

# Walidacja procedury analitycznej

- ❑ **Czym jest walidacja procedury analitycznej ?**
- ❑ **Dlaczego walidujemy procedury analityczne ?**
- ❑ **Na czym polega walidacja ?**
- ❑ **Co jest wynikiem walidacji ?**

- Sprawdzanie zgodności z aktami normatywnymi**
- Tworzenie nowych regulacji normatywnych**
- Sterowanie procesami produkcyjnymi**
- Kontrola i zapewnienie jakości (surowców, produktów i towarów)**
- Wspomaganie krajowego i międzynarodowego handlu**
- Wspomaganie badań**

## Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących

Laboratorium powinno stosować procedury analityczne właściwe do zadania analitycznego i spełniające wymagania klienta. Powinno się preferować stosowanie procedur opublikowanych w normach międzynarodowych, regionalnych lub krajowych. Można też stosować procedury zaadoptowane przez laboratorium lub opracowania własne, jeżeli są one odpowiednie do przewidywanego zastosowania i zostały zwalidowane.

# Różnice terminologiczne

**PN-EN ISO/IEC 17025. Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących:**

***walidacja metody badawczej***

**VIM, Międzynarodowy słownik podstawowych i ogólnych terminów metrologii:**

***walidacja procedury pomiarowej***

**GLP, Dobra praktyka laboratoryjna:**

***walidacja standardowej procedury pomiarowej***

***walidacja procedury analitycznej***

**WALIDACJA jest potwierdzeniem przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały w całości spełnione szczególne wymagania dotyczące zamierzonego zastosowania.**

***(PN-EN ISO/IEC 17025)***

**WALIDACJA jest procesem definiowania charakterystyki procedury analitycznej dla oceny możliwości jej zastosowania do określonego zadania.**

- ❑ **Poznanie wymagań analitycznych dla zamierzonego celu prowadzenia pomiarów**
- ❑ **Wyznaczenie charakterystyki procedury analitycznej**
- ❑ **Sprawdzenie, że wymagania mogą być w pełni zrealizowane za pomocą walidowanej procedury analitycznej**
- ❑ **Świadectwo (raport) walidacji**

# Charakterystyczne wymagania

- Rodzaj analitu
- Poziom stężeń
- Zakres stężeń
- Rodzaj matrycy
- Obecność interferentów
- Technika analityczna
- Granica wykrywalności i oznaczalności
- Precyzja i dokładność

} Wymagania prawne

# Parametry walidacji

## Zakres walidacji

- **Precyzja: powtarzalność, odtwarzalność**
- **Granica wykrywalności/oznaczalności**
- **Linowość, zakres roboczy**
- **Odzysk**
- **Czułość**
- **Selektywność**
- **Odporność**
- **Niepewność**
- **Spójność pomiarowa**

## Parametry analityczne procedury pomiarowej:

### □ jakościowe:

- selektywność, specyficzność

### □ ilościowe:

- zakres roboczy (liniowy)
- granica wykrywalności i oznaczalności
- odzysk

## Właściwości wyników pomiarów:

- spójność pomiarowa
- niepewność (z uwagi na np. powtarzalność / odtwarzalność, odporność)

# Które procedury analityczne wymagają walidacji ?

➤ **nie mające statusu normy;**

➤ **opracowania własne;**

➤ **znormalizowane:**

**stosowane poza przewidzianym zakresem;**

➤ **znormalizowane:**

**po wprowadzeniu modyfikacji.**

# Procedury analityczne o statusie normy

- procedury zamieszczone w międzynarodowych, regionalnych i krajowych normach badań  
***(ISO, EN, PN, DIN, BS, ASTM....)***
- procedury publikowane przez uznane organizacje  
***(AOAC dla artykułów spożywczych i rolnych; ICH dla analizy klinicznej, Farmakopea w przemyśle farmaceutycznym, ....)***
- **Nie są nimi** procedury publikowane w literaturze naukowej!!!

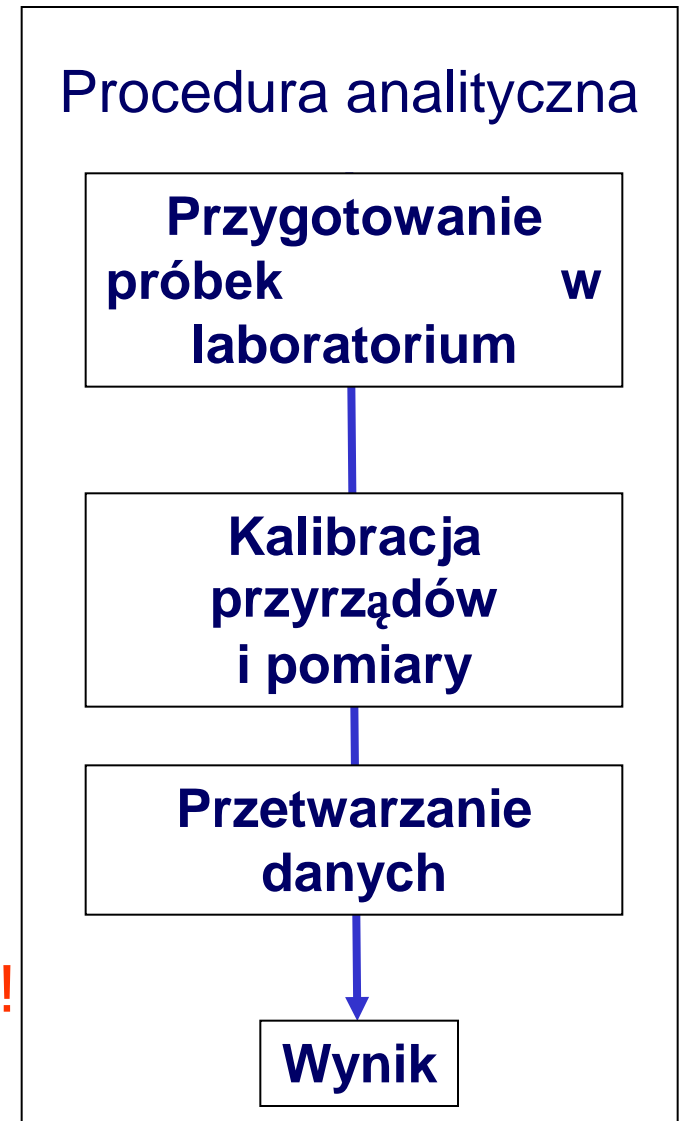
# Czy zwalidowaną procedurę można „automatycznie” użyć w laboratorium ?

1. Po raz pierwszy ? Nie !!! musi zostać potwierdzona;
2. Po potwierdzeniu ? Tak, ale tylko w określonym zakresie.

# Kiedy wymagana jest walidacja procedury ?



- **Walidacja całej procedury**  
(od przygotowania próbki do wyniku)
- **Walidacja pełnego zakresu stężeń**  
(oczekiwany zakres stężeń !)
- **Walidacja względem spodziewanych rodzajów próbek**



**Podjmij wysiłek tam, gdzie to konieczne!**

## Często spotykane terminy

- **Walidacja pełna**: gdy badane są wszystkie istotne parametry (pomiarowe, działania) procedury analitycznej.
- **Walidacja częściowa**: gdy badane są jedynie niektóre parametry procedury analitycznej.
- **Potwierdzenie**: postępowanie dotyczące zwalidowanej procedury mającej status normy. Nie ma potrzeby dodatkowego walidowania, należy jedynie potwierdzić możliwość jej prawidłowego stosowania w laboratorium.

# Wymagany zakres walidacji

Dla danego zadania analitycznego warto wybrać najważniejsze parametry odnośnie zakresu walidacji

## Cholesterol w surowicy

Granica wykrywalności: nie jest istotna

Niepewność: **istotna**

*(np.. mniejsza niepewność wyników stała się w USA źródłem oszczędności 100 mln \$/rok)*

## Ocena zanieczyszczenia środowiska [lokalizacja zagrożeń]:

Zakres pomiarowy **istotny**

Granica wykrywalności nie jest istotna

Niepewność nie jest istotna

## Kontrola antydopingowa:

Granica wykrywalności **parametr decydujący**

Niepewność **istotna**

Zakres pomiarowy, liniowość: nie jest istotna

***selekcja parametrów usprawnia funkcjonowanie laboratorium!!!!***

# Selektywność i specyficzność

Selektywność oznacza stopień w jakim metoda może być stosowana do oznaczania danego analitu w obecności innych składników próbki bez występowania interferencji.

*(IUPAC, 2001)*

Specyficzność oznacza 100 % selektywność

*Czy istnieją metody absolutnie selektywne ?*

IUPAC zaleca unikania stosowania terminu specyficzność !

Określa wiarygodność procedury pomiarowej

(IUPAC 1999)

$$R = \frac{\text{wartość _ obserwowana}}{\text{wartość _ odniesienia}}$$

Wartość odniesienia dla:

- CRM

$$R = \frac{C_{\text{obs}}}{C_{\text{CRM}}}$$

- próbki wzbogaconej

$$R = \frac{C_{\text{obs}} - C_{\text{mat}}}{C_{\text{analit\_dod}}}$$

*Wartość R bliska 1 oznacza niewielkie obciążenie procedury pomiarowej*

# Precyzja

Precyzja: (ang. *precision*) parametr, który charakteryzuje rozrzut uzyskanych wyników wokół wartości średniej. Jest obliczany jako odchylenie standardowe dla serii pomiarowej.

Odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*) to miara rozproszenia zbioru wartości uzyskanych w serii pomiarowej.

**SD** jest równe zero wtedy i tylko wtedy, gdy wszystkie wyniki są identyczne. W każdym innym przypadku  $SD > 0$

## SD dla przyrządów o różnej rozdzielczości

	<b>X</b>	<b>0,X</b>	<b>0,0X</b>
<b>Wyniki pomiarów</b>	<b>17</b>	<b>16,8</b>	<b>16,83</b>
	<b>17</b>	<b>17,1</b>	<b>17,14</b>
	<b>17</b>	<b>16,9</b>	<b>16,88</b>
	<b>17</b>	<b>17,4</b>	<b>17,43</b>
	<b>17</b>	<b>17,3</b>	<b>17,27</b>
	<b>17</b>	<b>17,2</b>	<b>17,24</b>
	<b>17</b>	<b>17,0</b>	<b>16,96</b>
<b>SD</b>	<b>0</b>	<b>0,22</b>	<b>0,223</b>

# Miary precyzji

**SD:** Odchylenie standardowe jest zawsze liczbą mianowaną, a miano wyrażone jest w takich samych jednostkach jak miano wartości wyników.

**RSD:** Względne odchylenie standardowe: (ang. relative standard deviation) otrzymuje się przez podzielenie wartości SD przez wartość średnią.

**CV:** współczynnik zmienności (ang. coefficient of variation) otrzymuje się przez pomnożenie RSD przez 100%

# Powtarzalność

**Powtarzalność (ang. *repeatability*)**

**Precyzja pośrednia: (ang. *intermediate precision*)**

**Odtwarzalność: (ang. *reproducibility*)**

# Powtarzalność

**Powtarzalność** (ang. repeatability) wyznaczana jest na podstawie wartości SD serii pomiarów przeprowadzanych w danym laboratorium, przez danego analityka, z wykorzystaniem danego urządzenia pomiarowego w krótkim okresie czasu.

**Stałe:** analityk, przyrząd, odczynnik, warunki pomiarowe

**Zmienne:** skład próbki; stężenie

**Precyzja pośrednia:** (ang. intermediate precision) służy do określenia długoterminowego SD procesu pomiarowego: w danym laboratorium

**Stałe:** laboratorium

**Zmienne:** przyrząd, analityk, skład próbki, stężenie analitu, partia odczynników, warunki laboratoryjne

# Powtarzalność

**Odtwarzalność:** (ang. reproducibility) służy do określenia SD dla wyników uzyskanych w różnych laboratoriach.

**Stałe:** (??)

**Zmienne:** laboratorium, przyrząd, analityk, skład próbki, stężenie analitu, partia odczynników, warunki laboratoryjne

# Granica wykrywalności (LOD) Granica oznaczalności (LOQ)

**LOD** (ang. limit of determination)

**GW**: najmniejsze stężenie (lub ilość) substancji możliwe do wykrycia za pomocą danej procedury analitycznej z określonym prawdopodobieństwem.

**LOQ** (ang. limit of quantification)

**GO**: najmniejsze stężenie (lub ilość) substancji możliwe do ilościowego oznaczenia za pomocą danej procedury analitycznej z założoną dokładnością i precyzją.

# Granica wykrywalności (LOD) Granica oznaczalności(LOQ)

## Równanie zależności kalibracyjnej:

$$\text{Sygnał } Y = b_0 + b_1 * c$$

$Y_{bl}$  = wartość średnia dla ślepej próby;

$s_{bl}$  = odchylenie standardowe dla ślepej próby

$$Y_{LOD} = Y_{bl} + 3 s_{bl} \quad \rightarrow \quad LOD = (Y_{LOD} - b_0)/b_1$$

$$Y_{LOQ} = Y_{bl} + 10 s_{bl} \quad \rightarrow \quad LOQ = (Y_{LOQ} - b_0)/b_1$$

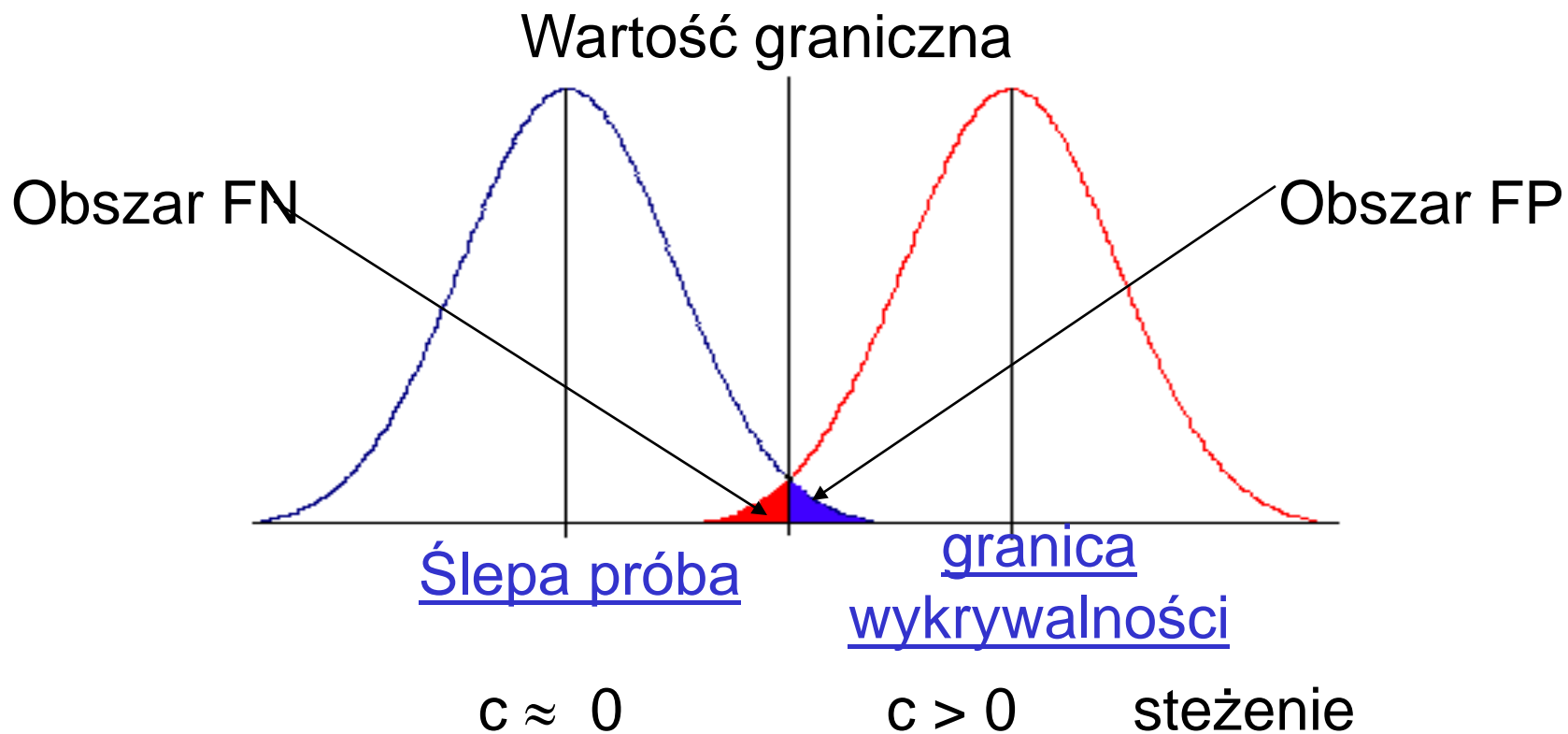
## Zdolność wykrywania śladowych ilości analitu

<b>Analit</b>	<b>Wynik badania:</b> <i>analit(u)...</i>	
$c_x < \text{LOD}$	<i>nie wykryto</i>	<i>wykryto</i> ○
$c_x \geq \text{LOD}$	<i>wykryto</i>	<i>nie wykryto</i> ⊙

- kontaminacja, nieodpowiednia selektywność, interferencje?
- ⊙ interferencje?

Analit nie jest obecny

Analit jest obecny

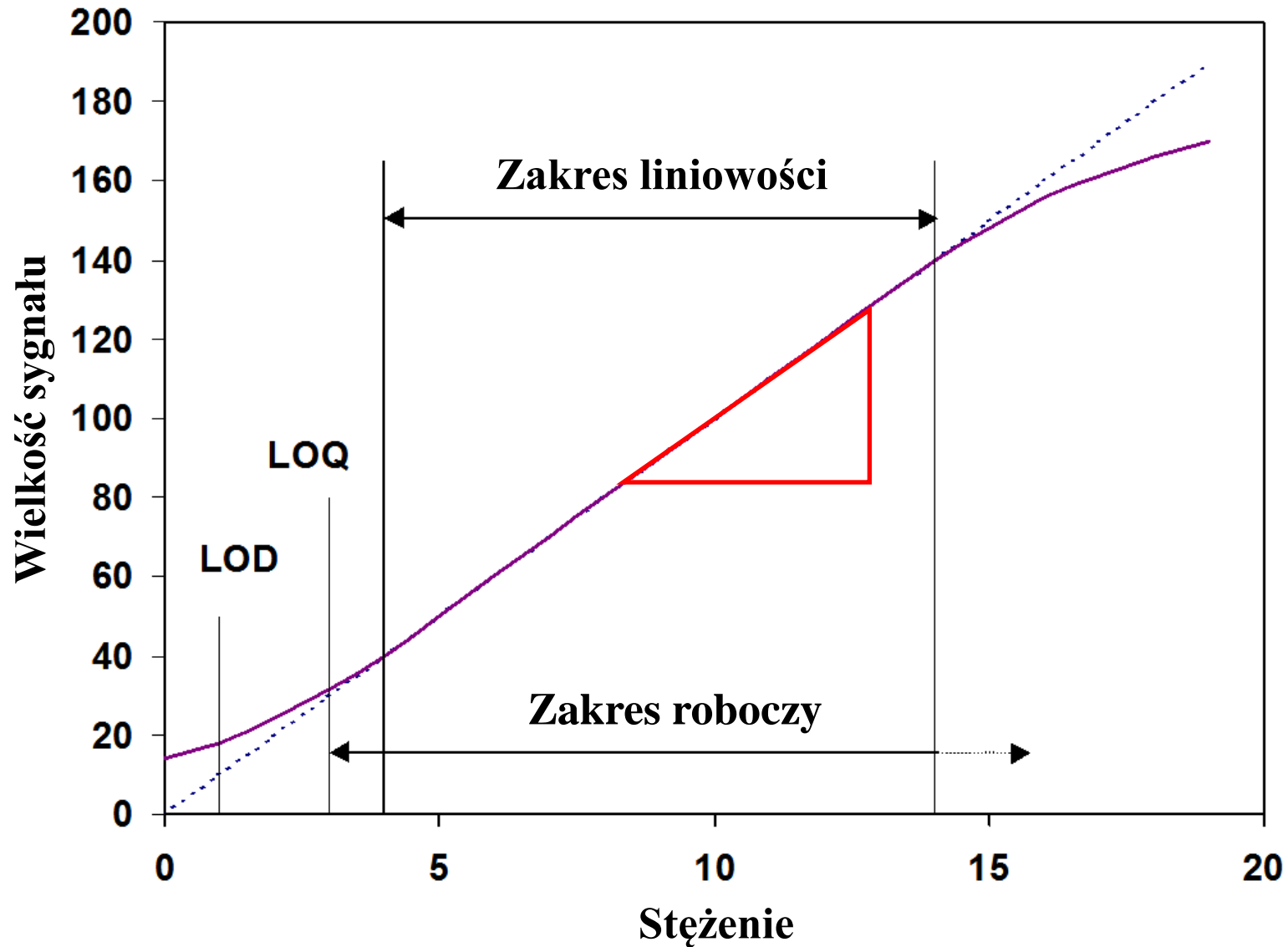


# Zakres liniowości Zakres roboczy

**Zakres liniowości to przedział zawartości analitu, dla którego sygnał jest proporcjonalny do tej zawartości. ( $r = 0,999$ )**

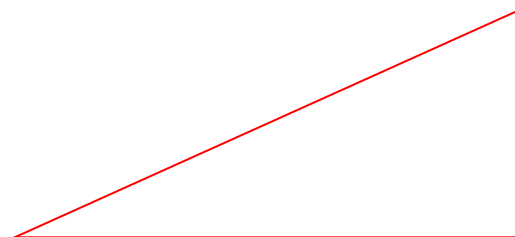
**Zakres roboczy to przedział między najniższym a najwyższym stężeniem jakie mogą zostać oznaczone za pomocą danej procedury analitycznej z założoną precyzją, dokładnością i liniowością.**

# Zakres liniowości, zakres roboczy



**Czułość** iloraz przyrostu odpowiedzi przyrządu pomiarowego i wywołującej go zmiany stężenia analitu

***Interpretacja:*** nachylenie zależności kalibracyjnej



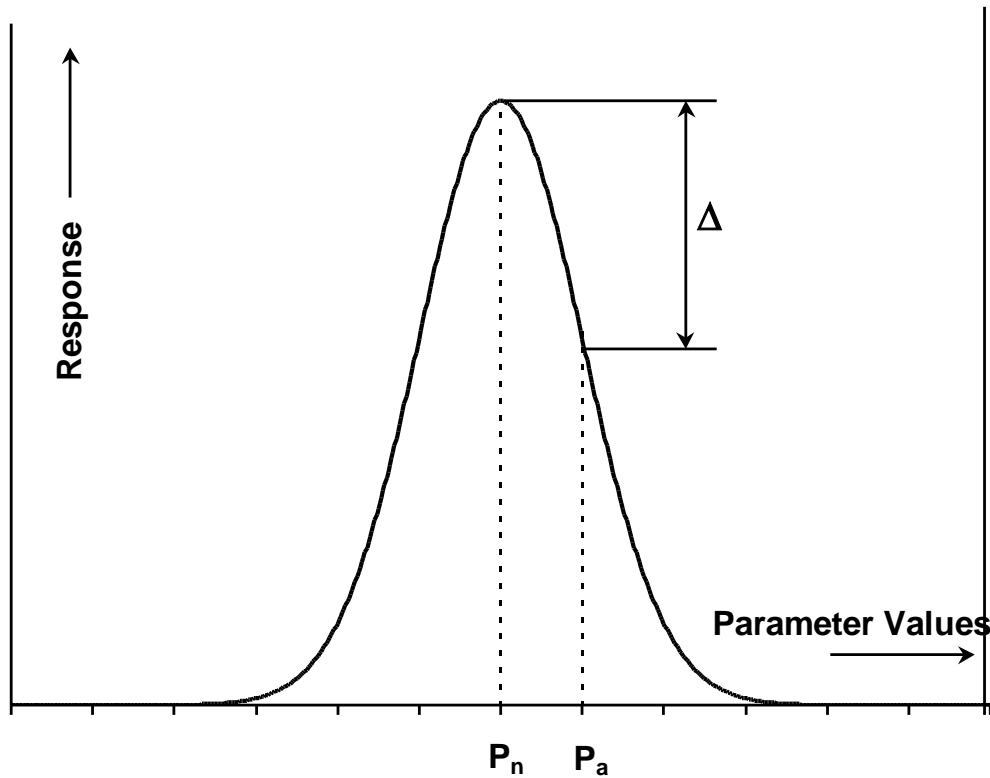
**zawartość**

**odpowiedź przyrządu =  
sygnał**

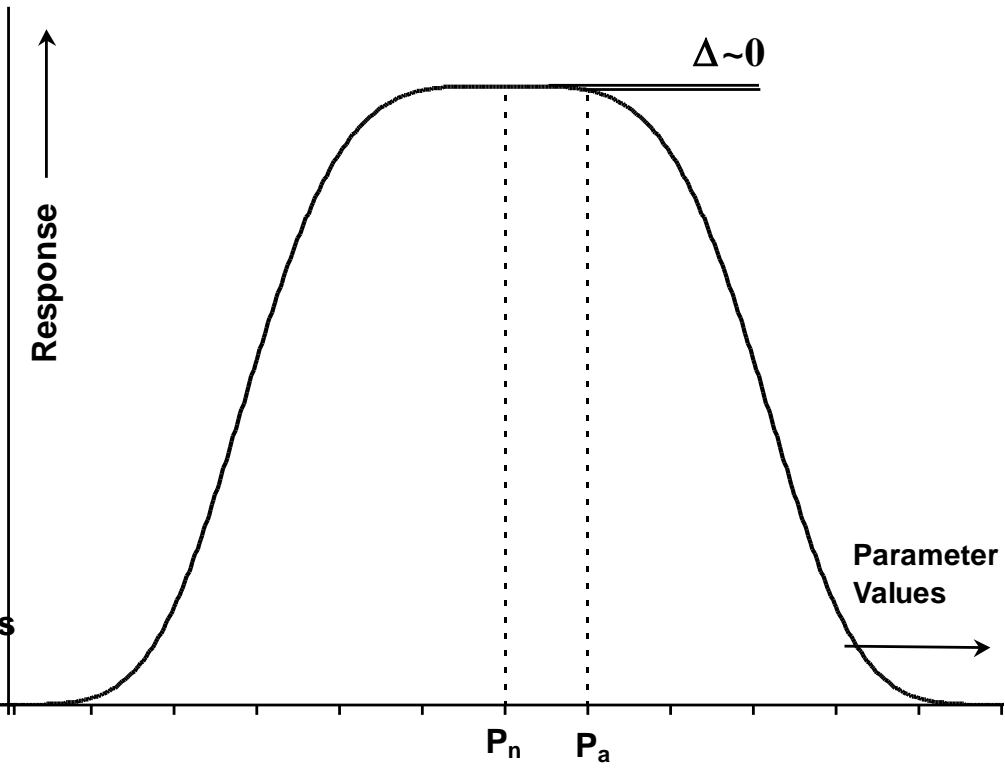
**Odporność procedury analitycznej oznacza stabilność uzyskiwanych wyników w zakresie niewielkich zmian warunków pomiarowych opisanych w procedurze analitycznej.**

***Warunki pomiarowe są dokładnie opisane w procedurze pomiarowej: np. pH, temp., stężenia odczynników, .....***

**Parameter nie-odporny**



**Parameter odporny**



LOGO

## Sprawozdanie z walidacji

**Procedura** oznaczanie kadmu (GF-AAS) wg

**Mezurand:** ogólne stężenie kadmu w produktach spożywczych

**Źródło procedury:** opracowanie własne

**Przeznaczenie:** ocena produktów spożywczych

**Matryca:** surowce i produkty spożywcze

**Postępowanie:** 1. mineralizacja wspomaganą młotem  
2. oznaczanie GF-AAS

**Kalibracja:** roztwory wzorcowe firmy-ZZZ

**Zakres roboczy:** 3,5 µg/kg - 20 µg/kg

**LOD:** 1 µg/kg

**LOQ:** 3,5 µg/kg

**Odzysk** (95 +/-2) % mleko (CRM)

**Odporność** nie badano

**Selektywność:** brak interferencji

do zawartości chlorku **100 mg/kg**

**Spójność pomiarowa:** SI. Ustalono przez kalibrację oraz przez pomiary CRM firmy Y

**Charakterystyczna niepewność:**

U = 15 % (k=2)

Składniki niepewności, patrz Aneks

Nazwisko

Funkcja

*Analityk*

*Kierownik*

*Laboratorium*

podpis

data

# Czy mogę wykonać oznaczenie kadmu ?

Rodzaj próbki	Oczekiwane stężenie	ODPOWIEDŹ
mleko	0,5 - 1,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	NIE ( $c < LOD$ )
woda morska	50 - 300 ng/L	NIE ( $c < LOD$ ), Cf)
Sok owocowy	5 - 10 $\mu\text{g}/\text{L}$	TAK

# Dlaczego walidujemy procedury analityczne ?

- ❑ W celu poznania parametrów analitycznych stosowanej procedury pomiarowej;
- ❑ W celu zapewnienia zaufania:
  - użytkowników danej procedury (analityków pracujących w laboratorium),
  - odbiorców wyników pomiarowych (klientów laboratorium).

***Zapamiętajmy !***

***Walidacja jest badaniem procedury analitycznej, a nie pracy analityka !***

## **... zgodnie z zaleceniami PN-EN ISO/IEC 17025**

- **Wyznaczanie niepewności jest równoznaczne z systematyczną oceną czynników wpływających na wynik pomiaru**
- **Polecane jest stosowanie certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM)**
- **Polecany jest udział w porównaniach międzylaboratoryjnych**
- **Polecane jest porównywanie wyników uzyskiwanych za pomocą innych technik analitycznych**