné úrovni vychýlení (bias). Neschopnost určit část nebo veškerý přítomný analyt může odrážet podstatný problém s metodou. Je tedy nutné hodnotit schopnost metody detekovat všechny formy analytu, které jsou přítomny [70, 73].

Analyty se mohou vyskytovat ve vzorku v různých formách a někdy jsou předmětem zájmu analytika jen určité jejich formy. Daná metoda může být tak záměrně navržena, aby stanovovala jen určitou formu analytu (speciální analýza).

^{*} Referenční hodnota je někdy označována jako „pravá hodnota, skutečná hodnota“ nebo „konvenční pravá hodnota, konvenční skutečná hodnota“.

Jelikož obvykle není známo, kolik je přítomno analytu ve zkušebním podílu, nelze si být jistý, jak úspěšná byla izolace z dané matrice vzorku. Jedním ze způsobů, jak stanovit účinnost izolace, je přidat ke zkoušeným podílům analyt v různých koncentracích, pak izolovat tyto analyty ze zkoušených podílů s přídatkem a změřit koncentraci analytu. Podstatným problémem spojeným s tímto způsobem je to, že analyt dodávaný tímto způsobem nebude pravděpodobně vázán tak silně jako ta část, která je přítomna přirozeně v matrici zkušebního podílu, a tak tento způsob bude poskytovat nerealisticky vysokou představu o účinnosti izolace.

5.6.2.4 Porovnání s výsledky získanými jinou metodou

Je možné vyhodnotit vychýlení porovnáním výsledků kandidátské metody s výsledky získanými alternativní metodou. Existují dva obecné typy alternativních metod, se kterými se lze setkat – referenční metoda nebo metoda, která se v současné době běžně používá v laboratoři. Účelem referenční metody je poskytovat „přijatou referenční hodnotu“ měřené vlastnosti a obecně poskytne výsledky s menší nejistotou než kandidátská metoda. Zvláštním druhem referenčních metod jsou primární metody.* Druhý případ nastává, když je účelem validace prokázat, že kandidátská metoda poskytuje výsledky, které jsou ekvivalentní výsledkům existující metody. Zde je cílem stanovit, že neexistuje významné vychýlení vůči výsledkům získaným existující metodou (i když tato metoda může sama o sobě vykazovat vychýlení).

V obou případech se výsledky kandidátské a alternativní metody porovnávají pro stejný vzorek nebo stejné vzorky. Jako vzorek (vzorky) mohou sloužit vlastní (in-house) referenční materiály nebo typické zkušební vzorky. Výhodou tohoto přístupu je to, že materiály nemusí být certifikovanými referenčními

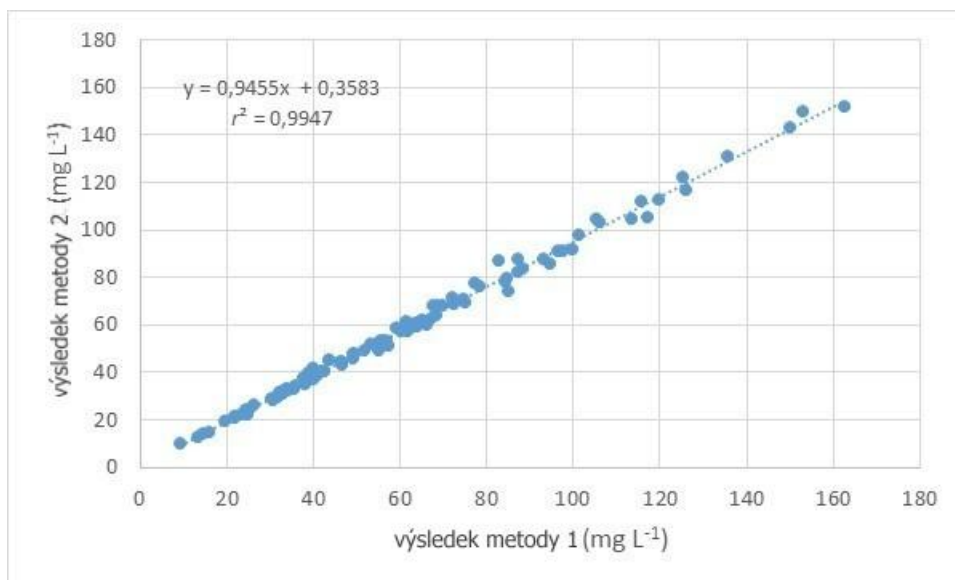
materiály, protože alternativní metoda poskytuje referenční hodnotu. Daná metoda může tedy být testována na „reálných“ vzorcích, které představují ty, se kterými se bude laboratoř rutinně setkávat.

Pokud je třeba porovnat dvě metody v širokém rozsahu koncentrací, je běžné použít jednoduchou neváženou regresní přímku [63]. Při použití stejných vzorků se jedna osa regresního grafu použije pro výsledky získané novou metodou a druhá osa pro výsledky získané například referenční metodou. Každý bod grafu tak představuje jeden vzorek analyzovaný oběma metodami. Pokud jsou u obou metod získány stejné výsledky, bude vykazovat regresní přímka úsek na ose y 0, směrnici 1 a korelační koeficient 1. Odchyłka od tohoto „ideálního“ stavu může nastat v řadě situací v závislosti na náhodných a systematických chybách [63]. Při vyhodnocení by analytik měl graf zkontrolovat a otestovat, zda se úsek a směrnice významně liší od 0 a 1 (obrázek 7). Významnost lze určit pomocí konfidenčních intervalů (95 % nebo 99 %) pro regresní přímku, které musí zahrnovat 0 pro úsek a 1 pro směrnici. [5].

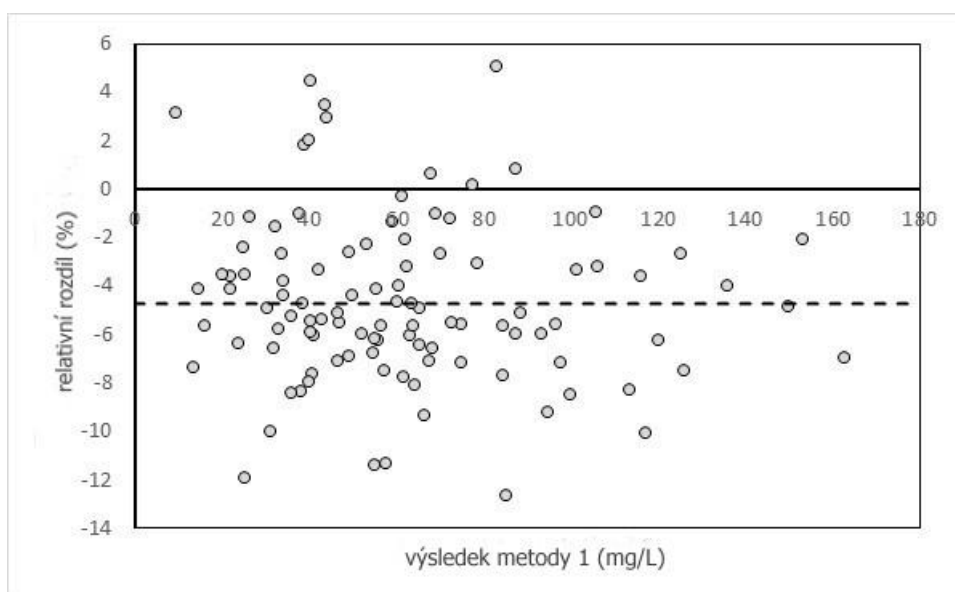
Graf vytvořený pomocí výše popsaného přístupu poskytuje cenné informace o povaze případných rozdílů mezi oběma metodami. „Diferenční graf“, viz obrázek 8, podrobněji popisuje případné odchylky [74]. Při vyvozování závěrů z vypočtené regresní přímky je však třeba postupovat s opatrností. Normální nevážená lineární regrese předpokládá, např. že neexistují žádné chyby pro data na ose x a že chyby ve směru y jsou konstantní v celém rozsahu koncentrací. Tak tomu je ale zřídka. Pokud je však pro přesnější metodu použita osa y a je k dispozici alespoň deset datových bodů rovnoměrně rozložených v předmětném rozsahu, poskytuje přístup přijatelné výsledky [75].

* „Primární metoda“: metoda nejvyšší metrologické kvality, jejíž fungování je zcela popsáno a pochopeno v jednotkách SI a jejíž výsledky jsou přijímány bez

odkazu ke standardu stejné veličiny (CCQM). Odpovídající termín VIM (viz 2.8 v [7]) je „primární referenční postup měření“.



Obrázek 7 – Srovnání dvou analytických metod. Přestože je korelace dobrá, statistická analýza odhaluje, že směrnice se významně liší od 1 na 95% konfidenční úrovni, což svědčí o tom, že metody poskytují rozdílné výsledky.



Obrázek 8 – Tento graf znázorňuje výsledky metody 1 oproti relativnímu rozdílu, tj. procentuálnímu rozdílu mezi výsledky získanými metodou 1 a metodou 2. Tento rozdílový graf odhaluje odchylky mezi oběma metodami až přibližně 13 % (průměrný rozdíl -4,7 %).

Stručný přehled 6 – Pravdivost

Co dělat	Kolikrát	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
a) Změřte RM kandidátskou metodou	10	<p>Porovnejte průměrnou hodnotu, \bar{x} s referenční hodnotou x_{ref} RM. Vypočítejte vychýlení (bias), b, relativní vychýlení v procentech b (%) nebo relativní výtěžnost v procentech (zjevnou výtěžnost).</p> $b = \bar{x} - x_{\text{ref}}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{\text{ref}}}{x_{\text{ref}}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{\text{ref}}} \times 100$	Poskytuje míru vychýlení, která zahrnuje jak příspěvek metody, tak příspěvek laboratoře k vychýlení.
b) Změřte slepé vzorky matrice nebo zkušební vzorky s přídavkem předmětného analytu a bez něj v celém rozsahu koncentrací.	10	<p>Porovnejte rozdíl mezi průměrnou hodnotou přídavku \bar{x}' a průměrnou hodnotou \bar{x} vůči přidané koncentraci x_{spike}. Vypočítejte relativní výtěžnost přídavku R' (%) při různých koncentracích:</p> $R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{\text{spike}}} \times 100$	<p>Vzorky s přídavkem se mají porovnávat se stejnými vzorky bez přídavku, aby se vyhodnotila čistá výtěžnost dodaného přídavku.</p> <p>Výtěžnosti u vzorků s přídavkem nebo matricových slepých vzorků s přídavkem budou obvykle lepší než u rutinních vzorků, ve kterých je analyt vázán pevněji.</p>
c) Změřte RM/zkušební vzorek kandidátskou metodou a alternativní metodou.	10	<p>Porovnejte průměrnou hodnotu \bar{x} s průměrnou hodnotou \bar{x}_{ref} měření získanou alternativní metodou. Vypočítejte vychýlení (bias), b, nebo relativní vychýlení v procentech, b (%) či relativní výtěžnost v procentech (zjevnou výtěžnost).</p> $b = \bar{x} - \bar{x}_{\text{ref}}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - \bar{x}_{\text{ref}}}{\bar{x}_{\text{ref}}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{\bar{x}_{\text{ref}}} \times 100$	<p>Poskytuje míru vychýlení ve vztahu k dané alternativní metodě. Alternativní metodou může být referenční metoda, nebo pokud je záměrem náhrada jedné metody druhou a existuje potřeba prokázat ekvivalentní výkonnost, metoda současně používaná v laboratoři.</p> <p>Alternativní metoda může sama o sobě vykazovat vychýlení, v takovém případě test neposkytne absolutní míru pravdivosti.</p>
<p>POZNÁMKA Vychýlení se může měnit s maticí a koncentrační úrovní, což znamená, že počet matic a koncentračních úrovní, které budou předmětem zkoumání, se musí deklarovat ve validačním plánu.</p>			

5.6.3 Interpretace měření vychýlení

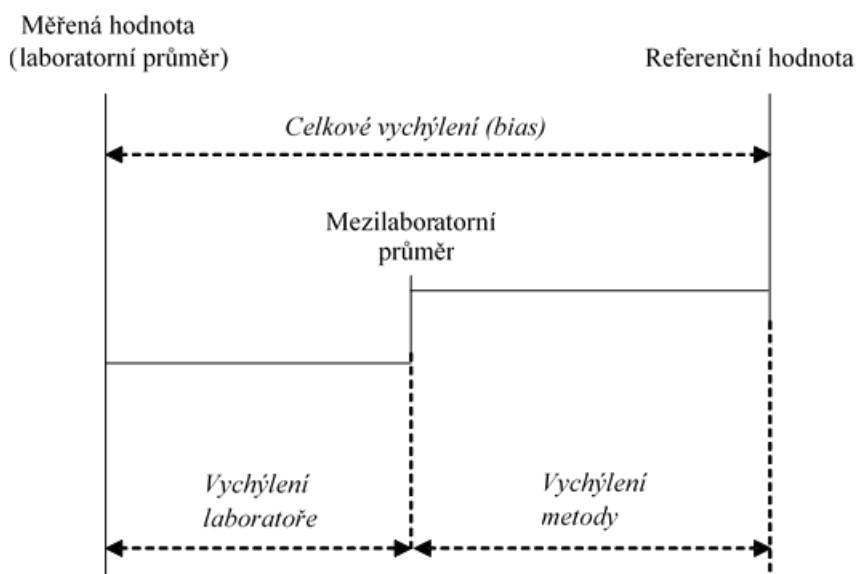
Obrázek 9 znázorňuje dvě složky vychýlení (bias), zde uváděné jako ‚vychýlení metody‘ a ‚vychýlení laboratoře‘.

Vychýlení metody vzniká ze systematických chyb, které přísluší k metodě, nezávisle na tom, která laboratoř ji používá. Vychýlení laboratoře vzniká z dalších systematických chyb, které jsou specifické pro danou laboratoř a její provádění dané metody. Laboratoř může samostatně odhadnout pouze sloučené (celkové) vychýlení z obou zdrojů. Při kontrole vychýlení je však důležité si být vědom konvencí, které pro tento účel platí. Například pro některé aplikace v oblasti potravin jsou regulační limity nastaveny ve vztahu k měřené veličině, která je definována pomocí konkrétního standardního měřicího postupu (označovaného také jako ‚empirické metody‘). Pro měřicí postupy používané ke stanovení takových ‚veličin definovaných postupem‘ je vychýlení metody podle své definice nulové. Vychýlení způsobené pouze danou metodou (viz obr. 9) je tak ignorováno a hlavním zájmem je metrologická srovnatelnost s dalšími laboratořemi využívajícími stejnou metodu. V takové situaci by laboratoř v ideálním případě měla stanovit vychýlení použitím referenčního materiálu certifikovaného pomocí stejného standardního měřicího postupu, která je předmětem zkoumání. V takovém případě se použijí obvyklé směrnice pro kontrolu a interpretaci vychýlení. Pokud takový materiál není k dispozici nebo je třeba doplnit další informace, může laboratoř použít alternativní materiály, při interpretaci výsledků však má

zohlednit všechny známé rozdíly mezi zkoumanou metodou a metodou (metodami) použitou k získání referenční hodnoty.

Při plnění analytického požadavku může být stejný analyt měřen několika různými měřicími přístroji na několika místech v rámci dané organizace. V takovém případě se v rámci dané organizace projevují četné a komplexní zdroje vychýlení. Pro takovou situaci může organizace stanovit postupy odhadu reprezentativní nejistoty zahrnující všechna místa/přístroje použité pro danou aplikaci. Měl by se přednostně použít materiál, který má stejné vlastnosti, včetně matrice vzorku, jako vzorky, které mají být měřeny. Pro určení hlavních příčin variability přispívajících k celkové nejistotě měření se může použít analýza rozptylu, což umožní přijmout následná opatření ke snížení rozdílů v rámci organizace.

Pro většinu účelů se však o přijatelnosti vychýlení má rozhodovat na základě celkového vychýlení změřeného pomocí vhodných referenčních materiálů, vzorků s přídavkem nebo referenčních metod, se zřetelem na preciznost metody a veškeré nejistoty v referenčních hodnotách, a na přesnost vyžadovanou při koncovém použití. Doporučuje se statistické testování významnosti [74, 75].



Obrázek 9 – Celkové vychýlení se skládá z vychýlení metody a vychýlení laboratoře. Poznámka: Laboratorní vychýlení a vychýlení metody jsou na obrázku znázorněny tak, že působí stejným směrem. V reálné praxi tomu tak vždy není.

5.7 Preciznost

5.7.1 Opakování

Opakování je nezbytné pro získání spolehlivých odhadů výkonnostních charakteristik metody, jako jsou preciznost (měření) a vychýlení (měření). Je třeba navrhnout experimenty zahrnující opakované analýzy tak, aby pokrývaly všechny změny pracovních podmínek, jež lze během rutinního používání metody očekávat. Cílem má být stanovit typickou variabilitu, a nikoliv minimální variabilitu.

5.7.2 Podmínky preciznosti

Preciznost je měřítkem toho, jak blízko jsou výsledky z opakovaných měření jeden od druhého [7, 29]. Obvykle se vyjadřuje statistickými parametry, které popisují rozptýlení výsledků, typicky směrodatnou odchylkou (nebo relativní směrodatnou odchylkou), vypočtenou z výsledků získaných provedením opakovaných měření na vhodném materiálu za specifikovaných podmínek. Rozhodnutí o ‚specifikovaných podmínkách‘ je důležitým aspektem vyhodnocení preciznosti měření – podmínky určují typ získaného odhadu preciznosti.

‚Opakovatelnost měření‘ a ‚reprodukovatelnost měření‘ představují dvě krajní míry preciznosti, které můžeme získat. Dokumentace standardizovaných metod (např. od ISO) obvykle obsahují, kde je to na místě, údaje o opakovatelnosti a reprodukovatelnosti.

Opakovatelnost, u které očekáváme nejmenší kolísání mezi výsledky, je mírou variability výsledků, když měření provádí jediný analytik s použitím stejného vybavení v krátkém časovém úseku.*

Reprodukovatelnost, u níž se očekává největší kolísání mezi výsledky, je mírou variability výsledků mezi laboratořemi.†

Mezi těmito dvěma extrémy poskytuje ‚mezilehlá preciznost‘ odhad kolísání ve výsledcích, když se měření provádějí v jedné laboratoři, ale za podmínek, které jsou variabilnější než podmínky opakovatelnosti. Použité přesné podmínky mají být uvedeny v každém jednotlivém případě. Cílem je získat odhad preciznosti odrážející všechny zdroje kolísání, které se vyskytnou

v jedné laboratoři během rutinních podmínek (různí analytici, delší časový úsek, různé položky vybavení atd.).‡

5.7.3 Odhady preciznosti – obecné aspekty

Obecně preciznost závisí na koncentraci analytu, a proto by měla být stanovena při řadě koncentrací v celém předmětném rozsahu. To může zahrnovat určitou koncentraci, která je předmětem zájmu (např. regulační limit), a koncentrace na krajích intervalu měření. V případě potřeby by měl být stanoven vztah mezi precizností a koncentrací analytu. Pokud je naměřená koncentrace výrazně nad mezí detekce, je preciznost často úměrná koncentraci analytu. V takových případech může být vhodnější vyjádřit preciznost jako relativní směrodatnou, protože ta je v předmětném rozsahu přibližně konstantní.

Vyhodnocení preciznosti vyžaduje dostatečný počet opakovaných měření provedených na vhodných materiálech. Materiály mají reprezentovat zkušební vzorky z hlediska matrice a koncentrace analytu, homogenity a stability, ale nemusí se jednat o certifikované referenční materiály. Opakované měření by mělo být také nezávislé, tj. celý proces měření by měl být opakován, včetně všech kroků přípravy vzorku. Minimální počet opakování se liší v závislosti na různých protokolech, ale obvykle se pohybuje mezi 6 a 15 pro každý materiál použitý ve studii.

Je třeba mít na paměti, že je obtížné spolehlivě odhadnout směrodatnou odchylku z datových souborů s málo opakováními. Je-li to přípustné, lze hodnoty vypočítané z několika malých souborů opakovaných měření kombinovat (sloučit) za účelem získání odhadů s dostatečným počtem stupňů volnosti.

Určité plány pokusů analyzované pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) jsou efektivní cestou k získání odhadů opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti s vhodným počtem stupňů volnosti (další vysvětlení tohoto přístupu je uvedeno v příloze C). Informace o experimentech pro posouzení preciznosti naleznete ve Stručném návodu 7.

* Opakovatelnost je někdy označována jako preciznost ‚v rámci pokusu‘, ‚v rámci série‘ nebo ‚v rámci vzorku‘.

† Při validaci se reprodukovatelnost vztahuje na kolísání mezi laboratořemi používajícími stejnou metodu. Reprodukovatelnost může také poukazovat na kolísání pozorované mezi laboratořemi, které používají

různé metody, ale se záměrem měřit stejnou veličinu [7].

‡ Mezilehlá preciznost se někdy označuje jako ‚vnitrolaboratorní reprodukovatelnost‘, ‚kolísání mezi pokusy‘, ‚kolísání v rámci série‘ nebo ‚kolísání v rámci vzorku‘.

5.7.4 Meze preciznosti

Je užitečné vypočítat ze směrodatné odchylky s „meze preciznosti“ [29, 55]. To umožňuje analytikovi rozhodnout, zda existuje významný rozdíl, při stanovení konfidenční úrovně, mezi výsledky duplikátních analýz vzorku získaných za specifikovaných podmínek. Mez opakovatelnosti (r) se vypočte takto:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r, \quad (\text{Rov. 5})$$

kde faktor $\sqrt{2}$ odráží rozdíl mezi dvěma měřeními, t je hodnota oboustranného Studentova t pro příslušný počet stupňů volnosti (vztahující se k odhadu s_r) a na požadované konfidenční úrovni. Pro relativně velký počet stupňů volnosti je $t \approx 2$ na konfidenční úrovni 95 %, proto se mez opakovatelnosti často aproximuje jako:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (\text{Rov. 6})$$

Mez mezilehlé preciznosti a mez reprodukovatelnosti R vypočítáme obdobně, jen nahradíme s_r za s_I a s_R .

Dokumentace standardizovaných metod (např. z ISO) obvykle obsahuje údaje o mezích opakovatelnosti i reprodukovatelnosti, pokud jsou relevantní.

Je-li uvedena mez preciznosti, lze snadno vypočítat odpovídající směrodatnou odchylku (např. s_r v případě meze opakovatelnosti)

přeskupením rovnice 6. To může být užitečné pro účely verifikace.

5.7.5 Současné stanovení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti

Přístupy k současnému stanovení opakovatelnosti a mezilehlé preciznosti jsou popsány v ISO 5725-3 [29]. Kromě toho nabízí model založený na Harmonizovaných pokynech pro validaci metod analýzy v jedné laboratoři [12] možnost stanovit opakovatelnost a mezilehlou preciznost v rámci jedné studie. Podvzorky vybraného zkušebního materiálu se opakovaně analyzují za podmínek opakovatelnosti v několika různých sériích, přičemž podmínky mezi sériemi se mohou maximálně lišit (různé dny, různí analytici, různé vybavení atd.). Pomocí jednofaktorové ANOVA [5, 6] lze opakovatelnost vypočítat jako preciznost v rámci skupiny, zatímco mezilehlá preciznost se získá jako druhá odmocnina součtu čtverců preciznosti v rámci skupiny a mezi skupinami. Tento typ zpracování může poskytnout účinný způsob, jak získat dostatečné stupně volnosti pro odhady opakovatelnosti a meziskupinové preciznosti. Například 8 skupin po 2 opakováních vede k 8 a 7 stupňům volnosti pro odhady opakovatelnosti a preciznosti mezi jednotlivými sériemi. Další viz příloha C.

Stručný návod 7 – Opakovatelnost, mezilehlá preciznost a reprodukovatelnost

Co dělat	Kolikrát	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
Změřte referenční materiály, přebytečné zkušební vzorky nebo slepé vzorky s přídavkem v různých koncentracích v rámci pracovního rozsahu. Opakovatelnost a mezilehlou preciznost lze určit z oddělených studií (viz a) a b) níže) nebo současně v jedné studii (viz c) níže).			
a) Stejný analytik a zařízení, stejná laboratoř, krátký časový úsek.	6-15 opakování pro každý materiál.	Určete směrodatnou odchylku (s) z výsledků pro každý materiál.	Odhady směrodatné odchylky opakovatelnosti s_r pro každý materiál. ^a
b) Různí analytici a zařízení, stejná laboratoř, delší časový úsek.	6-15 opakování pro každý materiál.	Určete směrodatnou odchylku (s) z výsledků pro každý materiál.	Odhady směrodatné odchylky mezilehlé preciznosti s_l pro každý materiál.
c) Různí analytici a zařízení, stejná laboratoř, delší časový úsek.	6-15 skupin duplikátních měření ^b získaných za podmínek opakovatelnosti v různých dnech/zařízení pro každý materiál.	Vypočtete směrodatnou odchylku opakovatelnosti z výsledků ANOVA pro každý materiál. Vypočtete meziskupinovou směrodatnou odchylku z ANOVA a zkombinujte ji se směrodatnou odchylkou opakovatelnosti pro každý materiál.	Odhady směrodatné odchylky opakovatelnosti s_r pro každý materiál. Odhady směrodatné odchylky mezilehlé preciznosti s_l pro každý materiál.
d) Různí analytici a zařízení, různé laboratoře, delší časový úsek.	6-15 skupin duplikátních měření ^b získaných za podmínek opakovatelnosti v různých laboratořích pro každý materiál.	Vypočtete směrodatnou odchylku opakovatelnosti z výsledků ANOVA pro každý materiál. Vypočtete mezilaboratorní směrodatnou odchylku z ANOVA a zkombinujte ji se směrodatnou odchylkou opakovatelnosti pro každý materiál.	Odhady směrodatné odchylky opakovatelnosti s_r pro každý materiál. Odhady směrodatné odchylky reprodukovatelnosti s_r pro každý materiál. Toto vyžaduje zvláštní mezilaboratorní porovnání („mezilaboratorní studie“).

^a Směrodatnou odchylku opakovatelnosti lze také odhadnout sloučením několika malých datových souborů, např. $n = 2$, z různých dnů.

^b Duplikátní měření uvnitř každé skupiny poskytně vyvážený počet stupňů volnosti pro odhady směrodatných odchylek v rámci skupiny a mezi skupinami. Rostoucí počet opakování v každé skupině zvýší počet stupňů volnosti spojených s odhadem opakovatelnosti.

5.8 Nejistota měření

Úplné pojednání o nejistotě (měření) přesahuje rámec této příručky, ale podrobné informace lze nalézt jinde [20, 21]. Nejistota je parametr spojený s výsledkem měření, který charakterizuje rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně přiřazeny měřené veličině. Odhad nejistoty by měl zohlednit *všechny známé vlivy* působící na výsledek. Nejistoty spojené s každým vlivem se kombinují podle zavedených postupů.

Několik přístupů k získání odhadu nejistoty pro výsledky z chemických měření popisují [21, 76, 77, 78]. Ty zohledňují:

- celkovou, dlouhodobou preciznost metody (tj. mezilehlou preciznost nebo reprodukovatelnost);
- vychýlení (bias) a jeho nejistotu, včetně statistické nejistoty týkající se měření vychýlení a nejistoty referenční hodnoty [79, 80, 81, 82, 83];
- kalibraci zařízení. Nejistoty spojené s kalibrací zařízení, jako jsou váhy, teploměry, pipety a odměrné baňky, jsou často zanedbatelně malé ve srovnání s celkovou precizností a nejistotou vychýlení. Je-li možné to ověřit, pak nejistoty kalibrace se nemusí zahrnout do odhadu nejistoty;
- jakékoli významné vlivy působící navíc k výše uvedeným. Například rozpětí teplot nebo časů povolené danou metodou nemusí být ve validačních studiích plně uplatněny a může být nutné přidat jejich účinek. Tyto vlivy lze užitečně kvantifikovat studii robustnosti (viz oddíl 5.9) nebo souvisejícími studii, které stanoví velikost daného vlivu na výsledek.

Tyto zdroje nejistoty patří k analytické metodě. Proces měření však zahrnuje i vzorkování. Vliv odběru vzorků na výsledky měření by proto měl být také zahrnut do celkového odhadu nejistoty. Pokyny, jak zahrnout tento zdroj nejistoty, jsou uvedeny v příručce Eurachem “Measurement Uncertainty Arising from Sampling” [16].

Pokud je významný příspěvek jednotlivých vlivů, například v kalibračních laboratořích, bude nutné zohlednit jednotlivé příspěvky všech jednotlivých vlivů samostatně.

Je třeba poznamenat, že s výhradou dodatečného posouzení vlivů mimo rozsah mezilaboratorní studie tvoří směrodatná odchylka

reprodukovatelnosti pracovní odhad kombinované standardní nejistoty za předpokladu, že vychýlení laboratoře měřené na relevantních materiálech je malé ve vztahu ke směrodatné odchylce reprodukovatelnosti, vnitrolaboratorní opakovatelnost je srovnatelná s opakovatelností standardní metody a mezilehlá preciznost laboratoře není větší než publikovaná směrodatná odchylka reprodukovatelnosti [77]. Tento přístup také předpokládá, že všechny laboratoře účastníci se mezilaboratorní studie jsou kompetentní, mají podobnou výkonnost a používají stejnou metodu (viz požadavky normy ISO 5725-2 [29]).

5.9 Robustnost

5.9.1 Definice

„Robustnost“ („ruggedness“ – viz oddíl 1.2.1, kde je diskutována terminologie a upozorněno, že robustnost, jak je definována níže, může být v některých publikacích označována jako robustness) zkušební metody je „schopnost měřicího postupu udržet přijatelnou výkonnost při menších změnách pracovních podmínek“ [19, 84].

5.9.2 Test robustnosti

U každé metody existují určité etapy, které, pokud nejsou prováděny dostatečně pečlivě, mají významný vliv na výkonnost metody a mohou dokonce vést k tomu, že metoda nebude fungovat vůbec. Tyto etapy je třeba identifikovat, obvykle při vývoji metody, a pokud je to možné, vyhodnotit jejich vliv na výkonnost metody pomocí „testu robustnosti“. Vliv vybraných faktorů lze vyhodnotit pomocí plánu pokusů, který umožňuje současně studovat řadu faktorů v předem stanoveném počtu pokusů. Často se používají dvouúrovňové screeningové návrhy, jako jsou neúplné faktorové nebo Plackett-Burmanovo plánování pokusů.

Výsledky lze znázornit různými způsoby, pomocí souhrnných tabulek, sloupcových grafů, regulačních diagramů, grafů vlivů a pravděpodobností atd. [85, 86]. AOAC tento pojem definovala a popisuje zavedenou techniku, jak provést takový test pomocí plánu pokusů podle Plackett-Burmana [87].

„Test robustnosti“ zahrnuje provedení úmyslných změn do metody a zkoumání následného vlivu na výkonnost.* Následně je pak možné určit v metodě proměnné, které mají nejvýznamnější vliv, a tak

* Obvykle se studuje vliv na měřenou veličinu, ale alternativou je zkoumat vliv na experimentální parametr, např. rozlišení píků v chromatogramu.

zajistit, aby při používání metody byly pečlivě kontrolovány. Pokud je třeba metodu dále vylepšit, nejspíše se toho dosáhne soustředěním se na ty části metody, o nichž je známo, že jsou kritické.

Robustnost postupu se musí stanovit u metod vyvinutých ve vlastní laboratoři, u metod převzatých z vědecké literatury a u metod publikovaných normalizačními orgány používanými mimo rozsah, pro který je standardní metoda specifikována. Pokud se v rámci metody používají metody zveřejněné normalizačními orgány, byla robustnost obvykle zkoumána jako součást procesu vzniku normy. Z tohoto důvodu není studie robustnosti na úrovni jedné laboratoře ve většině případů nezbytná. Informace o robustnosti by měly být uvedeny v laboratorním

postupu ve formě deklarovaných tolerančních limitů pro kritické experimentální parametry (viz příklad 5 a Stručný návod 8). Testování robustnosti pomocí experimentálního návrhu umožňuje identifikovat podmínky, které jsou kritické pro výkonnost metody, a specifikovat kritéria vhodnosti systému. Rozsah hodnot přijatelných charakteristik výkonnosti lze definovat, zatímco kritické podmínky lze zaznamenat jako součást strategie kontroly rizik, aby byla zajištěna platnost analytického postupu při každém použití [13, 88].

Příklad 5 – Výťah z ISO 11732 [68]. Pokyny poukazují na kritičnost některých experimentálních parametrů.

- NH_4Cl sušen do konstantní hmotnosti při 105 ± 2 °C.
- Daná množství lze snížit (např. o jednu desetinu).
- Při skladování v plastové láhvi (polyethylenu) při pokojové teplotě je roztok stabilní asi 1 měsíc.
- Absorbance roztoku by měla být 0,3 – 0,5.
- Odplyňte a vyčistěte roztok..., naplňte jej do reagenčního zásobníku činidla a nechte stát alespoň 2 hodiny.
- Tento roztok lze uchovávat v chladničce po dobu nejvýše jednoho týdne.
- Pro odběr vzorků jsou vhodné nádoby ze skla, polyalkenů nebo polytetrafluorethylenu (PTFE).
- Ve výjimečných případech lze vzorek skladovat až dva týdny, pokud byl po okselení přefiltrován membránovým filtrem.

Stručný návod 8 – Robustnost

Co dělat	Kolikrát	Co z dat počítat/stanovit	Poznámky
<p>Identifikujte proměnné, které by mohly mít významný vliv na výkonnost metody.</p> <p>Připravte experimenty (analýzy referenčních materiálů nebo zkušebních vzorků) pro sledování vlivu systematické změny proměnných na výsledky měření.</p>	<p>Nejúčinněji se hodnotí pomocí plánování pokusů. Např. 7 parametrů lze studovat v 8 pokusech s využitím plánu pokusů podle Plackett-Burmana [87].</p>	<p>Určete vliv každé změny podmínek na výsledky měření.</p> <p>Seřaďte proměnné v pořadí od největšího vlivu na výkonnost metody.</p> <p>Proveďte testy významnosti, abyste zjistili, zda jsou pozorované vlivy statisticky významné.</p>	<p>Navrhnete řízení kvality nebo upravte metodu tak, aby bylo možné kontrolovat kritické proměnné, např. stanovením vhodných mezních tolerancí ve standardním operačním postupu.</p>

6 Používání validovaných metod

Při použití metody někoho jiného, ať už se jedná o metodu vyvinutou jinde v laboratoři, publikovanou metodu nebo dokonce standardní či regulativní metodu, je třeba zvážit dvě věci.

Zprvée, jsou stávající validační údaje dostatečné pro požadovaný účel, nebo je nutná další validace? Je třeba poznamenat, že kromě množství poskytnutých informací o výkonnosti metody je problémem také spolehlivost zdrojů validačních dat. Data získaná z mezilaboratorních studií nebo od uznávaných normalizačních organizací jsou obecně považována za spolehlivá, méně spolehlivá jsou data zveřejněná pouze ve vědecké literatuře nebo poskytnutá výrobcí zařízení a/nebo reagensy.

Zadruhé, pokud jsou stávající validační údaje dostačující, je laboratoř schopna verifikovat (ověřit) výkonnost, kterou metoda údajně umožňuje? (Viz oddíl 3.4). Jsou dostupná vybavení a zařízení adekvátní? Pokud byla metoda validována rozsáhlým testováním za všech extrémních pracovních podmínek, bude nový kompetentní analytik pravděpodobně schopný dosáhnout uspokojivých výsledků v rámci stávajících údajů o výkonnosti. To by se však mělo vždy alespoň zkontrolovat. Obvykle stačí otestovat schopnost analytika dosáhnout deklarované opakovatelnosti a zkontrolovat případné vychýlení za předpokladu, že se standardní metoda používá v rámci svého rozsahu. Toto je podrobněji popsáno níže.

Normované metody se obvykle vytvářejí nějakou formou mezilaboratorní studie a normalizační orgány, které je vytvářejí, mají často odborníky na statistiku, kteří pomáhají zajistit, aby byly validační studie správně navrženy, provedeny a vyhodnoceny. Norma ISO 5725 [29] popisuje model, na němž by mělo být mezilaboratorní porovnání metod založeno, aby poskytlo spolehlivé informace o výkonnosti metody. Tento model se stále více používá, ale ne všechny normované metody mu byly podrobeny. Bylo by riskantní předpokládat, že všechny normované metody byly řádně validovány, a je proto odpovědností analytika zkontrolovat, zda jsou poskytované informace o výkonnosti metody odpovídající.

Podobně se často předpokládá, že standardní metody lze použít přímo z rukopisu a že publikované údaje o výkonnosti lze dosáhnout okamžitě kýmkoli, kdo metodu použije. To je nebezpečný předpoklad. Dokonce i ti, kdo jsou obeznámeni nebo jsou odborníky v konkrétní

oblasti chemie, na kterou se metoda vztahuje, potřebují praxi, aby získali plnou dovednost. Tento druh seznamování se s výkonností metody je součástí důvodu pro provádění verifikační studie již validovaných metod (viz oddíl 3.4).

Aby byla při používání validovaných metod (nebo v podstatě jakékoliv metody) zajištěna přijatelná výkonnost, doporučuje se dodržovat následující pravidla:

1. Analytik se má plně seznámit s novou metodou dříve, než ji začne používat. V ideálním případě bude metoda nejprve předvedena analytikovi někým, kdo již má s jejím používáním zkušenosti. Analytik by ji pak měl zpočátku používat pod důsledným dohledem. Míra dohledu se bude snižovat, dokud analytik nebude považován za dostatečně kompetentního pro samostatnou práci. Kompetentnost se může například stanovit na základě schopnosti analytika dosáhnout úrovní výkonnosti uvedených v metodě, jako je opakovatelnost, mez detekce atd. Toto je typický způsob, jak lze někoho zacvičit v používání nové metody: Laboratorní postupy školení se často takto navrhují, spolu s objektivními měřítky, k občasnému testování kompetencí během školení. V každém případě by si měl analytik metodu prostudovat a seznámit se s teorií, na které je měření založeno, teoreticky si nacvičit jednotlivé etapy, určit místa, kde lze udělat přestávku, a části procesu, kde je analytik povinen pracovat nepřetržitě. Kde je třeba připravit činidla, jak jsou po přípravě stabilní? Je třeba je připravit předem? Klasickým úskalím je strávit několik hodin přípravou řady vzorků a poté zjistit, že příprava činidla potřebného pro další fázi práce vyžaduje složitou syntézu, a mezitím mohou vzorky samy o sobě degradovat.
2. Je třeba provést posouzení toho, kolik vzorků lze pohodlně zvládnout najednou. Je lepší analyzovat několik vzorků dobře, než se pokoušet analyzovat velký počet a pak muset většinu z nich opakovat.
3. Před zahájením práce se ujistěte, že je vše potřebné pro metodu k dispozici. To zahrnuje shromáždění správného vybavení, činidel a standardů (včetně doprovodné přípravy), případně vyhrazení místa v digestořích atd.

Po dokončení verifikační studie (a uvědomění si praktických bezpečnostních opatření a všech

kritických kroků) může být užitečné připravit interní SOP (nebo kontrolní seznam), který se bude dodržovat při rutinním používání metody. Upozorňujeme, že takový dokument nesmí žádným způsobem měnit postup měření, ale má za cíl zdůraznit klíčové kroky a provést analytika postupem.

Pokud je nutné upravit nebo změnit validovanou metodu někoho jiného, pak je nezbytná odpovídající revalidace. Změny mohou v závislosti na své povaze způsobit, že původní validační data nebudou relevantní.

7 Využití validačních dat k návrhu řízení kvality

7.1 Úvod

„Zajišťování kvality“ (QA) a „řízení kvality“ (QC) jsou pojmy, jejichž významy se často mění v závislosti na kontextu. Podle ISO se zajišťování kvality týká činností, které laboratoř provádí, aby zajistila splnění požadavků na kvalitu, zatímco řízení kvality popisuje jednotlivá opatření, která se používají k tomu, aby požadavky byly skutečně splněny [9].

Validace/verifikace metody poskytuje představu o schopnostech a omezeních metody, se kterými se lze setkat při rutinním používání, pokud je metoda pod kontrolou. K ověřování, zda je metoda stále pod kontrolou, tedy zda funguje podle očekávání, jsou nutné specifické kontrolní činnosti. Během stádia validace/verifikace se metoda používala z velké části na vzorky o známém obsahu. Jakmile se metoda využívá rutinně, používá se pro vzorky s neznámým obsahem. Vhodné vnitřní řízení kvality lze provádět pokračujícím měřením stabilních zkušebních vzorků, což umožňuje analytikovi rozhodnout, zda rozmanitost získávaných výsledků skutečně odráží rozmanitost analyzovaných vzorků, nebo zda dochází k neočekávaným a nežádoucím změnám výkonnosti metody. V praxi je třeba tyto známé vzorky měřit s každou sérií vzorků jako součást procesu řízení kvality. Prováděné kontroly budou záviset na povaze, kritičnosti a četnosti analýz, velikosti série, stupni automatizace a náročnosti zkoušek a také na zkušenostech získaných během procesů vývoje a validace. Řízení kvality může mít mnoho podob, a to jak v rámci laboratoře (interní), tak mezi laboratořemi (externí).

7.2 Interní řízení kvality

Interní QC se vztahuje k postupům prováděným pracovníky laboratoře se záměrem kontinuálního sledování operací a výsledků měření s cílem rozhodnout, zda jsou výsledky dostatečně spolehlivé pro uvolnění [19, 89]. To zahrnuje opakované analýzy stabilních zkušebních vzorků, slepých vzorků, standardních roztoků nebo materiálů podobných těm, které se používají pro kalibraci, obohacených vzorků s přídavkem, vzorků bez identifikace (blind samples) a vzorků pro řízení kvality (vzorků QC) [89]. Pro sledování výsledků řízení kvality se doporučuje používat regulační diagramy [89, 90]. Zavedené QC musí být prokazatelně dostačující k zajištění platnosti výsledků. Ke sledování různých typů změn v rámci procesu lze používat různé druhy řízení

kvality. Vzorky pro řízení kvality, analyzované v pravidelných intervalech v analytické sérii, odhalí drift v systému; použití různých typů slepých vzorků ukáže, jaké jsou kromě analytu další příspěvky k signálu přístroje; duplikované analýzy umožňují kontrolu opakovatelnosti. Výběr kontrolních materiálů a postup řízení kvality mohou záviset na kritických bodech výkonnosti metody, které byly zjištěny během studie validace nebo verifikace.

Vzorky pro řízení kvality jsou typické vzorky, které jsou po stanovenou dobu dostatečně stabilní a homogenní, aby poskytovaly stejný výsledek (s výhradou náhodných výkyvů ve výkonnosti metody), a jsou k dispozici v dostatečném množství, aby bylo možné provádět opakované analýzy v běhu času. Během tohoto období lze mezilehlou preciznost metody kontrolovat sledováním hodnot získaných z analýzy vzorku QC, obvykle jejich vnesením do regulačního diagramu. Pro diagram se nastavují meze (obvykle se „varovné meze“ nastavují ve vzdálenosti $\pm 2s_i$ od střední hodnoty a „regulační (akční) meze“ ve vzdálenosti $\pm 3s_i$ od střední hodnoty, kde s_i je směrodatná odchylka pro mezilehlou preciznost). Pokud vnesené hodnoty QC odpovídají určitým pravidlům týkajícím se stanovených mezních hodnot, je QC považována za vyhovující. Dokud je hodnota vzorku QC přijatelná, je pravděpodobné, že výsledky vzorků ze stejné série jako vzorek QC mohou být považovány za spolehlivé. Je důležité, aby přijatelnost hodnoty získané pro vzorek QC byla ověřena hned, jak je to v analytickém procesu proveditelné, aby se v případě výskytu problému neplýtvalo úsilím na nespolehlivou analýzu samotných vzorků. Výsledky QC by neměly být používány pouze k hodnocení, zda metoda dosáhla přijatelné úrovně v určitém časovém okamžiku (např. k potvrzení, zda výsledky získané pro sadu zkušebních vzorků v jednom běhu mohou být vydány zákazníkovi). Sledování trendů v průběhu času může odhalit problémy s výkonností metody, což umožňuje přijmout nápravná opatření dříve, než se metoda skutečně vymkne kontrole.

Během validace metody získáme počáteční odhady různých měř. preciznosti. Abychom nastavili realistické meze v regulačním diagramu, musí měření odrážet způsob, jakým se má metoda skutečně používat v každodenní praxi. Měření během validace by proto měla napodobovat všechny možné variace provozních podmínek:

různé analytiky, kolísání teploty v laboratoři atd. Pokud se to neprovede, bude směrodatná odchylka pro mezilehlou preciznost s_i , nereálně malá, což povede k tomu, že v grafu budou vytyčeny meze, které při běžném použití nelze splnit. Z tohoto důvodu se obecně doporučuje přehodnotit uvedené meze po jednom roce nebo po nashromáždění dostatečného počtu výsledků [89].

Použití různých typů slepých vzorků umožňuje analytikovi zajistit, aby mohl výpočty provedené pro analyt vhodně korigovat a odstranit tak všechny příspěvky k odezvě, které nelze přiřadit analytu. Více informací o různých typech slepých pokusů je obsaženo v doplňku Eurachem Blanks in Method Validation [32]. Opakovaná analýza rutinních zkušebních vzorků umožňuje zkontrolovat změny preciznosti analytického procesu, které by mohly nepříznivě ovlivnit výsledek [91]. Replikáty mohou v sérii sousedit, aby se ověřila opakovatelnost. Mez preciznosti metody (viz 5.7.4) lze použít k posouzení, zda je rozptýlení výsledků opakování přijatelné.

Analýza vzorků bez identifikace (blind samples) je v podstatě formou opakované analýzy a slouží ke kontrole preciznosti. Sestává z opakovaného vkládání zkušebních podílů do analytické série, třeba vedoucím laboratoře, a je tak nazvána proto, že analytik obvykle nezná identitu zkušebních podílů ani to, že se jedná o opakované vzorky. Analytik tak nemá žádné předem dané představy o tom, že by konkrétní výsledky měly spolu souviset.

Standardy nebo materiály podobné těm, které se používají pro kalibraci, rozložené v intervalech v analytické sérii, umožňují provádět kontroly, zda je odezva analytického procesu na analyt stabilní.

Stanovení a zdůvodnění vhodné úrovně řízení kvality na základě posouzení rizik je odpovědností vedení laboratoře, s přihlédnutím k poznatkům získaným při validační/verifikační studii, spolehlivosti metody, kritičnosti práce a proveditelnosti opakování analýzy, pokud nefunguje napoprvé správně. Je všeobecně přijímáno, že pro rutinní analýzu se obecně přijímá jako přiměřená úroveň interní QC 5 %, tj. 1 z každých 20 analyzovaných vzorků má být vzorkem QC. Pro robustní rutinní metody s velkým objemem vzorků však může být nižší úroveň řízení kvality přiměřená.

U komplexnějších postupů není neobvyklá úroveň 20 % a ojediněle lze požadovat i 50% úroveň. U analýz prováděných jen občas by měla být při každé příležitosti provedena verifikační studie. To může obvykle zahrnovat použití RM obsahujícího certifikovanou nebo známou koncentraci analytu, po níž následují opakované analýzy tohoto vzorku a vzorku s přídavkem (vzorku, do kterého bylo záměrně přidáno známé množství analytu). Pokud se tyto analýzy provádějí častěji, mají podléhat systematickým postupům řízení kvality zahrnujícím použití regulačních diagramů a kontrolních vzorků.

7.3 Externí řízení kvality

Pravidelná účast ve zkoušení způsobilosti (PT), známých také jako externí hodnocení kvality (EHK), je uznávaným způsobem, jak může laboratoř sledovat svou výkonnost jak vůči svým vlastním požadavkům, tak i úrovni obdobných laboratoří. PT pomáhá odhalit rozdílnosti mezi laboratořemi (reprodukovatelnost) a systematické chyby (vychýlení).

Programy PT a jiné typy mezilaboratorních porovnání jsou uznávány jako důležité prostředky pro sledování úrovně shody analytických výsledků na národní a mezinárodní úrovni. Podle normy ISO/IEC 17025 [1] musí laboratoř sledovat svou výkonnost prostřednictvím účasti v PT a/nebo mezilaboratorních studiích „...tam, kde je to možné a potřebné“. Taková účast musí být plánována a vyhodnocena a musí být přijata vhodná následná opatření.

V některých případech mohou akreditační orgány určit účast v konkrétním programu PT jako požadavek akreditace. Hodnota PT je samozřejmě pouze tak dobrá jako program samotný. Požadavky na kompetenci poskytovatelů PT jsou popsány v normě ISO/IEC 17043 [92]. Praktické informace o výběru, použití a interpretaci programů PT jsou uvedeny v příručce Eurachem [93]. V databázi EPTIS (www.eptis.bam.de) lze nalézt informace o velkém počtu programů. Nicméně pro nově vznikající oblasti analýzy nebo zejména zřídka používané aplikace nemusí být žádný plně vhodný program PT k dispozici. Tyto a další omezení jsou zohledněny v pokynech [94, 95], které vyžadují, aby akreditované laboratoře vypracovaly strategii své účasti v PT.

8 Dokumentace validovaných metod

8.1 Od návrhu ke konečné verzi

Dobrá dokumentace a řádné vedení záznamů jsou pro správně validovanou metodu nezbytné. Metoda, jež je předmětem validace, se užívá podle zdokumentovaného postupu, který má být považován do schválení validační zprávy za návrh. Jakmile je validační proces ukončen, je důležité zdokumentovat analytický postup tak, aby metoda mohla být jasně a jednoznačně zavedena. Je pro to řada důvodů.

- Různá posuzování metody provedená během procesu validace předpokládají, že při použití bude metoda pokaždé používána stejným způsobem. Pokud tomu tak není, nebude skutečná výkonnost metody odpovídat výkonnosti předpovídané validačními daty. Dokumentace musí proto omezit možnost zavedení náhodných obměn metody.
- Patříčná dokumentace je rovněž nezbytná pro účely auditu a hodnocení a může být vyžadována také ze smluvních nebo regulativních důvodů.
- Vhodná dokumentace metody pomůže zajistit, aby byla metoda při každém použití konzistentní. Vzhledem k tomu, že kvalita dokumentace má přímý vliv na to, jak konzistentně lze metodu používat, je pravděpodobné, že ovlivňuje preciznost měření a nejistotu měření. Příspěvek k nejistotě spojený s nedostatečně zdokumentovanými metodami může být ve skutečnosti tak velký, že metoda se stává prakticky nepoužitelnou. Jakékoli nesrovnalosti v dokumentaci se musí vyřešit, předtím než lze získat rozumný odhad nejistoty.

8.2 Doporučení

8.2.1 Kontrola instrukcí

Náležitě zdokumentovat metodu není snadné. Informace mají být uváděny přibližně v pořadí, v jakém je uživatel pravděpodobně bude potřebovat. Častou chybou je předpokládat, že všichni pochopí fungování metody stejně dobře jako osoba, která ji vyvinula a zdokumentovala. Tato předpokládaná znalost může být nebezpečná. Užitečným způsobem, jak otestovat dokumentaci, je, aby kompetentní pracovník postupoval přesně podle popisu v dokumentaci. Pokud to odpovídá zamýšlenému účelu, měla by dokumentovaná metoda dobře fungovat při použití různými analytiky a poskytovat konzistentní výsledky. Pokud ne, je nutné text přepracovat, aby byly

postupy popsány podrobněji a byla odstraněna nejednoznačnost.

8.2.2 Doporučení v normách

Řada norem poskytuje návod, jaký druh informací by se měl do dokumentace metody zahrnout. Z pohledu analytika jsou pravděpodobně nejužitečnější normy řady ISO 78, které popisují dokumentaci řady různých typů metod chemické analýzy (normalizační orgány každoročně vytvářejí, validují a samozřejmě dokumentují velké množství metod a potřebují co nejkonzistentnější přístup a tyto normy vytvářejí především pro potřeby svých vlastních technických výborů). Norma ISO 78-2 [96] obsahuje rady týkající se dokumentace metod pro obecné chemické metody. Vzorové rozvržení založené na této normě je uvedeno v příloze A. Normy uvádějí logické pořadí informací s doporučenými nadpisy a jaké informace by se měly objevit pod každým nadpisem. Při používání těchto norem by čtenář měl dbát na vyváženost mezi flexibilitou přístupu a konzistentností. Ačkoli je žádoucí, aby dokumentace všech metod měla stejný formát, je třeba si uvědomit, že ne všechny metody vyžadují stejnou míru podrobnosti a často bude i vhodné některé doporučené části z dokumentace vynechat.

Kromě dokumentace metod je také důležité, aby byly zdokumentovány a schváleny validační plány a zprávy. Dodatek Planning and Reporting Method Validation Studies Doplněk Planning and Reporting Method Validation Studies poskytuje pokyny pro dokumentaci validačních plánů a zpráv [30].

8.2.3 Řízení dokumentů

Pro laboratoř, která dokumentuje své vlastní metody, může mít smysl vytvořit si „vlastní styl“. Kromě toho, že předkládá relevantní informace logickým a snadno použitelným způsobem, umožňuje také rozložit zátěž spojenou s dokumentací mezi více autorů. Návrhy vytvořené několika autory lze zkontrolovat z hlediska konzistence pomocí jediného kontrolního subjektu.

Dokumentované metody tvoří důležitou součást laboratorního systému managementu kvality a měly by podléhat vhodné míře řízení dokumentů. Důvodem je zajistit, aby se skutečně používaly pouze metody a postupy, které byly schváleny jako vhodné k používání. Proto by v rámci procesu dokumentace měly metody obsahovat informace, které uživateli umožní

posoudit, zda byla metoda schválena k použití a zda je kompletní. Dále by měly být k dispozici další informace týkající se čísla verze a data o vydání metody, autorovi, počtu existujících kopií metody a případných omezeních pro kopírování.

Čas od času mohou metody vyžadovat aktualizaci. Mohlo například dojít k vylepšení

technologické podstaty postupu. Řízení dokumentů dovoluje hladké stažení zastaralých metod a vydání revidovaných metod. V dnešní době je proces řízení dokumentů výrazně zjednodušen díky použití speciálního softwaru. Změny smějí provádět pouze oprávněné osoby. Toto lze nastavit v softwaru, kde mohou mít příslušné soubory všeobecný přístup ‚jen pro čtení‘ a velmi omezený přístup ‚pro zápis‘.

9 Dopady validačních dat pro rutinní používání analytických metod a uvádění výsledků

Je důležité, aby analytik byl schopen převést data získaná při analýze vzorků pomocí validované metody na výsledky, které přímo přispívají k řešení problému zákazníka. Pomáhají tomu výkonnostní charakteristiky zjištěné během procesu validace. Data o opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti a reprodukovatelnosti lze použít ke zjištění, zda jsou rozdíly zjištěné při analýze vzorků významné. Řízení kvality založené na validačních datech lze použít k potvrzení, že metoda je pod kontrolou a přináší smysluplné výsledky. Odhad nejistoty měření umožňuje vyjádřit výsledek jako rozsah hodnot s přijatelnou úrovní spolehlivosti.

Je důležité, aby analytik měl přístup k validačním údajům, které lze použít k podpoře platnosti výsledků. Jinou otázkou je, zda se tyto informace postoupí zákazníkovi. Často zákazník nemá technické znalosti, aby význam těchto údajů ocenil. Za takových okolností je zřejmě bezpečnější zpřístupnit údaje na vyžádání.

S tématy, jako je validace metody, variabilita a nejistota měření, je třeba za určitých okolností zacházet obezřetně, například v právních nebo forenzních souvislostech. Může být lepší otevřeně zmínit existenci nejistoty přiřazené k měření a být připraven obhájit rozhodnutí učiněná s vědomími této nejistoty.

Opatrnost je nutná vůči snahám použít analytický výsledek s přidruženou nejistotou k rozhodnutí,

zda původní zásilka, ze které byl vzorek odebrán, splňuje specifikaci nebo limit [97]. Takové rozhodnutí nemusí být v odpovědnosti analytika, ačkoli od něj může být vyžadována technická rada a pomoc při rozhodovacím procesu.

V některých odvětvích nemusí toto rozhodnutí záviset na analytikovi, ale může být stanoveno v právních předpisech nebo odvětvových pokynech [61, 98]. Téma korekce vychýlení je popsáno v letáku Eurachem Treatment of an Observed Bias [99] a pokyny pro korekci vychýlení lze nalézt v normě ISO 15796 [100].

Při uvádění výsledků jako ‚nedetekováno‘ je třeba postupovat s opatrností. Samo o sobě toto prohlášení neposkytuje potřebnou informaci a mělo by být doplněno vysvětlením, jaká je pro tento konkrétní případ mez detekce. Alternativně může být výsledek uveden jako nižší než stanovená mez detekce. Někdy je vhodné vykázat číselnou hodnotu, i když může být pod domnělou mezí detekce. Úřední orgány mohou někdy požadovat uvedení meze stanovitelnosti.

Pokud je spolu s výsledkem požadováno uvedení nejistoty, je vhodné uvést rozšířenou nejistotu za použití vhodného koeficientu rozšíření. Například koeficient rozšíření 2 odpovídá intervalu s konfidenční úrovní přibližně 95 %. Další návody k uvádění nejistoty měření lze nalézt v Pokynech Eurachem/CITAC [21, 97].

Příloha A – Protokol dokumentace metod

Náležitá dokumentace metod je diskutována v oddíle 8 příručky. Následující formát je uveden jako vhodný vzor pro inspiraci. Vychází z normy ISO 78-2 [96], ale obsahuje některá doplňující doporučení týkající se kalibrace, řízení kvality a řízení dokumentů. Příloha A slouží pouze jako vodítko a měla by být přizpůsobena tak, aby vyhovovala jakýmkoli specifickým požadavkům.

A.1 Předmluva

A.1.1 Souhrn aktualizací a revizí

Tento oddíl má dvojí účel. Zaprvé má umožnit provádění drobných změn v textu metody bez nutnosti úplné revize a nového vytištění metody. Zadruhé se doporučuje, aby každá metoda byla pravidelně přezkoumávána z hlediska vhodnosti pro daný účel, a souhrn slouží jako záznam o tom, že to bylo provedeno. Souhrn se obvykle nachází na začátku metody, hned za přední obálkou.

A.1.2 Aktualizace

Mnoho laboratoří používá systémy pro správu dokumentů a správa dokumentů je obvykle elektronická. V situacích, kdy se stále používají ručně psané změny, budou jakékoli ručně psané změny v textu metody přijaty, pokud budou změny zaznamenány také do tabulky uvedené níže (ručně psané záznamy jsou přípustné) a budou náležitě schváleny. Předpokládá se, že schválení (autorizace) potvrzuje, že byly prozkoumány vlivy změn na validaci metody a že tyto změny nezpůsobily žádné problémy a že byly provedeny ve všech kopiích metody.

#	Oddíl	Podstata změny	Datum	Autorizace
1 (např.)	3.4	Změna průtoku na 1,2 ml min ⁻¹	02/07/24	DGH

A.1.3 Revize

Vždy se má očekávat, že datum, kdy byla metoda používána, bude ležet mezi datem *revize* a *datem další revize*, jak je uvedeno v tabulce.

Datum revize	Výsledek revize	Datum příští revize	Autorizace

A.2 Úvod

Úvod se používá v případě potřeby k poskytnutí informací, jako jsou například připomínky k technické náplni postupu nebo důvody jeho vypracování. Pokud jsou požadovány podkladové informace o metodě, měly by být přednostně zahrnuty do této části.

A.3 Název

Název musí obsahovat druhy vzorků, pro které se zkušební metoda používá, analyt nebo charakteristiku, která se stanovuje, a princip stanovení. Pokud je to možné, měl by se omezit na následující informace. Preferovaný formát:

Stanovení A {*analyt nebo měřená veličina*} (v přítomnosti B {*interference*}) v C {*matrice*} pomocí D {*princip*}.

A.4 Upozornění

Upozorněte na všechna rizika a popište preventivní opatření nezbytná k jejich zamezení. Podrobná bezpečnostní opatření mohou být uvedena v příslušných oddílech, ale zde je třeba upozornit na existenci nebezpečí a nutnost preventivních opatření. Uveďte vhodná varování před všemi riziky spojenými s:

- nakládáním se vzorky,
- nakládáním nebo přípravou rozpouštědel, činidel, standardů nebo jiných materiálů,
- obsluhou zařízení,
- požadavky na speciální pracovní podmínky, např. digestoře,
- důsledky rozšiřování měřítka experimentu (meze výbušnosti).

A.5 Rozsah

Tato část umožňuje potenciálnímu uživateli rychle posoudit, zda je metoda pravděpodobně vhodná pro zamýšlenou aplikaci nebo zda má omezení. Měly by být uvedeny následující podrobnosti:

- popis základního problému (proč je metoda potřebná),
- analyt (analyty) nebo měřená veličina (veličiny), které lze touto metodou stanovit,
- forma, ve které je analyt (analyty) stanovován – speciace, celkový/dostupný atd.,
- matrice vzorku, ve které (kterých) může být tento analyt (analyty) stanovovány,
- pracovní rozsah (měřicí interval), ve kterém lze metodu použít. To by se mělo týkat vlastností, např. koncentrací v laboratorním vzorku,
- známé interference, které zabraňují nebo omezují použití metody,
- instrumentální techniky používané v metodě,
- minimální množství vzorku.

Potravinářství [101] používá pojem „použitelnost“ jako synonymum pro rozsah a definuje jej jako „analyty, matrice a koncentrace, pro které lze uspokojivě použít metodu analýzy“.

A.6 (Normativní) reference

V této části se musí uvést seznam dokumentů nezbytných pro používání metody. Dokumenty, které při přípravě metody sloužily pouze jako reference, musí být uvedeny v bibliografii na konci dokumentu.

A.7 Definice

Uveďte veškeré definice pojmů použitých v textu, které mohou být nezbytné pro jeho úplné pochopení. Pokud je to možné, používejte definice ISO. Citujte zdroje. V případě potřeby lze sem zařadit analytické strukturální vzorce.

A.8 Princip

Naznačte základní kroky metody, princip, podle kterého analytická technika funguje. Pomoci může vývojový diagram nebo diagram příčin a následků. Tato část by měla být napsána tak, aby umožňovala pochopit, jak metoda funguje. Zahrňte vysvětlení principu výpočtu. Kde je to vhodné pro objasnění fungování metody nebo výpočtů, uveďte podrobnosti o všech relevantních chemických reakcích (to může být například relevantní v případě derivatizace nebo u titrace).

Např. „Koncentrace se určí z 6bodové kalibrační křivky odečtením koncentrace odpovídající absorpční vzorku, korigované o hodnotu slepého vzorku, a vynásobením koncentračním faktorem.“

A.9 Reakce

Tento oddíl uvádí základní reakce, pokud jsou považovány za nezbytné pro pochopení textu nebo výpočtů. Odůvodňují výpočty z dat získaných při stanovení a mohou vést k lepšímu pochopení metody, zejména pokud dochází k několika postupným změnám v oxidačním stavu stanovovaného prvku. V případě titrací jsou užitečné zejména pro určení počtu ekvivalentů v každém molu reagující látky.

A.10 Činidla a materiály

Uveďte seznam všech činidel a materiálů potřebných pro analytický proces spolu s jejich základními charakteristikami (koncentrace, hustota atd.) a očísľujte je pro další odkazování. Uvádějte:

- registrační čísla Chemical Abstract Service (CAS) (jsou-li k dispozici),
- podrobnosti o veškerých souvisejících rizicích včetně pokynů k likvidaci,
- analytickou třídu nebo čistotu,
- potřebu kalibračních a QC materiálů pocházejících z nezávislých šarží,
- podrobnosti přípravy, včetně nutnosti přípravy předem,
- požadavky na uchování a skladování,
- dobu použitelnosti materiálů v původním stavu a připravených činidel,
- požadované složení s poznámkami o koncentraci nebo jiné veličině,
- požadavky na označení.

A.11 Přístroje

Popište dostatečně podrobně jednotlivá zařízení a jejich propojení, aby bylo možné je jednoznačně sestavit. Čísľujte položky pro pozdější odkazování. Srozumitelnost mohou zvýšit schémata a vývojové

diagramy. Každá kontrola funkce sestaveného zařízení musí být popsána v odstavci „Postup“ v bodu nazvaném „Předběžná zkouška“ nebo „Kontrolní zkouška“ (viz A.13).

Uveďte minimální požadavky na výkonnost a verifikaci, s křížovým odkazem na část o kalibraci (A.13) a všechny příslušné návody k přístrojům. Je-li to vhodné, odkazujte se na mezinárodní normy nebo jiné mezinárodně uznávané dokumenty týkající se laboratorního skla a souvisejících zařízení. Zahrňte požadavky na prostředí (odtahové digestoře atd.).

A.12 Vzorkování

Vzorkování v tomto protokolu zahrnuje jak odběr vzorků pro získání laboratorního vzorku, tak dělení vzorků v laboratoři za účelem získání zkušební vzorku, ze kterého bude odebrán zkušební podíl.

Pokud je vzorkování pro přípravu laboratorního vzorku nezávislé na chemické analýze jako takové, obecně postačí poukázat informativně na příslušný postup zabývající se konkrétně touto otázkou. Pokud takový relevantní postup neexistuje, může oddíl o vzorkování obsahovat plán vzorkování a postup vzorkování s pokyny, jak zabránit změnám produktu, zohledňující požadavky týkající se použití statistických metod.

Oddíl o vzorkování by měl poskytovat všechny informace nezbytné pro přípravu zkušební vzorku z laboratorního vzorku. Uveďte podrobnosti o skladování, úpravě/předúpravě a likvidaci. Pokud je tato fáze obzvláště složitá, může být vhodné vyhotovit samostatný dokument popisující jednotlivé kroky.

A.13 Postup

Popište sled jednotlivých operací. Pokud je popisovaná metoda již uvedena v jiné normě, použijte se výraz „použijte metodu uvedenou v ISO 12345“ nebo „použijte jednu z metod uvedených v ISO 12345“ s uvedením případných změn, je-li to potřeba. Zmiňte činnosti, pro které jsou nutná zvláštní bezpečnostní opatření. Oddíl „Postup“ obvykle obsahuje pododdíly, týkající se následujících záležitostí.

- zkušební podíl (jeho příprava ze zkušební vzorku nebo laboratorního vzorku a požadovaná hmotnost nebo objem);
- slepé pokusy (podmínky a omezení);
- předběžná zkouška nebo kontrolní zkouška (např. pro ověření výkonnosti měřicího přístroje);
- stanovení nebo zkouška (zkoušky). Zahrnuje uvedení počtu měření nebo zkoušek (např. duplikáty) a podrobný popis všech kroků;
- kalibrace. Identifikujte kritické části analytického procesu. Ty se budou muset kontrolovat pečlivým provedením a kalibrací. Odkaz na příslušné části výše. Začněte kalibraci zařízení – co je třeba kalibrovat, jak, čím a jak často? Zvažte vhodnou metrologickou návaznost kalibrátorů.

A.14 Výpočet

Popište způsob výpočtu výsledku (výsledků). Uveďte informace o jednotkách, ve kterých má být výsledek a další veličiny vyjádřeny, rovnici použitou pro výpočet, významy algebraických symbolů použitých v rovnici, počet desetinných míst nebo platných číslic, v nichž má být výsledek vyjádřen. Symboly veličin musí být v souladu s normou ISO 80000 [15].

A.15 Preciznost

U metod, které byly podrobeny mezilaboratornímu porovnání, se musí uvést údaje o preciznosti (tj. opakovatelnost a reprodukovatelnost). Údaje o preciznosti musí být vypočteny a pokud možno by měly být také uváděny v souladu s příslušnou částí ISO 5725 [29] nebo v souladu s jinou vhodnou mezinárodní normou (na kterou je třeba odkazovat). Jasně uveďte, zda jsou hodnoty preciznosti vyjádřeny v absolutních nebo relativních hodnotách, nebo jako meze preciznosti.

A.16 Zajišťování a řízení kvality

Jedním z výsledků provedené validace by měl být popis interních a externích postupů řízení kvality (zkoušení způsobilosti), které je třeba dodržovat. Vysvětlete, jakou formu má řízení kvality, jak často se provádějí kontrolní zkoušky během analýzy šarží, jaká jsou kritéria pro vyhovující/nevyhovující výsledek a jaká opatření se přijímají v případě nevyhovujícího výsledku. Křížový odkaz na příslušné části výše.

A.17 Zvláštní případy

Zahrňte veškeré změny postupu vyžadované v případě přítomnosti nebo nepřítomnosti specifických složek v analyzovaném produktu. Změny musí být již zmíněny v oddíle „Rozsah“. Každý zvláštní případ musí mít odlišný název.

A.18 Protokol o zkoušce

Tento oddíl má specifikovat informace, které mají být uvedeny v protokolu o zkoušce. Obvykle by měly být zahrnuty následující aspekty zkoušky:

- odkaz na použitou metodu;
- výsledek (výsledky) a případně údaj o související kvalitě (preciznost, specifikovaná nejistota, konfidenční interval), včetně odkazu na oddíl o „Výpočet“;
- jakékoliv odchylky od postupu;
- jakékoli pozorované neobvyklosti;
- datum zkoušky.

Akreditační předpisy mohou obsahovat požadavky na protokoly o zkouškách, stejně tak jako odvětvové právní předpisy a směrnice.

A.19 Přílohy

Pro lepší čitelnost je vhodnější některé informace uvádět jako přílohu. Musí být jasně uvedeno, zda je příloha normativní nebo informativní. Příklady informací, které lze přiložit, jsou údaje z validace metody, analýzy rizik a výpočtů nejistoty. U posledně jmenovaných je třeba určit hlavní zdroje nejistoty vztahující se k metodě a uvést přiřazené hodnoty. Je třeba zmínit i nevýznamné příspěvky, které nebyly použity v konečném výpočtu. Kombinovaná standardní nejistota a/nebo rozšířená nejistota by měly být uvedeny spolu s vysvětlením, jak byly odvozeny. Podrobnější pojednání může být k dispozici v souboru uvedeném křížovým odkazem.

A.20 Seznam literatury

Jsou-li informativní odkazy považovány za nezbytné, mohou být uvedeny v textu na místě, kde se na ně odkazuje, nebo pokud je jich více, v seznamu literatury na konci dokumentu.

Příloha B – Statistické základy pro výpočet meze detekce*

Stručný návod 3 v oddíle 5.3 ukazuje, že lze mez detekce (LOD) vypočítat vynásobením vhodné směrodatné odchylky faktorem 3. Tato příloha popisuje statistický základ pro hodnotu tohoto faktoru.

Při stanovení LOD je obvykle záměrem zjistit nejnižší koncentraci analytu přítomného ve vzorku, kterou již lze detekovat pomocí daného postupu měření a na specifikované konfidenční úrovni. Definování LOD je dvoustupňový proces. Nejprve se stanoví ‚kritická úroveň‘. Tato hodnota se nastaví tak, aby pravděpodobnost, že získaný výsledek měření překročí kritickou úroveň, nebyla větší než α , jestliže vzorek skutečně neobsahuje *žádný* analyt. Kritická úroveň představuje kritérium pro prohlášení vzorku za ‚pozitivní‘. Pravděpodobnost falešně pozitivního závěru obvykle používá $\alpha = 0,05$; což vede ke kritické hodnotě přibližně $1,65s$ (kde s je směrodatná odchylka velkého počtu výsledků pro slepý vzorek nebo vzorek obsahující nízkou koncentraci analytu a $1,65$ je jednostranná Studentova t -hodnota pro nekonečný počet stupňů volnosti na hladině významnosti $\alpha = 0,05$). Kritická úroveň se nejvhodněji vyjadřuje jako koncentrace, i když v zásadě to může být jakékoli pozorování, jako je plocha píku. Jakýkoli výsledek překračující kritickou úroveň má být prohlášen za pozitivní.

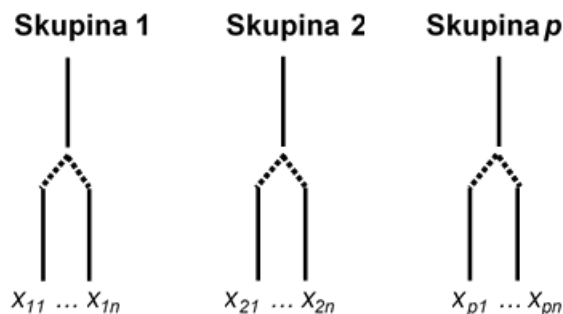
Pokud by však pravá hodnota koncentrace ve vzorku byla přesně rovna kritické úrovni (vyjádřené koncentrací), dalo by se u přibližně poloviny výsledků měření očekávat, že budou pod kritickou úrovní, což by vedlo k 50 % falešně negativních výsledků. Míra falešně negativních výsledků ve výši 50 % je zjevně příliš vysoká, aby byla prakticky použitelná; metoda neposkytuje spolehlivě výsledky nad kritickou úroveň, pokud je koncentrace rovna kritické úrovni. LOD má představovat pravou koncentraci, pro kterou je míra falešně negativních výsledků při dané kritické hodnotě přijatelná. Falešně negativní chyba β se obvykle nastavuje jako rovná hodnotě falešně pozitivní chyby, což je především z historických důvodů (IUPAC doporučuje výchozí hodnoty $\alpha = \beta = 0,05$ [56]). Při použití $\alpha = \beta = 0,05$ musí být LOD $1,65s$ nad hodnotou určenou pro kritickou úroveň. Faktor pro výpočet LOD při $\alpha = \beta = 0,05$ je tedy $1,65 + 1,65 = 3,30$. Toto číslo se obvykle zaokrouhluje, aby se získal výsledek ‘ $3s$ ’ uvedený v Stručném návodu 3. Tento přístup je založen na několika aproximacích, které jsou popsány v literatuře [56].

Násobitel 3, vypočtený v předchozím odstavci, vychází z hodnoty jednostranného Studentova t - pro nekonečný počet stupňů volnosti, zaokrouhloveno dolů na jedno platné číslo. Pro statisticky rigorózní odhad LOD by měl použitý multiplikační faktor zohlednit počet stupňů volnosti spojených s odhadem s . Pokud je například s získána z 10 opakovaných měření, hodnota Studentova t při $\alpha = 0,05$ je 1,83 (9 stupňů volnosti). To vede k vypočítanému LOD jako $3,7s$.

* Text vychází z příručky Eurachem Guide on Terminology in Analytical Measurement [8].

Příloha C – Analýza rozptylu (ANOVA)

Hlavní myšlenkou ‚analýzy rozptylu‘ (ANOVA) je, že tam, kde je možné nějakým způsobem seskupit data z opakování, např. podle analytika, přístroje, dne, laboratoře, metody atd., tam lze celkovou variabilitu v celé sadě dat vyjádřit jako kombinaci rozptylů (s^2) mezi skupinami a uvnitř skupin. ANOVA může být použita k vyhodnocení výsledků z typu experimentální studie zobrazené na obrázku C1. V tomto ‚hierarchickém návrhu‘ se opakovaná měření (obvykle získaná za podmínek opakovatelnosti) opakují v různých měřicích cyklech, aby poskytly p skupin dat. Pro odhad mezilehlé preciznosti z takové studie mají být rozdíly v podmínkách mezi jednotlivými cykly (různé dny, analytici atd.) maximální.



Obrázek C 1 – Příklad ‚hierarchického návrhu‘ experimentu, ze kterého lze pomocí ANOVA vyhodnotit různé míry preciznosti

Obecnou formu tabulky pro jednofaktorovou ANOVU, pro celkový počet N výsledků, v p skupinách o n pozorováních a v stupních volnosti, znázorňuje obrázek C2. Každý řádek tabulky se vztahuje k jinému zdroji rozptylu. První řádek se týká variability mezi průměry skupin, druhý popisuje variabilitu v rámci skupin a třetí popisuje variabilitu datového souboru jako celku. Tabulkové procesory a statistický software také poskytují kritické hodnoty F a F a odpovídající hodnotu P (pravděpodobnost).

Zdroj variability	Součet čtverců (SS)	ν	Střední čtverec (MS)	F	P	F_{krit}
Mezi skupinami	SS_b	$p-1$	$MS_b = SS_b/(p-1)$	MS_b/MS_w		
Uvnitř skupiny (reziduální)	SS_w	$N-p$	$MS_w = SS_w/(N-p)$			
Celkový	$SS_{\text{tot}} = SS_b + SS_w$	$N-1$				

Obrázek C2 – Struktura tabulky pro jednofaktorovou ANOVA

Hodnoty související s variabilitou mezi skupinami se téměř vždy označují termíny ‚mezi skupinové‘ nebo jsou identifikovány podle jednotlivých faktorů seskupení (např. analytik, den nebo laboratoř). V softwarech, učebnicích atd. se pro popis variability uvnitř skupiny používá několik různých termínů – nejčastější jsou ‚ve skupinách‘, ‚reziduální‘, ‚chyba‘ nebo ‚měření‘.

Za předpokladu, že hierarchický návrh zobrazený na obrázku C1 provádí jedna laboratoř, že opakovaná měření v rámci každé skupiny byla získána za podmínek opakovatelnosti a že se analytické podmínky mezi skupinami lišily, lze opakovatelnost a mezilehlou preciznost vypočítat následujícím způsobem.

1. Směrodatná odchylka opakovatelnosti s_r se získá jako druhá odmocnina průměrného součtu čtverců uvnitř skupiny, který představuje variabilitu uvnitř skupiny:

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad (\text{Rov. C1})$$

2. Příspěvek k celkové variabilitě od faktoru seskupení (s_{between}) získáme také z tabulky ANOVA:

$$s_{\text{between}} = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}} \quad (\text{Rov. C2})$$

3. Mezilehlou preciznost s_l lze nyní vypočítat kombinací výše uvedených složek variability uvnitř skupiny a mezi skupinami:

$$s_l = \sqrt{s_r^2 + s_{\text{between}}^2} \quad (\text{Rov. C3})$$

Experiment zmiňovaný v oddíle 5.7.5 lze ilustrovat následovně. V rámci provádění validace metody v jedné laboratoři byla v průběhu každého z osmi dnů provedena duplikátní měření (tabulka C1). Měření v jednotlivých dnech byla prováděna za podmínek opakovatelnosti, avšak s různými analytiky, na různém vybavení atd. v různých dnech, aby se napodobily podmínky, za kterých bude metoda rutinně používána.

Tabulka C1 – Příklad experimentálního uspořádání, které umožňuje vyhodnotit opakovatelnost a mezilehlou pomocí jednofaktorové ANOVA s přijatelným počtem stupňů volnosti

Den:	1		2		3		4		5		6		7		8	
Výsledek:	$x_{1,1}$	$x_{1,2}$	$x_{2,1}$	$x_{2,2}$	$x_{3,1}$	$x_{3,2}$	$x_{4,1}$	$x_{4,2}$	$x_{5,1}$	$x_{5,2}$	$x_{6,1}$	$x_{6,2}$	$x_{7,1}$	$x_{7,2}$	$x_{8,1}$	$x_{8,2}$

Jednofaktorová ANOVA může být použita k oddělení variability vlastní metodě (opakovatelnost) a variability způsobené rozdíly v podmínkách měření, tj. různými analytiky, zařízením, prodlouženým časovým rozsahem (mezilehlá preciznost). Připomínáme, že při tomto přístupu není možné vyvodit závěry o tom, který z parametrů – analytik, zařízení, čas – nejvíce přispívá k mezilehlé preciznosti, ale to ve fázi validace obvykle není zapotřebí. Pokud jsou tyto informace potřebné, je nutné použít hierarchické uspořádání s vícefaktorovou ANOVA (multi-factor hierarchical nested design), aby bylo možné odhadnout variabilitu způsobenou jednotlivými faktory, jako je zařízení, analytik a čas, samostatně a současně.

Použití jednofaktorové ANOVA na výsledky v tabulce C1 poskytne tabulku výsledků podobnou těm uvedeným na obrázku C2. Hodnoty F , kritické F a P hodnoty umožňují vyvodit jasné závěry o tom, zda je variabilita mezi výsledky získanými v různých dnech výrazně větší než variabilita ve výsledcích získaných ve stejný den. Hodnoty dvou měř. preciznosti (s_r a s_l) se pak snadno vypočtou z rovnic C1 – a C3 výše. Přiřazený počet stupňů volnosti (v) bude $N-p = 16-8 = 8$ pro s_r . Hodnota v pro mezilehlou preciznost je komplexnější, ale nebude menší než $p-1$, tj. 7 v tomto příkladu (viz obrázek C2). Výsledkem je rozumný kompromis mezi pracovním úsilím a nejistotou odhadů preciznosti.

Příloha D – Jak vybrat a zajistit platnost zkušební soupravy

Tato příloha je určena k pomoci při volbě správné zkušební soupravy (test kit) těm, kteří ji používají pro provedení zkušební metody nebo jako součást zkušební metody. Uživatel by měl zhodnotit všechny otázky a porovnat specifikace a požadavky dané zkušební soupravy, aby mohl posoudit její vhodnost. V části „Návrhy pro uživatele“ byste měli najít pomoc pro toto hodnocení.

Název zkušební soupravy:	Číslo šarže:	Datum hodnocení zkušební soupravy:
Název výrobce:	Datum výroby zkušební soupravy:	

Položky	Kritérium	Specifikace zkušební soupravy	Požadavek uživatele	Vhodnost pro daný účel?	Návrhy uživateli
1. Jaký je rozsah zkušební soupravy?	<i>1.1. Co je měřenou veličinou (veličinami)?</i>				Porovnejte identitu navrhované měřené veličiny s cílovou veličinou. Zkontrolujte podobnost chemické struktury, polaritu a kmen pro mikrobiologické metody, například kmen DNA v soupravách PCR, sekvence aminokyselin při testování alergenů atd.
	<i>1.2. Jaká je matrice?</i>				Vyhodnoťte podobnost kategorií, typů v rámci kategorií a odvětví. Zkontrolujte porovnatelnost chemického složení matrice pro chemickou analýzu, mikrobiologické zátěže v případě mikrobiologických analýz a přísad v případě analýzy DNA.
	<i>1.3. Jaký je pracovní rozsah?</i>				Zkontrolujte, zda je úroveň nebo pracovní rozsah zkušební soupravy v mezích cílové úrovně/pracovního rozsahu.
2. Je zkušební souprava validována?	<i>2.1.</i> <input type="checkbox"/> ANO <input type="checkbox"/> NE				<p>Je-li odpověď ANO, zhodnotit položky 2.2., 2.3., 2.4. a 2.5.</p> <p>Pokud je odpověď NE, proveďte úplnou validaci použití zkušební soupravy, viz bod 2.5., nebo vyhledejte alternativní zkušební soupravu.</p>
	<i>2.2. Která organizace provedla validaci?</i>				Zkontrolujte, zda validace byla provedena výrobcem nebo nezávislou organizací, a popište případně jejich příslušné osvědčení třetí stranou (např. akreditace zkušební laboratoře podle ISO/IEC 17025 nebo certifikace podle ISO 9001, schválení SVP).

Položky	Kritérium	Specifikace zkušební soupravy	Požadavek uživatele	Vhodnost pro daný účel?	Návrhy uživatelů
	2.3. Který návod/protokol byl použit pro validaci zkušební soupravy?				<p>Níže jsou uvedeny příklady přijatelných návodů/protokolů;</p> <ul style="list-style-type: none"> • IUPAC, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (Technická zpráva IUPAC) [12] • Pokyn Eurachem: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (3rd ed. 2025). • ICH, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R2), Adopted November 1st, 2023 [13] • ISO 16140, Microbiology of the food chain-Method validation [102] • AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces [103] • NordVal International Protocol for Validation of Microbiological alternative (proprietary) methods against a reference method-Protocol No.1 [104] • Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards [105]
2. Je zkušební souprava validována?	2.4. Které výkonnostní charakteristiky byly hodnoceny?				<p>Příklady výkonnostních charakteristik, které by mohly být relevantní, jsou:</p> <p>Kvantitativní analýza;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Selektivita • Mez detekce (LOD) • Mez stanovitelnosti (LOQ) • Pracovní rozsah • Analytická citlivost • Pravdivost • Preciznost • Robustnost <p>Kvalitativní analýza;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stanovení mezní koncentrace • Diagnostická citlivost • Diagnostická specifita <p>Zkontrolujte, zda jsou požadované charakteristiky výkonnosti zahrnuty ve validaci.</p>

Položky	Kritérium	Specifikace zkušební soupravy	Požadavek uživatele	Vhodnost pro daný účel?	Návrhy uživatelů
					<p>Jako minimum je třeba prokázat hodnocení následujících charakteristik výkonnosti</p> <p>Analytické kvantitativní metody;</p> <ul style="list-style-type: none"> • Přesnost (pravdivost a preciznost) • Pracovní rozsah <p>Mikrobiologické kvantitativní metody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Přesnost (relativní pravdivost a preciznost) • Selektivita (inkluzivita/exkluzivita) <p>Kvalitativní metody</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diagnostická citlivost • Diagnostická specifita
2. Je zkušební souprava validována?	<i>2.5. Existuje validační zpráva?</i>				<p>Zkontrolujte, zda validační zpráva potvrzuje prohlášení dodavatele o validaci zkušební soupravy.</p> <p>Pokud existuje přijatelná validační zpráva o zkušební soupravě, ověřte, zda lze dosáhnout hodnot vlastností pro vybrané charakteristiky výkonnosti a zda je to zdokumentováno ve zprávě.</p> <p>Pokud zkušební souprava není validována, musí být validace provedena jako pro interní metodu podle následujících dokumentů:</p> <ul style="list-style-type: none"> • IUPAC, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (Technická zpráva IUPAC) [12] • Pokyn Eurachem: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (3rd ed. 2025). • ICH, Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R2), Adopted November 1st, 2023 [13] • ISO 16140, Microbiology of the food chain-Method validation [102] • AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces [103] • NordVal International Protocol for Validation of Microbiological alternative

Položky	Kritérium	Specifikace zkušební soupravy	Požadavek uživatele	Vhodnost pro daný účel?	Návrhy uživatelů
					<p>(proprietary) methods against a reference method-Protocol No.1 [104]</p> <ul style="list-style-type: none"> Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards [105] <p>Nebo může být validace provedena nezávislou autorizovanou organizací, jako je například</p> <ul style="list-style-type: none"> AOAC INTERNATIONAL AFNOR NMKL-NordVal International SKUP
3. Stanovil výrobce nějaká omezení pro používání zkušební soupravy?					
4. Jsou známy nějaké interference, které by mohly omezit použití zkušební soupravy?					
5. Dodává výrobce kromě zkušební soupravy také kalibrátory, pufrovací roztoky, vzorky pro řízení kvality, CRM atd.?					Kromě provedení verifikační nebo validační studie je třeba provádět interní řízení kvality, aby se sledovala kvalita výsledků měření získaných při běžném používání zkušební soupravy.
6. Jsou-li kalibrátory dodávány, jsou k dispozici informace o návaznosti jejich hodnot?					Vyberte zkušební soupravu, která poskytuje výsledky s návazností na příslušnou referenční hodnotu.
7. Jsou známy nějaké problémy s komutabilitou?					
8. Jak dlouho trvá dokončení jednoho měření?					
9. Jaké konkrétní dovednosti se od obsluhy vyžadují?					
10. Kolik stojí použití zkušební soupravy k provedení jednoho měření?					
11. Je potřeba nějaké speciální vybavení?					
12. Jaká je doba použitelnosti?					
13. Jaké jsou podmínky skladování?					

Položky	Kritérium	Specifikace zkušební soupravy	Požadavek uživatele	Vhodnost pro daný účel?	Návrhy uživateli
14. Konečné posouzení: Je zkušební souprava vhodná?		<i>ANO</i> <input type="checkbox"/>			
		<i>NE</i> <input type="checkbox"/>			

Literatura*

(Aktualizované nejdůležitější odkazy naleznete v seznamu literatury Eurachem v sekci Publikace na webových stránkách Eurachem, www.eurachem.org/.)

- 1 ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva. [ČSN EN ISO/IEC 17025:2018, Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří, ČAS, Praha (2018).]
- 2 ISO 15189:2022 Medical laboratories – Requirements for quality and competence, ISO Geneva. [ČSN EN ISO 15189 ed. 3:2023, Zdravotnické laboratoře – Požadavky na kvalitu a kompetenci, ČAS, Praha (2023).]
- 3 ISO 15195:2018 Laboratory medicine – Requirements for the competence of calibration laboratories using reference measurement procedures, ISO Geneva.
- 4 R. Bettencourt da Silva and S. L. R. Ellison (eds.) Eurachem/CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis, Eurachem (1st ed. 2021). ISBN 978-0-948926-39-6. Available from www.eurachem.org. [KVALIMETRIE 27: Použití informací o nejistotě k posuzování shody, Výběr, použití a interpretace programů zkoušení způsobilosti, Posuzování výkonnosti a nejistota v kvalitativních chemické analýze. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2022 (ISBN 978-80-86322-16-2). Dostupné na www.eurachem.cz.]
- 5 J. N. Miller, J. C. Miller, R. D. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 7th ed., Pearson Education Ltd., 2018, ISBN 978-1-29218-671-9.
- 6 S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, T. J. Duguid Farrant, Practical statistics for the analytical scientist. A bench guide, 2nd ed., RSC Publishing, Cambridge, 2009, ISBN 978-0-85404-131-2.
- 7 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, www.bipm.org. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva. [TNI 010115, Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM), ČNI, Praha (2009). Výkladový slovník metrologie. On-line interaktivní zpracování Mezinárodního slovníku metrologie – Základní a obecné pojmy a související pojmy (VIM) (JCGM 200: 2012, 3. vydání; VIM3). Dostupné na www.unmz.cz/metrologie/slovniky/.]
- 8 V. J. Barwick (ed.), Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3, Eurachem, (2nd ed. 2023), ISBN 978-0-948926-40-2. Available from www.eurachem.org. [Kvalimetrie 29: Názvosloví analytického měření – Úvod do VIM 3, Kompetence chemické laboratoře. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2023 (ISBN 978-80-86322-18-6). Dostupné na www.eurachem.cz.]
- 9 ISO 9000:2015 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary, ISO Geneva. [ČSN EN ISO 9000:2016, Systémy managementu kvality – Základní principy a slovník, ÚNMZ, Praha (2016).]
- 10 ISO 9001:2015 Quality management systems – Requirements, ISO Geneva. [ČSN EN ISO 9001:2016, Systémy managementu kvality - Požadavky, ÚNMZ, Praha (2016).]
- 11 ISO online browsing platform (OBP), <https://www.iso.org/obp/ui/>.
- 12 M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report), Pure Appl. Chem., 2002, **74** (5), 835.

* (Pozn. překladatele: Informace o dostupnosti českého znění je uvedena za odkazem v hranatých závorkách.)

- 13 Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R2), Adopted November 1st 2023, www.ich.org.
- 14 F. Raposo and C. Ibelli-Bianco, Performance parameters for analytical method validation: Controversies and discrepancies among numerous guidelines, *TrAC* 2020, **129**, 115913.
- 15 ISO 80000-1:2022 Quantities and units – Part 1: General, ISO Geneva. [ČSN EN ISO 80000-1: 2023 Veličiny a jednotky - Část 1: Obecně, ČAS, Praha (2023).]
- 16 M. H. Ramsey, S. L. R. Ellison and P. Rostron (eds.) Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches. Second Edition, Eurachem (2019). ISBN (978-0-948926-35-8). Available from www.eurachem.org. [KVALIMETRIE 25: Nejistota vzorkování. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2020 (ISBN 978-80-86322-13-1). Dostupné na www.eurachem.cz.]
- 17 AMC technical brief No. 19, March 2005, M. Thompson (ed.), Terminology – the key to understanding analytical science. Part 2: Sampling and sample preparation, www.rsc.org.
- 18 Compendium of chemical terminology, 2nd ed. (the ‘Gold Book’). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. (<https://goldbook.iupac.org/>).
- 19 Compendium of terminology in analytical chemistry (‘Orange Book’), 4th edition, D. Brynn Hibbert (Ed), The Royal Society of Chemistry (2023), ISBN (print): 978-1-78262-947-4, <https://doi.org/10.1039/9781788012881>.
- 20 Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), JCGM 100:2008 (corrected version 2010), www.bipm.org. Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva.
- 21 S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.), Eurachem/CITAC Guide CG4: Eurachem/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurement, (3rd ed. 2012), ISBN 978-0-948926-30-3. Available from www.eurachem.org. [KVALIMETRIE 19, Stanovení nejistoty analytického měření. Editori M. Suchánek a D. Milde, 4. české přepracované vydání, Eurachem-ČR, Praha 2014, ISBN 978-80-86322-07-0. Dostupné na www.eurachem.cz.]
- 22 ISO 17000:2020 Conformity assessment – Vocabulary and general principles, ISO Geneva. [ČSN EN ISO/IEC 17000:2020, Posuzování shody - Slovník a základní principy. ČAS, Praha 2020.]
- 23 Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories, INAB Guide PS15, March 2019, www.inab.ie.
- 24 CLSI, User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline – 3rd ed. CLSI document EP15-A3. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2014, www.clsi.org.
- 25 AOAC Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis, 2002, www.aoac.org.
- 26 Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**(2), 331.
- 27 ASTM E1601-19 Standard practice for conducting an interlaboratory study to evaluate the performance of an analytical method, 2019, www.astm.org.
- 28 CEN/TR 10345:2013 Guideline for statistical data treatment of inter laboratory tests for validation of analytical methods, CEN Brussels.
- 29 ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parts 1-6, ISO Geneva. [ČSN ISO 5725, Přesnost (pravdivost a preciznost) metod a výsledků měření – Části 1-6, ČAS, Praha (2018-2025).]
- 30 V. Barwick (ed.), Planning and Reporting Method Validation Studies – Supplement to Eurachem Guide on the Fitness for Purpose of Analytical Methods, Eurachem (1st ed. 2019). Available from www.eurachem.org. [KVALIMETRIE 28: Akreditace a mikrobiologické laboratoře, Návod pro validaci metod. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2023 (ISBN 978-80-86322-17-9). Dostupné na <http://www.eurachem.cz>.]

- 31 Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 of 22 March 2021 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling. [Prováděcí nařízení komise (EU) 2021/808 ze dne 22. března 2021 o provádění analytických metod pro rezidua farmakologicky účinných látek používaných u zvířat určených k produkci potravin a o interpretaci výsledků, jakož i o metodách, které se mají používat pro odběr vzorků, a o zrušení rozhodnutí 2002/657/ES a 98/179/ES. Dostupné na <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN-CS/TXT/?from=EN&uri=CELEX%3A32021R0808.>]
- 32 H. Cantwell (ed.), Blanks in Method Validation – Supplement to Eurachem Guide ThFitness for Purpose of Analytical Methods, Eurachem (1st ed. 2019). Available from www.eurachem.org/.
- 33 ISO Guide 30:2015 Reference materials. Selected terms and definitions, ISO Geneva. [TNI POKYN ISO 30:2016, Referenční materiály – Vybrané termíny a definice ÚNMZ, Praha (2016).]
- 34 OMCL Network of the Council of Europe, PA/PH/OMCL (05) 47 DEF Validation of Analytical Procedures (2005).
- 35 SANTE/12682/2019, Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, EU Reference Laboratories (EURL) (2020).
- 36 EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2, Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency (EMA), (2011).
- 37 NMKL PROCEDURE No. 4 Validation of chemical analytical methods, Nordic Committee on Food Analysis, (2009).
- 38 Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption (2020).
- 39 Commission Directive 2009/90/EC (31 July 2009) laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status. [Směrnice komise 2009/90/ES ze dne 31. července 2009, kterou se podle směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/60/ES stanoví technické specifikace chemické analýzy a monitorování stavu vod. Dostupné na <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0090>]
- 40 AMC technical brief No. 17, July 2004, M. Thompson (ed.), The amazing Horwitz function, www.rsc.org/.
- 41 Regulation (EU) 2017/625 of the European Parliament and of the Council of 15 March 2017 on official controls and other official activities performed to ensure the application of food and feed law, rules on animal health and welfare, plant health and plant protection products (2017). [Nařízení evropského parlamentu a rady (EU) 2017/625 ze dne 15. března 2017 o úředních kontrolách a jiných úředních činnostech prováděných s cílem zajistit uplatňování potravinového a krmivového práva a pravidel týkajících se zdraví zvířat a dobrých životních podmínek zvířat, zdraví rostlin a přípravků na ochranu rostlin. Dostupné na <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0625.>]
- 42 M. H. Ramsey, P. D. Rostron, F. C. Raposo (eds.) Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Validation of Measurement Procedures that Include Sampling, Eurachem (2024). Available from www.eurachem.org/.
- 43 M. H. Ramsey, Challenges for the estimation of uncertainty of measurements made in situ. *Accred Qual Assur* 26, 183–192 (2021).
- 44 Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001), *Pure Appl. Chem.*, 2001, 73(8), 1381.
- 45 NATA – Technical report #17 – Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative methods, 2012.
- 46 E. Theodorsson, Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry, *Bioanalysis*, 2012, 4(3), 305.

- 47 AMC technical brief No. 37, March 2009, M. Thompson (ed.), Standard additions: myth and reality, www.rsc.org/.
- 48 H. Sahai, R. P. Singh, The use of R2 as a measure of goodness of fit: An overview, Virginia Journal of Science, 1989, **40**(1), 5.
- 49 Analytical Methods Committee, Uses (proper and improper) of correlation coefficients, Analyst, 1988, **113**, 1469.
- 50 D. A. Armbruster, T. Pry, Limit of Blank, Limit of Detection and Limit of Quantitation, The clinical Biochemist Reviews, 2008, 29, 49.
- 51 M. Valcárcel, S. Cárdenas, D. Barceló et al., Metrology of qualitative chemical analysis, report EUR 20605 EN, European Commission, 2002, ISBN 92-894-5194-7.
- 52 ISO 11843-1:1997/Cor 1:2003 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, ISO Geneva. [ČSN ISO 11843-1:1998, Detekční schopnost - Část 1: Termíny a definice, ČNI, Praha 1998.]
- 53 ISO 11843-2:2000/ Cor 1:2007 Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case, ISO Geneva. [ČSN ISO 11843-2:2001, Detekční schopnost - Část 2: Metodologie v případě lineární kalibrace, ČNI, Praha 2001.]
- 54 ISO 11843-3:2003 Capability of detection – Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used, ISO Geneva. [ČSN ISO 11843-3:2004, Detekční schopnost - Část 3: Část 3: Metodologie pro stanovení kritické hodnoty odezvy bez použití dat z kalibrace, ČNI, Praha 2004.]
- 55 ISO 3534 Statistics – Vocabulary and symbols – Parts 1-3, ISO Geneva. [ČSN ISO 3534 Statistika – Slovník a značky – Část 1-3, ÚNMZ, ČAS Praha (2010-2019).]
- 56 Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), Pure Appl. Chem., 1995, **67**, 1699.
- 57 L. A. Currie, Detection in analytical chemistry – Importance, theory, and practice, ACS Symposium Series 361, American Chemical Society, Washington, DC 1988.
- 58 Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, Analyst, 1987, **112**, 199.
- 59 A. Shrivastava, V. B. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, Chronicles of Young Scientists, 2011, **2**(1), 21.
- 60 United States Pharmacopeia, Validation of compendial methods, 26th revision, National Formulary, 21st ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2003.
- 61 Commission Regulation (EC) No 333/2007 (28 March 2007) laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of trace elements and processing contaminants in foodstuffs, Off. J. EU, L 88/29, 29 March 2007. [Nařízení komise (ES) č. 333/2007 ze dne 28. března 2007, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu obsahu olova, kadmia, rtuti, anorganického cínu, 3-MCPD a benzo[a]pyrenu v potravinách. Dostupné na <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R0333>.]
- 62 T. Wenzl, J. Haedrich, A. Schaechtele, P. Robouch, J. Stroka, Guidance Document on Estimation of LOD and LOQ for measurements in the Field of Contaminants in feed and food, JRC Technical Reports, 2016.
- 63 Commission Regulation (EC) No 657/2002 (12 August 2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. EU, L 221, 17 August 2002. [Rozhodnutí komise ze dne 14. srpna 2002, kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků. Dostupné na <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657>.]
- 64 H. Evard, A. Krueve, I. Leito, Tutorial on estimation the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review. Analytical Chimica Acta, (2016), 942, 23.

- 65 H. Evard, A. Kruve, I. Leito, Tutorial on estimation the limit of detection using LC-MS analysis, part II: Practical aspects. *Analytical Chimica Acta*, (2016), 942, 40.
- 66 Analytical Methods Committee No 92, Reporting and inference near the detection *Analytical Methods*, 2020, **12**,401.
- 67 M. Thompson, S. L. R. Ellison, Towards an uncertainty paradigm of detection, *Analytical Methods*, 2013, 5, 5857.
- 68 ISO 11732:2005 Water quality – Determination of ammonium nitrogen – Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection, ISO Geneva. [ČSN EN ISO 11732:2005, Jakost vod – Stanovení amoniakálního dusíku – Metoda průtokové analýzy (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí, ČNI, Praha 2005.]
- 69 A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson, Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, *Accred. Qual. Assur.*, 2007, **12**, 45.
- 70 D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002), *Pure Appl. Chem.*, 2002, **74**(11), 2201.
- 71 S. L. R. Ellison and A. Williams (eds.), *Eurachem/CITAC Guide: Metrological traceability in chemical measurement*, Eurachem, (2nd ed. 2019). ISBN: 978-0-948926-34-1. Available from www.eurachem.org. [KVALIMETRIE 24: Návaznost chemických měření, Metodický návod pro pořádání malých mezilaboratorních porovnání. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2019 (ISBN 978-80-86322-12-4). Dostupné na www.eurachem.cz.]
- 72 P. De Bièvre, R. Dybkaer, A. Fajgelj, D. Brynn Hibbert, *Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report)*, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**(10), 1873.
- 73 AMC technical brief No. 21, Sept. 2008, M. Thompson (ed.), The estimation and use of recovery factors, www.rsc.org/.
- 74 T. Linsinger, Application note 1, Rev. 3 2010. Comparison of a measurement result with the certified value, www.erm-crm.org. [https://crm.jrc.ec.europa.eu/graphics/cms_docs/erm1_czech.pdf]
- 75 ISO 33403:2024 Reference materials – Requirements and recommendations for use, ISO Geneva. [ČSN ISO 33403:2025 ČAS, Praha v tisku.]
- 76 B. Magnusson, T. Näykki, H. Hovind, M. Krysell, E. Sahlin, *Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories*, Nordtest Report TR 537 (ed. 4) 2017, www.nordtest.info.
- 77 ISO 21748:2017 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation, ISO Geneva.
- 78 Eurolab, *Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation*, Technical report No. 1/2007, www.eurolab.org. [EUROLAB TZ 1/2007 Revize nejistot měření: alternativní přístupy k vyhodnocení nejistot. Eurolab-CZ, Praha 2009, dostupné na <https://www.4e.cz/dokumenty.htm>.]
- 79 S. L. R. Ellison, A. Williams, *Measurement uncertainty: the key to the use of recovery factors? From “The use of recovery factors in trace analysis”*, M. Parkany (ed.), RSC, Cambridge, 1996, ISBN 0-85404-736-0.
- 80 V. J. Barwick, S. L. R. Ellison, *Measurement uncertainty: approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery*, *Analyst*, 1999, **124**, 981.
- 81 S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, *Estimating measurement uncertainty: Reconciliation using a cause and effect approach*, *Accred. Qual. Assur.*, 1998, **3**, 101-105.
- 82 G. E. O’Donnell, D. Brynn Hibbert, *Treatment of bias in estimating measurement uncertainty*, *Analyst*, 2005, **130**, 721.
- 83 B. Magnusson, S. L. R. Ellison, *Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 201.

- 84 D. Brynn Hibbert, E-H. Korte and U. Örnemark, Metrological and quality concepts in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2021), *Pure Appl. Chem.*, 2021, **93**, 997.
- 85 Y. Vander Heyden, A.Nijhuis, J. Smeyers-Verbeke, B.G.M. Vandeginste and D.L. Massart, Guidance for Robustness/Ruggedness Tests in Method Validation, *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Volume 24, Issues 5-6, 2001, 723-753. doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00529-X.
- 86 B. Dejaegher & Y. V. Heyden, Ruggedness and robustness testing, *Journal of Chromatography A*, 2007, **1158(1-2)**, 138–157. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.086.
- 87 W. J. Youden, E. H. Steiner, *Statistical Manual of the AOAC*, AOAC International, 1975, ISBN 0-935584-15-3.
- 88 Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Chapter 3 Review of the use of robustness and ruggedness in analytical chemistry. Editor(s): Margriet M.W.B. Hendriks, Jan H. de Boer, Age K. Smilde, *Data Handling in Science and Technology*, Elsevier, Volume 19, 1996, Pages 79-147.
- 89 B. Magnusson, H. Hovind, M. Krysell, U. Lund and I. Mäkinen, *Handbook – Internal Quality control*, Nordtest Report TR 569, 5th ed., 2018, Available from <https://www.nordtest.info>.
- 90 ISO 7870 Control charts – Parts 1-5, ISO Geneva. [ČSN ISO 7870, Regulační diagramy – Část 2, 4 a 6, ÚNMZ, ČAS, Praha 2018-2024.]
- 91 AMC technical brief No. 9, Feb. 2002, M. Thompson (ed.), A simple fitness-for-purpose control chart based on duplicate results obtained from routine test materials, Available from <https://www.rsc.org>.
- 92 ISO/IEC 17043:2023 Conformity assessment – General requirements for proficiency testing, ISO Geneva. [ČSN EN ISO/IEC 17043:2023, Posuzování shody – Obecné požadavky na kompetenci poskytovatelů zkoušení způsobilosti. ČAS, Praha 2023.]
- 93 B. Brookman and I. Mann (eds.), *Eurachem Guide: Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes*, Eurachem, (3rd ed. 2021). Available from www.eurachem.org. [KVALIMETRIE 27: Použití informací o nejistotě k posuzování shody, Výběr, použití a interpretace programů zkoušení způsobilosti, Posuzování výkonnosti a nejistota v kvalitativních chemické analýze. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2022 (ISBN 978-80-86322-16-2). Dostupné na <http://www.eurachem.cz>.]
- 94 EA-4/18 G: 2021, Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation, European co-operation for Accreditation, 2021. Available from www.european-accreditation.org. [EA-4/18 G:2021, Návod k určení úrovně a četnosti účasti ve zkoušení způsobilosti, ČIA Praha 2022. Dostupné na <https://www.cai.cz> Dokumenty ke stažení.]
- 95 ILAC-P9:01/2024, ILAC Policy for Proficiency Testing and/or Interlaboratory comparisons other than Proficiency Testing, 2024. Available from www.ilac.org. [ILAC-P9:01/2024 Politika ILAC pro zkoušení způsobilosti nebo mezilaboratorní porovnání jiná než zkoušení způsobilosti, ČIA Praha 2024, dostupné na <https://www.cai.cz> Dokumenty ke stažení.]
- 96 ISO 78-2:1999 Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis, ISO Geneva.
- 97 S. L. R. Ellison and A. Williams (eds.), *Eurachem/CITAC guide: Use of uncertainty information in compliance assessment*, Eurachem, (2nd ed., 2021). ISBN 978-0-948926-38-9. Available from www.eurachem.org/. [KVALIMETRIE 27: Použití informací o nejistotě k posuzování shody, Výběr, použití a interpretace programů zkoušení způsobilosti, Posuzování výkonnosti a nejistota v kvalitativních chemické analýze. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2022 (ISBN 978-80-86322-16-2). Dostupné na <http://www.eurachem.cz>.]
- 98 COMMISSION REGULATION (EC) No 152/2009 (27 January 2009) laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. [Nařízení komise (ES) č. 152/2009 ze dne 27. ledna 2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a laboratorního

- zkoušení pro úřední kontrolu krmiv. Dostupné na <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0152>.]
- 99 Eurachem leaflet: Treatment of an Observed Bias, Eurachem Measurement Uncertainty and Traceability Working Group, 2017. Available from www.eurachem.org/.
- 100 ISO 15796:2005, Gas Analysis – Investigation and treatment of analytical bias, ISO Geneva.
- 101 Codex Alimentarius Commission, Procedural manual 28th ed., 2023.
- 102 ISO 16140 series, Microbiology of the food chain-Method validation. Available from www.iso.org.
- 103 G. W. Latimer Jr., (ed.), AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces, Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, (22nd ed. 2023). Available from www.aoac.org.
- 104 NordVal International Protocol for Validation of Microbiological alternative (proprietary) methods against a reference method-Protocol No.1. Available from www.nmkl.org.
- 105 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards. Available from www.clsi.org.

KVALIMETRIE

30

2. část

Validace postupů měření, které zahrnují odběr vzorků

Doplněk k pokynům Eurachem Vhodnost analytických metod pro
daný účel a Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků

Pokyn Eurachem

Validace postupů měření, které zahrnují odběr vzorků

Doplňěk k pokynům Eurachem
*Vhodnost analytických metod pro daný účel
a Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků*

Společně připravili Eurachem, EUROLAB, CITAC, Nordtest a RSC
Analytical Methods Committee

Editoři

Michael H. Ramsey (University of Sussex, UK)
Peter D. Rostron (University of Sussex, UK)
Fernando C. Raposo (Portugalsko)

Složení pracovní skupiny*

Členové Eurachemu

Michael H. Ramsey (spolupředseda): University of Sussex, Velká Británie
Marios Kostakis (spolupředseda): Národní a Kapodistrijská univerzita v Aténách, Řecko
Fernando C. Raposo: Portugalsko
Patrizia Stefanelli: Istituto Superiore di Sanità, Itálie
Vassilis Zonaras: Ředitelství kontroly pesticidů a fytofarmacie, Kifissia, Attica, Řecko
Alex Williams Eurachem, Velká Británie
Perihan Yolcu Ömeroğlu Univerzita Bursa Uludag, katedra potravinářského inženýrství, Turecko
Nathalie Guigues: Laboratoire national de métrologie et d'essais, Francie

Členové EUROLAB

Andrea Paul: Bundesanstalt für Materialforschung und – prüfung (BAM), Německo
Fulvio Mattaliano: Chemická laboratoř TUV SUD, Itálie
Tatjana Tomić: Chorvatská společnost pro měření, Chorvatsko
Sandra Babić: Univerzita v Záhřebu, Fakulta chemického inženýrství a technologie, Chorvatsko

Člen CITAC

Ricardo Bettencourt da Silva: Univerzita v Lisabonu, Portugalsko

Člen Nordtest

Bertil Magnusson: Trollboken AB, Švédsko

Zástupce RSC AMC

Peter Rostron (tajemník): University of Sussex, Velká Británie
*V době schválení dokumentu

Tato publikace by se měla citovat jako:

M. H. Ramsey, P. D. Rostron, F. C. Raposo (eds.) Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC
Guide: *Validation of Measurement Procedures that Include Sampling, Eurachem* (2024). Dostupné
z www.eurachem.org.

Poděkování

Tento dokument byl vytvořen především společnou pracovní skupinou Eurachem/EUROLAB/ AMC ve složení (uvedeném vpravo) fungujícím v období 2021–2024. Editoři jsou též zavázáni dalším osobnostem a organizacím, kteří přispěli svou radou, komentáři a pomocí.

Lorens Sibbesen, Labquality International (DK) (do srpna 2023).

Zvláštní poděkování patří Lauře Martin a Martině Razzaboni (EUROLAB) za organizaci a pořádání online diskusního fóra.

Předmluva

Poznatek, že proces měření začíná, když je odebrán **primární vzorek** z materiálu, který má **vzorek** představovat (tj. **vzorkovaného objektu**), vyžaduje, aby i proces **validace** začal v tomto bodě. Tradičně byly primární **vzorkování** a chemická (nebo fyzikální) analýza považovány za dvě samostatné činnosti, často prováděné různými organizacemi s pracovníky, kteří z velké části nevěděli o činnostech druhého, a s různými přístupy k zajištění kvality dat. Validace analytických metod nebo analytických postupů, pokud se uvažuje izolovaně, je dobře zavedená [1]. Nové zhodnocení integrované povahy celkového procesu měření však dává příležitost spojit tyto dvě činnosti – odběr vzorků a analýzu do jednotného přístupu k validaci. Mnohé z výkonnostních charakteristik používaných při validaci analytické metody, např. **pracovní rozsah, analytická citlivost, selektivita**, nejsou obecně použitelné pro **postupy odběru vzorků**, ale nejistota spojená s výslednou naměřenou hodnotou, ačkoli v současné době není uznána jako charakteristika **postupu měření**, je ve skutečnosti nejdůležitější pro posouzení vhodnosti **pro daný účel**, a tedy platnosti celkového postupu měření.

Tento nový pokyn popisuje rozšíření zavedených validačních metodik s cílem poskytnout integrovaný přístup pro celkový proces měření, a proto *Validace postupů měření, které zahrnují odběr vzorků* (VaMPIS). Činí tak provedením realističtějšího odhadu **nejistoty měření** [2], včetně nejistoty měření, která vyplývá ze vzorkování [3], a používá ji jako klíčové měřítko pro posouzení vhodnosti pro účel postupu měření, a tedy výsledných hodnot měření. Tento přístup je stejně použitelný pro měření provedená *in situ* (tj. bez odebrání vzorku) a pro měření provedená *ex situ* (tj. ve zkušební laboratoři po dodání dříve odebraného vzorku). K vysvětlení, jak lze tento přístup použít pro postupy měření *in situ* a *ex situ*, slouží dva řešené příklady.

Vypracování tohoto pokynu proto vyžadovalo spolupráci mezi odborníky v obou oblastech validace analytické metody a nejistoty měření, zejména složky nejistoty měření vyplývající ze vzorkování (tj. nejistoty vzorkování). Těži také z komunikace se zaměstnanci pracujícími pro organizace, které provádějí odběr vzorků a/nebo analýzu, například prostřednictvím online diskusního fóra (organizovaného společností EUROLAB).

Souhrn

Tento pokyn si klade za cíl vysvětlit, jak validovat celý postup měření od okamžiku, kdy je primární vzorek vybrán (a obvykle odebrán) z konkrétního vzorkovaného objektu, až do uvedení výsledku měření. Spolehlivá interpretace výsledku měření, například pro posouzení **shody s mezemi** [2], vyžaduje nejen naměřenou hodnotu, ale také realistický odhad nejistoty měření s ní spojené. Je to nakonec nejistota měření, která shrnuje kvalitu naměřené hodnoty a sdružuje příspěvky ze všech složek postupu měření (odběr vzorků a analýza). Nejistotu měření lze proto použít k ověření celého postupu měření posouzením, zda je vhodný pro konkrétní zamýšlený účel (oddíl 1), za předpokladu, že i všechny ostatní výkonnostní charakteristiky analytické části postupu měření byly prokázány jako vhodné pro tento účel.

K validaci se přistupuje integrovaným přístupem, ve kterém jsou vzorkování, **příprava vzorků** a analytické kroky považovány za součásti celého procesu měření. Pokud je pro konkrétní kombinaci analytického a vzorkovaného objektu již specifikována cílová nejistota měření, lze skutečnou celkovou nejistotu měření a její hlavní složky odhadnout pomocí přístupů, jako je *duplikátní metoda* spolu s odhadem analytického **vychýlení (bias)** pomocí certifikovaných referenčních materiálů (CRM) [3]. Celková nejistota měření pak může být porovnána s *cílovou nejistotou* pro posouzení vhodnosti pro účel celého postupu měření. Jsou popsány možnosti nastavení cílové nejistoty pro konkrétní situaci. Pokud je skutečná nejistota měření nepřijatelně nad (nebo pod) cílovou nejistotou, mohou být složky nejistoty měření (např. vzorkování, příprava a analýza vzorků) přezkoumány (stejně jako jejich relativní náklady), aby se zjistilo, které složky mohou být nejlépe upraveny tak, aby dosáhly cílové nejistoty, a tím dosáhly vhodnosti pro daný účel (oddíl 2).

Pro vysvětlení, jak lze tento přístup k VaMPIS aplikovat, jsou uvedeny dva řešené příklady. V prvním z těchto příkladů (měření koncentrace dusičnanů v salátu) je aplikován *sekvenční přístup*. Dříve validovaný *ex situ* analytický postup (tj. analytická metoda) se používá k posouzení vhodnosti pro účel celého postupu měření, který zahrnuje vzorkování v terénu (podle postupu doporučeného Evropskou unií), tedy „integraci“ postupu odběru vzorků do stávajícího (v současné době pouze analytického) postupu měření. Cílová nejistota pro tuto situaci není externě specifikována, proto je vypočtena metodou *optimalizované nejistoty*^a. Ukázalo se, že stávající postup měření není vhodný pro daný účel, zejména kvůli složce nejistoty měření ze vzorkování. Například zvýšení počtu hlávek salátu použitých ve směsném vzorku z 10 na 40 **položek**, může snížit nejistotu měření na hodnotu, která je mnohem blíže k cílové hodnotě. Další snížení analytické složky nejistoty měření pod úroveň považovanou za vhodnou pro daný účel, pokud ji hodnotíme samostatně, může také dále pomoci dosáhnout vhodnosti pro účely celého postupu měření.

Druhý příklad používá přístup *simultánní (integrovaný)* k validaci celého postupu měření *in situ* (tj. vzorkování a analýza) pro olovo v půdě pomocí přenosného zařízení rentgenové fluorescenční spektrometrie (pXRF). Náhodná složka nejistoty měření se odhaduje pomocí duplikátní metody a systematická složka kromě analýz vhodného CRM též porovnáním hodnot měření *in situ* a *ex situ* na stejných vzorkovaných objektech. Porovnávají se dva různé přístupy k nastavení kritérií vhodnosti pro účel pro dva různé zamýšlené účely. Postup měření *in situ* je shledán vhodným pro účely geochemického mapování, ale ne pro posouzení shody s regulační prahovou hodnotou na tomto místě.

Je diskutována potřeba průběžného **řízení kvality** (QC, interní a externí) rutinní aplikace validovaných postupů měření (oddíl 3). Řízení celkového postupu měření je nezbytné, aby bylo možné účinně aplikovat VaMPIS. Tradičně některé organizace, které provádějí primární odběr vzorků, pracovaly s malou mírou komunikací s analytickými laboratořemi, které provádějí analytický postup a uvádějí výsledky měření. Aby bylo možné validovat celý postup měření a provádět průběžnou QC, musí být

^a Optimalizovaná nejistota je *hodnota nejistoty měření, která minimalizuje celkové náklady na provedení měření (včetně odběru vzorků) a důsledky, které vyplývají z účinků této nejistoty na rozhodnutí o shodě.*

zvýšena úroveň komunikace a efektivní spolupráce mezi všemi organizacemi odpovědnými za tyto činnosti (oddíl 4).

OBSAH

Předmluva	90
Souhrn	91
Seznam akronymů a zkratek	94
1 Úvod	95
1.1 Důvod vzniku pokynu	95
1.2 Cíl pokynu a komu je určen	95
1.3 Kontext pokynu	95
1.4 Pokyn Eurachem FPAM: Vhodnost analytických metod pro daný účel – Pokyn pro laboratoře k validaci metod	96
1.5 Pokyn Eurachem: Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků	96
1.6 Účel zahájení procesu měření	96
1.7 Co je validovaný postup měření a jak lze kvantitativně prokázat jeho vhodnost?	97
1.8 Terminologie	98
2 Přístupy	99
2.1 Zahrnutí postupů odběru vzorků do integrovaných postupů měření	99
2.2 Výkonnostní charakteristiky pro postupy měření, které zahrnují vzorkování	100
2.3 Validace postupů měření, které zahrnují vzorkování (VaMPIS) pomocí integrovaného přístupu, buď sekvenčního nebo simultánního	103
2.4 Metody in situ	110
2.5 Metody na místě	113
2.6 Validační zprávy a validační výkazy, které zahrnují vzorkování	113
3 Kroky následující po validaci	114
3.1 Průběžná validace	114
3.2 Řízení kvality jako nedílná součást průběžné validace	114
3.3 Monitorování procesu měření v čase prostřednictvím zřízení vhodných systémů IMQC	115
3.4 Účast v programech PT (včetně odběru vzorků)	116
3.5 Průběžné hodnocení kvalifikací vzorkařů	117
4 Zásady managementu	118
4.1 Management celého procesu měření	118
4.2 Organizace procesu měření	122
Příloha A – řešené příklady	124
Příklad A1: Dusičnany v salátu pěstovaném ve skleníku – sekvenční přístup k VaMPIS pomocí duplikátní metody	124
Příklad A2: <i>In situ</i> měření celkového olova v ornici – simultánní přístup k VaMPIS duplikátní metodou	132
Literatura	146

Seznam akronymů a zkratek

ANOVA	analýza rozptylu
AQC	analytické řízení kvality
BCR	Community Bureau of Reference
CRM	certifikovaný referenční materiál
CTS	mezilaboratorní porovnání odběrů
Df	stupně volnosti
EoL	očekávání ztráty
FPAM	Vhodnost analytických metod pro daný účel (pokyn Eurachem)
GPS	"Global Positioning System" (globální systém určování polohy).
GUM	Pokyn pro vyjadřování nejistoty měření
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ICP-AES	atomová emisní spektroskopie s indukčně vázaným plazmatem
IMQC	integrované řízení kvality měření
IMQCP	plán integrovaného řízení kvality měření
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MPT	zkoušení způsobilosti měření
NBS	National Bureau of Standards
NIST	Národní úřad pro normalizaci a technologie
pXRF	přenosná rentgenová fluorescence (spektrometr)
PT	zkoušení způsobilosti
QA	zajišťování (prokazování) kvality
QC	řízení kvality
QUAM	Stanovení nejistoty analytického měření (pokyn Eurachem)
RANOVA	robustní analýza rozptylu
RM	referenční materiál
RST	referenční vzorkovaný objekt
SPT	zkoušení způsobilosti pro odběr vzorků
SS	součet čtverců
VaMPIS	Validace postupů měření, které zahrnují odběr vzorků

1 Úvod

1.1 Důvod vzniku pokynu

Validace postupu měření se tradičně zaměřuje na analytickou složku tohoto procesu, která se obvykle provádí v laboratoři (tj. *ex situ*). Nicméně dochází k rostoucímu uvědomění si, že proces měření skutečně začíná v době, kdy je primární vzorek vybrán ze vzorkovaného objektu [3]. Tato koncepce se stává ještě jasnější, když je k měření na vzorkovaném objektu použito zařízení *in situ*, když se dříve zjevně oddělené kroky vzorkování a analýzy spojí do jednoho postupu měření. Důsledky této koncepce pro proces validace spočívají v tom, že musí být přepracována tak, aby zahrnovala všechny kroky postupu měření, včetně vzorkování a jakékoli fyzické přípravy nebo konzervace aplikované na tento primární vzorek. Spíše než se snažit jednoduše přidat vzorkování k tradičnímu přístupu pro analytickou validaci, je efektivnější použít nový *integrováný přístup* k validaci celého postupu měření. Tento integrováný přístup používá nejistotu hodnoty měření jako klíčové měřítko, které sjednocuje a kvantifikuje účinky *všech* kroků v postupu měření (vzorkování a analýza).

1.2 Cíl pokynu a komu je určen

Hlavním cílem tohoto pokynu je vysvětlit přístupy, které lze použít k validaci postupu měření, který zahrnuje primární odběr vzorků *celkově*, a také zdůraznit význam probíhajícího řízení kvality a otázek managementu. Pokyn je určen těm, kdo navrhují a validují postupy měření jako celý proces (*in situ* nebo *ex situ*), a zejména pro ty, kteří navrhují postupy odběru vzorků. Bude také užitečnou pomůckou pro ty, kdo rutinně provádějí postupy měření a monitorují průběžné prokazování kvality analytických měření, včetně odběru vzorků a analytických složek.

1.3 Kontext pokynu

1.3.1 Obecný kontext

Primární odběr vzorků a analýza (zkoušení) jsou často prováděny různými organizacemi. Historické oddělení lidí a organizací zapojených do těchto dvou složek celého procesu měření přináší několik problémů, které jsou popsány níže.

1.3.2 Pro validaci

Koncept a praxe validace je nyní dobře zavedena ve zkušebních (např. analytických) laboratořích, ale dříve byla zřídka formálně aplikována tak, aby zahrnovala postup odběru vzorků. Validace postupu odběru vzorků izolovaně, bez integrace s následným procesem analytického měření nebo zkoušení, je potenciálně zajímavá pro organizace zapojené pouze do odběru vzorků a byla akreditována některými akreditačními orgány. Důkazy o vhodnosti pro daný účel však nemohou být bez naměřených hodnot kvantitativní ani objektivní, jak to požaduje norma ISO/IEC 17025 [4] a některé akreditační orgány. Pokud jedna organizace provádí celý proces měření (tj. odběr vzorků a měření, ať už kvantitativní nebo kvalitativní [5]), pak je relativně snadné validovat celý proces. Pokud jsou však zapojeny dvě (nebo více) organizací, musí mezi nimi probíhat průběžná komunikace a spolupráce, aby bylo možné validaci provádět efektivně.

1.3.3 Pro regulační orgány

Pro regulační orgány musí existovat povědomí o tom, že spolehlivá rozhodnutí o shodě musí být založena na výsledcích měření z validovaných postupů měření (včetně odběru vzorků a analýzy/zkoušení). Tradiční předpoklad, že vzorek lze považovat za plně „reprezentativní pro daný vzorkovaný objekt“ (tedy za předpokladu zanedbatelné složky nejistoty odběru vzorků celkové nejistoty

měření), pokud je odebrán „správně“ a „správným“ postupem odběru vzorků, musí být kriticky zhodnocen.

1.3.4 Pro akreditační orgány

U akreditačních orgánů musí být definice postupu měření rozšířena tak, aby zahrnovala primární odběr vzorků a všechny kroky, které mohou nastat mimo zkušební laboratoř (např. konzervace vzorků, přeprava vzorků a jejich fyzikální příprava), jak vyžaduje kapitola 7.4.1 normy ISO/IEC 17025 [4]. Je třeba hledat kvantitativní důkazy k prokázání platnosti celého postupu měření, tedy včetně odběru vzorků a analýzy.

1.4 Pokyn Eurachem FPAM: Vhodnost analytických metod pro daný účel – Pokyn pro laboratoře k validaci metod

Pokyn Eurachem FPAM [1] je dobře zavedeným dokumentem, který popisuje kroky potřebné k validaci analytické metody (nebo přesněji postupu měření [6]), které musí být validovány posouzením vhodnosti pro účel výsledků měření. Používá odhady pro osm výkonnostních charakteristik^b analytických postupů, které se vyskytují po dodání „laboratorního vzorku“ do zkušební laboratoře (obrázek 1, poslední 3–4 kroky stínované světle šedé nebo nestínované). Čtvrtý krok fyzikální přípravy laboratorního vzorku obvykle probíhá v laboratoři, ale není vždy zahrnut do procesu analytické validace.

1.5 Pokyn Eurachem: Nejistota měření vyplývající z odběru vzorků

Pokyn Eurachem o nejistotě vzorkování [3] se primárně zabývá odhadem příspěvku nejistoty měření v důsledku procesu vzorkování (nejistota vzorkování) v kontextu celého procesu měření (obrázek 1, první 3–4 kroky, stínované tmavší šedou). Proces měření se považuje za zahájený, když je primární vzorek odebrán z vzorkovaného objektu (např. šarže, sada nebo objem materiálu), a za ukončený, když je uveden výsledek analytického měření. Pro validaci celého procesu měření je celková nejistota měření, která vyplývá z obou složek, vzorkování a zkoušení (např. chemická analýza), identifikována jako klíčový sjednocující parametr, který může být použit k rozhodnutí vhodnosti pro účel výsledných naměřených hodnot, a tedy k dosažení kvantitativní a transparentní validace.

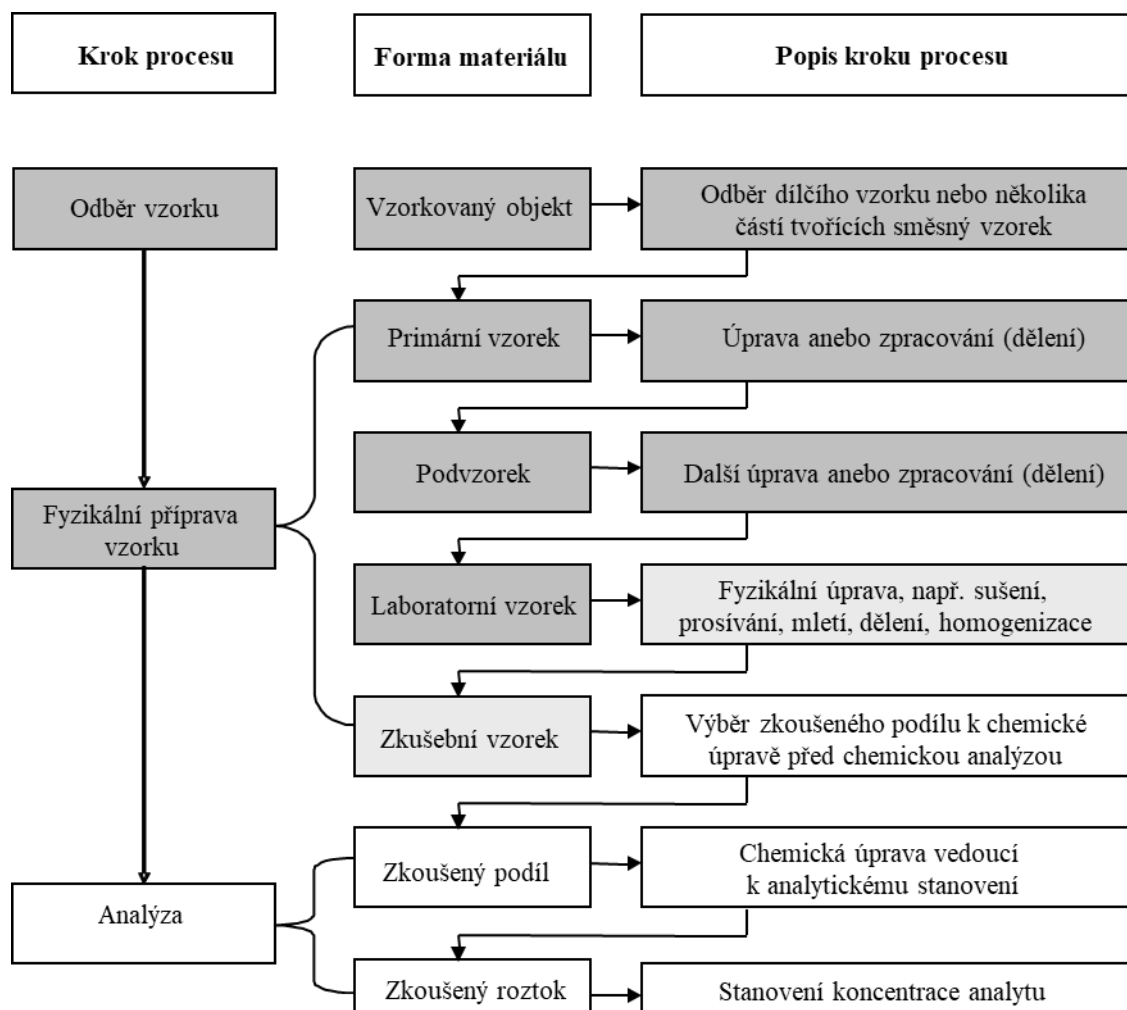
1.6 Účel zahájení procesu měření

Účelem procesu měření (včetně odběru vzorků a zkoušení, jako je chemická analýza) je umožnit uživateli výsledků měření přijímat spolehlivá rozhodnutí. Výsledek měření může být například použit při posuzování shody^c, aby se rozhodlo, zda je koncentrace analytu ve vzorkovaném objektu pod (nebo nad) danou regulační mezí. Každý výsledek měření se obvykle skládá ze dvou hodnot, odhadované hodnoty koncentrace a přidružené nejistoty. Nejistota měření musí být spolehlivě odhadnuta a musí být dostatečně malá, aby bylo možné učinit spolehlivé rozhodnutí, ale ne tak malá, aby byl postup měření nepřiměřeně nákladný. Postup měření lze považovat za validovaný, pokud lze prokázat, že je vhodný pro daný účel. Vhodnost pro daný účel je často definována z hlediska cílové nejistoty. Obecně platí, že cílová nejistota (která má zahrnovat složku nejistoty odběru vzorků) má být stanovena ve zvláštním předpisu nebo dohodnuta mezi zkušební laboratoří a jejím zákazníkem. Jednou z možností nastavení cílové nejistoty měření, pokud je požadována, je použití optimální nejistoty měření, která minimalizuje náklady na měření i potenciální náklady na nesprávnou klasifikaci (např. kvůli nesprávnému prohlášení o shodě, viz příloha A, příklady A1, A2 a příloha B). Dvě hlavní složky postupu měření, vzorkování a analýza, přispívají k celkové nejistotě měření. Validace se musí zaměřit především na celkovou

^bSelektivita, mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ), pracovní rozsah, analytická citlivost, pravdivost (vychýlení, výtěžnost), preciznost (opakovatelnost, mezilehlá preciznost a reprodukovatelnost), nejistota měření, robustnost.

^cTermín „posuzování shody-souladu (compliance assessment)“ je v tomto dokumentu obecně používán, ale uvedené techniky by byly obvykle stejně použitelné pro „posuzování shody (conformity assessment)“.

nejistotu měření, ale následně také na tyto dvě složky, což umožní dosáhnout cílové úrovně nejistoty měření nákladově nejefektivnějším způsobem.



Obrázek 1 - Schematický diagram celého typického procesu měření. Tmavě šedé rámečky ukazují kroky vzorkování, průhledné rámečky analytické kroky a světle šedé rámečky krok fyzikální přípravy, který lze zahrnout do obou kategorií v závislosti na plánu pokusů použitým pro validaci [3]

1.7 Co je validovaný postup měření a jak lze kvantitativně prokázat jeho vhodnost?

Postup odběru vzorků nelze validovat izolovaně, ale musí být chápán jako jedna složka jakéhokoli postupu měření. Jedním z důležitých faktorů je, že validace postupu měření poskytuje kvantitativní důkaz, že výsledné naměřené hodnoty splňují stanovené požadavky postupu měření. Například, pokud lze prokázat, že nejistota naměřených hodnot je vhodná pro daný účel (např. nejistota měření je dostatečně blízko cílové nejistoty). Validace bude vyžadovat určitý stupeň opakování pro odhad nejistoty jednotlivých naměřených hodnot. Rutinní aplikace validovaného postupu, a to i pro testování shody, nemusí nutně vyžadovat opakovaná měření.

Cílová hodnota nejistoty měření, jakkoli nastavená, může být použita pro kvantitativní validaci celého nebo *integrovaného* postupu měření, tedy včetně postupu odběru vzorků. Ověření postupu měření celého *integrovaného* postupu v jednom jediném procesu se nazývá simultánní přístup. Může se také stát, že analytický postup již byl validován izolovaně, a to buď validací v příslušné laboratoři, nebo *prostřednictvím* mezilaboratorní studie, kdy je několik laboratoří požádáno, aby striktně dodržovaly

stejný standardní pracovní (operační) postup. V této situaci lze použít *sekvenční* přístup, při kterém je postup odběru vzorků validován po analytickém (tj. zkušebním) postupu, aby se dosáhlo validace celého postupu měření. V tomto druhém případě by však validace analytického postupu měla být přezkoumána a potenciálně revidována v kontextu tohoto konkrétního celkového procesu měření (viz oddíl 2.1).

1.8 Terminologie

Pro účely tohoto doplňkového pokynu platí obecně definice uvedené v obou pokynech Eurachem [1, 3], v jiných případech je citován externí zdroj. Pojmy jsou v textu při prvním použití zobrazeny tučně.

Termín „postup měření“ se používá jak pro postup odběru vzorků, tak pro analytický postup, s občasným předcházejícím adjektivem „celý“ pro zdůraznění této situace. Analytický postup se používá (spíše než tradiční „analytická metoda“), aby odpovídal pojmu „postup měření“ použitému a definovanému ve VIM [6] (definice 2.6)^d, namísto „metody měření“, která obecně popisuje vybranou techniku [6]. Termín „proces měření“ se používá v širším smyslu, což odpovídá definici VIM „měření“ (definice 2.1)^e, obvykle s cílem zdůraznit proces spíše než výsledek.

Tento dokument a pokyn o nejistotě vzorkování [3] používají „odhad“ nejistoty měření na základě odhadované směrodatné odchylky. Pokyn QUAM [2] používá jak „odhad“, tak termín „hodnocení“, který se používá v GUM [7]. Ze statistického hlediska existuje skutečná (dosud neznámá) hodnota směrodatné odchylky a tím i nejistoty měření. Každá hodnota nejistoty měření je tedy pouze odhad s vlastním konfidenčním intervalem [8].

Pojem „koncentrace“, pokud není kvalifikován, by měl být chápán tak, že se vztahuje na jakoukoli z různých měr poměru nebo množství. Pokud text vyžaduje omezenou interpretaci, je „koncentrace“ kvalifikována (například jako „látková koncentrace“) nebo nahrazena konkrétnějším termínem (například „hmotnostní zlomek“).

^dPodrobný popis měření podle jednoho nebo více měřicích principů a dané metody měření založený na modelu měření a zahrnující jakýkoliv výpočet k získání výsledku měření.

^eProces experimentálního získání jedné nebo více hodnot veličiny, které lze rozumně přiřadit veličině.

2 Přístupy

2.1 Zahrnutí postupů odběru vzorků do integrovaných postupů měření

ISO/IEC 17025:2017 [4] stanoví jako obecný požadavek, že „metoda vzorkování se musí zabývat faktory, které mají být pod kontrolou, aby se zajistila platnost výsledků následného zkoušení“. Jinými slovy, postup odběru vzorků se musí zabývat všemi hlavními faktory, které mohou ovlivnit kvalitu vzorku odebraného z daného vzorkovaného objektu (např. **heterogenita** analytu, vlhkost, expozice slunečnímu záření, teplota, typ půdy, množství/objem vzorku atd.), a všemi dalšími faktory, které vznikají během balení a přepravy vzorků. Každý z těchto ovlivňujících faktorů musí být řešen a jejich možné účinky na jakékoli rozhodnutí o shodě musí být vyhodnoceny ve vztahu k jakýmkoli kritickým akceptačním mezím s použitím celkové nejistoty měření uvedené spolu s výsledkem měření pro každý primární vzorek.

Nejistota měření zahrnuje náhodné i systematické složky, přičemž druhé jmenované je obtížnější odhadnout. Základními prvky vzorkování je rozhodování o tom, kolik vzorků odebrat (kolik dílčích vzorků, pokud se používá **směsný vzorek** [3]), jakou hmotnost (nebo objem) vzorku odebrat (na dílčí vzorek) a kde a kdy odebrat vzorek (vzorky) z vzorkovaného objektu (podle konkrétního postupu odběru vzorků). Všechny tyto aspekty ovlivní vhodnost vzorku a tím i celý postup měření a následně vhodnost výsledných vzorků, které jsou buď předány do laboratoře nebo měřeny *in situ* přenosným zařízením nebo senzorem.

Validace postupů vzorkování musí tedy poskytnout objektivní důkaz, že jsou splněny požadavky na postup vzorkování (i když jsou integrovány do celého postupu měření, tedy včetně zkoušení popsaného níže) pro daný účel, což vede k tomu, že vzorky jsou vhodné pro měření/zkoušení (tj. *vhodné vzorky* pro tento účel). Celkovým požadavkem bude, aby byl odběr vzorků prokázán kvantitativně (tj. pomocí odhadů nejistoty měření), aby byl dostatečně reprezentativní pro původní vzorkovaný objekt [9].

Objektivní důkaz je stanoven nastavením kritérií přijatelnosti pro řadu výkonnostních charakteristik (viz oddíl 2.2) podle dané situace a prokázáním, že tato kritéria byla splněna. **Reprezentativní vzorek** je definován jako „vzorek vyplývající z postupu odběru vzorků, u kterého se očekává, že odpovídajícím způsobem reprezentuje sledované vlastnosti základního souboru“ [3]. Nedostatečná reprezentativnost je často vnímána jako převážně vyplývající z heterogenity analytu ve vzorkovaném objektu. V této souvislosti je však třeba zdůraznit, že může být také ovlivněna technikou použitou konkrétním vzorkářem a následnými změnami koncentrace sledovaného analytu (analytů) mezi okamžikem odběru primárního odběru a aplikací analytického postupu na laboratorní vzorek v důsledku faktorů, jako jsou nevhodné balení, nedostatečná kontrola důležitých provozních podmínek během přepravy nebo nesprávná manipulace operátora.

Existují výjimečné případy, kdy primární vzorek tvoří 100 % vzorkovaného objektu. V takovém případě složka nejistoty vzorkování nevyplývá z heterogenity analytu v rámci objektu, ale vyplývá z nevhodného balení/přepravy a změn v procesech přípravy, jako je skladování vzorků, filtrace atd. Tyto příspěvky k nejistotě lze někdy kvantifikovat pomocí terénních slepých vzorků.

Postup odběru vzorků lze kvantitativně validovat pouze jako součást celého procesu měření, protože vyžaduje naměřené hodnoty. Analytický postup (nebo „metodu měření“) lze posuzovat izolovaně, ale to vylučuje účinky všech kroků v postupu měření, které se vyskytují před analytickým krokem. Stupeň reprezentativnosti, který se odráží v nejistotě měření, lze považovat za důležitou výkonnostní charakteristiku procesu měření, jakmile tento proces zahrnuje vzorkování. Toto je dále rozpracováno v oddíle 2.2.

Některé postupy odběru vzorků pro konkrétní aplikace jsou popsány v příslušných legislativních dokumentech (např. nařízení Komise (ES) č. 152/2009, kterým se stanoví metody odběru vzorků a metody analýzy pro úřední kontrolu krmiv [10]). V současné regulační praxi, kterou se řídí generální ředitelství EK odpovědné za provádění těchto politik, jsou tyto postupy odběru vzorků výsledkem rozsáhlých diskusí mezi odborníky (z členských států EU, průmyslu, akademické obce atd.) po specializovaných cyklech zkoušení způsobilosti (PT), mezilaboratorních studiích nebo jiných výzkumných studiích. Tyto studie jsou organizovány tak, aby shromáždily dostatek důkazů pro konkrétní analytický problém, např. prokazující, že laboratoře jsou schopny spolehlivě měřit na nižších úrovních konkrétní **měřenou veličinu**, což účinně umožňuje regulačním orgánům stanovit zákonem dovolenou mez. V uvedeném nařízení se uvádí, že „*odběr vzorků pro úřední kontrolu krmiv, pokud jde o stanovení složek, doplňkových látek a nežádoucích látek, se provádí v souladu s metodami stanovenými v příloze I*“. Kromě toho se „*příprava vzorků pro analýzu a vyjádření výsledků se provádí v souladu s metodami stanovenými v příloze II*“ [10].

2.2 Výkonnostní charakteristiky pro postupy měření, které zahrnují vzorkování

Je zřejmé, že odběr vzorků musí být proveden v souladu se zdokumentovaným postupem odběru vzorků, včetně odebrání primárního vzorku ze vzorkovaného objektu, který jej obsahuje (a v případě potřeby konzervuje), přepravy do laboratoře a konečného skladování. Tento postup musí být proveden podle ISO/IEC 17025:2017 (kapitola 7.3) [4], podle plánu vzorkování, který specifikuje hmotnost nebo objem primárního vzorku, počet dílčích vzorků (v závislosti na očekávané nebo známé heterogenitě vzorkovaného objektu), místo (místa) a čas, typ a velikost kontejneru pro přepravu vzorků, podmínky během přepravy vzorku (kromě *in situ* nebo měření na místě) a jakýkoli druh konzervace. Tyto faktory mají být zváženy a optimalizovány při navrhování každého postupu odběru vzorků. Návrh postupu odběru vzorků závisí na vlastnostech vzorkovaného objektu (heterogenita analytů) a účelu odběru vzorků, a tedy na účelu celkového procesu měření.

Rozumí se, že některé z výše uvedených charakteristik mohou být identifikovány jako výsledek odborného úsudku (kompetentními vzorkaři/inspektory, kteří mají odpovídající zkušenosti/znalosti různých vzorkovaných objektů), které jsou následně validovány. Při rutinním používání mohou být vyžadovány drobné úmyslné odchylky od písemných postupů odběru vzorků vzhledem k podmínkám, za kterých jsou vzorky odebírány. V takovém případě má být provedeno také posouzení rizik s cílem odhadnout účinky těchto odchylek na kvalitu laboratorního vzorku a případně na výsledek měření a také na konečné rozhodnutí o shodě. Jakékoli odchylky mají být jasně zdokumentovány.

Kromě těchto záměrných odchylek postupu odběru vzorků může mít na vhodnost vzorku přicházejícího do zkušební laboratoře vliv i řada ovlivňujících faktorů (jak je uvedeno výše), a to v závislosti na skutečném provedení postupu odběru vzorků (a na vhodnosti postupu odběru vzorků). Při pohledu na celý proces měření (včetně vzorkování a analýzy) musí být použity takzvané výkonnostní charakteristiky pro celý postup měření.

Otázkou je, zda vzorkování jako součást celého procesu měření vyžaduje zvláštní pozornost věnovanou některé z těchto výkonnostních charakteristik (konkrétně včetně stupně reprezentativnosti vzorku). Pozorování jednotlivých výkonnostních charakteristik uvedených dále v této části pro každou charakteristiku jsou založena na informovaném úsudku, ale vyžadovala by speciálně navržené provádění pokusů, aby bylo kvantitativně prokázáno.

Pokyn Eurachem FPAM [1] předepisuje experimenty pro poskytování objektivních důkazů pro každou (relevantní) výkonnostní charakteristiku postupu měření. Důkazy musí být vyjádřeny pomocí specifických požadavků na kvalitu nebo výkonnostních charakteristik.

Kromě pracovní charakteristiky „selektivita“ je důkazem poskytnutým pro analytické metody obvykle kvantitativní míra ve formě směrodatné odchylky založené na výsledcích opakovaných měření (prováděných za specifických podmínek měření). Pro celý postup měření, který

zahrnuje vzorkování, musí objektivní důkazy zahrnovat všechny aspekty z validačních postupů, které již byly rozsáhle a komplexně popsány pro analytické metody [1].

Zahrnutí vzorkování do celého postupu měření však vyžaduje, aby byly zahrnuty některé další kroky. Ty byly popsány jinde [3]. Plánování pokusů má zahrnovat odhad nejistoty měření, včetně složky vyplývající z primárního odběru vzorků (tj. nejistoty vzorkování). To bude obvykle vyžadovat replikaci odběru vzorků (alespoň duplikaci) a každý z těchto nezávislých vzorků musí být analyzován pomocí nezávislých replik (alespoň v duplikátech), aby byla umožněna validace a tím zajištěno, že budou odebrány vhodné vzorky pro následnou analýzu.

Problém vzniká, když dva nezávislé orgány/organizace provádějí vzorkování a zkoušení odděleně. Tyto orgány musí spolupracovat a umožnit provedení výše uvedených plánů.

Při pohledu na celkový postup měření jsou **preciznost** a **pravdivost** (vychýlení) a následně nejistota měření spojená s výsledkem měření výkonnostními charakteristikami, u kterých lze očekávat, že budou mít největší vliv při zahrnutí vzorkování.

U studií preciznosti je důležité zahrnout vlivy všech relevantních ovlivňujících faktorů z odběrové části procesu.

Prohlášení o validaci, které posuzuje vhodnost pro účel (na základě objektivních důkazů) celého postupu měření (včetně vzorkování), se rozhodne na základě předem stanovených kritérií pro výkonnostní charakteristiky pro ty, které jsou ovlivněny při zahrnutí vzorkování.

V případě, že jedno nebo více z těchto kritérií není splněno, je jednou z možností zlepšit postup odběru vzorků po odlišném uspořádání vzorkování nebo zvýšením počtu dílčích vzorků ve směsném vzorku. Případně zlepšením analytického postupu podle toho, co je praktičtější a nákladově efektivnější.

Nejistota měření již byla diskutována jako kritérium pro posouzení vhodnosti pro účel celého postupu měření. Nejistota měření nebyla vždy zahrnuta jako výkonnostní charakteristika, protože byla považována za vlastnost výsledku měření, nikoli postupu měření [1]. Při použití definic VIM a) postupu měření a b) výsledku měření [6] lze odhad nejistoty měření považovat za součást postupu měření. Nejistotu měření lze tedy také považovat za další výkonnostní charakteristiku jakéhokoli postupu měření [11].

Následující výkonnostní charakteristiky, kromě nejistoty měření, mají být posuzovány individuálně ve vztahu k hodnocení vhodnosti postupu odběru vzorků, pokud jsou integrovány v rámci celého postupu měření:

- **Analytická citlivost**

„Změna odezvy přístroje, která odpovídá změně měřené veličiny (například koncentrace analytu), tj. gradientu odezvy křivky“ [1]. Tato důležitá výkonnostní charakteristika musí být zkoumána během vývoje postupu měření jako jeden z primárních faktorů ovlivňujících jeho analytický příspěvek k nejistotě, ne však příspěvek vzorkování;

- **Selektivita**

„Rozsah, v jakém může být metoda použita ke stanovení jednotlivých analytů ve směsích nebo maticích bez interferencí z jiných složek podobného chování“ [1]. Tato výkonnostní charakteristika se běžně posuzuje pomocí vhodného CRM (nebo vhodného RM nebo interního materiálu pro řízení kvality). Obecně lze předpokládat, že vzorkování neovlivní tuto výkonnostní charakteristiku metody;

- **Mez detekce, LOD / mez stanovitelnosti, LOQ**

„Nejnižší úroveň analytu, kterou lze detekovat při stanovené konfidenční úrovni“ (LOD), „nejnižší úroveň analytu, kterou lze kvantitativně stanovit s přijatelnou výkonností“ (LOQ) [1]. Vzhledem k tomu, že přijatelná výkonnost nutně zahrnuje preciznost a pravdivost, tj. nejistotu měření, může mít odběr vzorků vliv na LOD/LOQ. Pokud je vzorkování hlavní složkou nejistoty měření, může vzorkování zvýšit LOD/LOQ měřicího postupu (viz pracovní rozsah). To může nastat zejména v případě, když postup odběru vzorků vede ke kontaminaci. Vzorkování může LOD také snížit. Například pokud se pro stanovení koncentrace zlata odebírá

velké množství proudového sedimentu nebo půdy (např. 50 kg), pak lze efektivní LOD analytického postupu snížit použitím terénních předkoncentračních technik (např. rýžování) ke zvýšení počtu zrn zlata ve zpracovaném laboratorním vzorku, a tím potenciálně snížit složku nejistoty vzorkování k nejistotě měření;

- **Pracovní interval (formálně pracovní rozsah)**

„Interval, ve kterém metoda poskytuje výsledky s přijatelnou přidruženou nejistotou měření“ [1]. V závislosti na heterogenitě vzorkovaného objektu, ze kterého se odebírají primární vzorky, může být vzorkování hlavní složkou celkové nejistoty měření. V některých případech může vzorkování změnit pracovní interval metody, aby se nejistota měření spojená s výsledkem udržela v určitých přijatých mezích (pod nebo rovna přijaté cílové nejistotě), a proto obecně zvyšuje LOD/LOQ, a tím snižuje pracovní rozsah postupu měření.

- **Pravdivost**

„Těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaných naměřených hodnot veličiny a referenční hodnoty veličiny“ [6]. Analytickou složku pravdivosti lze odhadnout (jako analytické vychýlení) pomocí vhodného (např. dobře zvoleného) CRM/RM nebo dobře charakterizovaného vzorku řízení kvality nebo položky PT (se známými hodnotami množství). Postup odběru vzorků má být navržen tak, aby se minimalizovalo vychýlení vzorkování ([3], oddíl 10.2.4). Zbytkové nebo nezjištěné **vychýlení vzorkování** však také ovlivní vychýlení (pravdivost) celkového výsledku měření. To nebude zřejmé, pokud je pravdivost odhadnuta pomocí CRM (čímž se ignoruje složka vzorkování nejistoty měření). Pro zahrnutí vychýlení vzorkování do odhadu vychýlení měření je vyžadováno použití buď **referenčního vzorkovaného objektu** (reference sampling target, RST [12]) nebo výsledků *zkoušení způsobilosti pro odběr vzorků* (Sampling Proficiency Testing, SPT) [3] (nebo *mezilaboratorní porovnání odběrů* (Collaborative Trial in Sampling, CTS) [13]). Při měření plyných výfukových plynů se často provádí referenční měření každoročně na stejném zdroji, aby se vychýlení ověřilo.

- **Preciznost**

Vzorkování, pokud je kvantifikováno jako složka nejistoty měření, jistě ovlivňuje preciznost výsledku měření zvýšením, obvykle významně, pozorované variability, čímž se zvyšuje jak nepreciznost měření, tak nejistota měření spojená s jakoukoli naměřenou hodnotou (viz příloha A, příklady A1 a A2);

- **Robustnost**

„Míra schopnosti zůstat neovlivněn malými, ale záměrnými změnami parametrů metody“ [1]. Lze předpokládat, že tyto odchylky většinou souvisí s analytickou částí postupu měření. Vzorkování však může také významně ovlivnit robustnost, pokud vzorkaři nedodržují dobře popsany postup vzorkování (např. striktně nerespektují počet a velikost dílčích vzorků). Vzorkaři se často mírně liší v tom, jak používají postupy vzorkování (úmyslně nebo nevědomě, jak ukazují videozáznamy), což se často odráží ve skóre výkonnosti SPT. Postupy odběru vzorků pro některé (zejména heterogenní) vzorkované objekty nejsou dostatečně robustní, aby snížily účinky těchto rozdílů na výsledné hodnoty měření a jejich přidruženou nejistotu měření. Stupeň reprezentativnosti vzorku (a tedy měření) je kvantifikován nejistotou spojenou s hodnotami měření (tj. nejistotou měření). To zahrnuje příspěvky z preciznosti vzorkování a vychýlení vzorku (složka pravdivosti v důsledku vzorkování). Nejistota měření zahrnuje účinky jak heterogenity koncentrace analytu ve vzorkovaném objektu, tak i typických mírných odchylek od postupu odběru vzorků, kterých se vzorkaři dopouštějí. Přidání záměrnějších změn pravděpodobně není nutné, pokud se při validaci používá CTS nebo SPT (krok 3b níže), ale může být vhodné, pokud se používá duplikátní metoda. Posouzení vhodnosti pro účely celého postupu měření (tedy včetně odběru vzorků) lze dosáhnout porovnáním odhadované celkové nejistoty měření s cílovou nejistotou měření (viz oddíl 2.3 a příloha A, příklady A1 a A2).

2.3 Validace postupů měření, které zahrnují vzorkování (VaMPIS) pomocí integrovaného přístupu buď sekvenčního nebo simultánního

2.3.1 Všeobecný přístup

Validace postupu odběru vzorků v rámci postupu měření musí být kvantitativní, aby poskytovala „objektivní důkazy“, jak požaduje ISO/IEC 17025:2017 (kapitola 7.2.2.1, včetně poznámky 1) [4]. Toho lze dosáhnout jedním ze dvou způsobů; buď použitím a) sekvenčního nebo b) simultánního přístupu [14].

U sekvenčního přístupu (oddíl 2.3.2) již byl analytický postup/metoda validován pro specifikovaný analyt a zkušební materiál, čímž byly odhadnuty výkonnostní charakteristiky postupu měření [1] (bez ohledu na složku vzorkování).

U simultánního přístupu (oddíl 2.3.3) je analytický postup/metoda validován/a současně s postupem vzorkování, a proto považuje vzorkování za součást celého postupu měření. Tento druhý přístup je zvláště důležitý pro postupy měření *in situ*, kde jsou kroky vzorkování a analýzy účinně neoddělitelné (oddíly 2.3.3-6., 2.5 a případová studie v příkladu A2 přílohy A). Přehled validace je uveden na obrázku 2.

2.3.2 Sekvenční přístup k VaMPIS

Sekvenční přístup je použitelný pouze v případě, že zvolený analytický postup (tj. analytická metoda) je již validován pro specifikovaný analyt v materiálu obsaženém ve vzorkovaném objektu. Pokud tomu tak není, je třeba použít simultánní přístup (oddíl 2.3.3).

Popis 11 kroků tohoto validačního postupu (obrázek 2):

Krok 1: Specifikace měřené veličiny, která je předmětem zájmu jak z hlediska analytu, tak z hlediska vzorkovaného objektu (tj. část materiálu v určitém čase, kterou má (primární) vzorek představovat, např. šarže, sada nebo oblast). Ověřte, zda byla cílová nejistota pro celkový postup měření externě specifikována regulačním orgánem nebo zákazníkem (pro informování kroku 8).

Krok 2: Identifikace podrobného postupu měření navrženého pro specifikovaný analyt a typ vzorkovaného objektu. To by mělo zahrnovat postup odběru vzorků (např. případné použití směsných vzorků ke snížení složky nejistoty vzorkování k celkové nejistotě měření), jakoukoli fyzikální přípravu vzorku (např. sušení, prosévání, filtraci, mletí, štěpení, homogenizaci, přepravu) a vhodný analytický postup, který byl dříve validován (obrázek 1).

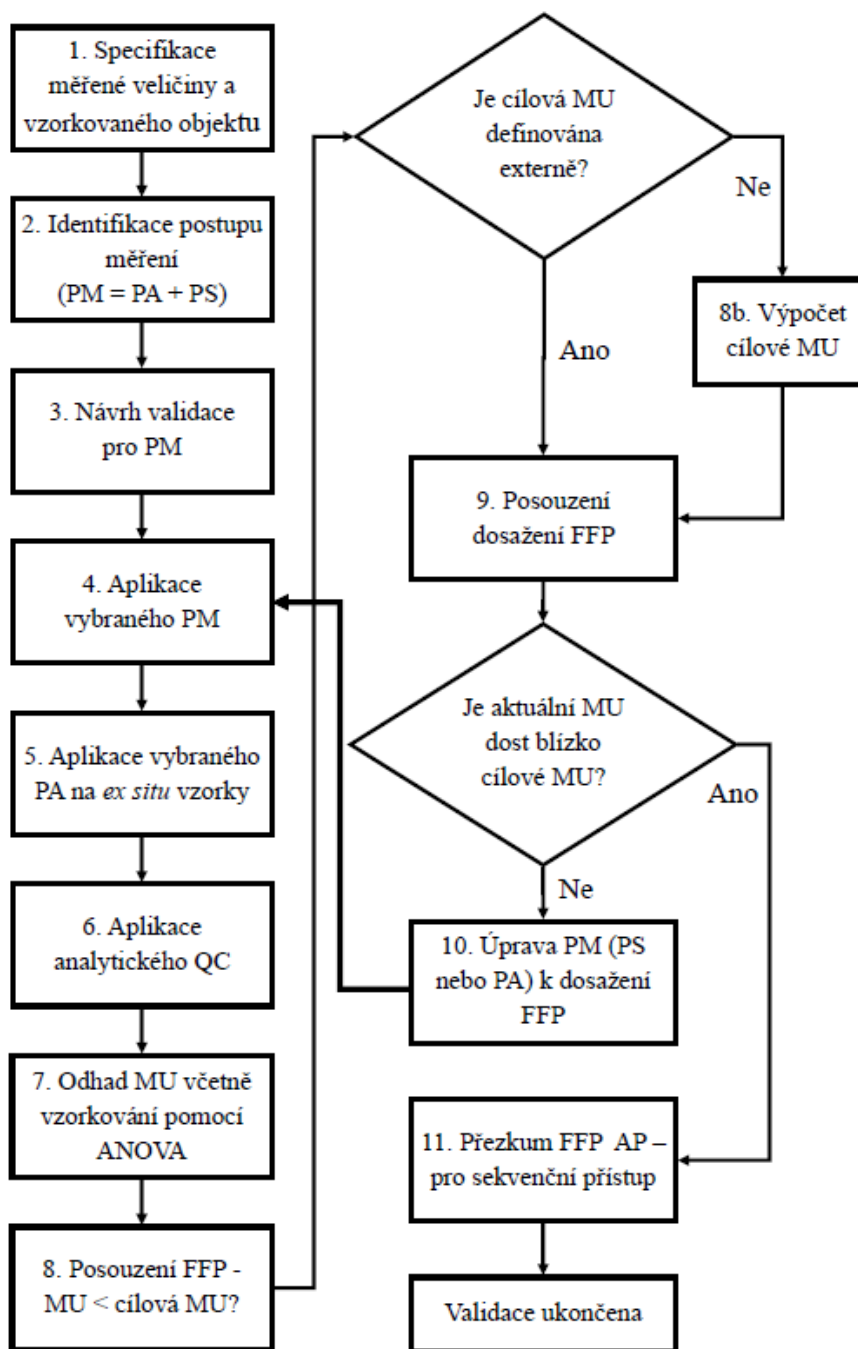
Krok 3: Návrh experimentů pro validaci postupu měření (včetně vzorkování a analýzy)

Vyberte duplikátní metodu [3], která má být použita jedním vzorkářem na každý vzorkovaný objekt, nebo pokud je to možné a vhodnější pro konkrétní organizaci (např. zkušební laboratoř) více vzorkaři. Vzorkování různých objektů může být provedeno dvěma nebo více vzorkaři stejně vyškolenými, za předpokladu, že obě poloviny každé dvojice vzorků jsou odebrány stejným vzorkářem.

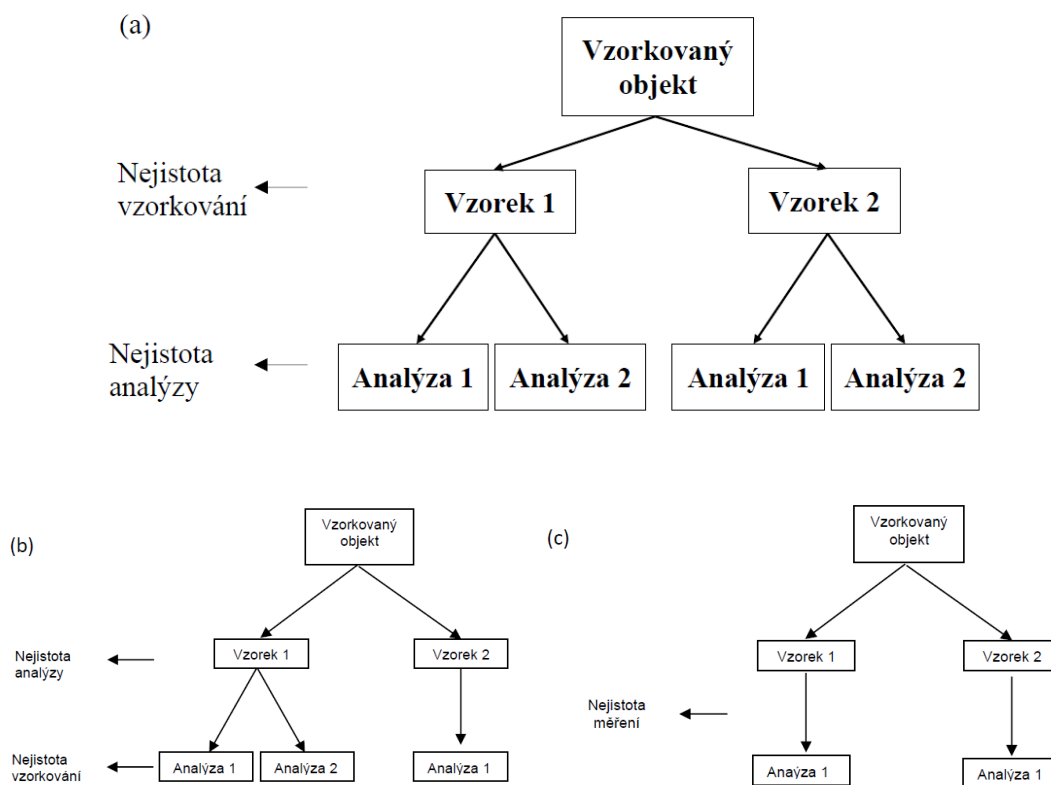
- a. Duplikátní metoda vyžaduje výběr nejméně osmi různých vzorkovaných objektů (které jsou vybrány jako typické pro zadaný typ). Každý vzorkovaný objekt je vzorkován dvakrát pomocí nezávislého nebo „čerstvého“ výkladu postupu odběru vzorků v úplné, nevyvážené nebo zjednodušené vyvážené strategii (obrázek 3 a, b nebo c). Příkladem této nezávislosti je odlišná, ale stejně pravděpodobná interpretace strategie „W“ v příkladu A1 přílohy A.
- b. Mezilaboratorní porovnání odběrů (CTS) vyžaduje použití alespoň jednoho typického vzorkovaného objektu (ale ideálně několika) a aby každý účastník přísně dodržoval stejný postup odběru vzorků. Takový objekt má být vzorkován duplikátně a nezávisle všemi různými vzorkaři pomocí speciální vyvážené strategie (obrázek 4 [13]). Tato možnost má tu výhodu, že do odhadu nejistoty

měření a do procesu validace zahrnuje vychýlení mezi vzorkaři (a potenciálně, pokud účastníci provádějí vlastní analýzy, vychýlení mezi laboratořemi). Pokud je heterogenita analytu v rámci vzorkovaného objektu převažujícím zdrojem nejistoty měření, může být dodatečný příspěvek z vychýlení mezi vzorkaři zanedbatelný.

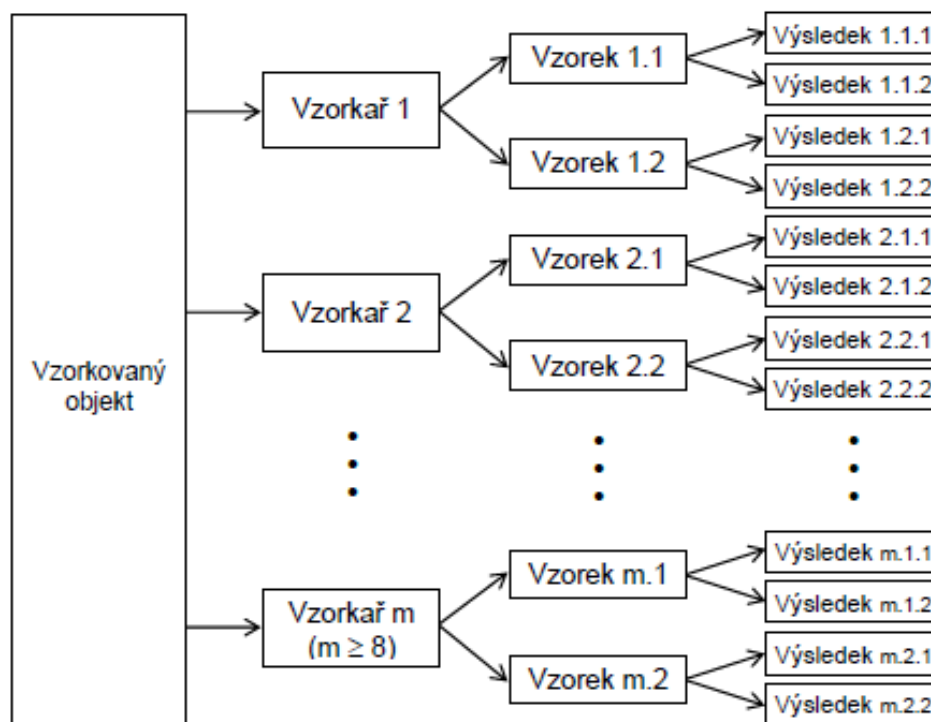
- c. V rámci obou těchto plánů pokusů je fyzikální příprava vzorku obvykle zahrnuta pod obecnou kategorii „odběr vzorků“. Pokud byl dříve identifikován jako potenciálně podstatný zdroj nejistoty měření, lze jej odhadnout samostatně pomocí rozšířeného plánu založeného také na duplikátní metodě [3, obr. D.1]. Případně lze nejistotu z některé fyzikální přípravy vzorku zahrnout pod kategorii „analýza“ provedením analýz duplikovaných zkušebních vzorků rozdělených ze stejného laboratorního vzorku spíše než na duplikovaných zkušebních podílů z jednoho zkušebního vzorku.
- d. Duplikátní metoda, SPT a CTS jsou příklady přístupů „shora dolů“, kde je záměrem zahrnout všechny příspěvky k nejistotě měření bez požadavku odhadnout tyto příspěvky individuálně. Otázkou pak je rozhodnout, který z obecných kroků v postupu potřebuje mít samostatný odhad svého příspěvku k nejistotě měření. Například duplikátní metoda automaticky zahrnuje složku nejistoty měření vyplývající z fyzikální přípravy vzorku (a všechny kroky před výběrem zkušebního podílu) pod záhlavím „vzorkování“. Složka přípravy vzorku by musela být odhadnuta samostatně pouze v případě, že by existovalo podezření, že je tak velká, že by vyžadovala důkaz, že její následné snížení by bylo potřebné k dosažení celkové vhodnosti pro daný účel [15].
- e. Existují metody pro odhad nejistoty měření (včetně nejistoty vzorkování) jako funkce koncentrace [16, 17], ale vyžadují mnohem více duplikátních vzorků v koncentračním rozsahu. Při použití duplikátní metody je relativní nejistota při koncentracích výrazně nad mezí detekce (tj. $> \times 10$) poměrně konstantní. Pod touto úrovní je absolutní nejistota spolehlivějším odhadem. Nejdůležitější koncentrační hladinou, na které lze odhadnout nejistotu měření, je regulační mez pro posuzování shody a validační experiment může být navržen tak, aby tento cíl řešil.



Obrázek 2 - Vývojový diagram pro kvantitativní a integrovaný VaMPIS (sekvenční nebo simultánní). Zobrazuje 11 hlavních kroků, kterými se posuzuje postup měření (PM), s jeho složkami postupu odběru vzorků (PV) a analytického postupu (PA). MU je nejistota měření, UfS je MU ze vzorkování, FFP je vhodnost pro daný účel. Převzato z [14]



Obrázek 3 - Plány pokusů použité pro odhad náhodné složky nejistoty měření (jako opakovatelnosti) pomocí duplikátní metody: (a) plná dvoustupňová hierarchická vyvážená, (b) nevyvážená, (c) zjednodušená strategie [3]



Obrázek 4 - Plán pokusů pro mezilaboratorní porovnání odběrů (SPT nebo CTS) [13]

Krok 4: Aplikace vybraného postupu měření, počínaje postupy odběru vzorků a fyzikální přípravy vzorků pro možnost *ex situ* (včetně terénních slepých vzorků a případně obohaceného zkušebního materiálu) na vzorkovaný objekt (objekty).

Krok 5: Aplikace vybraného analytického postupu na všechny primární vzorky odebrané pro možnost *ex situ*. Proveďte analýzy duplikovaných (a nezávislých) zkušebních podílů (nebo **zkušebních vzorků**) z obou duplikovaných vzorků v plně vyvážené strategii (pomocí buď duplikátní metody obrázek 3, nebo CTS obrázek 4).

Krok 6: Aplikace řízení kvality (integrovaně, tj. analýza a vzorkování) na všechna měření rutinním způsobem, včetně odhadu analytického vychýlení a jeho nejistoty (např. v případě potřeby aplikujte korekce na analytické vychýlení, slepé vzorky reagensů a terénní slepé vzorky).

Krok 7: Odhad celkové nejistoty měření použitím ANOVA na naměřené hodnoty (kde celková nejistota měření zahrnuje složky vznikající při odběru a analýze vzorků). Zahrňte odhad analytického vychýlení a jeho nejistoty do odhadu nejistoty měření. Před odhadem prozkoumejte pravděpodobnostní rozdělení naměřených hodnot, abyste rozhodli o nevhodnějším typu ANOVA (klasická nebo robustní) a zda je vyžadována logaritmická transformace (nebo případně jiný typ transformace dat). Další podrobnosti a zpracované příklady jsou k dispozici v příloze A a jinde [3].

Krok 8: Posouzení vhodnosti výsledků měření pro daný účel porovnáním odhadů jejich nejistoty měření s cílovou nejistotou [3].

- a. Může existovat externě nastavená cílová nejistota specifikovaná regulačním orgánem nebo zákazníkem (pomocí pokynů, např. [18]), vůči které lze odhadovanou nejistotu měření porovnat, aby bylo možné posoudit vhodnost pro účely výsledků měření.
- b. Cílová nejistota může být také vypočtena pro konkrétní analyt/vzorkovaný objekt (krok 8b) v závislosti na účelu měření buď pomocí procenta celkového rozptylu [3, oddíl 16.2] nebo metody optimalizované nejistoty. Podrobnosti o nich jsou uvedeny v příloze B, také v pokynu Eurachem o nejistotě vzorkování [3, oddíl 16.3], a reference [19, 20, 21].
- c. Vstupy požadované pro metodu optimalizované nejistoty zahrnují experimentální odhady nejistoty měření a její jednotlivé složky ze vzorkování (u_{smp}) a analýzy (u_{ana}). Vyžadují se také náklady jak na komponenty měření (odběr vzorků a analýzu), tak na potenciální důsledky falešně pozitivních nebo falešně negativních rozhodnutí o shodě pro vzorkovaný objekt. Celkové náklady z obou zdrojů jsou minimalizovány na optimální úrovni nejistoty měření, kterou lze použít jako cílovou nejistotu a která splňuje definici vhodnosti pro daný účel (teorie metody Optimalizované nejistoty je uvedena v příloze B a řešené příklady její aplikace jsou uvedeny v příloze A, příklady A1 a A2).

Krok 9: Posouzení, do jaké míry bylo dosaženo vhodnosti pro daný účel porovnáním experimentální nejistoty měření se známou nebo odhadovanou hodnotou cílové nejistoty (např. optimalizované nejistoty).

- a. Pokud je experimentální nejistota měření dostatečně blízko cílové nejistotě, lze celý postup měření považovat za vhodný pro svůj účel (tj. validovaný). Do jaké míry je aritmetický rozdíl mezi experimentální a cílovou nejistotou měření významný, lze posoudit statisticky [18, 22] nebo finančně porovnáním zbytkových nákladů (tj. očekávání ztráty) [19].
- b. Pokud se však experimentální nejistota měření podstatně liší od cílové nejistoty, je třeba přijmout opatření k dosažení vhodnosti pro daný účel. V tomto případě lze sekundární část metody optimalizované nejistoty použít k rozhodnutí, zda je nákladově efektivnější modifikovat buď metody odběru vzorků, nebo chemické analýzy, aby se dosáhlo optimální cílové nejistoty.

- c. Rozsah použitelnosti této validace a její potenciál pro měření na příbuzných plodinách je dále rozebrán v oddíle 2.6.

Krok 10: Úprava postupu měření pro dosažení vhodnosti pro daný účel (v případě potřeby)

Může být nákladově efektivnější snížit celkovou nejistotu měření úpravou postupu vzorkování tak, aby se snížil příspěvek u_{smp} , spíše než modifikovat analytickou metodu tak, aby se snížil její příspěvek. Typickým přístupem k snížení příspěvku u_{smp} nejistoty měření, a tedy celkové nejistoty měření, je zvýšení počtu dílčích vzorků použitých k vytvoření každého primárního směsného vzorku. Faktor, kterým lze zvýšit počet dílčích vzorků k dosažení vhodnosti pro účel lze teoreticky vypočítat a následně experimentálně testovat [23]. Řešený příklad je uveden v příloze A, příklad A1. Může se také stát, že dominantním zdrojem nejistoty měření, klasifikovaným jako u_{smp} během plánování pokusů (obrázek 3a) je fyzikální příprava vzorků, nikoli samotný odběr. V takovém případě lze použít modifikovaný plán pokusů k odhadu a sledování požadovaného snížení této složky [3, obrázek D1 a 15]. Pokud nejistotě měření dominuje analytická složka, je nákladově nejefektivnější snížit nejistotu analytického měření. To lze vyřešit zvážením nejvíce omezujících výkonnostních charakteristik [1]. Pokud je to například mez detekce, pak může být dostatečné tuto hodnotu nějakým způsobem snížit. Tam, kde jsou vzorkování i analýza stejně dominantními zdroji nejistoty měření, lze druhou část metody optimalizované nejistoty použít k posouzení, do jaké míry mohou být obě sníženy, aby bylo dosaženo cílové nejistoty co nejefektivněji.

Krok 11: Přezkum vhodnosti pro daný účel analytického postupu pro sekvenční přístup

V sekvenčním přístupu je analytická metoda již validována pro specifikovaný analyt a zkušební materiál. Je však možné, že nejistota měření vykázaná jako vhodná pro daný účel při izolované validaci analytického postupu (u_{ana}) se statisticky liší od nejistoty odhadnuté během integrované validace včetně odběru vzorků. Takové srovnání by měly umožnit konfidenční intervaly obou odhadů nejistoty měření [22], pokud jsou k dispozici.

Pokud je nejistota měření analytické metody odhadnutá izolovaně výrazně nižší než nejistota měření z integrovaného přístupu, pak by vyšší hodnota z integrovaného přístupu měla být považována za realističtější. Tato situace může nastat, protože nejistota měření z duplikátní metody zahrnuje příspěvek z heterogenity rutinního zkušebního materiálu (nikoli laboratorního vzorku), který je obvykle vyšší než u mnohem homogennějšího referenčního materiálu, který se tradičně používá pro tento účel při izolované validaci analytického postupu. Může však být také užitečné porovnat citovanou hodnotu u_{ana} s mezilaboratorní reprodukovatelností z mezilaboratorního pokusu (např. CTS), aby bylo možné posoudit, zda je první hodnota spolehlivě odhadnuta.

Pokud je optimalizovaná hladina u_{ana} z výpočtu optimalizované nejistoty výrazně menší než experimentálně odhadovaná hodnota, může být důvod pro snížení této hodnoty, například snížením analytické meze detekce. Alternativně, pokud je optimalizovaná hodnota výrazně větší než experimentální hodnota, pak může být důvod pro použití méně přesného (možná méně nákladného) analytického postupu, který má vyšší odhadovanou nejistotu měření. Zpracované příklady tohoto obecného přístupu, včetně metodiky optimalizované nejistoty a duplikátní metody, jsou uvedeny v příloze A, příklady A1 a A2.

2.3.3 Simultánní přístup k VaMPIS

V *simultánním* a integrovanějším přístupu je analytický postup (tj. metoda) validován jako součást celého procesu měření. Požadované kroky (obrázek 2) jsou obecně stejné jako kroky pro přístup sekvenční s několika výjimkami:

1. Tam, kde jsou obvykle zpočátku složky vzorkování a analýzy postupu měření zvažovány samostatně pro sekvenční přístup, mohou být často zvažovány společně pro

integrovanější simultánní přístup (zejména pro *měření in situ*). Plán pokusů duplikátní metody lze aplikovat v obou přístupech, aby bylo zajištěno integrované posouzení jak celého postupu měření, tak relativního přínosu jeho dvou hlavních složek;

2. Některé výkonnostní charakteristiky analytických složek postupu měření nelze snadno posoudit při simultánním přístupu, jak je popsáno v příkladech obsažených v tomto pokynu, např. analytická citlivost, mez detekce / mez stanovitelnosti, pracovní rozsah a robustnost. Široká vhodnost těchto výkonnostních charakteristik musí být stanovena v dřívějších experimentálních studiích, ačkoli jejich účinky v konkrétní aplikaci se odrážejí v odhadované nejistotě měření, která se používá k posouzení vhodnosti pro účel celého postupu měření.

Simultánní přístup by však mohl být také použit v případě postupu měření aplikovaného se sadou replikátů, v různých dnech (replikace v rámci každého dne), pomocí jednoho nebo více operátorů (pokud je to relevantní pro konkrétní zkušební laboratoř), na jednom nebo více přístrojích (pokud je to relevantní), měřením CRM nebo dobře charakterizovaného interního materiálu QC k posouzení pravdivosti a včetně různých objektů vzorkování (podle duplikátní metody, jak je popsáno).

Mnoho měřících postupů z důvodu jejich dlouhého trvání neumožňuje měření typicky 32 (nezávislých) analytických replikátů (obrázek 3a) za podmínek opakovatelnosti měření. Je nutné oddělit je, například provedením analýz pro dva vzorkované objekty každý den (např. $n = 8$ rozložené na 4 dny).

Tento simultánní přístup by byl schopen posoudit opakovatelnost, mezilehlou preciznost (včetně každodenní variability, variability operátora v rámci laboratoře a případně variability přístroje), pravdivost/vychýlení a celkovou nejistotu měření spojenou s výsledkem měření (při dodržení tohoto konkrétního postupu měření), včetně složky vzorkování.

Tento modifikovaný přístup není obecně použitelný pro postupy měření *in situ* v situacích, kdy existuje možnost časové variability koncentrace analytu v rámci vzorkovaných objektů;

3. V kroku 5, pokud je použit CTS, každý účastník provádí své vlastní chemické analýzy pomocí společného analytického postupu, který má být validován, spolu s měřením společného referenčního materiálu s odpovídající maticí. To umožní kvantifikovat mezilaboratorní analytické vychýlení (a další nejistotu měření, kterou generuje);
4. Analytická opakovatelnost (z ANOVA v kroku 7) poskytuje odhad této složky nejistoty měření (u_{ana}). Tato hodnota pak může být použita jako jeden parametr validace analytické části postupu měření. V této části validace může být rovněž nutné zvážit a potenciálně upravit další funkční charakteristiky (tj. selektivitu, mez detekce, mez stanovitelnosti, pracovní rozsah včetně linearitu), aby se dosáhlo integrované cílové nejistoty měření (včetně odběru vzorků a analýzy);
5. Tradiční cílová nejistota (TU) je obvykle nastavena pouze pro analytickou složku nejistoty měření (tj. TU_{ana}), ale v ideálním případě by to mělo být pro celé měření, které zahrnuje příspěvek odběru vzorků (tj. TU_{meas}). To může být nastaveno externě regulačním orgánem nebo dohodnuto se zákazníkem (pro konkrétní analytickou aplikaci) nebo pomocí interní metody, jako je *procento celkového rozptylu* ([3]) nebo *optimalizovaná nejistota* [3, oddíl 16.3] nastavená pro konkrétní zvažovaný případ.
 - a. Obecně platí, že pokud není zpočátku dosaženo TU_{ana} , lze informace o všech výkonnostních charakteristikách (uvedených v oddílu 2.2) použít k výběru nejúčinnějších charakteristik, které je třeba upravit, aby se daného cíle dosáhlo.
 - b. Pokud vzorkování přispívá dominantně k celkové nejistotě měření a náklady na odběr vzorků jsou mnohem nižší než náklady na chemickou analýzu, pak může být experimentální odhad u_{ana} nižší, než je požadováno pro splnění celkové cílové nejistoty měření. V takovém případě může být pro tento účel dostačující méně nákladná analytická metoda (např. použití kratší doby

počítání na detektoru spektrometru). Naopak za opačných okolností může být požadováno snížení u_{ana} (např. použití vnitřního standardu ve spektrometrii nebo výběr jiné analytické techniky s dolní mezí detekce);

6. *Simultánní* a integrovanější přístup je vhodný zejména pro *in situ* postupy měření, kde není z vzorkovaného objektu odebrán žádný fyzický vzorek. V tomto případě jsou oba procesy odběru vzorků a analýzy účinně neoddelitelné a integrovaný přístup k validaci je nezbytný. Lze použít stejné dva přístupy (krok 3), ale „**duplikátní vzorky**“ se provádí přemístěním měřicího zařízení *in situ* s prostorovou a časovou nejednoznačností implicitní v postupu měření (oddíl 2.4 s řešeným příkladem v příloze A, příklad A2).

Bez ohledu na přístup přijatý k validaci bude k monitorování nejistoty měření (a jejich složek u_{smp} a u_{ana}) vyžadován průběžný odběr vzorků a analytické QC, aby se zjistilo, zda se významně liší od hodnoty stanovené během validace, případně pomocí „meze opakovatelnosti“ [1, oddíl 6.6.3]. Podrobněji o tom bude pojednáno v oddíle 3.

2.4 Metody *in situ*

2.4.1 Validace metod *in situ* pomocí integrovaného přístupu

Měření, která jsou provedena *in situ*, nevyžadují odebrání fyzického vzorku, ale zahrnují umístění nějakého měřicího nebo snímacího zařízení na původní místo vzorkování.

Metoda měření začíná umístěním měřicího zařízení (např. senzoru) na konkrétní místo (na dotek nebo velmi blízko k danému objektu vzorkování) a v určeném čase, aby co nejlépe reprezentovalo uvedený vzorkovaný objekt. Výsledkem tohoto typu odběru vzorků je „virtuální vzorek“ s prostorovými rozměry a hmotností, které jsou obvykle určeny měřicí technikou a nemusí být operátoru přesně známy.

Zařízení pak analyzuje část vzorkovaného objektu. Analyzovanou část lze proto považovat za vzorek „*in situ*“, který byl „odebrán“, ale nebyl odebrán ani extrahován ze své původní polohy v prostoru a čase. Příklady metod *in situ* zahrnují senzory měřící, a) různé plyny v průmyslovém komíně, b) kontaminanty v toku vody (obojí po stanovenou dobu) nebo c) stopové prvky v ornici na stanovené ploše půdy.

Příkladem c) je přenosná rentgenová fluorescenční spektrometrie (pXRF), u níž se hloubka, a tedy hmotnost vzorku *in situ* bude lišit mezi různými prvky analytu (např. 1 až 320 mg) v závislosti na hloubce analýzy (např. kritická hloubka pronikání rentgenového záření) v daném zkušebním materiálu [24].

„Analytická“ část postupu měření je ve všech případech účinně neoddelitelná od části „vzorkování“. Všechny části postupu měření provádí stejná osoba (nebo přístroj) s malým jasným rozdělením mezi vzorkováním a analýzou, které jsou obvykle přítomny pro měření *ex situ* (kde je odebraný vzorek analyzován ve vzdálené laboratoři).

Virtuální vzorek navíc není připraven/zpracován (např. vysušen a/nebo homogenizován), jak je obvyklé u *ex situ* postupů nebo metod. V případě virtuálního vzorku se původní heterogenita koncentrace analytu nesnižuje, jako by tomu bylo v případě broušení vzorku *ex situ*, a proto je často příčinou zvýšeného příspěvku ze složky u_{sna} celkové nejistoty měření. Navíc tzv. přenosná nebo kapesní zařízení často nemají vysokou úroveň měřicí výkonnosti přístrojů *ex situ*, jako je rozlišení, spektrální rozsah, dynamický rozsah atd.

Validace postupu měření *in situ* v ideálním případě probíhá převážně na místě typického vzorkovaného objektu (např. „v terénu“). Často je však považováno za vhodnější otestovat analytické zařízení *in situ* (např. senzor) v laboratoři, ale tento test pak bude proveden za relativně ideálních podmínek, které nebudou napodobovat podmínky, ve kterých jsou rutinní měření prováděna. Jakákoli hodnota nejistoty měření odhadnutá výrobcem měřicího zařízení *in situ* je obecně pravděpodobnější jako odhad u_{ana} na základě vnitrolaboratorní opakovatelnosti

a vylučuje analytické vychýlení, mezilaboratorní vychýlení a často nejdůležitější je ignorování u_{smp} složky celkové nejistoty měření.

Laboratorní testy zejména nezahrnují interakci měřicího zařízení s reálným vzorkovaným objektem. Validace s certifikovaným referenčním materiálem by například vynechala odebrání vzorku *in situ* z typického vzorkovaného objektu, který je často značně heterogenní (jak laterálně, tak vertikálně).

Efektivní integrace vzorkování a analytických kroků do postupu měření *in situ* znamená, že upřednostňovanou možností je integrovaný přístup k validaci celého postupu měření (oddíl 2.3). Metody již popsané pro tento účel pro *ex situ* jsou s menšími úpravami široce použitelné, ale jsou také vyžadovány některé další kroky, jak je popsáno níže a v oddílech 2.4.2–2.4.4:

Management kvality vody. EN 17075 [25] popisuje požadavky a protokoly pro posuzování výkonnosti zařízení pro kontinuální měření používaných buď pro diskretní měření (přenosná zařízení), nebo v pevné poloze pro kontinuální měření kvality vody. Po posouzení výkonnosti v kontrolovaných podmínkách (metrologické výkonnostní charakteristiky a všechny relevantní faktory, které mohou ovlivnit měření) se doporučuje tříměsíční terénní ověření, které zkontroluje, zda zařízení pracuje v reálných podmínkách se stejnou výkonností. EN 17075 nepoužívá duplikátní metodu s ANOVA. Místo toho vyžaduje 24 párových měření (zařízení a referenční metoda) během terénní zkoušky. Poté se vypočítá devadesátý percentil rozdílů (v absolutní hodnotě pro kompenzaci pod/nad odhadem) a porovná se s hodnotou nejistoty měření odhadnutou za kontrolovaných podmínek;

Měření kvality ovzduší. ISO 20988:2007 [26] poskytuje komplexní pokyny a specifické statistické postupy pro odhad nejistoty včetně měření vnějšího ovzduší, emisí stacionárních zdrojů, vnitřního ovzduší, atmosféry na pracovišti a meteorologie. Na hraniční podmínky splněné při měření kvality ovzduší aplikuje obecná doporučení GUM [7]. Mezi uvažované hraniční podmínky patří měření rychle se měnící v čase, jakož i přítomnost vychýlení v řadě pozorování získaných za podmínek zamýšleného použití metod měření kvality ovzduší. Mezi uvažované metody měření patří:

- metody korigované na systematické účinky opakovaným pozorováním referenčních materiálů;
- metody kalibrované párovým měřením s referenční metodou;
- metody, které nejsou korigovány na systematické vlivy, protože ze své konstrukční podstaty eliminují vychýlení;
- metody, které nejsou korigovány na systematické vlivy při zamýšleném použití, které záměrně zohledňují vychýlení.

Experimentální data pro odhad nejistoty mohou být poskytnuta buď jediným plánem pokusů v přímém přístupu, nebo kombinací různých plánů pokusů v nepřímém přístupu.

2.4.2 Odhad opakovatelnosti duplikátní metodou

Při použití duplikátní metody (oddíl 2.3.2, krok 3) musí být odebrán duplikovaný „vzorek“ přemístěním měřicího/snímacího zařízení *in situ* pomocí nové interpretace pokynů pro umístění zařízení v prostoru a/nebo čase.

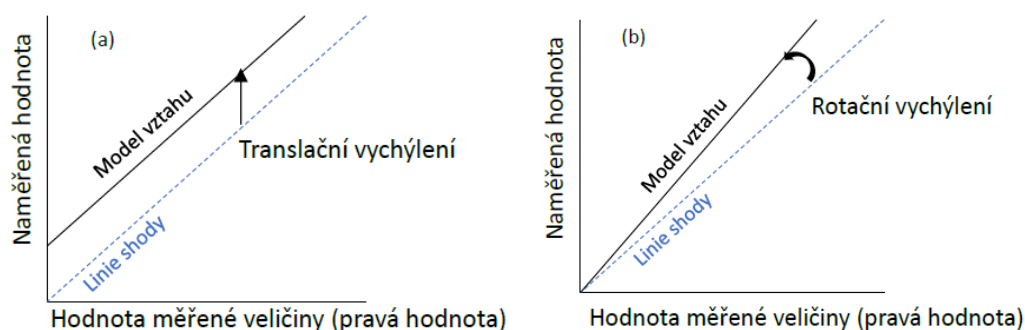
Plně vyvážená strategie (obrázek 3a) vyžaduje provedení dvou analýz pro obě duplikátní pozice „vzorku“. Alternativně lze provést pouze jednu analýzu pro oba duplikáty „vzorku“ ve zjednodušené strategii (obrázek 3c). V tomto druhém případě bude zapotřebí externí odhad složky u_{ana} , aby bylo možné oddělit příspěvek vzorkování (u_{smp}) od kombinované nejistoty měření (u_{meas}), která byla odhadnuta pomocí ANOVA (viz příklad A2). Čas ušetřený použitím této zjednodušené vyvážené strategie lze použít k měření většího počtu vzorkovaných objektů, a tím snížit konfidenční interval odhadů nejistoty měření.

2.4.3 Odhad analytického vychýlení

Odhad analytického vychýlení pro metodu použitou pro postup *ex situ* (obrázek 2, krok 6, např. pomocí vhodného matricového CRM) lze také aplikovat na měřicí zařízení *in situ*, ale tento postup obvykle podhodnocuje vychýlení měření *in situ* na skutečných vzorkovaných objektech. Mezi příčiny tohoto podhodnocení patří rozdíly mezi složením a vlastnostmi CRM a zkušebního materiálu (a vzorkovaného objektu) v důsledku problémů, jako je vlhkost, velikost zrna, heterogenita a drsnost povrchu [27].

Tyto složky systematických vlivů lze odhadnout tak, že se do validace zahrne srovnání s měřením *ex situ* provedeným na fyzických vzorcích odebraných na stejných místech jako měření *in situ*. Statistický model pak může být sestaven tak, aby popisoval vztah mezi hodnotami měření *in situ* a *ex situ*, přičemž umožňuje odhadnout nejistotu měření obou typů postupů měření.

Výsledný model poskytuje odhad vychýlení mezi oběma sadami měření, které má dvě složky (každá s vlastní nejistotou): pevnou hodnotu nazývanou translačním vychýlením (danou hodnotou úseku) a proporcionální složku nazývanou rotační složka (danou hodnotou směrnice, obrázek 5). Řešený příklad tohoto přístupu je popsán v příloze A, příklad A2.



Obrázek 5 - Schematické znázornění dvou složek vychýlení měření (např. pro metodu *in situ*) jako funkce koncentrace. Vychýlení (bias) je situace, kdy se všechny naměřené hodnoty liší od hodnoty měřené veličiny (tj. pravdivé nebo přijaté referenční hodnoty) buď a) o stejnou koncentraci pro translační vychýlení, nebo b) o násobek koncentrace pro rotační vychýlení. Hodnota měřené veličiny může být reprezentována buď certifikovanou hodnotou série shodných certifikovaných referenčních materiálů, nebo naměřenými hodnotami provedenými druhou „referenční“ metodou (například metodou *ex situ*)

2.4.4 Sladění měřené veličiny a vzorkovaného objektu

Před porovnáním měření *in situ* s měřením *ex situ* je důležité sjednotit specifikaci měřené veličiny i vzorkovaného objektu. Hodnota měřené veličiny (definovaná jako „veličina, která má být měřena“ [6]) odpovídá skutečné hodnotě koncentrace analytu ve vzorkovaném objektu. V případě olova v půdě (příloha A, příklad A2) metoda *ex situ* (ICP-AES po kyselém rozkladu) měří celkovou koncentraci olova v sušené, proseté a mleté ornici.

Naproti tomu metoda *in situ* (pXRF) měří také celkové olovo, ale v nezpracované půdě, která stále obsahuje vlhkost, biotu (např. kořeny rostlin), hrubozrnný materiál, který nespadá do definice „půdy“ (např. kameny o průměru > 2 mm) a pórové prostory. Dokonale sladit obě měřené veličiny může být nedosažitelné, ale protože lze rozdíly identifikovat, lze někdy sjednocení zlepšit. Pro příklad půdy, pokud je měřená veličina definována jako koncentrace hlášená na základě sušiny, lze toho dosáhnout měřením terénní vlhkosti půdy (ideálně sondou na každém místě) a korekcí. Podstatné snížení vychýlení měření bylo popsáno pomocí korekce vlhkosti [27].

Vzorkovaný objekt je také třeba co nejvíce sladit mezi oběma měřicími technikami. Pro uvedený příklad půdy je hloubka ornice tradičně odebraná pro *ex situ* analýzu 150 mm, zatímco kritická hloubka průniku *in situ* pXRF je pro olovo menší než 1,5 mm [27]. Tento nesoulad

bude důležitý, pokud se ukáže, že koncentrace analytu se mění s hloubkou, například při odhalení pomocí pXRF k měření koncentrace olova v půdě do hloubky 150 mm [27].

Alternativně lze hloubku vzorku *ex situ* snížit na 1 mm, ale výsledkem bude primární vzorek o nízké hmotnosti (např. ~ 0,5 g) a následně vyšší složka nejistoty vzorkování a větší celková nejistota měření pro měření *ex situ*.

2.5 Metody na místě

Metody na místě zahrnují odebírání vzorků a jejich analýzu „na místě“. Fyzický vzorek se odebírá ze vzorkovaného objektu, obvykle se nějakým způsobem připraví a poté se analyzuje v okolí, namísto jeho přepravy do vzdálené laboratoře. V podstatě se velmi podobají laboratorním tradičním měřením *ex situ*, s výjimkou místa, kde se analýza provádí, které je na místě spíše než ve vzdálené laboratoři.

Pro účely validace je proto postup v podstatě totožný s postupem popsaným pro *ex situ* postupy měření, které zahrnují vzorkování (oddíl 2.3). Jediným rozdílem je, že výkonnostní charakteristiky (včetně nejistoty měření) je třeba kvantifikovat měřením na místě, nikoli v laboratoři.

Podmínky na místě jsou obvykle variabilnější a méně kontrolovatelné než v laboratoři. Další faktory, které ovlivňují nejistotu měření, mohou být různé přístroje a snížený dohled personálu. To by mělo vést k měření s různými charakteristikami (např. složka u_{ana}), které je třeba kombinovat se složkou u_{smp} pro odhad celkové nejistoty měření, jak již bylo popsáno pro situaci *ex situ*.

2.6 Validační zprávy a validační prohlášení, které zahrnují vzorkování

Obecné požadavky na přípravu validační zprávy jsou popsány jinde [1, oddíl 5.3]. V případě *ex situ* měření je tento popis třeba rozšířit tak, aby zahrnoval dostatečné podrobnosti o všech krocích postupu měření, včetně primárního odběru vzorků, konzervace a fyzikální přípravy vzorku před přivezením do laboratoře. Pro měření *in situ* musí zpráva vysvětlit, jak bylo ve validovaném postupu měřicí zařízení umístěno u vzorkovaného objektu a kolik flexibility bylo umožněno při interpretaci tohoto postupu. Ve všech případech musí být výslovně uveden rozsah validace z hlediska cílového analytu a vzorkovaného objektu, pro který je postup použitelný. Například v případě *ex situ* stanovení dusičnanů v šaržích hlávkového salátu na poli (příloha A, příklad A1) by se validace vztahovala na podobné šarže mnoha tisíc hlávek salátu, ale ne nutně na jiné plodiny nebo hlávkový salát v maloobchodním prostředí. Pro *in situ* měření olova v ornici (příloha A, příklad A2) je validace pro geochemické mapování použitelná pro toto konkrétní zkušební místo, ale nebyla by automaticky přenosná na jiné kontaminované půdní lokality bez důkazů řízení kvality na podporu této širší aplikace.

3 Kroky následující po validaci

3.1 Průběžná validace

Pro zajištění vhodnosti pro účel výsledků měření v rutinním provozu existuje velmi důležitý vztah mezi validací a průběžným řízením kvality postupů měření, které zahrnují vzorkování.

Validace postupu měření poskytuje objektivní důkaz, že zvolený postup měření je vhodný pro konkrétní účel. Dále validace poskytne informace o tom, které ovlivňující faktory jsou kritické a mají být popsány v postupu měření, zahrnujícího zkoušení a vzorkování, aby byla zajištěna platnost konečných výsledků měření. To umožní přípravu vhodného plánu řízení kvality, který bude zahrnovat všechny faktory, které je třeba sledovat. Validace je však jednorázová událost a nemůže zajistit, že metoda je vhodná pro účely běžného každodenního použití, protože podmínky během rutinního vzorkování a zkoušení se mohou lišit od podmínek během validace [1 a 3, oddíl 13.1]. Někdy mohou být provedeny některé změny, jako je zavedení nového zařízení nebo nového personálu nebo zlepšení metody, například v případě, že je třeba rozšířit (analytický) rozsah metody (včetně další matrice) nebo rozšířit pracovní rozsah na nižší (nebo vyšší) obsah analytu. V těchto případech má být určen vliv takových změn.

Průběžná validace zajišťuje, že postup měření zůstává validní během rutinního používání a je tak vhodný pro zamýšlený účel naměřených hodnot. Zahrnuje jak rutinní sledování postupu měření (tj. QC), tak hodnocení výkonnosti postupu po provedení změn, aby se zjistilo, zda je postup měření stále vhodný pro daný účel.

3.2 Řízení kvality jako nedílná součást průběžné validace

Řízení kvality (QC) má být prováděno během celého postupu měření. V ideálním případě po *integrovaném přístupu měření QC* (IMQC, tedy včetně vzorkování). Opatření QC jsou v laboratořích dobře zavedená a rutinně používaná. Kromě replikovaných analýz se zahrne replikovaný (např. duplikovaný) odběr vzorků, aby se ověřilo, zda je celková nejistota měření odhadnutá během počáteční validace stále použitelná. Replikované vzorky mohou být použity v integrovaném přístupu k současné kontrole složky nejistoty měření v důsledku vzorkování (u_{smp}) a složky analýzy (u_{ana}), buď jako u_{meas} , nebo jednotlivě, v závislosti na použitém plánu pokusů. Mezi další možné QC materiály patří terénní slepé vzorky pro testování možné kontaminace vzorku a obohacené vzorky pro kontrolu stability analytu ve vzorku během přepravy a skladování. Pokud analytický postup zahrnuje rozsáhlou přípravu vzorku, může být terénní slepý vzorek a obohacené vzorky použité pro řízení kvality použity také jako kontrolní vzorky pro vyhodnocení vychýlení metody v integrovaném přístupu. Pro zajištění vhodnosti pro účely rutinní analýzy má být připraven a dodržován vhodný *integrováný plán řízení kvality měření* (IMQCP), který zahrnuje jak složky analýzy, tak vzorkování. Frekvence QC bude záviset na posouzení rizika, a pokud je riziko vysoké, doporučuje se vyšší frekvence řízení kvality.

Kdykoli dojde ke změně v odběrové nebo analytické části postupu měření, je nutné zkontrolovat, zda tato změna neovlivní její původní výkonnost. V integrovaném přístupu to lze provést přepočtem hodnoty u_{meas} po aplikaci zjednodušené vyvážené strategie (oddíl 2.3.2, obrázek 3c) včetně provedené změny a porovnat ji s u_{meas} odhadnutou během počáteční validace (pomocí integrovaného přístupu). Pokud se nová hodnota u_{meas} (opět s integrovaným přístupem) významně neliší od nejistoty měření odhadnuté během počáteční validace [22], lze metodu považovat za stále vhodnou pro daný účel a má být uváděna původní hodnota u_{meas} . V opačném případě má být celý postup revalidován.

Požadavky na průběžné validační parametry by měly být stejné nebo blízké požadavkům na počáteční validaci. Průběžná validace má být prováděna podle schváleného postupu a má být dobře zdokumentována. Všechny výsledky mají být analyzovány statistickými nástroji a poté mají být uvedeny jasné závěry.

3.3 Monitorování procesu měření v čase prostřednictvím zřízení vhodných systémů IMQC

Účelem vhodného řízení kvality měření (QC) je prokázat, že celkový postup měření je odpovídajícím způsobem kontrolován a vhodný pro zamýšlený účel. Program řízení kvality musí zahrnovat všechny podniknuté kroky, včetně například fyzikální přípravy primárních vzorků, aby bylo zajištěno, že vykázané výsledky měření jsou vhodné pro daný účel.

V integrovaném přístupu musí program IMQC zahrnovat také funkce, které budou pokrývat všechny kroky postupu odběru vzorků: příprava odběrových nádob, kontrola zařízení, vzorkování, přeprava, jakož i kompetence všech pracovníků provádějících vzorkování. Vzorkovací část programu IMQC obsahuje zdokumentované důkazy o tom, že:

- pracovníci provádějící odběr vzorků jsou kompetentní, odborně vyškolení a průběžně hodnocení způsobilosti vzorkaře (oddíl 3.5) se provádí podle předem naplánovaného návrhu a četnosti;
- postup použitý pro odběr vzorků a manipulaci s nimi je vhodný a validovaný;
- zařízení pro odběr vzorků je pravidelně udržováno a kalibrováno, pokud je to možné;
- úplná a bezpečná dokumentace vzorkování je dostatečná k zajištění logistické návaznosti a jedinečné identifikace vzorku.

Prvky IMQC pro vzorkování zahrnují odpovídající monitorování a řízení zdrojů nejistoty vzorkování (tj. jako složky celkové nejistoty měření), jako je heterogenita analytu v rámci vzorkovaného objektu, nestabilita a možná kontaminace primárního vzorku. Postupy IMQC musí umožnit účinnou detekci nejistoty vzorkování výrazně nad úroveň, která byla odhadnuta během validace, a poskytnout způsob, jak odmítnout neplatné výsledky měření vyplývající ze vzorkování, které nejsou vhodné pro daný účel.

Cíle integrovaného přístupu QC (IMQC) jsou:

- sledování celkové nejistoty měření (u_{meas}) a jejích složek (u_{smp} a u_{ana}), *pokud je to možné*, aby se potvrdilo, že se významně neodchylují od hodnot stanovených při validaci;
- monitorování kontaminace vzorků během odběru vzorků a manipulace s nimi (pokud je to možné);
- sledování stability primárních vzorků během přepravy a skladování.

Pokud validace ukázala, že neexistuje riziko nestability vzorku, lze tento aspekt vynechat, ale mělo by to být zdokumentováno ve validační zprávě.

Prvky interního řízení kvality mohou zahrnovat:

- použití referenčních vzorkovaných objektů (jsou-li k dispozici), referenčních materiálů nebo materiálů pro řízení kvality;
- použití alternativních přístrojů, které byly kalibrovány tak, aby poskytovaly návazné výsledky;
- kontrola (kontroly) funkčnosti zařízení;
- případné použití kontrolních nebo pracovních zkušebních materiálů s regulačními diagramy;
- průběžné kontroly měřicího zařízení;
- opakování zkoušek nebo kalibrací použitím stejných nebo různých metod;
- opakované zkoušení uchovaných zkušebních materiálů;
- korelace výsledků pro různé charakteristiky zkušebního materiálu;
- přezkoumání vykázaných výsledků;

- vnitrolaboratorní porovnání;
- zkoušení slepého zkušebního materiálu (slepých zkušebních materiálů).

Externí opatření pro řízení kvality mohou zahrnovat:

- mezilaboratorní porovnání (nebo porovnání mezi organizacemi), jako je mezilaboratorní porovnání odběrů (CTS) a zkoušení způsobilosti při odběru vzorků (SPT) (oddíl 3.4).

Data získaná z IMQC mají být zaznamenána takovým způsobem, aby bylo možné detekovat trendy, a pokud je to možné, mají být použity statistické techniky k analýze výsledků [3] a případně ke zlepšení výkonnosti laboratoře. Pokud se zjistí, že výsledky IMQC jsou mimo předem definovaná kritéria, mají být přijata na základě hodnocení rizik vhodná opatření, aby se zabránilo hlášení nesprávných výsledků [4].

V případě, že laboratoř/organizace provádí pouze vzorkování bez provedení jakýchkoli měření, není možné, aby tato organizace provedla validaci (oddíl 2.1) ani aby použila postupy IMQC, které poskytují kvantitativní výsledky, jako je monitorování nejistoty měření, kontaminace vzorku nebo stability vzorku. Nejlepším řešením v této situaci je, aby organizace odpovědná za odběr vzorků spolupracovala se zkušební laboratoří za účelem provedení integrované validace a následného IMQC.

Pro akreditaci vzorkování podle normy ISO/IEC 17025 [4], která popisuje obecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří, musí laboratoř potvrdit všechny požadavky související se všemi laboratorními činnostmi.

Program řízení kvality bude účinnější, pokud bude zahrnovat více než jednoho vzorkaře, aby byly vidět změny ve vzorkování, heterogenitě a preciznosti, inspekci v terénu a validaci zařízení.

V případě nesouladu mají být prošetřeny všechny odchylky.

3.4 Účast v programech PT (včetně odběru vzorků)

Přínosy pro kvalitu analytických dat z laboratoří, které se účastní programů zkoušení způsobilosti (PT), jsou nyní dobře známé. Rozšíření tohoto principu na celý postup měření zahrnutím postupů odběru vzorků a přípravy vzorků bylo teoreticky navrženo v roce 1995 [28] a v praxi bylo demonstrováno později v tomto roce.

Programy zkoušení způsobilosti pro odběr vzorků (SPT) byly od té doby přijaty v několika aplikačních sektorech. V některých případech však byly tyto kroky omezeny na primární kroky odběru vzorků.

Většina SPT může být účinně považována za programy *zkoušení způsobilosti měření* (MPT). Je to proto, že MPT vyžaduje replikaci celého postupu měření. Účastníci MPT (často nazývané SPT) jsou povinni nejen odebírat primární vzorky, ale také provádět fyzikální přípravu vzorků, stejně jako chemickou analýzu, i když je tato delegována na jinou organizaci.

Výsledky z SPT poskytují kvantitativní důkazy. Umožňují porovnání několika různých implementací daného postupu vzorkování, kdy každá z těchto implementací je prováděna jiným vzorkařem. Důležité je, že každý vzorkař SPT používá stejnou kombinaci analytu a vzorkovaného objektu. Informace poskytované SPT mohou být užitečné pro: a) školení nových vzorkařů; b) průběžné monitorování; c) zlepšení výkonnosti zkušenějších vzorkařů.

Kromě toho mohou výsledky SPT poskytnout návazné kvantitativní důkazy, které lze použít buď pro certifikaci vzorkařů, nebo pro akreditaci organizací pro odběr vzorků (např. podle ISO/IEC 17025 [4]). Výsledky SPT lze také použít k přísnějšímu odhadu složky nejistoty měření vyplývající ze vzorkování (nejistota vzorkování $u_{\text{sm}})$, která zahrnuje systematické účinky mezi různými vzorkaři. Tuto hodnotu pak lze porovnat s hodnotou nejistoty vzorkování, která byla odhadnuta v době validace (podle integrovaného přístupu). Pokud se zjistí, že je výrazně větší, pak by to naznačovalo, že buď a) postup vzorkování musí být přezkoumán a testován v další SPT, nebo b) validace musí být přezkoumána a v případě potřeby opakována nebo přehodnocena s novou hodnotou nejistoty odběru vzorků ($u_{\text{sm}})$.

Programy PT tradičně využívají velmi homogenní položky PT. To znamená, že tyto materiály nepotřebují další zpracování nebo dělení vzorku po odběru jednoho zkušebního podílu. V důsledku toho budou odhady nejistoty měření pravděpodobně podhodnoceny, protože ignorují další složky nejistoty měření, které by obvykle vznikly z dělení vzorku a zpracování terénního vzorku, např. sekání, sušení a homogenizace. Tato omezení lze překonat, pokud je z výsledků SPT odhadnuta složka u_{smp} celkové nejistoty měření, která a) zahrnuje replikaci všech postupů, které by byly použity pro reálný terénní vzorek; b) jsou získány z měření provedených na realisticky heterogenních objektech vzorkování, ideálně v terénních podmínkách.

Separace analytických PT a PT pro odběry vzorků může mít za následek vyloučení účinků, které vyplývají z celého postupu měření. Proto je třeba upřednostňovat integrované MPT. Po validaci celého postupu měření se pomocí kroků popsaných v tomto dokumentu doporučuje účast v MPT za účelem sledování způsobilosti praktické realizace celkového postupu měření.

3.5 Průběžné hodnocení kvalifikací vzorkařů

Vzorkař má dokumentovat svou kompetenci týkající se vzorkování obecně a vzorkování těch matric, na které se vztahuje rozsah postupu odběru vzorků. Kompetence by mohla být získána a udržována účastí na teoretických a praktických a/nebo odborných kurzech, seminářích, zkušenostech, školení na pracovišti pod vedením zkušeného vzorkaře a účastí v SPT, pokud je k dispozici (oddíl 3.4), a případně certifikací vzorkaře [29, 30].

Mezi požadované technické dovednosti patří porozumění alespoň: účelu odběru vzorků; vzorkování jako součásti procesu měření a jeho příspěvku k nejistotě měření; zásadám technik odběru vzorků; omezení zařízení; kontrole zařízení; kalibraci a údržbě; praktickému odběru vzorků a dílčímu odběru vzorků; zásadám skladování a přepravy vzorků včetně správných materiálů vzorkovnic a rizikům křížové kontaminace; a konečně vlivu kritických faktorů.

Sleduje se kvalita odběrových činností a následně výkonnost a kvalifikace vzorkařů (IMQC). Výkonnost a kvalifikace mají být rutinně hodnoceny definováním průběžného specifického procesu dohledu. Dohled má být v ideálním případě založen na kvantitativních, ale také popisných údajích o výkonnosti získaných během vzorkování, včetně údajů o řízení kvality, průběžných pravidelných školení a shrnutí shody. Posledně jmenované popisné prvky jsou zvláště důležité v případě činností odběru vzorků, které neprovádí zkušební laboratoř. V případě potřeby může být hodnocení výkonnosti založeno také na namátkových kontrolách ve formě pohovorů a/nebo inspekce.

Frekvence hodnocení kvalifikací vzorkařů může být pro osvědčené postupy provedena minimálně jednou za rok. Frekvence má však zohledňovat relevantní faktory, jako jsou změny příslušných norem a regulačních požadavků, rizika vyplývající z odběru vzorků nedostatečně vyškoleným nebo neškoleným operátorem/referentem a probíhající změny v technologii. Množství vzorkovací práce potřebné k udržení dostatečné úrovně zkušeností závisí na roli vzorkaře.

Účelem průběžného hodnocení je prokázat a ověřit znalosti a kompetence vzorkařů i v případě neočekávaných nebo neobvyklých okolností.

4 Záležitosti managementu

4.1 Management celého procesu měření

4.1.1 Obecně

Proces měření se skládá z několika kroků (shrnuto na obrázku 1). V průběhu přípravné fáze činností je nutné mezi zainteresovanými stranami vymezit osobu odpovědnou za celý proces měření. V ideálním případě má být za celkový proces měření odpovědný vedoucí laboratoře. Vzhledem k tomu, že dílčí odpovědnost za odběr vzorků a vhodnost vzorků se může lišit v závislosti na okolnostech, lze k určení oblastí odpovědnosti předem použít obecný rámec (tabulky 1a a 1b), který je zde uveden pro jeden konkrétní příklad. Aby byla zajištěna integrita vzorků, mají být identifikovány a zdokumentovány všechny kroky postupu odběru vzorků a musí být vytvořen tzv. „řetězec sledování“ (pro logistickou, nikoli metrologickou návaznost). Vzhledem k tomu, že odběr vzorků je většinou založen na jedné nebo více osobách, které jsou odpovědné za různé kroky v tomto procesu, je stejně důležité, aby byla role každé osoby jasně definována a určena před zahájením procesu a také aby byla jasně identifikována v řetězci sledování.

V závislosti na celkovém nastavení a účelu procesu měření (a jako takové jeho části odběru vzorků) mohou být zapojeny různé osoby v závislosti na konkrétní situaci (uvedené ve sloupcích tabulky 1).

Následující pododdíly identifikují několik odpovědností, které přebírají různé zúčastněné osoby na základě jejich role a jejich školení a zkušeností s výkonem této role.

4.1.2 Stanovení postupu vzorkování

Vzhledem k tomu, že postup vzorkování stanoví rámec pro skutečný odběr vzorků, který má být proveden, je zásadní, aby si ti, kteří přebírají odpovědnost za zavedení takových postupů a plánů, plně uvědomili jeho význam a účel vzorkování v rámci celého postupu měření. Navrhovatelé postupu odběru vzorků musí být lidé se znalostmi a zkušenostmi s ohledem na formu a podmínky vzorkovaného objektu, přestože se to má týkat i zákazníka. Často bude zapotřebí informací od odborníků z oboru (tabulka 1).

Pokud byl stanoven a externě validován postup odběru vzorků (např. regulačním orgánem nebo podobně), je tým pro odběr vzorků / měření odpovědný za dodržování tohoto postupu a použití IMQC podle potřeby.

Kromě toho má laboratoř provádějící následnou analýzu vzorků být konzultována ohledně jakýchkoli specifických požadavků. Organizace vzorkaře a zkušební laboratoře mají spolupracovat, aby dosáhly spolehlivých výsledků testování.

4.1.3 Primární odběr vzorků

Před naplánováním odběru vzorků musí být všechny relevantní informace sdíleny mezi zkušební laboratoř, vzorkaři a konečným zákazníkem/klientem. Informace musí být jasně uvedeny v dokumentu o postupu vzorkování, který bude mít za účel uvést správné informace jednou v terénu (tj. na **místě odběru vzorků**).

Tabulka 1 - Příklad struktury odpovědnosti za měření * ve fázi rutinního měření (po validaci): (a) celková odpovědnost vedoucího laboratoře, odběr vzorků prováděný laboratoři, (b) celková odpovědnost regulačního/kontrolního subjektu

(a) Externí zúčastněné strany	Klient						
Interní zainteresovaná strana		Manažer odběru vzorků	Laboratorní vzorkař	Interní kurýr	Příjem vzorku	Laboratoř	Vedoucí laboratoře
Celková odpovědnost Fáze měření							×
Žádost o odběr vzorků a shromažďování informací	×	×					
Návrh vzorkování (nebo výběr vhodného postupu odběru vzorků (ideálně předem validovaný))		×	×				×
Primární odběr vzorků (včetně <i>in situ</i> analýzy)	×		×				
Přeprava vzorků			×	×	×		
Ověření (vhodnost) a příjem vzorků			×		×		
Laboratorní analýza (včetně přípravy vzorku)						×	×
Kvalita konečného výsledku měření	×						×

(b) Externí zúčastněné strany	Klient			Kurýr balíku	Externí laboratoř
Interní zúčastněná strana		Inspekční orgán	Profesionální vzorkař		
Celková odpovědnost Fáze měření		×			
Žádost o odběr vzorků a shromažďování informací	×	×			
Návrh vzorkování (nebo výběr vhodného postupu odběru vzorků (ideálně předem validovaný))		×	×		×
Primární odběr vzorků (včetně <i>in situ</i> analýzy)	×		×		
Přeprava vzorků			×	×	×
Ověření (vhodnost) a příjem vzorků			×		×
Laboratorní analýza (včetně přípravy vzorků a validace analytického procesu)					×
Kvalita konečného výsledku měření	×	×(*)			

(*) musí probíhat průběžná komunikace a spolupráce mezi regulačním/kontrolním orgánem a vedoucím laboratoře, který je odpovědný pouze za analytickou složku, jakož i za poskytnutí důkazů o kvalitě vzorkování. Pokud validace procesu měření zahrnuje různé vzorkované objekty (nebo měřené veličiny), je nezbytné, aby validační zpráva obsahovala minimální požadavky, které jsou potřebné k tomu, aby byla validace účinná (např. kvalifikace personálu/pracovní pozice/odpovědnosti).

Minimální informace, které mají být uvedeny v rámci postupu odběru vzorků, jsou:

- rozsah měření, včetně:
 - rozsahu vzorkovaného objektu (v prostoru a/nebo čase);
 - definice měřené veličiny (včetně jednotek měření a toho, zda má být vykazována na základě původní/čerstvé nebo sušené hmotnosti);
 - příslušných platných právních předpisů a regulačních limitů pro posuzování shody (pokud existují).
- Analyt (analyty) nebo parametry, které mají být měřeny v laboratorním vzorku;
- veškerá měření nebo analýzy, které mají být provedeny v terénu (buď na místě, nebo *in situ*, tj. bez odebrání fyzického vzorku);
- podmínky konzervace vzorků a přepravy (např. skladovací teplota a/nebo atmosféra);
- hmotnost nebo objem vzorku (a počet dílčích vzorků, pokud jsou požadovány směsné vzorky);
- vzorkovnice (např. volně ložené, počet pytlů nebo sudů specifikovaného objemu a materiálu atd.);
- poznámky o očekávaném stupni heterogenity vzorkovaného objektu a možnou přítomnost subpopulací;
- konečná hmotnost nebo objem laboratorního vzorku;
- metody fyzikální přípravy primárního vzorku (v terénu nebo v laboratoři), např.:
 - rozměňování a/nebo pūlení;
 - dělení vzorku nebo snížení hmotnosti/pūlení;
 - sušení, prosévání, mletí, pūlení, homogenizace.
- počet zkušebních vzorků, zkušebních podílů a alikvotů, které mají být analyzovány;
- zkušební materiály QA/QC;
- jakékoli další relevantní informace;
- informace týkající se bezpečnostních podmínek v místě odběru vzorků a specifických požadavků, které je třeba vzít v úvahu při manipulaci se vzorky.

Technik odběru vzorků (vzorkař) se má se zákazníkem dohodnout na provedení odběru vzorků v podmínkách nejvhodnějších pro rutinní operace, například zamezení nepříznivým povětrnostním podmínkám nebo překrývání s jinými činnostmi, které by mohly ovlivnit účinnost celého postupu (vzorkování a zkoušení).

Vzorkař má tam, kde je to možné, také zajistit, aby veškeré zařízení používané pro odběr vzorků bylo dekontaminováno a ověřeno. Pokud jsou požadovány *in situ* nebo měřicí přístroje na místě, ověří, zda byly správně kalibrovány, a zajistí, aby byly pro ověření v terénu odebrány příslušné referenční materiály nebo zkušební materiály QC.

V terénu před provedením odběru vzorků vzorkař zajistí, aby byly dodrženy pokyny uvedené v dohodnutém postupu odběru vzorků. Pokud dojde k jakékoli odchylce (odchytkám) mezi postupem odběru vzorků a skutečnou situací v terénu, vzorkař si podle svého výcviku zvolí mezi:

- ověřením, zda stávající podmínky stále splňují minimální požadavek na provedení platného odběru vzorků a pokračováním v činnostech. V tomto případě musí vzorkař hlásit jakékoli podstatné odchylky ve zprávě o odběru vzorků;
- pozastavením činnosti a pokračováním v aktualizaci postupu odběru vzorků (po konzultaci se zákazníkem/klientem a laboratoři).

Během odběru vzorků musí být všechny relevantní informace popsány ve zprávě o odběru vzorků. Ta musí zahrnovat alespoň:

- identifikaci vzorkaře;
- datum, místo a čas měření a případně klimatické podmínky (např. při odběru vzorků v otevřeném terénu);
- odkaz na provedený postup odběru vzorků;
- podmínky cíle odběru vzorků: objemy, hmotnosti, nádoby, důkazy o možné kontaminaci atd.;
- počet a hmotnost/objem odebraných alikvotních podílů a jejich identifikaci (například uvedením čísla nádoby nebo uvedením použitého schématu odběru vzorků);

- postup homogenizace a redukce primárního vzorku (ve srovnání se specifikovaným, viz výše), je-li použito;
- použité nádoby a konzervační látky;
- jakékoli měření provedené v terénu (*in situ* nebo na místě) a identifikaci použitého zařízení;
- jakékoli odchylky od dříve dohodnutého postupu odběru vzorků.

Finální zpráva o odběru vzorků má být schválena (podepsána) zákazníkem.

Rovněž by bylo vhodné přiložit fotografickou dokumentaci zobrazující alespoň snímky vzorkovaného objektu, dílčích vzorků (aliquotů) před homogenizací a laboratorního vzorku.

Řetězec sledování by měl být také použit pro zasílání vzorku, hlášení podmínek transportu a sledování času.

4.1.4 Manipulace se vzorkem a jeho přeprava

V některých případech může laboratoř převzít odpovědnost za poskytnutí vhodných nádob na vzorky (včetně jedinečné identifikace) a veškerých nezbytných konzervačních látek (včetně pokynů, jak je používat).

Osoby odpovědné za manipulaci a přepravu mají být dostatečně vyškoleny, včetně informování o jakékoli náchylnosti ke zhoršení kvality vzorků / balení vzorků a o podmínkách požadovaných během přepravy (např. teplota). V zásadě by mohlo být užitečné dát odpovědné osobě konkrétní pokyny, zejména v případech, kdy přepravu provádějí lidé mimo běžný proces měření (např. poštovní nebo kurýrní služby).

4.1.5 Příjem vzorku ve zkušební laboratoři

Pod vedením vedoucího laboratoře jsou pracovníci laboratoře (předem vyškolení v technických pokynech, předpisech, doporučeních atd.) odpovědní za následující kontroly a úkoly po obdržení vzorků:

- zvláštní podmínky přepravy;
- neporušenost vzorkovnic;
- přesnost a úplnost dokumentace;
- datum a čas odběru vzorků mají být v případě potřeby v souladu s maximální dobou skladování;
- proveditelnost analytického požadavku (pokud to není předem dohodnuto s laboratoří).

V některých laboratořích je tato odpovědnost svěřena konkrétním osobám.

Stav vzorků dodaných do laboratoře by měl odpovídat stavu definovanému v technických referenčních pokynech (například technických předpisech), pokud jsou aplikovatelné, jinak by vzorky měly být považovány za nevhodné pro analýzu.

Pro pracovníky laboratoře je užitečné mít písemný standardní postup pro kontrolu a odmítnutí vzorků, včetně některých jasných kritérií, která má dodržovat osoba odpovědná za posouzení vhodnosti pro analýzu vzorku přicházejícího do laboratoře. Nevhodnost vzorku není vždy možné posoudit jeho vizuální kontrolou po obdržení, což může vyžadovat pozdější opatření na základě kvantitativních důkazů z probíhajícího IMQC, tam, kde je to na místě (oddíl 3).

4.1.6 Příprava vzorků (včetně fyzikálních operací, jako je skladování, dělení vzorku a homogenizace)

Všechny kroky přípravy vzorku mají být vhodně navrženy a provedeny, zdokumentovány a zahrnuty do validace postupu měření. Za přípravu vzorků jsou často odpovědní pracovníci laboratoře (často analytici, kteří provádějí analýzu), kteří jsou odpovědní vedoucímu laboratoře.

Určený laboratorní personál je odpovědný za přečtení příslušných požadavků zkušební metody a/nebo zákazníků před skladováním, manipulací a přípravou laboratorního vzorku. Tito pracovníci mají být zodpovědní, kompetentní a přiměřeně dobře informovaní o relevantnosti svého úkolu. Vedoucí laboratoře má vypracovat pokyny tak, aby umožnil efektivní a bezpečné provedení práce.

V některých případech je další identifikovatelnou odpovědnou osobou v této fázi zástupce inspekčního orgánu. Inspektor má zajistit, aby množství připraveného vzorku bylo dostatečné pro zamýšlenou analýzu a pro uchování vzorků a aby všechny zkušební vzorky byly získány ze stejného laboratorního vzorku.

4.1.7 Konečná odpovědnost za celý proces měření

Je třeba aplikovat doporučení uvedená v předchozích odstavcích a v ideálním případě má být vedoucí laboratoře odpovědný za celý proces měření a delegovat odpovědnost na příslušné osoby, které jsou zapojeny do různých fází procesu (na základě jejich kvalifikace a zkušeností). Příklad systému delegování odpovědnosti je vyobrazen v tabulce 1 (a, b). Převzetí odpovědnosti za činnosti mimo laboratoř však bude často obtížné a vyžaduje dobrou komunikaci nejen se zákazníkem a vzorkaři, ale také se zástupcem inspekčního orgánu. Vedoucí laboratoře má být na základě jasných předchozích dohod týkajících se účelu, postupu odběru vzorků a konkrétních přenesených povinností průběžně informován, aby bylo zajištěno, že nic nemůže být špatně pochopeno nebo spadá mezi dvě nepřekrývající se oblasti odpovědnosti.

4.2 Organizace procesu měření

4.2.1 Komunikace se zákazníkem za účelem měření

Fáze komunikace mezi stranami (např. zákazníkem/inspekčním nebo regulačním orgánem a laboratoři) by mohla být rozdělena do dvou různých kroků: předběžná fáze pomocí neformální komunikace (např. mobilní telefony) a závěrečná fáze oficiální a formálnější písemné komunikace.

Předběžná fáze poskytuje relevantní příležitost k diskusi / přezkoumání návrhu postupu odběru vzorků, a zda je považován za uspokojivý. Cílem je usnadnit odběr, přepravu a skladování vzorků, jakož i informovat vedoucího laboratoře o jakémkoli zpoždění nebo významné odchylce při provádění odběru vzorků, která ovlivní následnou analýzu.

Počáteční fáze komunikace může také identifikovat požadavky na další školení nebo úpravy technických postupů v rámci postupu odběru vzorků (včetně přepravy a skladování) a vylepšené pokyny pro použití zařízení nebo zařízení pro odběr vzorků. To může být užitečné zejména v případě, že odběr vzorků a analýzy provádí několik různých organizací.

Každá operace odběru vzorků vyžaduje vypracování příslušných pokynů, které uvádějí zejména důvod odběru vzorků, místo a čas odběru vzorků, definici cíle odběru vzorků, měřené parametry, jasné označení primárních vzorků v souladu s metodou odběru vzorků a veškerá zvláštní opatření požadovaná na základě informací od zákazníka. Rovněž mají být zahrnuty informace o podmínkách přepravy a jakékoli další informace popisující vzorkování produktu nebo jiné informace, které by mohly být laboratoři nápomocné při hodnocení výsledků. V případě jakékoli odchylky od doporučeného postupu odběru vzorků by to mělo být podrobně popsáno ve zprávě o odběru vzorků. Zásadní je důkladný přístup s pečlivým důrazem na detail.

Laboratoř se obecně má se zákazníkem/inspekčním nebo regulačním orgánem dohodnout na všech operacích souvisejících s fází odběru vzorků a/nebo zkoušení/analýzy. Pokud je odběr vzorků prováděn výhradně laboratoři, pak jsou všechny informace, které jsou relevantní pro odhad nebo ověření nejistoty měření, k dispozici vedoucímu laboratoře. Pokud však odběr vzorků

provádí nezávislá organizace, mají být tyto informace po předchozí diskusi s laboratorii o návrhu postupu odběru vzorků k dispozici.

Vzhledem k tomu, že samotná technika odběru vzorků způsobí nejistotu ve výsledku měření, je nezbytné, aby byly vzorkaři (pracovníci provádějící odběr vzorků) vhodně vyškoleni v používaných postupech. Kromě toho musí vzorkař často kontaktovat pracovníky laboratoře přidělené k provedení analýzy a někdy také přímo zákazníka, který požádal o měření. Tento přístup je zvláště významný v případě vzorkovacích činností prováděných několika organizacemi (např. vládními nebo nevládními agenturami, kontrolními orgány, laboratořemi kontroly kvality, klienty nebo výrobci). Za takových okolností mají být přijata preventivní opatření, aby se zabránilo změnám postupu odběru vzorků, které by mohly ovlivnit buď koncentraci analytu ve vzorkovaném objektu, nebo v primárních vzorcích, nepříznivě ovlivnit analytické stanovení nebo učinit vzorky nevhodnými pro analytický účel.

Příloha A – řešené příklady

Příklad A1: Dusičnany v salátu pěstovaném ve skleníku – sekvenční přístup k VaMPIS pomocí duplikátní metody

1. Účel

Validace procesu měření pro stanovení koncentrace dusičnanů v salátu pěstovaném ve skleníku pomocí standardního protokolu o odběru vzorků a analytického postupu (tj. metody), který byl dříve samostatně validován. Obecný přístup k validaci je popsán v oddíle 2.1 tohoto dokumentu. Počáteční část validace této případové studie a odhad nejistoty, již byly popsány v příkladu A1 pokynu Eurachem o nejistotě vzorkování [3]. Místo opakování celého textu je zde uveden souhrn tohoto tématu, přičemž pro podrobnosti odkazujeme čtenáře na původní dokument [14].

2. Scénář a vzorkovaný objekt

Dusičnany jsou nezbytné pro zdraví rostlin, existují však obavy o lidské zdraví spojené s konzumací potravin obsahujících zvýšené hladiny dusičnanů. Koncentrace dusičnanů v salátu jsou pravidelně sledovány v souladu s nařízením EU. Odhady koncentrace se provádějí pro sektor skleníku s 12 000 až 20 000 hlávkami salátu a výsledek pro každý sektor se používá individuálně při posuzování shody s příslušným nařízením. Každý sektor je proto považován spíše za vzorkovaný objekt než za jednotlivé hlávky salátu. Pro spolehlivé porovnání naměřených koncentrací dusičnanů s evropskou regulační limitní hodnotou [31] (4500 mg kg^{-1}) je žádoucí odhad nejistoty měření.

Proces validace je popsán pomocí následujících kroků ze sekvenčního vývojového diagramu VaMPIS (obrázek 2):

Krok 1: Specifikace měřené veličiny, která je předmětem zájmu jak z hlediska analytu, tak vzorkovaného objektu (shrnuje v tabulce A1.1)

Tabulka A1.1 – Specifikace měřené veličiny zahrnující vzorkovaný objekt

Měřená veličina			
Analyt/ technika	Jednotka	Sektor/ matrice	Vzorkovaný objekt (objekty)
Extrakce horkou vodou a stanovení dusičnanů metodou HPLC	mg kg^{-1} , jak bylo obdrženo	Potravina/ salát	1 sektor salátu pěstovaný ve skleníku

Krok 2: Identifikace podrobného postupu měření (včetně jeho dvou složek)

Krok 2.1 Postup odběru vzorků

Přijatý postup/protokol odběru vzorků pro tento účel specifikuje, že z 10 hlávek salátu sklizených z každého sektoru hlávkového salátu [32] se připraví jeden směsný vzorek. Saláty se vybírají tak, že se danou částí skleníku prochází ve tvaru písmene W nebo pětibodové kostky. Tento postup se aplikuje na všechny sektory bez ohledu na jejich velikost. V tomto případě byly vzorky odebrány ráno a přepraveny do smluvní analytické laboratoře v chladičích boxech, aby dorazily do 24 hodin od odběru vzorků.

Krok 2.2 Fyzikální příprava vzorku

Primární vzorky byly po přijetí v laboratoři zmrazeny. Salát (dílčí vzorek) z každého 10hlávkového vzorku byl nakrájen na čtyři stejné čtvrtiny a dvě čtvrtiny byly ponechány. Toto

se opakovalo pro každý z 10 dílčích vzorků ve vzorku. Výsledných 20 čtvrtin bylo umístěno do přístroje (např. Hobartova) a macerováno za vzniku směsného vzorku.

Krok 2.3 Analytická metoda

Analytická metoda pro stanovení dusičnanů v zelenině a zeleninových produktech [33] byla dříve validována pomocí mezilaboratorního pokusu [34]. V této aplikaci byly odebrány dva analytické zkušební podíly (10 g). Každý zkušební podíl byl extrahován horkou vodou a koncentrace dusičnanů byla stanovena pomocí HPLC (UV detektor). Vzorky pro řízení kvality (výťažnost z obohacení) byly analyzovány souběžně s reálnými vzorky. Původní naměřené hodnoty použité pro odhad nejistoty mají být minimálně zaokrouhleny a mají zahrnovat všechny hodnoty, které jsou menší než nula nebo mez detekce.

Krok 3: Plán pokusů pro validaci postupu měření (včetně složek vzorkování a analýzy)

Pro tuto validaci byla vybrána *duplikátní metoda* s plně vyváženou strategií (obrázek 3a), která omezuje náklady, protože může být provedena jedním vzorkářem. Tento přístup proto nezahrnuje příspěvek k nejistotě měření ze systematických účinků mezi vzorkaři. V mnoha případech nebude možné analyzovat všechny primární vzorky a jejich duplikáty ve stejný den, protože by to například v příkladu A1 vyžadovalo 32 analytických měření. Mezi – denní variabilita by mohla být zahrnuta do návrhu duplikátní metody, např. pokud by bylo možné provést pouze osm analýz za jeden den, pak by to bylo ekvivalentní dvěma vzorkovaným objektům. Do návrhu by mohly být zahrnuty i další zdroje variability, jako jsou více (analytických) operátorů a více přístrojů. Například operátor A měří ve dnech 1 a 3 a operátor B měří ve dnech 2 a 4. Analýza každého vzorku má být náhodně přiřazena každý den, aby se minimalizovaly účinky faktorů, jako je instrumentální drift.

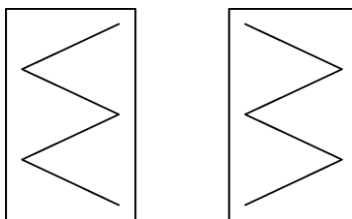
Vzhledem k preventivním opatřením zahrnutým do přípravy vzorku (např. zmrazení do 24 hodin od odběru) se považuje za nepravděpodobné, že fyzikální příprava vzorku způsobí vysokou úroveň nejistoty měření (z náhodných nebo systematických zdrojů), a proto je tato složka zahrnuta do odhadu nejistoty měření (jako nejistota přípravy vzorku), ale nemusí být při validaci odhadována samostatně.

Pro protokol odhadu nejistoty bylo vybráno doporučené minimum osmi objektů. Tyto objekty byly považovány za typické pro sektory ledového salátu pěstovaného ve sklenících. Pro každý z těchto sektorů byl kromě rutinního vzorku (vzorek 1, S1) odebrán druhý vzorek s 10 hlávkami (vzorek 2, S2). Tento duplikátní vzorek byl odebrán způsobem, který reprezentoval odchylku, jež by mohla nastat v důsledku nejednoznačnosti ve vzorkovacím protokolu, například polohování původu návrhu W a jeho orientace. Primární a duplikátní vzorky tvoří druhou úroveň vyvážené strategie pro každý vzorkovaný objekt (obrázek A1.1).

Bylo rozhodnuto, že zahrnutí terénních slepých vzorků nebude v této situaci použitelné, protože je nepravděpodobné, že by zařízení pro odběr vzorků a balení způsobilo kontaminaci nebo ztrátu dusičnanů z primárního vzorku.

Krok 4: Použití vybraných postupů vzorkování a přípravy vzorků na vzorkovaný (vzorkované) objekt (objekty)

Postup odběru vzorků byl aplikován jedním vzorkářem na všech osm sektorů a nebyly hlášeny žádné odchylky od písemného protokolu. Fyzikální přípravu vzorku provedli pracovníci laboratoře nezávisle na obou duplikovaných vzorcích pro každý vzorkovaný objekt.



Obrázek A1.1 – Příklad použití „duplikátní metody“ pro odběr vzorků ze sektorů čerstvého salátu. Duplikátní metodu lze aplikovat pomocí W návrhu jako vzoru, protokol stanovuje návrh, ale ne polohu nebo orientaci. Je stejně pravděpodobné, že „W“ začne zleva nebo zprava. Deset hlávek je odebráno podél linie W pro vytvoření směšného vzorku pro jeden vzorkovaný objekt [3]

Krok 5: Použití vybraného analytického postupu na všechny odebrané primární vzorky

Byly provedeny duplikátní analýzy všech duplikovaných vzorků při nejnižší úrovni vyvážené strategie (obrázek A1.1). Bylo použito plné analytické řízení kvality (AQC) na šarže chemické analýzy. Výsledné naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce A1.2. Nebyly k dispozici žádné vhodné CRM s odpovídající maticí, takže analytické vychýlení bylo odhadnuto pomocí výtěžnosti obohacených vzorků.

Tabulka A1.2 – Měření koncentrace (mg kg^{-1}) dusičnanů v osmi duplikovaných vzorcích. Duplikátní vzorky jsou označeny S1 a S2. Podobně jsou označeny duplikátní analýzy A1 a A2. DS1A2 (hodnota 4754 mg kg^{-1}) je tedy analýza 2, ze vzorku 1 ze vzorkovaného objektu D

Vzorek Objekt	S1A1	S1A2	S1A1	S2A2
A	3898	4139	4466	4693
B	3910	3993	4201	4126
C	5708	5903	4061	3782
D	5028	4754	5450	5416
E	4640	4401	4248	4191
F	5182	5023	4662	4839
G	3028	3224	3023	2901
H	3966	4283	4131	3788

Krok 6: Aplikace analytického řízení kvality na všechny naměřené hodnoty rutinním způsobem

Šarže chemických analýz vyhovovaly všem požadavkům na řízení kvality laboratoře. Nebylo zjištěno žádné významné analytické vychýlení, a proto korekce vychýlení nebyla považována za nezbytnou pro výsledné hodnoty měření ani pro odhad nejistoty měření.

Krok 7: Odhad nejistoty měření a jejich složek vyplývajících ze vzorkování a analýzy (aplikace ANOVA na naměřené hodnoty)

Podrobnosti o naměřených hodnotách a následné ANOVA (pomocí softwaru RANOVA3) jsou uvedeny jinde [3]. Pro účely této diskuse jsou odhady celkové nejistoty měření a jejich dvou složek vyplývajících ze vzorkování (včetně přípravy vzorku) a chemické analýzy (tabulka A1.3, spodní řádek) odděleny od celkové variability (vyjádřené jako celkový rozptyl a celková směrodatná odchylka (celková Sdev)).

Byla dána přednost robustní ANOVA, před klasickou ANOVA, protože v nezpracovaných hodnotách byl patrný malý podíl (< 10 %) odlehklých hodnot (sektor C, vzorek S1 nebo S2, tabulka A.1.2). Takové odlehklé hodnoty by měly nepřiměřený vliv na nejistotu měření odhadnutou pomocí klasické ANOVA. Robustní statistiky se ukázaly jako účinné při zahrnutí těchto odlehklých hodnot na kterékoli ze tří úrovní plánu pokusů spíše, než se je snažit identifikovat a v odůvodněných případech je jednotlivě vylučovat [3]. Robustní odhad směrodatné odchylky (tj. standardní nejistoty) celého postupu měření (s_{meas}) je 360 mg kg⁻¹. Složka vzorkování (včetně přípravy vzorku) (s_{smp}) je 319 mg kg⁻¹, což představuje přibližně 78 % celkového rozptylu měření ($100 \times 22,64 / 28,91$, z % hodnot celkového rozptylu). V tomto případě je nejistota vzorkování způsobena především heterogenitou analytu (tj. dusičnanů) v rámci každého vzorkovaného objektu.

Tabulka A1.3 – Výstup softwaru RANOVA3 [35] ukazující robustní odhady nejistoty měření (rozšířená relativní nejistota odvozená z opakovatelnosti) pro případovou studii dusičnanů v salátu (jednotky koncentrace jsou hmotnostní zlomek v mg kg⁻¹). Hodnoty jsou uvedeny nezaokrouhleně pro srovnání, ale budou vyžadovat následné zaokrouhlení

Robustní ANOVA

Průměr	4408,3			
Celková Sdev	670,58			
	<u>Mezi</u>			
	<u>sektory</u>	<u>Vzorkování</u>	<u>Analýza</u>	<u>Míra</u>
Směrodatná odchylka	565,4	319,05	167,94	360,55
% z celkového rozptylu	71,09	22,64	6,27	28,91
Rozšířená relativní nejistota (95 %)		14,47	7,62	16,36

Hodnoty směrodatné odchylky opakovatelnosti se používají jako odhady nejistoty měření, a to buď jako standardní nejistota (u_{meas} odhadovaná jako s_{meas}) nebo jako rozšířená forma (pro 95% spolehlivost) relativně ke koncentraci (x) pomocí:

$$U' = 100 \times \frac{2 s_{meas}}{x} \%$$

Pro tento příklad je celková nejistota měření odhadnuta jako $U'_{meas} = 16,36 \% = 16 \%$ pro rutinní účely.

Analytická složka nejistoty měření odhadnutá z opakovatelnosti, je $U'_{ana} = 7,6 \%$.

Tato hodnota je podobná hodnotě $U'_{ana} = 6 \%$ (tj. $u'_{ana} = 3 \%$), která byla dříve uváděna pro samostatnou validaci tohoto analytického postupu [34]. Což bylo založeno na hodnotách mezilaboratorní relativní směrodatné odchylky reprodukovatelnosti [36], v tomto případě 3,21 % a 2,37 % pro dva různé druhy salátu. Hodnota U'_{ana} odhadovaná zde pomocí duplikátní metody je aritmeticky větší než hodnota ze samotné validace (6 %), což se může zdát překvapivé vzhledem k tomu, že samotná validační hodnota zahrnovala také mezilaboratorní složku. Zvýšení může být částečně způsobeno heterogenitou analytu ve zkušebním materiálu, který byl použit v duplikátní metodě. Samostatný přístup obvykle používá mnohem homogennější RM.

Krok 8: Posouzení vhodnosti výsledků měření pro daný účel porovnáním jejich odhadů nejistoty měření s cílovou nejistotou

V současné době neexistuje žádná cílová nejistota (která zahrnuje složku nejistoty vzorkování) specifikovaná regulačním orgánem nebo zákazníkem, vůči které lze tuto odhadovanou nejistotu

měření (16 %) porovnat s posouzením vhodnosti pro účel výsledků měření. Byly diskutovány různé přístupy k nastavení hodnoty cílové nejistoty měření [18]. Jedním z těchto přístupů je metoda optimalizované nejistoty (příloha B, [19]), která byla dříve doporučena [3, oddíl 16] a použita pro tento účel v různých sektorech [21, 37].

Aplikace metody optimalizované nejistoty pro příklad dusičnanů v salátu

Aplikaci metody optimalizované nejistoty lze provést pomocí mnoha softwarových balíčků, ale pro tento účel je napsán program (OptiMU) v tabulkovém procesoru Excel [35]. Vstupní parametry metody, optimalizovaná nejistota a hodnoty použité v tomto příkladu jsou uvedeny v tabulce A1.4.

Tabulka A1.4 – Vstupní data pro metodu optimalizované nejistoty použité pro výpočet optimální (cílové) nejistoty pro příklad dusičnanů v salátu

Parametr	Jednotky	Hodnota
Náklady na odběr vzorků	€	40
Náklady na analýzu	€	40
Náklady na následky	€	5280
u_{smp}	(mg kg ⁻¹)	319,05
u_{ana}	(mg kg ⁻¹)	167,94
u_{meas}	(mg kg ⁻¹)	360,55
Limitní hodnota (T)	(mg kg ⁻¹)	4500
Koncentrace, při které je třeba optimalizovat (c_m)	(mg kg ⁻¹)	4871,2

Náklady jsou komerční jednotkové náklady na odběr vzorků a chemickou analýzu. Při odhadu nákladů na následky existují dvě obecné možnosti. Pokud je produkt chybně předán jako vyhovující předpisům, dojde k falešné shodě (tj. falešně negativní). Pokud se to následně zjistí, bude výrobci uložena pokuta a může být požadováno stažení výrobku z trhu a výrobce si nemusí udržet podporu zákazníků, a proto zažije pokles prodeje nebo prudké snížení ceny akcií. Při vyhodnocování tohoto parametru lze použít minulé příklady. Alternativně, pokud je výrobek nesprávně klasifikován jako nevyhovující regulačnímu limitu, dojde ke scénáři falešné neshody (tj. falešně pozitivní). To obvykle vede ke zbytečnému odmítnutí šarže produktu. Náklady se zde obvykle vyhodnocují jako náklady na šarži. V tomto příkladu jsou náklady na důsledky (tj. 5280 EUR) vypočteny pro *falešnou neshodu* (tj. falešně pozitivní) rozhodnutí na základě hodnoty celé šarže 12 000 hlávek salátu za 0,44 EUR (všechny ceny platné v době validace v roce 2004).

Hodnoty nejistoty jsou odvozeny z robustní ANOVA diskutované výše. Limitní koncentrace (T) je uvedena v nařízeních EU [31].

Koncentrace, při které má být systém optimalizován (c_m), je obecně volena tak, aby existovala značná pravděpodobnost chybné klasifikace. Předchozí aplikace metody optimalizované nejistoty využily řadu kritérií pro nastavení c_m (např. $1,1T = 4950 \text{ mg kg}^{-1}$) [38]. Pro toto šetření byla hladina c_m stanovena na hypotetický donucovací limit dusičnanů v salátu [23]. Relativní rozšířená analytická nejistota (U'_{ana}) byla již odhadnuta na 7,62 %. Minimální koncentrace, která by naznačovala, že koncentrace dusičnanů byla vyšší než limitní hodnota ($c_m - U_{\text{ana}} = T$), byla vypočtena jako $4\,871 \text{ mg kg}^{-1}$ ($T + U_{\text{ana}}$ při c_m , = $4500 + (0,0762 \times 4871)$). Zajímavé je, že tato hodnota je podobná dvěma dalším hodnotám, které lze vypočítat pro nastavení c_m pomocí alternativních přístupů, kterými jsou mediánová hodnota neshodných měření ($4\,891 \text{ mg kg}^{-1}$) a hodnota $1,1T$ ($4\,950 \text{ mg kg}^{-1}$).

Krok 9: Posouzení, do jaké míry bylo dosaženo vhodnosti pro daný účel, porovnáním experimentální nejistoty měření se známou nebo odhadovanou cílovou nejistotou (např. optimalizovaná nejistota).

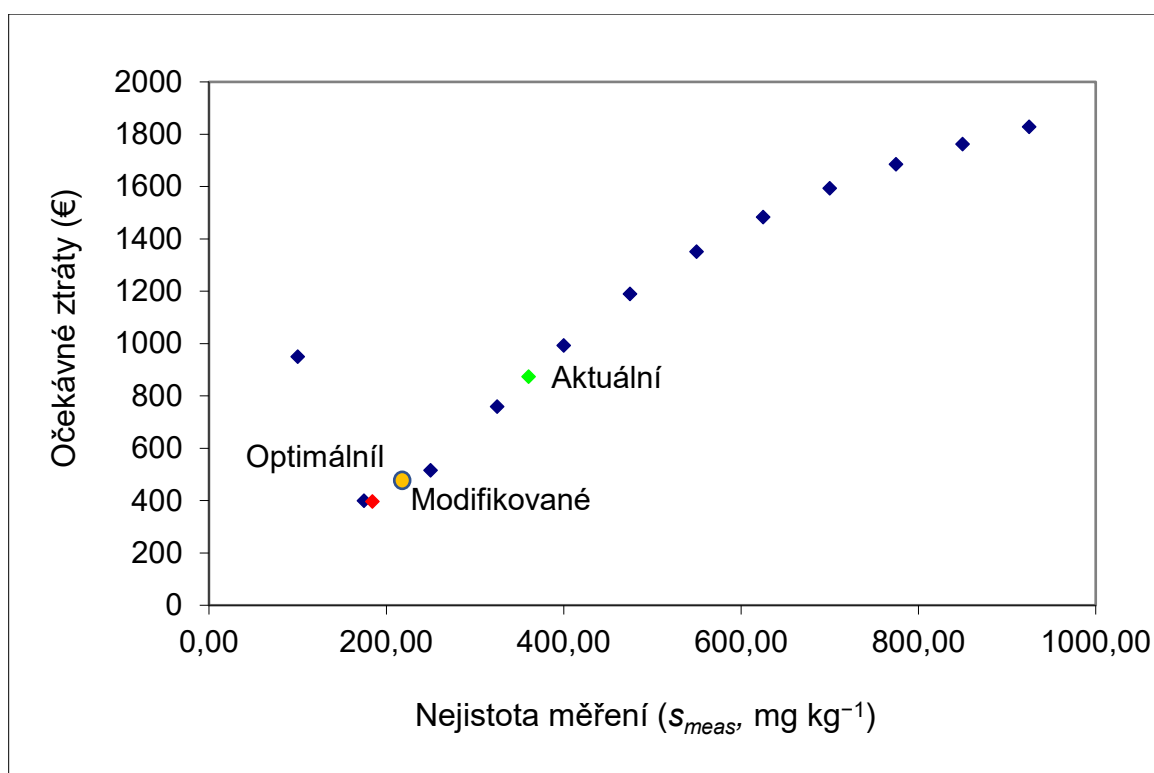
Výsledky aplikace této metody optimalizované nejistoty (obrázek A1.2) ukazují příkladově specifickou verzi obecného případu (obrázek B1.1), kde jsou celkové náklady formálně vyjádřeny jako „očekávání ztráty“ $E(L)$. Skutečná nejistota měření (jako $s_{meas} = 361 \text{ mg kg}^{-1}$, $E(L) = 873 \text{ €}$) je jasně nad optimální (použito jako cílová) nejistotou měření (jako $s_{meas} = 184 \text{ mg kg}^{-1}$, $E(L) = 395 \text{ €}$). V jednotkách relativní rozšířené nejistoty jsou hodnoty U'_{meas} těchto dvou bodů 16,4 % a 8,3 % v uvedeném pořadí. To znamená, že tento postup měření produkuje naměřené hodnoty, které nejsou vhodné pro daný účel, a proto nejsou způsobilé pro validaci v současné podobě.

Nicméně obrázek A1.2 také naznačuje, že pokud by nejistota měření mohla být snížena z 361 mg kg^{-1} na přibližně 184 mg kg^{-1} , pak vhodnosti pro daný účel by mohlo být dosaženo při cílové nejistotě měření, a tím zvalidovat tento postup měření. Výpočet také ukazuje, že celková úspora ve výši 478 EUR (873–395 EUR) za šarži by pak byla dosažena snížením rizika falešné klasifikace neshody.

Krok 10: Úprava postupu měření pro dosažení vhodnosti pro daný účel (v případě potřeby)

Pokud se ukáže, že postup měření není vhodný pro daný účel vzhledem k tomu, že nejistota měření je podstatně vyšší (nebo nižší) než cílová nejistota (jakkoli nastavená), je možné vypočítat, jak lze postup upravit tak, aby dosáhl hodnoty nejistoty měření, která bude vhodná pro daný účel. Druhou část metody optimalizované nejistoty lze použít k výpočtu, zda je nákladově efektivnější upravit postup odběru vzorků nebo analytický postup. V tomto případě aplikujeme čtyři rovnice (B1.5 až B1.8 v příloze B) za použití příslušných nákladů na odběr vzorků a analytické postupy. Metoda optimalizované nejistoty vypočítává, že nákladově nejefektivnějším způsobem, jak celkově dosáhnout cílové nejistoty měření, je snížit nejistotu vzorkování 2,14krát (z 319 na 149 mg kg^{-1}). Používá se model z teorie vzorkování, který předpovídá, že čtverec základní chyby vzorkování (a tudíž obvykle s_{smp}) je nepřímo úměrný hmotnosti vzorku [3, str. 24]. Přístup optimalizované nejistoty také předpovídá, že tohoto snížení nejistoty vzorkování by mohlo být pravděpodobně dosaženo zvýšením výdajů na vzorkování 4,57krát z 40 € na 183 € na šarži. Z praktického hlediska se předpokládá, že zvýšení hmotnosti vzorku 4krát (tj. odběr 40 hlávek pro směsný vzorek namísto 10 hlávek) sníží nejistotu vzorkování 2krát (tj. odmocnina ze 4). Vzhledem k tomu, že nejistota vzorkování přispívá přibližně 78 % k nejistotě měření, pak by tato úprava postupu měla také snížit celkovou nejistotu měření o podobný násobek.

Byl proveden experiment s cílem prozkoumat skutečné snížení nejistoty vzorkování (a tím i nejistoty měření), které by bylo dosaženo zvýšením počtu hlávek salátu ve složeném vzorku z 10 na 40 [23]. Bylo zjištěno následné snížení nejistoty vzorkování 1,8krát, což je podobné, ale aritmeticky mírně nižší než faktor 2 odhadnutý z teorie vzorkování. Pokud je tento faktor 1,8 aplikován na diskutovaný příklad, snižuje to nejistotu vzorkování jako s_{smp} , z 319 na 177 mg kg^{-1} . Při sloučení se složkou analýzy to vede ke snížení celkové nejistoty měření (jako s_{meas}) z 360 na 244 mg kg^{-1} (žlutá skvrna na obrázku A1.2). Pro rozšířenou relativní nejistotu se jedná o snížení U'_{meas} z 16,4 % na 11,1 %. Tato modifikovaná nejistota měření se blíží (o 33 % hodnoty nad) optimální (tj. cílové) nejistoty měření 184 mg kg^{-1} a vede ke snížení nákladů (tj. očekávané ztrátě) o přibližně 375 € na cíl (z přibližně 873 € na 498 €), což se blíží (78 %) optimální úspoře 478 €. Postup měření lze proto nyní považovat za validovaný, protože jeho výsledky měření jsou nyní vhodné pro daný účel.



Obrázek A1.2 – Křivka optimalizované nejistoty pro příklad dusičnanů v salátu, zobrazující odhad skutečné nejistoty měření ($s_{meas} = 361 \text{ mg kg}^{-1}$, $E(L) = 873 \text{ €}$, zobrazeno jako zelená tečka), je daleko nad optimální (použito jako cílová) nejistotou měření (as $s_{meas} = 184 \text{ mg kg}^{-1}$, $E(L) = 395 \text{ €}$, jako červená tečka). To znamená, že aktuální postup měření není vhodný pro daný účel a nelze jej zvalidovat v jeho současné podobě. A Modifikovaná nejistota měření ($s_{meas} = 244 \text{ mg kg}^{-1}$, $E(L) = 500 \text{ €}$, jako žlutá tečka) je diskutována v kroku 10 [14]

Krok 11: Přezkoumání vhodnosti pro účely analytického postupu

Metoda optimalizované nejistoty naznačuje, že analytický postup, který byl dříve validován ($s_{U'_{ana}} \sim 6 \%$), dosáhl celkové nejistoty měření, která je dostatečně blízko optimální nejistotě měření pro aktuální validaci celého měřicího systému. Navíc výpočty optimalizované nejistoty (rovnice B1.6 a B1.8, příloha B) také naznačují, že mírné snížení nejistoty analytického měření (1,56krát) ze $168 \text{ na } 108 \text{ mg kg}^{-1}$ (tj. U'_{ana} ze $7,6 \%$ na $4,9 \%$) by bylo také přínosné pro dosažení optimální (tj. cílové) nejistoty. Odhaduje se, že tohoto snížení v U'_{ana} lze dosáhnout zvýšením analytických výdajů 2,4krát ze 40 € na 96 € . Tyto výdaje by mohly být zaměřeny na nižší U'_{ana} přezkoumáním a zlepšením některých ze sedmi již diskutovaných výkonnostních charakteristik (oddíl 2.2). Je zajímavé, že pokud by bylo této nižší U'_{ana} dosaženo zlepšením analytické metody, celková nejistota měření by podle předpovědi dále klesla na 207 mg kg^{-1} ($U'_{meas} = 9,4 \%$), což je ještě blíže k optimalizované nejistotě (použité jako U'_{TU}) 184 mg kg^{-1} ($U'_{meas} = 8,4 \%$). Cílová nejistota měření je definována jako maximální hodnota, ale v tomto případě má skutečná nejistota měření mírně nad hodnotou podobný finanční účinek jako mírně pod ní. Vzhledem k tomu, že analýza přispívá pouze přibližně 22% k nejistotě měření, její mezní snížení by mělo mnohem menší účinek než již provedené pětinasobné zvýšení výdajů na odběr vzorků. Celkově lze tedy současný analytický postup považovat za vhodný pro zařazení do tohoto postupu měření.

Souhrn

Proces sekvenční validace postupu měření (oddíl 2.1 hlavního textu) byl aplikován na stanovení dusičnanů v salátu. Platnost navrhovaného postupu měření byla posouzena podle nejistoty výsledných hodnot měření a bylo zjištěno, že *není* vhodný pro daný účel, protože nejistota měření $16,4 \%$ byla přibližně dvojnásobkem cílové nejistoty $8,3 \%$. Cílová nejistota nebyla

regulátorem ani zákazníkem specifikována, proto byla vypočtena metodou optimalizované nejistoty. Duplikátní metoda, která byla použita k odhadu skutečné nejistoty měření, také ukázala, že dominantním zdrojem nejistoty měření bylo vzorkování (U'_{smp} 14,5 % přispělo 78 % k celkové nejistotě měření). Teorie vzorkování byla použita k předpovědi, že zvýšení počtu dílčích vzorků v každém směsném vzorku z původně specifikovaných 10 až na 40 by snížilo celkovou nejistotu měření až na 11,1 %. Tato úprava byla považována za dostatečnou k tomu, aby byly naměřené hodnoty vhodné pro daný účel a aby byl postup měření validován. Tato validace nezahrnuje příspěvek k nejistotě měření z vychýlení mezi vzorkaři, které by mohlo být zajištěno mezilaboratorním porovnáním odběrů (CTS). Vzhledem k dominantnímu příspěvku odběru vzorků k nejistotě měření způsobenému zejména heterogenitou dusičnanů však může tento přístup s jedním vzorkářem poskytnout dostatečně realistický odhad nejistoty měření pro účely validace.

Použitelnost validace

Očekává se, že tato validace bude obecně použitelná pro šarže salátu jakékoli odrůdy pěstované ve sklenících. Důvodem je především to, že všechny saláty jsou pěstovány tak, aby splňovaly stejnou specifikovanou limitní hodnotu, a proto mají obecně podobné složení. Platnost tohoto předpokladu má být testována průběžnými výsledky IMQC u šarží pěstovaných za různých podmínek. Použití tohoto měřicího protokolu na jiné potravinářské plodiny by vyžadovalo přinejmenším verifikaci (ověření) a případně plnou validaci vzhledem k pravděpodobně odlišné charakteristice prostorové distribuce analytu (dusičnanů) v různých plodinách.

Příklad A2: *In situ* měření celkového olova v ornici – simultánní přístup k VaMPIS duplikátní metodou

1. Účel

Validace procesu měření *in situ* pro stanovení celkové koncentrace olova (Pb) v ornici pomocí integrovaného postupu měření (tj. jak odběru vzorků, tak analytických postupů). Obecným přístupem je tedy simultánní validace (oddíl 2.3.3). Popsaná validace je z velké části založena na odhadu nejistoty měření, která je typická pro rutinní operaci [39]. Vhodnost pro účel *měření in situ* je hodnocena, pokud jsou prováděna pro dva možné účely: (1) geochemické mapování koncentrace Pb v ornících na testovaném místě (několik vzorkovaných objektů) a (2) klasifikace půdy pro koncentraci Pb, která pravděpodobně překračuje regulační prahovou hodnotu.

2. Scénář a vzorkovaný objekt

Olovo je těžký kov, který je velmi toxický pro lidský, živočišný a rostlinný život, a proto je jeho koncentrace v půdách regulována v mnoha zemích. Případová studie byla provedena na pozemku o rozloze přibližně dvou hektarů ve Wirksworthu v Derbyshire ve Velké Británii [27], kde bylo podezření z umístění středověké hutě Pb. Očekávalo se proto, že lokalita bude mít půdy s širokou škálou různých, ale stále zvýšených koncentrací Pb.

Proces validace je popsán pomocí následujících kroků ze sekvenčního vývojového diagramu VaMPIS (obrázek 2):

Krok 1: Specifikace měřené veličiny z hlediska analytu i vzorkovaného objektu: shrnuto v tabulce A2.1

Tabulka A2.1 – Specifikace měřené veličiny zahrnující vzorkovaný objekt

Měřená veličina			
Analyt / Technika	Jednotka	Sektor / Matrice	Vzorkovaný objekt
Celkové Pb podle ručního přenosného XRF aplikovaného <i>in situ</i>	mg Pb na kg vysušené půdy (tj. mg kg ⁻¹)	Ornice (jmenovitá hloubka 0–150 mm)	Plocha 30 × 30 m půdy (v lokalitě s 24 takovými objekty)

Krok 2: Identifikace navrhovaného podrobného postupu měření, včetně jeho dvou hlavních složek odběru vzorků a analýzy

Krok 2.1 Umístění vzorkovaných objektů

Nepřavidelná travnatá plocha, používaná pro pastvu zvířat, byla pokryta pravidelnou vzorkovací mřížkou 24 vzorkovaných objektů s roztečí 30 m (obrázek A2.1). Umístění každého *in situ* měření bylo ve středu čtverce o straně 30 m, umístěného pomocí měřicí pásky s odhadovanou prostorovou nejistotou ± 2 m.

Krok 2.2 Instrumentální postup

V každém místě měření byla před měřením plocha trávníku 150 × 150 mm o hloubce 30 mm odstraněna rýčem, aby se odhalila nepokrytá půda (tj. ne část vzorku). Odstraněný materiál, který nebyl součástí vzorku, byl odložen a po dokončení měření vrácen. Ruční přenosný rentgenový fluorescenční spektrometr (pXRF) byl poté umístěn ručně do středu nepokryté země, jemně v kontaktu s půdou. 75sekundový měřicí cyklus byl proveden pomocí instrumentální kalibrace navržené pro půdy výrobcem pXRF s analytickou výkonností a instrumentálním nastavením popsáním jinde, a to jak pro laboratorní měření, zaměřené na *analytickou citlivost a selektivitu* [40], tak i pro *in situ* použití v terénu [27]. Konkrétním

problémem pro *selektivitu* stanovení Pb pomocí XRF je potenciální interference na rentgenové čáře Pb-La z vysokých koncentrací arsenu (As). Účinnost korekce této interference lze pro tuto lokalitu posoudit odhadem *pravdivosti* jako *vychýlení* pomocí CRM s vysokými koncentracemi As i Pb (např. NIST 2710). Mez detekce pro Pb byla odhadnuta na 39 mg kg⁻¹ [27], což je výrazně pod minimální koncentrací naměřenou pXRF v tomto místě (~330 mg kg⁻¹). Horní mez pracovního rozsahu je výrazně nad odpovídající maximální naměřenou koncentrací (~11 000 mg kg⁻¹).

	A	B	C	D	E	F
1	•	•		•	•	
2	•	•	•	•	•	•
3	•	•	•	•	•	•
4	•	•	•			
5	•	•	•			
6	•	•				

Obrázek A2.1 – Mapa mřížky 24 čtvercových vzorkovaných objektů, každý o rozměrech 30 m × 30 m, se středovým měřicím místem, rozložená napříč testovaným místem (v rámci jeho nepravidelného ohraničení)

Krok 3: Návrh experimentů pro validaci postupu měření (včetně vzorkování a analýzy)

Celková nejistota měření byla odhadnuta použitím duplikátní metody se zjednodušenou vyváženou strategií (obrázek 3c), s jednotlivými měřeními provedenými na duplikátních „vzorcích“ na všech 24 vzorkovaných objektech. Tím se zkrátil čas měření na každém vzorkovaném objektu, což umožnilo použití postupu na více objektů. Minimální počet požadovaných duplikátů je 8 [3], ale zvýšený počet 24 duplikátů v tomto případě dává mnohem užší konfidenční intervaly odhadovaných hodnot nejistoty měření [8].

První místo odběru vzorků bylo umístěno ve středu vzorkovaného objektu podle písemného postupu měření a bylo provedeno instrumentální měření (tj. chemická analýza). Druhé (duplikátní) místo bylo pak umístěno 2 m od prvního místa, aby představovalo stejně pravděpodobnou reinterpretaci postupu měření (provedeno ručně pomocí měřicího pásma a tyčí). Tato prostorová nejistota je podobná 5 m typické standardní GPS [41], ale použití diferenciální GPS může tuto hodnotu snížit na několik cm. V takovém případě může být vzdálenost duplikátního vzorku (tj. měření) zmenšena tak, aby široce odrážela tuto situaci. Malé rozdíly v separaci duplikátních vzorků však obvykle nevedou k významným změnám v odhadu nejistoty vzorkování [42].

Kroky 4 a 5. Aplikace vybraných postupů měření (vzorkování a analýza) na vzorkovaný objekt (objekty)

Vzhledem k integrované povaze měření *in situ* byly všechny kroky provedeny jedním operátorem na všech 24 vzorkovaných objektech bez hlášených odchylek od písemného postupu. Měřením maticově podobných RM před a po průzkumu nebyl zjištěn žádný významný instrumentální drift. To podpořilo implementaci sekvenčního spíše než náhodného pořadí měření každého vzorkovaného objektu na celé ploše. Výsledné naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce A2.2.

Jedna složka analytického vychýlení byla odhadnuta měřením lisovaných tablet vyrobených ze série 4 odpovídajících RM půd (3 interní RM a jeden CRM NBS/NIST 2710), a to jak

bezprostředně před, tak bezprostředně po terénních měřeních, aby se také odhadl potenciální instrumentální drift.

Tabulka A2.2 – *In situ* naměřené hodnoty koncentrace Pb [43]

Vzorek	S1Pb	S2Pb
č.	(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)
A6	1 005	1 633
A5	4 631	3 723
A4	1 415	2 264
A3	865	1 350
A2	2 899	2 216
A1	721	1 758
B6	2 122	1 014
B5	1 321	1 043
B4	3 348	3 904
B3	11 543	5 570
B2	2 904	2 833
B1	2 617	2 762
C5	976	786
C4	6 127	3 874
C3	331	576
C2	12 878	8 948
D3	3 246	4 332
D2	9 006	6 098
D1	1 936	1 989
E3	5 811	6 289
E2	4 611	2 880
E1	1 326	1 442
F3	1 215	2 713
F2	2 070	2 305

Komplexnější odhad vychýlení měření byl proveden také fyzickým odebráním vzorků půdy na stejných místech po provedení měření *in situ*. Vzorky o průměru 25 mm a hloubce 0–150 mm byly odebrány pomocí půdního šneku a výsledné primární vzorky byly přes noc vysušeny při 65 °C, rozmačkány, prosety tak, aby si udržely velikostní frakci menší než 2 mm (podle které je definována půda [44]) a poté rozemlety na < 100 μm v achátovém kruhovém mlýně. Duplikátní zkušební podíly těchto zkušebních vzorků byly poté analyzovány na Pb v plně vyvážené strategii pomocí ICP-AES po rozkladu kyselinou (dusičnou a chloristou), s úplným AQC včetně analytických duplikátů a 6 CRM (BCR 141, BCR 142, BCR 143, NBS2709, NBS2710, NBS2711), aby bylo možné odhadnout analytické vychýlení a také zajistit návaznost. Podobné zkušební podíly byly také odebrány pro přímá měření laboratorním pXRF, pomocí této plně vyvážené strategie, zejména za účelem odhadu čistě analytického příspěvku k nejistotě měření [43].

Krok 6: Použití analytického řízení kvality na všechny naměřené hodnoty rutinním způsobem

Deset terénních měření NBS/NIST 2710 poskytlo průměrnou hodnotu 4935 mg kg^{-1} , což oproti certifikované hodnotě 5532 mg kg^{-1} dává statisticky významné odhadnuté vychýlení ($\pm s/\sqrt{n}$) $-10,8 \pm 0,7 \%$ [45]. Ekvivalentní hodnota pro významné vychýlení pXRF v laboratoři (*ex situ*) byla $-11,5 \pm 1,1 \%$ a pro postup ICP-AES *ex situ* byla $-5,5 \pm 0,05 \%$ při použití 6 CRM. Negativní vychýlení pro Pb naznačuje, že možná spektrální interference (např. od As) byla účinně korigována a neovlivňuje selektivitu. Analytické duplikáty byly zahrnuty do plně vyvážené strategie a zpracovány pomocí ANOVA, interpretováno níže.

Krok 7: Odhad nejistoty měření a její složky vyplývající ze vzorkování a analýzy (aplikace ANOVA na naměřené hodnoty)

Protože byl použit zjednodušený plán pokusů (obrázek A2.2), byly naměřené hodnoty (tabulka A2.2) zadány do konkrétní verze příslušného softwaru RANOVA3 [35].

Tabulka A2.3 – Výstup softwaru RANOVA3 [35] ukazující klasické a robustní odhady nejistoty měření (rozšířená relativní nejistota odvozená z opakovatelnosti) pro případovou studii *in situ* měření olova v ornici (jednotkou koncentrace je hmotnostní zlomek v mg kg^{-1})

Klasická ANOVA

Průměr	3275,5	Počet sektorů	24
Celková Sdev	2797,3		
	<u>Mezi sektory</u>		<u>Míra</u>
Směrodatná odchylka	2494,8		1265,1
% z celkového rozptylu	79,55		20,45
Rozšířená relativní nejistota (95 %)			77,25
	Faktor nejistoty (95 %)		1,8514

Robustní ANOVA

Průměr	2856,6		
Celková Sdev	2050		
	<u>Mezi sektory</u>		<u>Míra</u>
Směrodatná odchylka	1893,5		785,61
% z celkového rozptylu	85,31		14,69
Rozšířená relativní nejistota (95 %)			55,00

Robustní odhad celkové nejistoty měření (nejistota měření jako relativní rozšířená nejistota U') je uveden jako 55 % v pravém sloupci v dolní části tabulky A2.3. Tento robustní odhad je použitelnější než klasický odhad (77,3 %), protože pravděpodobnostní rozdělení naměřených hodnot je pozitivně zešikmené a zjevně není gaussovské (obrázek A2.2a). Zpočátku není možné pomocí tohoto plánu pokusů oddělit dvě složky vyplývající ze vzorkování a chemické analýzy. Složka „vzorkování“ nejistoty měření (odhadovaná jako U_{smp}) však může být zpětně získána

odečtením externího odhadu analytické složky od složky měření pomocí jejich rozptylů (U'_{ana} and U'_{meas} , resp. V rovnici A2.1).

$$U'_{smp} = \sqrt{U'^2_{meas} - U'^2_{ana}} \quad \text{Rovnice A2.1}$$

Externí hodnota U'_{ana} 3 % byla odhadnuta pomocí dodatečných *ex situ* pXRF měření provedených v laboratoři na připravených verzích odebraných primárních vzorků ze stejných 24 objektů, v plně vyvážené experimentální strategii (tj. s duplikátními analýzami na 10 duplikátních vzorcích) [27]. Tento přístup předpokládá, že instrumentální výkonnost pXRF je podobná při použití *in situ* a *ex situ*.

Dosažení těchto hodnot do rovnice A2.1, aplikované na hodnoty relativní rozšířené nejistoty měření, získáme:

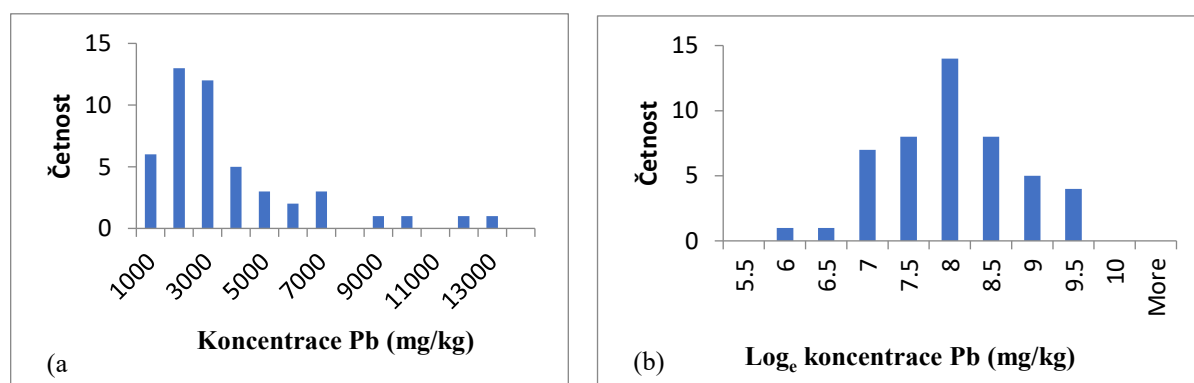
$$U'_{smp, in situ} = 54,9 \% = (\sqrt{55^2 - 3^2})$$

To jasně ukazuje, že instrumentální analýza přispívá zanedbatelným podílem ($< 0,3 \%$, $100 \times 3^2 / 55^2$) k celkovému rozptylu z nejistoty měření.

Protože hodnota nejistoty měření je velká ($u' > 15-20 \%$) a pravděpodobnostní rozdělení je pozitivně zešikmené (obrázek A2.2a), nejistotu měření lze vyjádřit přesněji pomocí **faktoru nejistoty** $^F U$ [46]. Robustní ANOVA umožňuje pracovat až s 10 % odlehlých hodnot, ale nebude dost efektivní pro vysokou míru zešikmení zobrazenou na obrázku A2.2a. Hodnotu $^F U$ lze vypočítat ze směrodatné odchylky \log_e -transformovaných naměřených hodnot ($s_{G, meas}$), zobrazených na obrázku A2.2b, použitím:

$$^F U = \exp(2s_{G, meas}) \quad \text{Rovnice A2.2}$$

Tuto transformaci a výpočet \log_e provádí automaticky RANOVA3 a hodnota $^F U$ pro tuto studii je 1,85 (tabulka A2.3) a $s_{G, meas}$ 0,308.



Obrázek A2.2 – Pravděpodobnostní rozložení 48 naměřených hodnot z tabulky A2.2 zobrazující (a) pozitivně zešikmené, pravděpodobně logaritmicko-normální rozložení, což je potvrzeno (b) přibližně normálním rozložením přirozených logaritmů hodnot

Duplikátní metoda odhaduje pouze náhodné složky nejistoty měření, takže je třeba také zvážit systematické složky, jako je vychýlení měření.

Zahrnutí systematických vlivů do odhadů nejistoty měření

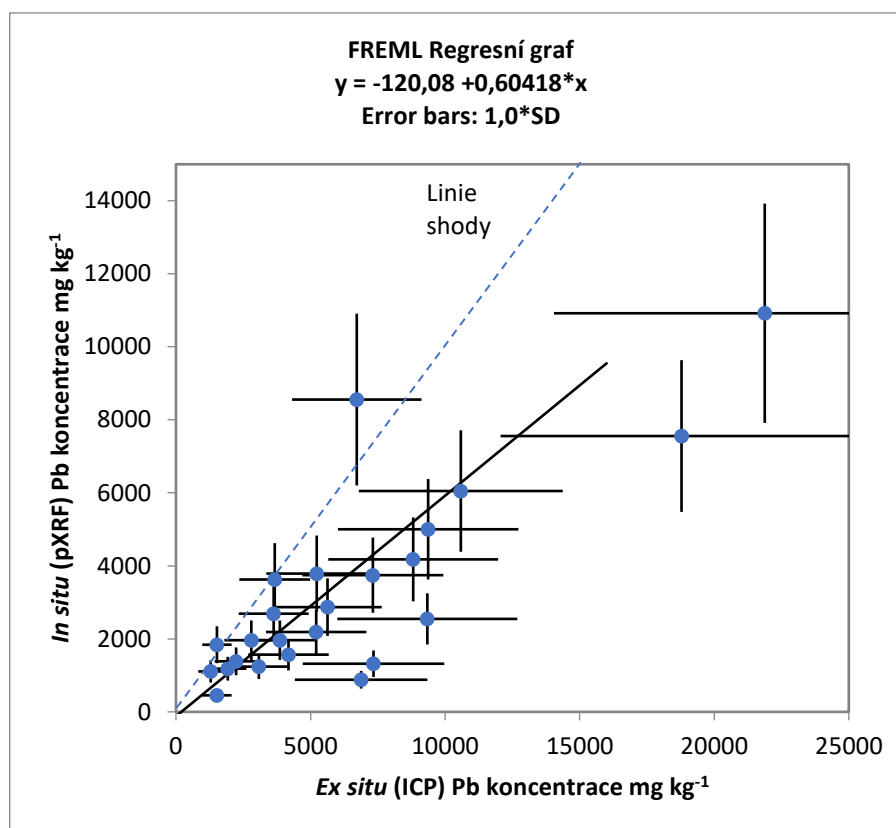
Měření provedená na NIST 2710 poskytla odhadované analytické vychýlení $-10,8\%$ ($\pm 0,7\%$). Fyzikální forma CRM se však velmi liší od forem zkušebních materiálů měřených *in situ*, jak je popsáno níže.

Je proto realističtější odhadnout vychýlení porovnáním naměřených hodnot *in situ* s naměřenými hodnotami *ex situ* provedenými na fyzických vzorcích odebraných na stejných místech/bodech, jak je znázorněno na obrázku A2.1, a tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce A2.4.

Tabulka A2.4 – Měření koncentrace Pb v půdě provedené *in situ* pomocí pXRF (s jejich standardní nejistotou, $u' = 27,5\%$) ve srovnání s těmi provedenými *ex situ* na odebraných vzorcích pomocí ICP-AES ($u' = 35,8\%$)

Č. objektu	Ex situ ICP-AES	u' ICP (35,8 %)	In situ pXRF	u' pXRF (27,5 %)
A6	7 340	2 628	1 319	363
A5	8 815	3 156	4 177	1 149
A4	1 522	545	1 840	506
A3	1 290	462	1 108	305
A2	9 340	3 344	2 547	700
A1	3 080	1 103	1 240	341
B6	4 180	1 496	1 568	431
B5	1 926	690	1 183	325
B4	3 670	1 314	3 626	997
B3	6 718	2 405	8 555	2 353
B2	5 630	2 016	2 869	789
B1	3 630	1 300	2 690	740
C5	6 880	2 463	881	242
C4	9 370	3 354	5 002	1 376
C3	1 522	545	454	125
C2	21 877	7 832	10 919	3 003
D3	5 230	1 872	3 788	1 042
D2	18 784	6 725	7 556	2 078
D1	2 800	1 002	1 963	540
E3	10 584	3 789	6 050	1 664
E2	7 316	2 619	3 745	1 030
E1	2 235	800	1 384	381
F3	3 860	1 382	1 964	540
F2	5 210	1 865	2 188	602

Vztah mezi dvěma sadami hodnot měření Pb (obrázek A2.3) ukazuje, že hodnoty *in situ* jsou obecně mnohem nižší než hodnoty *ex situ*. Vztah byl modelován pomocí metody maximální pravděpodobnosti proložení lineární funkce, kdy existuje nejistota jak u nezávislých, tak závislých proměnných, známých jako FREML, která umožňuje individuální nejistotu měření obou sad měřených hodnot [47]. Relativní standardní nejistota (u') pro hodnoty *in situ* je 27,5 % (tj. = U' z 55 % děleno 2) a pro měření *ex situ* je 35,8 %, což je 71,5 % / 2 (kde 71,5 % je hodnota U' odvozená z ANOVA plně vyvážené strategie na 10 duplikovaných fyzických vzorcích [43]).



Obrázek A2.3 - Vztah mezi hodnotami měření *in situ* a *ex situ* pro koncentraci Pb, modelované pomocí FREML, vykazující obecné záporné vychýlení pro měření *in situ*, odhadované statistickým modelem jako rotační vychýlení -50 %

Obecná rovnice popisující statistický model vychýlení mezi dvěma sadami měření koncentrace Pb [Pb] je:

$$[Pb]_{in\ situ} = \beta \times [Pb]_{ex\ situ} + \alpha \quad \text{Rovnice A2.3}$$

Hodnota směrnice lineárního modelu β dává rotační složku vychýlení a hodnota úseku α translační složku, jak je popsáno na obrázku v oddíle 2.4.4.

Pro tuto případovou studii je modelovaná rovnice vztahu:

$$[Pb]_{in\ situ} = 0,60 (\pm 0,09) \times [Pb]_{ex\ situ} - 120 (\pm 288)$$

Oba modelové koeficienty mají standardní chybu (se_{β} a se_{α} , zobrazeno v závorkách), která umožňuje posoudit jejich statistickou významnost. Standardní chyba úseku je více než dvakrát větší než jeho samotná hodnota ($t = 288/120 = 2,4 > t_{0,05(2),22(tj. n-2)} = 2,074$), což znamená, že

úsek není statisticky významný (tj. neliší se od nuly), a proto neexistuje detekovatelné translační vychýlení.

Koeficient směrnice je statisticky významný ($t = 0,09/0,60 = 0,15 < t_{0,05(2),22} = 2,074$), takže rotační vychýlení lze vypočítat jako -40% ($\pm 9\%$) (tj. $(1-0,6) \times 100$).

Možné příčiny tohoto velkého vychýlení měření byly identifikovány jako: a) vlhkost půdy; b) materiál/částice s průměrem > 2 mm; c) drsnost povrchu v „neporušeném vzorku“ pXRF; d) rozdíly v hloubce mezi neporušeným virtuálním vzorkem pro *in situ* pXRF (~ 1 mm) a odebraným *ex situ* terénním vzorkem pro ICP-AES (150 mm) [27]. Profil koncentrace Pb horních 62 mm hloubky dvou jader s použitím *in situ* pXRF na jedenácti 6 mm řezech jádra neprokázal žádnou detekovatelnou systematickou změnu koncentrace s hloubkou [27]. Toto zjištění naznačuje, že nesoulad hloubky mezi měřeními *in situ* a *ex situ* nemusí být dominantní příčinou systematické chyby mezi nimi.

Úprava systematické složky nejistoty měření pro *in situ* měření

Existují dvě možnosti, jak zacházet s odhadem systematických vlivů, mezi něž patří analytické vychýlení, při odhadu nejistoty měření, ale dosud není dosaženo konsensu týkající se doporučené možnosti.

První možností je „provést korekci“ měření *in situ* ($[Pb]_{pXRF,corr}$), aby se shodovala s hodnotami *ex situ* použitím přepočtu modelu vychýlení. To předpokládá, že měřená veličina je v tomto případě definována z hlediska koncentrace analytu uváděné na základě suché hmotnosti (jak je uvedeno v tabulce A2.1). Pro tuto případovou studii korekční rovnice pro vychýlení měření (přepočet rovnice A2.3) je:

$$[Pb]_{pXRF,corr} = \frac{[Pb]_{pXRF,raw} - \alpha}{\beta}$$

V tomto případě vložení hodnoty směrnice a vynechání nevýznamného úseku dává:

$$[Pb]_{pXRF,corr} = \frac{[Pb]_{pXRF,raw}}{0,60}$$

Nejistotu této korekce ($se'_{\beta} = 0,09$) lze kombinovat (jako relativní procento 9 %) do hodnoty nejistoty měření $U' = 55\%$ ($u' = 27,5\%$) přístupem popsáním v [3, oddíl A2/6.4], vše vyjádřeno jako relativní standardní nejistota:

$$u'_{corr} = \sqrt{(u'^2 + (se'_{\beta})^2)}$$

$$u'_{corr} = \sqrt{(27,5^2 + 9^2)} = 28,9\%$$

$$U'_{corr} = 57,9\%$$

Alternativně lze přidat nejistotu z korekce do nejistoty měření, pokud je vyjádřena jako $^F u$, $S_{G,meas}$ ($= \ln(^F u)$) pomocí aproximace, která je použitelná, když s'_{bias} je menší než 0,2, což v tomto případě je ($se'_{\beta} = 0,09$) [48].

$$S_{G,meas,corr} = \sqrt{0,308^2 + 0,09^2} = 0,321 \quad \text{Rovnice A2.4}$$

Rozšířený faktor nejistoty $^F U$, vypočtený dříve pro tuto studii jako 1,85, pak lze přepočítat pomocí rovnice A2.2, čímž se získá mírně zvýšená hodnota 1,90 (= exp (2×0,321)).

Druhou možností pro zahrnutí systematických vlivů do odhadu nejistoty měření je nekorigování naměřených hodnot na vychýlení, ale přidání celkového vychýlení a jeho nejistoty do nejistoty měření ([3, oddíl A2/6.4 strana 50], opět vše vyjádřeno relativně v procentech. Pro tuto případovou studii by to znamenalo vysokou hodnotu U' 98 %, což by v tomto případě nebylo reálné pro interpretaci výsledků.

$$u'_{corr} = \sqrt{(u'^2 + ((\beta - 1)^2) + (se_{\beta}^2)}$$

$$u'_{corr} = \sqrt{(27,5^2 + 40^2 + 9^2} = 49\%$$

$$U'_{corr} = 98 \%$$

Krok 8: Posouzení vhodnosti výsledků měření pro daný účel porovnáním jejich odhadů nejistoty měření s cílovou nejistotou.

Pro cílovou nejistotu *in situ* měření Pb v půdě nebyla externě nastavena žádná hodnota. Existují však dva možné způsoby nastavení cílové nejistoty, které závisí na uvedeném účelu měření *in situ*.

Účel 1: Mapování koncentrace analytu na místě za účelem identifikace oblastí s vyšší a nižší koncentrací kontaminantu

Kritériem vhodnosti pro účely geochemického mapování je, že nejistota měření (vyplývající jak z odběru vzorků, tak z analýzy) by neměla překročit 20 % celkového rozptylu koncentrace analytu v oblasti, která má být mapována, což zahrnuje rozptyl mezi různými vzorkovanými objekty [49 a 3, oddíl 16.2]. Při použití 20 % celkového rozptylu je cílová standardní nejistota ($u_{meas.Target}$) dána:

$$u_{meas.Target} = \sqrt{0,2 \times s_{Total}^2}$$

Tento robustní odhad celkové směrodatné odchylky pro lokalitu v této případové studii byl 2050 mg kg⁻¹ (tabulka A2.3). Cílová nejistota měření, vyjádřená jako $u_{meas.Target}$, by proto byla 917 mg kg⁻¹. Z hlediska rozšířené nejistoty měření by to mohlo být vyjádřeno buď jako $U = 1834$ mg kg⁻¹, nebo $U' = 64$ %.

Účel 2: Zatřídění pozemku proti meznímu limitu kontaminace

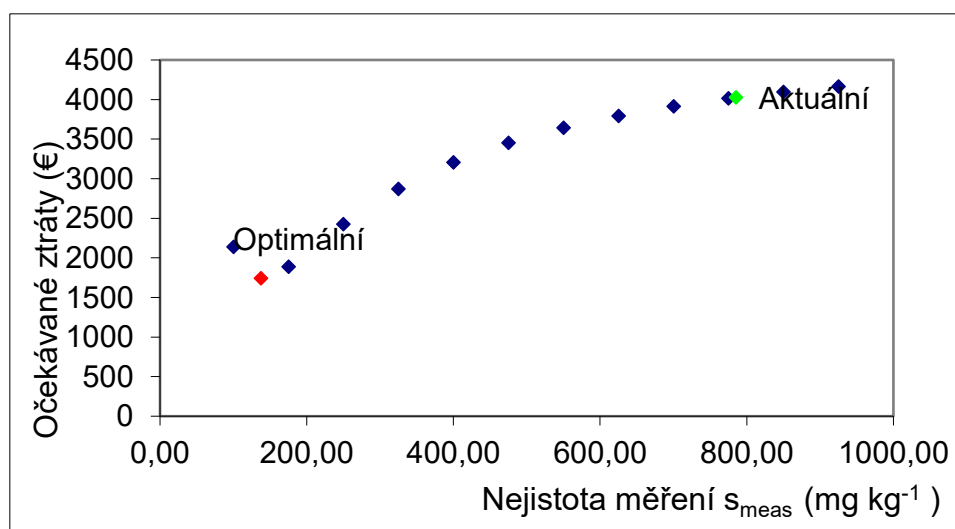
Byl podrobně popsán výpočet optimální úrovně nejistoty měření pro měření *in situ* a *ex situ* pro systémy podobné těm, které byly použity v této případové studii [50]. Tato optimální hodnota pak může být použita jako cílová nejistota. Parametry pro výpočty optimalizované nejistoty (příloha B), převzaté z ANOVA bez korekce (tabulka A2.3) jsou uvedeny v tabulce A2.5.

Tabulka A2.5 – Vstupní data pro výpočet optimální nejistoty, tedy cílové nejistoty měření. (* hodnota μ_{meas} , která zahrnuje korekci vychýlení (rovnice A2.4) by byla 827,0 mg kg⁻¹)

Položka	Hodnota	Jednotky
Náklady na odběr vzorků (každý)	29	€
Analytické náklady (každý)	12	€
Následné náklady na lokalitu pro falešně pozitivní klasifikaci (tj. nepotřebná remediacce)	10000	€
u_{smp}	784	mg kg ⁻¹
u_{ana}	43	mg kg ⁻¹
u_{meas}	786	mg kg ⁻¹
Mezní hodnota koncentrace	2000	mg kg ⁻¹
Koncentrace, při které je třeba optimalizovat	2200	mg kg ⁻¹

Limitní hodnota pro maximální koncentraci Pb v půdě v této konkrétní situaci zelených otevřených prostor v době experimentu (1995) byla 2000 mg kg⁻¹ [51]. Náklady na odběr vzorků a instrumentální analýzu jsou v tomto výpočtu rozděleny a jsou založeny na celkových nákladech na práci a vybavení, rozdělených podle jednotlivých měření (tabulka A2.5). Náklady na důsledky jsou v tomto příkladu založeny na falešně pozitivní klasifikaci. K tomu dochází, když je naměřená hodnota koncentrace nad mezní hodnotou, ale skutečná hodnota (tj. hodnota měřené veličiny) je pod mezní hodnotou. Náklady se počítají z objemu půdy v chybně klasifikovaném vzorkovaném objektu, který je zbytečně sanován, a to v cenách pak převládají [50].

Hodnotu optimální nejistoty měření, použitou jako nejistotu cíle, lze vypočítat pomocí rovnice B1.1, jejíž odvození je popsáno v příloze B.



Obrázek A2.4 – Vztah mezi celkovými náklady (vyjádřenými jako očekávaná ztráta z rovnice B1.1) a nejistotou měření (vyjádřeno jako $s_{\text{meas}} = u_{\text{meas}}$) ukazující, že skutečná nejistota měření (786 mg kg⁻¹, ●) je mnohem vyšší než optimální nejistota měření (138 mg kg⁻¹, ●) potřebná k dosažení vhodnosti pro účely měření *in situ* pro účely klasifikace pozemků

Krok 9: Posouzení, do jaké míry bylo dosaženo vhodnosti pro daný účel, porovnáním experimentální nejistoty měření s optimální hodnotou (tj. cílová nejistota měření).

Účel 1: Geochemické mapování

Při použití cíle $u_{\text{meas}} 917 \text{ mg kg}^{-1}$ (na základě kritéria vhodnosti pro daný účel 20 % celkového rozptylu) skutečný robustní odhad u_{meas} při 786 mg kg^{-1} (tabulka A2.3) ukazuje, že jak výsledky měření, tak i postup měření *jsou* pro tento účel vhodné. Z hlediska relativní nejistoty platí stejný závěr, že je vhodný pro daný účel, protože skutečná nejistota měření 55 % (tabulka A2.3) je menší než optimální/cílová nejistota měření 64 % (s použitím robustních odhadů v celém rozsahu). To předpokládá, že cílová nejistota měření je spíše preferovanou hodnotou než přísný maximální cíl. Skutečnost, že skutečná nejistota měření je pod cílovou nejistotou měření, není nedostatkem, ale je skutečně prospěšná, protože dále zlepšuje spolehlivost geochemického mapování.

Účel 2: Klasifikace pozemků vzhledem k limitu

Vztah mezi náklady (očekávání ztráty, $E(L)$) a nejistotou měření (obrázek A2.4) ukazuje, že skutečná nejistota měření ($\underline{u} = 786 \text{ mg kg}^{-1}$, $U' = 55 \%$) je vysoko nad optimální hodnotou ($\underline{u} = 138 \text{ mg kg}^{-1}$, $U' = 9,7 \%$). Ekvivalentní náklady na skutečnou nejistotu měření ($EoL = 4026 \text{ €}$) jsou více než dvakrát vyšší než při optimální hodnotě nejistoty měření ($EoL = 1739 \text{ €}$). To znamená, že postup *in situ* *není* na tomto místě v současné době vhodný pro účely klasifikace koncentrace Pb v půdě proti limitní hodnotě (T) 2000 mg kg^{-1} . Dosažení vhodnosti pro daný účel by se nezlepšilo, pokud by byla pro výpočet skutečné nejistoty měření použita tolerance pro účinek korekce vychýlení (rovnice A2.4), aby se získala zcela podobná hodnota 827 mg kg^{-1} . Vhodnějším přístupem by pro tento účel bylo použití *ex situ* měření založeném na odebraných primárních vzorcích. Nejistota měření přístupu *ex situ* aplikovaná zde analýzou ICP-AES však dává ještě větší nejistotu měření 71,5 %, opět dominovanou nejistotou vzorkování (99,7 % nejistoty měření) způsobenou převážně heterogenitou koncentrace Pb v rámci těchto objektů. Stejným postupem lze také prokázat, že tato možnost měření *ex situ* je vysoko nad cílovou nejistotou měření, která je nutná k dosažení vhodnosti pro daný účel.

Krok 10: Úprava postupu měření pro dosažení vhodnosti pro daný účel (v případě potřeby)

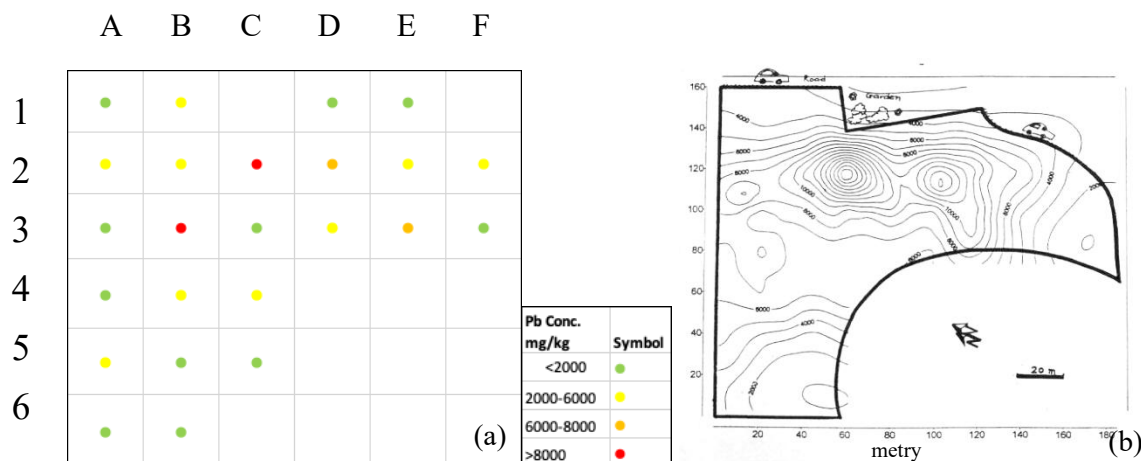
Účel 1: Pro účel geochemického mapování je vhodný již postup *in situ*, takže nominálně nevyžaduje žádnou úpravu. To je zřejmé z geochemické mapy, která byla připravena pro tuto lokalitu (obrázek A2.5a), která ukazuje, že měření pXRF může spolehlivě identifikovat místa s vysokou koncentrací Pb (např. C2) od míst s nízkou koncentrací Pb (např. D1). Tato mapa může také obecně identifikovat obecnou polohu dvou středověkých hutí na místech u sektorů C2 a D2. Tyto dvě přibližné polohy byly definitivně potvrzeny několika sadami samostatného průzkumu pomocí 159 *ex situ* měřeními [43], která byly prostorově modelována tak, aby získaly obrysy stejné koncentrace Pb technikou známou jako krigování (obrázek A2.5b).

Nicméně, i když je postup vhodný pro účel z hlediska splnění minimálního požadavku nejistoty měření, použitím (řekněme n-násobných) kompozitních měření v rámci každého vzorkovaného objektu by bylo předpovězeno, že sníží nejistotu odběru vzorků a tím i nejistotu měření (podle \sqrt{n}) a tím dálelepší spolehlivost výsledných geochemických map koncentrace Pb.

Účel 2: Pro dosažení optimální (cílové) úrovně nejistoty měření ukazují výsledky výpočtu optimalizované nejistoty, že k dosažení vhodnosti pro daný účel je nutné snížení 5,8krát (= $786/138$). Nejistotě měření dominuje příspěvek ze vzorkování (tj. 99,7 % nejistota vzorkování z předchozí aplikace (rovnice A2.1)). To znamená, že nákladově nejefektivnějším způsobem, jak snížit nejistotu měření, je snížit nejistotu odběru vzorků, i když náklady na každý odběr vzorků (29 €) přesahují dvojnásobek nákladů na každou analýzu (12 €, tabulka A2.5).

Nejistotu odběru vzorků je možné snížit faktorem x , zvýšením hmotnosti vzorku faktorem x^2 , podle teorie vzorkování, kde s^2 je nepřímo úměrná hmotnosti [3, rovnice 6, str. 24]. Ke snížení nejistoty vzorkování o požadovaný násobek 5,8 k dosažení vhodnosti pro daný účel by proto

bylo nutné provést 34násobná kompozitní měření na každém místě ($5,8^2$), což je zjevně nepraktické. Nicméně i použití čtyřnásobných kompozitních měření (řekněme v rozích metru čtverečního kolem místa odběru vzorků) by mohlo podobně snížit nejistotu odběru vzorků 2krát, a tedy nejistotu měření na přibližně 23 %, což by snížilo celkové náklady a bylo blíže k dosažení vhodnosti pro daný účel.



Obrázek A2.5 – Mapy (na základě obrázku A2.1) ukazující naměřenou koncentraci Pb z (a) 24 měření in situ popsaných v této případové studii, (b) samostatného průzkumu s použitím mnohem většího počtu (159) měření *ex situ* [43]. Ukazují, že (a) měření *in situ*, i při vysoké nejistotě měření 55 %, se podařilo lokalizovat části lokality s vysokými koncentracemi Pb, které jsou dány přítomností středověkých Pb hutí, které byly potvrzeny (b) mapou vytvořenou z většího počtu *ex situ* měření

Alternativní přístup, umožněný nízkými náklady na měření *in situ* (12 €), by spočíval ve snížení rozestupu sítě, například faktorem 3 ze stávajících 30 m na 10 m. Toto vyšší prostorové rozlišení průzkumu by mohlo být aplikováno pouze kolem oblastí s vysokou koncentrací, které se nacházejí v počátečním průzkumu s nízkou hustotou. To by zvýšilo náklady na měření v těchto oblastech, ale snížilo potenciální náklady na zbytečnou remediaci 9krát (3^2), a tudíž snížilo následné náklady o podobný násobek pro stejnou hodnotu nejistoty měření [50].

Krok 11: Přezkum vhodnosti pro účely analytického postupu

Tato konkrétní měření *in situ* lze považovat za vhodná pro účely geochemického mapování prostorového rozložení koncentrace Pb, ale *ne* pro účely klasifikace kontaminované půdy na tomto konkrétním místě, tj. zda jsou nad nebo pod limitem 2000 mg kg^{-1} . Nicméně na jiném méně kontaminovaném místě, řekněme s objekty, které jsou všechny pod 500 mg kg^{-1} , *in situ* pXRF naměřené hodnoty s podobnou nejistotou měření 55 %, mohou být prokázány jako vhodné pro účely klasifikace vzhledem k limitu 2000 mg kg^{-1} , který by pak byl mnohem výše nad nimi.

Použitelnost validace

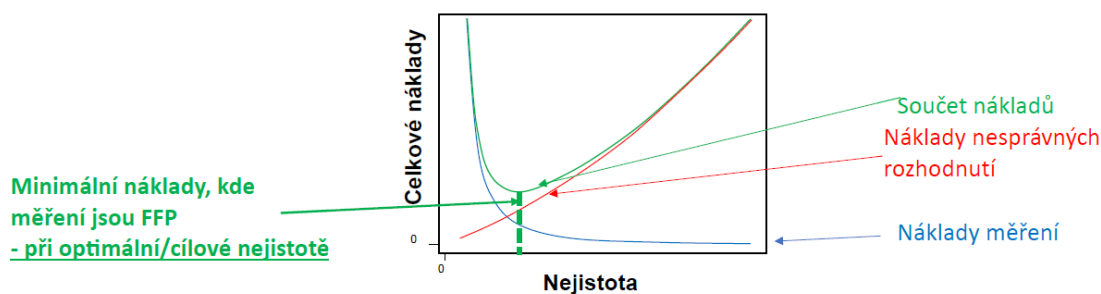
Tento příklad ukazuje, jak je možné validovat celý postup měření současně, včetně všech kroků vzorkování a analýzy. V tomto případě má příspěvek analýzy (U'_{ana}) ve výši 3 % velmi malý vliv na celkovou nejistotu měření (ale to je částečně způsobeno velmi vysokými hladinami koncentrace Pb (průměr = $\sim 3000 \text{ mg kg}^{-1}$), které jsou výrazně nad mezí detekce pro Pb touto technikou, což je 39 mg kg^{-1} [27]). Tato validace je proto poněkud specifická pro toto místo, a to je často případ aplikačních sektorů, jako je kontaminovaná půda, kde je často vysoký stupeň variability mezi různými místy. To kontrastuje s objekty a místy, která jsou si mnohem podobnější, kdy bude validace obecněji použitelná, jako je tomu v případě dusičnanů v salátu (příloha A, příklad A1).

Příloha B – Teoretické základy metody optimalizované nejistoty

Metoda optimalizované nejistoty je jedním z přístupů k nastavení cílové nejistoty měření pro postup měření, který zahrnuje odběr vzorků i chemickou analýzu. Je stručně popsána v oddíle 2.3.2, krok 8c a použita v příkladech A1 a A2, u obou v kroku 8. Metoda optimalizované nejistoty umožňuje nastavit jedno kritérium vhodnosti pro daný účel, které lze použít k validaci celého postupu měření. Může také optimalizovat relativní podíly nejistoty měření, které jsou generovány jak odběrem vzorků, tak analytickými postupy.

Metoda optimalizované nejistoty porovnává vliv změn nejistoty měření s odhadovanými celkovými náklady. Tyto náklady nejsou jen náklady na vzorkování a provedení chemické analýzy, ale zahrnují také náklady, které mohou vzniknout z nesprávné klasifikace vzorkovaného objektu. Tyto „následné náklady“ mohou vzniknout v důsledku vlivu nejistoty měření na rozhodnutí o shodě/posuzování shody. Pro příklad A1, pokud šarže salátu poskytuje falešně pozitivní hodnotu měření (tj. falešnou neshodu) pro koncentraci dusičnanů, pak bude šarže chybně zamítnuta. Tato chybná klasifikace bude stát výrobce celou hodnotu této šarže. Naopak, pokud naměřená hodnota vede k falešně negativnímu rozhodnutí (tj. falešná shoda), bude spotřebitelům prodána šarže salátu s hodnotou dusičnanů nad limitem EU. Pokud jsou tyto vysoké hodnoty koncentrace dusičnanů zjištěny následně, může být výrobce právně odpovědný za následky.

Existuje optimální úroveň nejistoty měření, při které jsou minimalizovány celkové náklady (tj. jak náklady na měření, tak náklady na důsledky, formálně nazývané očekávání ztráty $E(L)$) (obrázek B1.1). Tato optimální úroveň nejistoty měření může být použita jako cílová nejistota, při které lze říci, že postup měření produkuje hodnoty měření, které jsou vhodné pro tento účel.



Obrázek B1.1 – Obecná koncepce metody optimalizované nejistoty. Optimální úroveň nejistoty měření je stanovena pro minimální celkové náklady, včetně nákladů jak na postup měření (odběr vzorků a analýza), tak na potenciální náklady vyplývající z nesprávných rozhodnutí o shodě

Druhá část tohoto přístupu optimalizované nejistoty dále odhaluje relativní příspěvky odběru vzorků a analýzy jak k nejistotě experimentálního měření, tak k celkovým nákladům na měření. Je proto možné rozhodnout, která z těchto dvou složek musí být řešena, aby se změnila nejistota měření, aby se přiblížila cílové nejistotě, a tím se dosáhlo vhodnosti pro daný účel.

Rovnice, která udává celkové náklady (formálně očekávání ztráty) jako funkci nejistoty měření (zelená čára na obrázku B1.1), převzatá z [19], je:

$$E(L) = C \left[1 - \Phi \left(\frac{\varepsilon}{s_{\text{meas}}} \right) \right] + \frac{D}{s_{\text{meas}}^2} \quad \text{Rovnice B1.1}$$

kde:

$E(L)$ = očekávání ztráty (formální termín pro celkové náklady)

C = náklady na následky

ε = limit chyby $\varepsilon = |T - c_m|$

T = limitní hodnota

c_m = koncentrace analytu, při které se provádí optimalizace

s_{meas} = směrodatná odchylka naměřených hodnot (tj. standardní nejistota)

D = náklady na jednotkový rozptyl pro celý proces měření (vysvětlení v rovnici B1.4)

Φ = pravděpodobnost, že skutečná koncentrace bude ve shodě s limitem, v případě falešného případu shody, pro koncentraci analytu c_m . Odečtením této pravděpodobnosti od 1 se vypočítá pravděpodobnost, že skutečná koncentrace je neshodná, tedy pravděpodobnost nesprávné klasifikace. (Φ je dáno funkcí NORM.S.DIST v Excelu)

Vypočítané vstupní parametry

Pomocí hlavních vstupních parametrů (naznačeno výše, např. tabulky A1.4, A2.5) lze vypočítat další parametry.

Proměnná A jsou náklady na jednotkový rozptyl (s_{smp}^2) pro odběr vzorků, kde L_{smp} jsou skutečné náklady na odběr vzorků:

$$A = L_{smp} \times s_{smp}^2 \quad \text{Rovnice B1.2}$$

Proměnná B jsou náklady na jednotkový rozptyl (s_{ana}^2) pro analýzu, kde L_{ana} jsou skutečné náklady na analýzu:

$$B = L_{ana} \times s_{ana}^2 \quad \text{Rovnice B1.3}$$

Výpočty optimálních úrovní těchto dvou nákladů (L'_{smp} a L'_{ana}) jsou dány rovnicemi B1.7 a B1.8.

Náklady na jednotkový rozptyl pro celý proces měření:

$$D = (\sqrt{A} + \sqrt{B})^2 \quad \text{Rovnice B1.4}$$

Optimální rozdělení výdajů

Po stanovení optimální hodnoty nejistoty jsou z rozptylu měření (v'_{smp}) vyhodnoceny optimální hodnoty rozptylu vzorkování (v'_{ana}) a rozptylu analýzy (v'_{meas}). Použitím druhé odmocniny těchto rozptylů lze odvodit optimální nejistoty pro vzorkování (s'_{smp}) a analýzu (s'_{ana}).

Optimální rozptyl vzorkování:

$$v'_{smp} = v'_{meas} \left[\frac{\sqrt{A}}{(\sqrt{A} + \sqrt{B})} \right] \quad \text{Rovnice B1.5}$$

Optimální rozptyl analýzy:

$$v'_{ana} = v'_{meas} \left[\frac{\sqrt{B}}{(\sqrt{A} + \sqrt{B})} \right] \quad \text{Rovnice B1.6}$$

Následně jsou vypočítány optimální náklady na vzorkování a chemickou analýzu, L'_{smp} a L'_{ana} .

Optimální náklady na vzorkování:

$$L'_{smp} = \frac{A}{v'_{smp}} \quad \text{Rovnice B1.7}$$

Optimální náklady na analýzu:

$$L'_{ana} = \frac{B}{v'_{ana}} \quad \text{Rovnice B1.8}$$

Literatura⁶

1. Cantwell H (ed.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (3rd ed.). Dostupné z <http://www.eurachem.org>.
[Český překlad součástí tohoto pokynu.]
2. Ellison S L R, Williams A (eds) (2012) Eurachem/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in analytical Measurement, (3rd ed), ISBN 978-0-948926-30-3. Dostupné z <http://www.eurchem.org/>.
[KVALIMETRIE 19, Stanovení nejistoty analytického měření. Editoři M. Suchánek a D. Milde, 4. české přepracované vydání, Eurachem-ČR, Praha 2014, ISBN 978-80-86322-07-0. Dostupné na www.eurachem.cz.]
3. Ramsey MH, Ellison SLR, Rostron P (eds.) (2019) Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/ AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approach, (2nd ed), Eurachem, ISBN 978-0-948926-35-8. Dostupné z <http://www.eurchem.org/>.
[KVALIMETRIE 25: Nejistota vzorkování. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2020 (ISBN 978-80-86322-13-1). Dostupné na www.eurachem.cz.]
4. ISO 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, International Organization for Standardization, Switzerland.
<https://www.iso.org>.
[ČSN EN ISO/IEC 17025:2018, Všeobecné požadavky na kompetenci zkušebních a kalibračních laboratoří, ČAS, Praha (2018).]
5. Bettencourt da Silva R, Ellison SLR (eds.) Eurachem/CITAC Guide: Assessment of performance and uncertainty in qualitative chemical analysis. First Edition, Eurachem (2021). ISBN 978-0-948926-39-6. Available from <https://www.eurachem.org>.
[KVALIMETRIE 27: Použití informací o nejistotě k posuzování shody, Výběr, použití a interpretace programů zkoušení způsobilosti, Posuzování výkonnosti a nejistota v kvalitativních chemické analýze. Eurachem-ČR, Ústí nad Labem 2022 (ISBN 978-80-86322-16-2). Dostupné na www.eurachem.cz.]
6. JCGM 200 (2008) International Vocabulary of Metrology – basic and general concepts and associated terms (VIM, 3rd edition). Joint Committee for Guides in Metrology (Sevres).
<https://www.bipm.org/en/committees/jc/jcgm/publications>.
[TNI 010115, Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM), ČNI, Praha (2009). Výkladový slovník metrologie. On-line interaktivní zpracování Mezinárodního slovníku metrologie –Základní a obecné pojmy a související pojmy (VIM) (JCGM 200: 2012, 3. vydání; VIM3). Dostupné na www.unmz.cz/metrologie/slovniky/.]
7. JCGM 100:2008 Evaluation of measurement data – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). Sevres, (2008).
8. Rostron PD, Fearn T, Ramsey MH (2020) Confidence intervals for robust estimates of measurement uncertainty. Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality,

⁶ Pozn. překladatele: Informace o dostupnosti českého znění je uvedena za odkazem v hranatých závorkách.

- Comparability and Reliability in Chemical Measurement 25, 107–119. <https://doi.org/10.1007/s00769-019-01417-4>
9. Cordeiro F (Raposo), Ramsey MH (2023) Sampling in the context of conformity assessment. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*. 28, 181–182. <https://doi.org/10.1007/s00769-023-01542-1>
 10. Commission Regulation (EC) No 152/2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed, *Official Journal of the European Union*, L54 (2009).
 11. Raposo F.C. and Ramsey M.H. (2024) The role of measurement uncertainty in the validation of a measurement procedure. *Accreditation and Quality Assurance, Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*. <https://doi.org/10.1007/s00769-024-01593-y>
 12. Ramsey MH, Squire S, Gardner MJ (1999) Synthetic reference sampling target for the estimation of measurement uncertainty. *Analyst* 124, 1701–1706. <https://doi.org/10.1039/A905299B>
 13. Ramsey MH, Geelhoed B, Damant, AP, Wood, R (2011) Improved evaluation of measurement uncertainty from sampling by inclusion of between-sampler bias using sampling proficiency testing. *Analyst* 136, 1313–1321. <https://doi.org/10.1039/C0AN00705F>
 14. Ramsey MH, Rostron P (2024) Measurement uncertainty from sampling and its role in validation of measurement procedures. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*. <https://doi.org/10.1007/s00769-024-01575-0>
 15. Lyn JA, Ramsey MH, Fussel RJ, Wood R (2003) Measurement uncertainty from physical sample preparation: estimation including systematic error. *Analyst* 128, 1391–1398. <https://doi.org/10.1039/B307581H>
 16. Lee J.C. and Ramsey M.H. (2001) Modelling measurement uncertainty as a function of concentration: an example from a contaminated land investigation. *Analyst*, 126, issue 10, 1784–1791. <https://doi.org/10.1039/B104946C>
 17. Thompson M. (2011) Uncertainty functions, a compact way of summarising or specifying the behaviour of analytical systems. *TrAC: Trends in Analytical Chemistry* 30, 1168–1175. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.03.012>
 18. Bettencourt da Silva R, Williams A (Eds), *Eurachem/CITAC Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement*, (1st ed. 2015). Dostupné z www.eurachem.org.
[KVALIMETRIE 21: Referenční materiály v chemické analýze. Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních. Eurachem-ČR, Praha 2016. (ISBN 978-80-86322-09-4)]
 19. Thompson M, Fearn T (1996) What exactly is fitness for purpose in analytical measurement? *Analyst* 121, 275–278. <https://doi.org/10.1039/AN9962100275>
 20. Ramsey MH, Lyn JA, Wood R (2001) Optimised uncertainty at minimum overall cost to achieve fitness-for-purpose in food analysis. *Analyst* 126, 1777–1783. <https://doi.org/10.1039/B104285H>

21. Ramsey MH, Taylor PD, Lee JC (2002) Optimized contaminated land investigation at minimum overall cost to achieve fitness-for-purpose. *Journal of Environmental Monitoring*, 4 (5), 809–814. <https://doi.org/10.1039/B203096A>
22. Rostron PD, Fearn T, and Ramsey MH (2022) Comparing Uncertainties – Are they really different? *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*, 27, 133–142. <https://doi.org/10.1007/s00769-022-01501-2>
23. Lyn JA, Palestra IM, Ramsey MH, Damant AP, Wood, R (2007) Modifying uncertainty from sampling to achieve fitness for purpose: a case study on nitrate in lettuce *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement* 12, 67–74. <https://doi.org/10.1007/s00769-006-0239-0>
24. Rostron P, Ramsey MH (2017) Quantifying heterogeneity of small test portion masses of geological reference materials by PXRF: implications for uncertainty of reference values. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 41, 3, 359–473. <https://doi.org/10.1111/ggr.12162>
25. ISO 17075 = EN 17075+A1 (2023) Water Quality – General requirements and performance test procedures for water monitoring equipment – Continuous measuring devices.
26. ISO 20988:2007. Air quality. Guidelines for estimating measurement uncertainty.
27. Argyraki A, Ramsey MH, Potts PJ (1997) Evaluation of portable XRF for in situ measurements of lead on contaminated land. *Analyst* 122, 743–749. <https://doi.org/10.1039/A700746I>
28. Thompson M, Ramsey MH (1995) Quality concepts and practices applied to sampling – an exploratory study. *Analyst* 120, 261–270. <https://doi.org/10.1039/AN9952000261>
29. AMC Technical Briefs. The role of accreditation in ensuring sampling quality. *Anal. Methods*, 2019, 11, 3358–3360. <https://doi.org/10.1039/C9AY90095K>
30. Nordtest sampler certification scheme handbook. NT ENVIR 008. ISSN: 1459–2800 (Ed 2–1, Approved 2015-04). <https://www.nordtest.info/wp/2015/04/14/nordtest-sampler-certification-scheme-handbook-version-2-1-nt-envir-008/>
31. Commission Regulation (EC) No 563/2002 of 2 April 2002 amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Official Journal of the European Communities*, L 86/5 to L 86/6.
32. European Directive 79/700/EEC. *OJ L* 207, 15.8.1979, p26.
33. BS EN 12014-2:1997 Foodstuffs-Determination of nitrate and/or nitrite content; Part 2; HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetable products. BS EN 12014-2. Londýn.
34. Farrington D, Damant AP, Powell K, Ridsdale J, Walker M, Wood, R (2006) A Comparison of the Extraction Methods used in the UK Nitrate Residues Monitoring Program, *Journal of the Association of Public Analysts (Online)* 34, 1–11. http://www.apajournal.org.uk/Volume_34-35/JAPA_Vol_34_pg_1-11/2006-0001-0011.pdf

35. AMC Software.
<http://www.rsc.org/Membership/Networking/InterestGroups/Analytical/AMC/Software/>
36. Barwick VJ, Ellison SLR (1998) Estimating measurement uncertainty using a cause and effect and reconciliation approach Part 2. Measurement uncertainty estimates compared with collaborative trial expectation. *Anal. Commun.* 1998, 35, 377–383. <https://doi.org/10.1039/A806576D>
37. Lyn JA, Ramsey MH, Wood, R (2002) Optimised uncertainty in food analysis: application and comparison between four contrasting ‘analyte-commodity’ combinations. *Analyst* 127, 1252–1260. <https://doi.org/10.1039/B203669J>
38. Lyn JA, Ramsey MH, Wood R (2003) Multi-analyte optimization of uncertainty in infant food analysis. *Analyst* 128, 379–388. <https://doi.org/10.1039/B212697B>
39. Ramsey MH (2020) Challenges for the estimation of uncertainty of measurements made *in situ*. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement* 26, 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00769-020-01446-4>
40. Potts, P. J, Webb, P. C., Williams-Thorpe, O., and Kilworth, R. (1995) Analysis of silicate rocks using field-portable X-ray fluorescence instrumentation incorporating a mercury(II) iodide detector: a preliminary assessment of analytical performance. *Analyst* 120, 1273. <https://doi.org/10.1039/AN9952001273>
41. GPS Accuracy, US Government. <https://www.gps.gov/systems/gps/performance/accuracy/>
42. Ramsey MH, Solomon-Wisdom GO, Argyraki A (2013) Evaluation of *in situ* heterogeneity of elements in solids: implications for analytical geochemistry. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 37, 379–391. <https://doi.org/10.1111/j.1751-908X.2013.00236.x>
43. Argyraki A (1997) Estimation of measurement uncertainty in the sampling of contaminated land. PhD Thesis, Imperial College, University of London. <https://spiral.imperial.ac.uk/handle/10044/1/8489>.
44. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF). *The analysis of agricultural materials*; London, 1986; ISBN 0112427626
45. ISO/Guide 33:2015(en)Reference materials — Good practice in using reference materials. [TNI POKYN ISO 33 Referenční materiály – Správná praxe při jejich používání. ÚNMZ, 2016.]
46. Ramsey MH, Ellison SLR (2015) Uncertainty Factor: an alternative way to express measurement uncertainty in chemical measurement. *Accreditation and Quality Assurance: Journal for Quality, Comparability and Reliability in Chemical Measurement*. 20, 2,153–155. DOI: [10.1007/s00769-015-1115-6](https://doi.org/10.1007/s00769-015-1115-6)
47. Analytical Methods Committee (2002) Fitting a linear functional relationship to data with error on both variables, Technical Brief No.10, Royal Society of Chemistry, London. <https://www.rsc.org/membership-and-community/connect-with-others/join-scientific-networks/subject-communities/analytical-science-community/amc/technical-briefs/>
48. Ramsey MH, Ellison SLR (2017) Combined uncertainty factor for sampling and analysis. *Accreditation and Quality Assurance* 22, 187–189. <https://doi.org/10.1007/s00769-017-1271-y>

49. Ramsey, MH, Thompson M, Hale M (1992) Objective Evaluation of Precision Requirements for Geochemical Analysis using Robust Analysis of Variance. *Journal of Geochemical Exploration* 44, 23–36. [https://doi.org/10.1016/0375-6742\(92\)90046-B](https://doi.org/10.1016/0375-6742(92)90046-B)
50. Taylor PD, Ramsey MH, Potts PJ (2004) Balancing measurement uncertainty against financial benefits: a comparison of *in situ* and *ex situ* analysis of contaminated land. *Environmental Science and Technology* 38, 6824–6831. <https://doi.org/10.1021/es049739p>
51. UK Department of the Environment: Interdepartmental Committee on the Redevelopment of Contaminated Land (ICRCL); Londýn, 1987.

ISBN 978-80-86322-19-3