

## Wybrane aspekty walidacji metod analitycznych

Robert Gąsior

*Instytut Zootechniki – PIB, Centralne Laboratorium w Aleksandrowicach,  
32-083 Balice k. Krakowa*

W ostatnich latach rosną wymagania w stosunku do laboratoriów badawczych wykonujących analizy chemiczne, pomiary fizyczne lub fizykochemiczne. Coraz większy nacisk kładzie się na jakość stosowanych technik analitycznych, odpowiednio sprawdzonych i charakteryzowanych pod kątem przydatności do badań i oszacowania parametrów walidacyjnych. Laboratoria powinny stosować udokumentowane metody badań, które są wiarygodne i nieobciążone błędami systematycznymi. Metody stosowane w chemii analitycznej mogą być klasyczne i instrumentalne.

**Metody klasyczne** są oparte na pomiarze masy lub reakcjach chemicznych i fizykochemicznych. W wyniku reakcji chemicznej powstaje sygnał analityczny, który jest mierzony w sposób bezpośredni. Do metod klasycznych zalicza się metody miareczkowe, gdzie sygnałem analitycznym jest objętość roztworu zużytego do miareczkowania, oraz metody wagowe, w których sygnałem jest masa (mierzona na wadze analitycznej) badanej substancji wytrąconej lub w inny sposób wytworzonej podczas procesów chemicznych lub fizykochemicznych. Odczyt objętości w metodach miareczkowych może być prosty (z biurety) lub w formie elektronicznej (elektroniczna biureta automatyczna, aparat do oznaczania azotu metodą Kjeldahla).

Przykładami metod klasycznych są analizy uznawane za podstawowe w badaniach materiałów roślinnych i zwierzęcych, takie jak oznaczenia suchej masy (wilgotności) metodą suszarkowo-wagową, białka (azotu) metodą Kjeldahla, tłuszczu metodą ekstrakcyjno-wagową (Soxhlet), popiołu metodą wagowo-pieczową, włókna metodą wagową z hydrolizą

w środowisku kwaśnym i zasadowym.

**Metody instrumentalne** są oparte na bardziej skomplikowanych zjawiskach fizykochemicznych, w których sygnał analityczny uzyskuje się za pomocą mniej lub bardziej złożonej aparatury pomiarowej. W metodach instrumentalnych wykorzystuje się zależność mierzonych wielkości od zawartości badanego składnika w próbce. Zależność ta może mieć charakter zarówno liniowy, jak i nieliniowy, opisywany przez odpowiednie równanie regresji krzywej kalibracji. Przykładem postaci równania regresji jest funkcja liniowa:  $y = ax + b$  lub funkcja wielomianu  $y = ax^2 + bx$ . Krzywa kalibracji jest istotnym elementem wzorcowania pomiarów wykonywanych na danym urządzeniu analitycznym i wykonuje się ją na podstawie sporządzonych roztworów wzorcowych o różnych stężeniach badanego składnika. Generalnie, do metod instrumentalnych zalicza się techniki spektrometryczne, spektrofotometryczne i chromatograficzne.

Przykładami metod instrumentalnych są oznaczenia:

- składników mineralnych – mikroelementów i makroelementów metodą spektroskopii absorpcji atomowej (ASA),
- metali ciężkich i toksycznych metodą spektroskopii absorpcji atomowej z użyciem kuwety grafitowej,
- fosforu metodą spektrofotometryczną w oparciu o reakcje z odczynnikiem fosforomolibdenowym oraz składników krwi metodą spektrofotometryczną,

- aminokwasów metodą chromatografii jonowymiennej,
- oznaczenia witamin A i E oraz kwasów organicznych metodą wysokosprawną chromatografii cieczowej (HPLC),
- lotnych kwasów tłuszczowych oraz wyższych kwasów tłuszczowych metodą chromatografii gazowej.

Wymagania w zakresie kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących przedstawia norma PN-EN ISO/IEC 17025 (2005). Przewiduje ona stosowanie metod opublikowanych w normach międzynarodowych, regionalnych lub krajowych, a także metod opartych na tych normach lub tekstach opublikowanych w czasopismach naukowych, ale uzupełnionych, rozszerzonych i zaadaptowanych przez laboratorium. Dopuszcza również stosowanie metod własnych, opracowanych przez laboratorium (p. 5.4 normy PN-EN ISO/IEC 17025, 2005). W wielu przypadkach laboratoria nie stosują bezpośrednio metod znormalizowanych. Coraz częstsze stosowanie przez laboratoria własnych oryginalnych procedur oraz procedur opartych na normach międzynarodowych, regionalnych lub krajowych i publikacjach naukowych wynika z faktu, że procedury opublikowane w normach mają określone tylko niektóre cechy charakterystyki, i to w warunkach, które jedynie z pewnym prawdopodobieństwem można uznać za reprezentatywne dla wszystkich laboratoriów stosujących daną metodę (Dobecki, 2004). Własne oryginalne procedury oraz procedury oparte na normach lub publikacjach są przez laboratoria zaadaptowane – odpowiednio rozszerzone i uzupełnione. Laboratorium powinno ustalić formę i zawartość procedury, która będzie opisywała czynności związane z daną analizą, niezależnie od tego, czy jest to analiza jakościowa, czy ilościowa. Procedura może zawierać: zakres i zasadę metody, ewentualne ograniczenia i uwagi, stosowane odczynniki i wzorce, stosowane przyrządy pomiarowe (w tym np. aparaturę do analiz instrumentalnych) i wyposażenie pomocnicze oraz sposób postępowania. Ten ostatni obejmuje: przygotowanie wzorców i przeprowadzenie wzorcowania, pobranie (jeśli dotyczy) i przygotowanie próbek, wykonanie właściwego oznaczenia, przeprowadzenie obliczeń wyników i opracowanie raportu.

Pobranie próbek wymaga bardziej

szczegółowego wyjaśnienia. W zasadzie w każdym laboratorium osoba wykonująca analizę pobiera bezpośrednio do analiz próbkę reprezentatywną. Takie pobranie próbek jest częścią integralną każdej procedury badawczej. Jednak, w rozumieniu normy PN-EN ISO/IEC 17025 (p. 5.7.1) pobieranie próbek ma nieco inne znaczenie i dotyczy wydzielenia próbki dla laboratorium z ilości pierwotnej danego materiału przeznaczanego do badań. Takie pobranie próbki jest więc czynnością uprzednią w stosunku do pobrania przez laboranta bezpośrednio do analiz próbki reprezentatywnej. Tak więc, nie każde laboratorium pobiera próbki w sensie wymagań powyższej normy, ponieważ większość laboratoriów otrzymuje już pobrane (na ogół przez samego klienta) próbki do badań. Wówczas odpowiedzialność za poprawność (reprezentatywność) pobrania próbki dla laboratorium spoczywa na kliencie. W przypadkach dużej wagi prawnej (np. sprawy sądowe) próbki dla laboratoriów wykonujących analizy pobierają osoby do tego uprawnione. Istotną częścią metody są także elementy wewnętrznego sterowania jakością analiz. Sterowanie jakością obejmuje na ogół zasady i kryteria powtórного wykonania analiz (związane z granicą powtarzalności), zasady wzorcowania z wykorzystaniem właściwych materiałów odniesienia oraz karty kontrolne (np. przedstawione na wykresie w formie elektronicznej lub w postaci papierowej) wraz z zasadami i kryteriami oceny jakości analiz. Karty kontrolne mogą dotyczyć analiz roztworów wzorcowych, własnych materiałów referencyjnych i certyfikowanych materiałów referencyjnych.

### Walidacja

Norma PN-EN ISO/IEC 17025 (2005) mówi, że opracowana metoda powinna być przed zastosowaniem właściwie zwalidowana (p. 5.4.4). Walidacja jest potwierdzeniem przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały spełnione wymagania dotyczące zamierzonego zastosowania i że dana metoda jest przydatna do rozwiązania określonego problemu. W praktyce walidacja oznacza sprawdzenie danej metody pod kątem jej wiarygodności i takiego jej zastosowania, aby spełniała wymagania klienta. Walidacja jest niezwykle ważnym zagadnieniem związanym z procesem opracowywania procedury badawczej. Jest jednak zawsze

kompromisem pomiędzy kosztami, ryzykiem i możliwościami technicznymi. Przy ocenie metody na ogół bierze się pod uwagę wybrane elementy jej charakterystyki, a niektóre można podać w sposób przybliżony (p. 5.4.5.3, uwaga 3, PN-EN ISO/IEC 17025, 2005). Walidację opisuje się głównie za pomocą różnych parametrów walidacyjnych. Dowodem przeprowadzonej przez laboratorium walidacji powinno być sprawozdanie. Walidacja może obejmować takie parametry, jak: powtarzalność, odtwarzalność, granicę powtarzalności, niepewność, zakres oznaczania, opis krzywej kalibracji (Dobecki, 2004; Arendarski, 2003).

**Powtarzalność** jest miarą precyzji wyrażoną odchyleniem standardowym lub współczynnikiem zmienności (odchylenie standardowe w stosunku do wyznaczonej wartości średniej), oznaczonymi w warunkach powtarzalności, tzn. uzyskanymi w badaniach tego samego obiektu, przy użyciu tej samej metody, w tym samym laboratorium, przez tego samego wykonawcę, przy użyciu tego samego wyposażenia i w krótkim przedziale czasu. **Odtwarzalność** jest, analogicznie jak powtarzalność, wyrażona odchyleniem standardowym lub współczynnikiem zmienności, oznaczonymi w warunkach odtwarzalności, tzn. uzyskanymi w badaniach tego samego obiektu, przy użyciu różnych metod lub tej samej metody, przez różnych wykonawców, przy użyciu różnego lub tego samego wyposażenia i w dłuższym przedziale czasu. W zależności od tego, czy badania były przeprowadzone w jednym laboratorium czy w dwóch lub więcej można wyróżnić odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną lub międzylaboratoryjną. **Granica powtarzalności** może być zdefiniowana jako maksymalna (dopuszczalna) różnica między pojedynczymi wynikami wykonanych oznaczeń, której przekroczenie powoduje konieczność powtórzenia wykonania analizy. Granicę powtarzalności można też wyrazić w postaci odchylenia standardowego lub współczynnika zmienności. **Niepewność** jest parametrem, który określa przedział, wewnątrz którego z określonym prawdopodobieństwem znajduje się wartość prawdziwa wielkości mierzonej. Niepewność jest na ogół wyrażona jako wielokrotność odchylenia standardowego lub współczynnika zmienności, w zależności od przyjętego poziomu ufności. **Zakres oznaczania** obejmuje dolną i górną granicę zawartości badanego

składnika, które można w sposób wiarygodny ilościowo oznaczyć w próbce. Zakres oznaczania jest na ogół związany z zakresem krzywej kalibracji i zastosowanymi naważkami próbek badanych substancji. **Krzywa kalibracji** opisuje zależność między wartościami odczytu na aparacie a stężeniami oznaczanej substancji. Dokładność krzywej kalibracji może być charakteryzowana za pomocą kwadratu współczynnika korelacji  $r^2$  i resztowego współczynnika zmienności, który opisuje procentowe średnie kwadratowe odchylenie punktów od krzywej kalibracji. Wiarygodność metody może być dodatkowo potwierdzona wynikami badań materiału referencyjnego o znanej zawartości badanych składników.

### **Dokładność, niedokładność, niepewność pomiaru**

Dokładność pomiaru można zdefiniować jako stopień zgodności wyniku pomiaru z wartością prawdziwą wielkości mierzonej (Arendarski, 2003). Analogicznie, można zdefiniować niedokładność pomiaru jako stopień niezgodności wyniku pomiaru z wartością prawdziwą wielkości mierzonej. Nieco inaczej niedokładność definiuje norma PN-71/N-02050 (1971), która stwierdza, że jest ona wyrażona przez zespół błędów granicznych, zawierający zarówno błędy systematyczne, jak i przypadkowe, przy czym, jeżeli wszystkie błędy systematyczne zostaną wyeliminowane, niedokładność może być utożsamiana z niepewnością pomiaru. Terminy „dokładność” i „niedokładność” niektórzy stosują zamiennie, zależnie od kontekstu.

Ostatnio, coraz częściej stosowanym, chociaż nie nowym, terminem stosowanym w metrologii jest niepewność. Laboratorium powinno mieć i stosować procedury szacowania niepewności pomiaru, chociaż w pewnych przypadkach może to być niemożliwe lub utrudnione, i nie zawsze metrologicznie i statystycznie uzasadnione. W takich przypadkach laboratorium powinno starać się zidentyfikować wszystkie składniki niepewności i racjonalnie je oszacować (p. 5.4.6.2, PN-EN ISO/IEC 17025, 2005). Niepewność jest parametrem związanym z wynikiem pomiaru i charakteryzuje rozrzut wartości, który można w uzasadniony sposób przypisać wielkości mierzonej (Dobecki, 2004; Arendarski, 2003). Z kolei, według normy PN-ISO 10012-1 (2004), niepewność pomiaru to wynik postępo-

wania mającego na celu oszacowanie przedziału, wewnątrz którego znajduje się wartość prawdziwa wielkości mierzonej, zwykle z daną wiarygodnością. Niepewność może być wyrażona za pomocą odchylenia standardowego (wartości bezwzględne w określonych jednostkach) lub współczynnika zmienności (wartości względne). Niepewność może być również wielokrotnością tych parametrów (z uwzględnieniem współczynnika rozszerzenia  $k$ ), w zależności od przyjętego poziomu ufności (patrz również akapity Walidacja oraz Zasady wyznaczania niepewności - budżet niepewności). W praktyce obliczeniowej niepewność określa się na dwóch poziomach ufności (przedziałach ufności), w zależności od tego, jaką część przedziału rozkładu wartości się przyjmuje. Do tych obliczeń przyjmuje się założenie o rozkładzie normalnym (najczęściej) lub, gdy rozkład jest inny, standaryzuje się go do rozkładu normalnego. W przypadku, gdy przedział ufności wokół wartości umownie prawdziwej (w praktyce jest to wartość średnia z pomiarów lub wartość średnia skorygowana o błąd systematyczny), dla którego określa się niepewność, wynosi około 68%, niepewność taką nazywa się niepewnością standardową ( $P \leq 0,32$ ). Mówimy wtedy, że niepewność standardowa określa przedział, wewnątrz którego znajduje się wartość prawdziwa, z prawdopodobieństwem 68%. Z kolei, jeżeli przedział ufności wokół wartości umownie prawdziwej wynosi około 95%, niepewność taką nazywa się niepewnością rozszerzoną lub po prostu niepewnością ( $P \leq 0,05$ ). Mówimy wtedy, że niepewność rozszerzona określa przedział, wewnątrz którego znajduje się wartość prawdziwa z prawdopodobieństwem 95%. Przedział ufności wynoszący 95% jest powszechnie stosowanym przedziałem służącym do określenia niepewności rozszerzonej. Obie niepewności, standardowa i rozszerzona, są pojęciami powszechnie przyjętymi w metrologii i teorii pomiarów.

### Zasady wyznaczania niepewności - budżet niepewności

Wyróżnia się dwie metody szacowania niepewności: typu A i typu B. **Metoda typu A** polega na szacowaniu niepewności metodą statystyczną, na podstawie serii obserwacji. W celu obliczenia niepewności metodą typu A należy przeprowadzić wyczerpujące badania związane z wykonaniem licznych pomiarów

i poddaniu ich wyników analizie statystycznej. W przypadku, gdy takie badania nie są ekonomicznie uzasadnione, niepewność można oszacować innymi praktycznymi sposobami, określanymi jako **metoda typu B**. Nazwą tą objęte są inne niż oparte na własnych badaniach statystycznych sposoby pozyskiwania informacji o niepewności. Informacje te mogą być uzyskane z uwzględnieniem takich przesłanek, jak: wcześniejsze wyniki pomiarów i własne doświadczenie, właściwości stosowanych materiałów i przyrządów, specyfikacje producentów (np. dotyczące dokładności wzorców i wyposażenia badawczego), dane z certyfikatów i tablic fizycznych.

Na wynik pomiaru wpływa wiele czynników o charakterze losowym. Oznacza to, że niepewność nie jest wielkością prostą składającą się tylko z jednego czynnika. W rzeczywistości niepewność jest funkcją wielu składowych zmiennych losowych. Mówimy wtedy, że niepewność pomiaru (lub metody) jest niepewnością złożoną składającą się z poszczególnych niepewności cząstkowych. W celu obliczenia niepewności złożonej należy stworzyć tzw. budżet niepewności, który jest zestawieniem wszystkich zidentyfikowanych niepewności cząstkowych (Ellison i in., 2000). Niepewności cząstkowe szacuje się, stosując dwie podstawowe zasady. Po pierwsze, niepewności te należy przedstawić w postaci niepewności standardowych, czyli niepewności, które odpowiadają przedziałowi ufności 68% dla rozkładu normalnego. Niepewność standardowa jest charakteryzowana przez odchylenie standardowe średniej arytmetycznej. Po drugie, niepewności cząstkowe należy przedstawić w postaci względnej. Jest to konieczne ze względu na różne zazwyczaj jednostki miar składanych niepewności cząstkowych (np. niepewność pomiaru objętości wyrażona w mililitrach i niepewność masy odważanej próbki wyrażona w gramach). Niepewności w postaci względnej można wyrażać również w ujęciu procentowym. Najlepszym parametrem określającym wówczas niepewność standardową jest współczynnik zmienności średniej arytmetycznej. Obliczone niepewności cząstkowe należy następnie złożyć zgodnie z zasadą propagacji Gaussa:

$$Us_n = \sqrt{us_1^2 + us_2^2 + \dots us_n^2}$$

gdzie:



$U_{s_n}$  – złożona niepewność standardowa, składająca się z  $n$  niepewności cząstkowych (standardowych);

$us_1, us_2, us_n$  – niepewności cząstkowe (standardowe).

Powyższy wzór jest szczególną postacią ogólnego wzoru zawierającego pod pierwiastkiem sumę kwadratów iloczynów odpowiednich pochodnych cząstkowych i niepewności, zamiast sumy kwadratów samych niepewności. Z zasady propagacji Gaussa wynika, że wariancja złożona jest równa sumie wariancji składowych, co jest równoważne stwierdzeniu, że niepewność złożona podniesiona do kwadratu jest sumą kwadratów niepewności cząstkowych (w teorii błędów niepewności podniesione do kwadratu odpowiadają wariancjom). Uzyskana w ten sposób złożona niepewność standardowa jest niepewnością wyrażoną w postaci względnej, najczęściej w ujęciu procentowym (współczynnik zmienności). Ostatnim etapem liczenia niepewności jest jej odpowiednie rozszerzenie, tak aby odpowiadała rozszerzonemu przedziałowi ufności (95%). W tym celu należy pomnożyć złożoną niepewność standardową przez współczynnik rozszerzenia  $k$  ( $U_{95\%} = k \times U_{s_n}$ ). Przyjęto, stosując pewne przybliżenie, że jego wartość wynosi 2. Mając tak obliczoną niepewność, wynik pomiaru można przedstawić w sposób następujący:

$$X_{sr} \pm U_{95\%}$$

gdzie:

$X_{sr}$  – wartość umownie prawdziwa,

która jest wartością średnią z pomiarów;  
 $U_{95\%}$  – niepewność przy poziomie ufności 95%.

Końcowy wynik pomiaru można przedstawić również w postaci bezwzględnej, przeliczając wartość procentową niepewności na konkretne jednostki. Przykładowo, jeżeli  $X_{sr} = 6,6$  g/kg, a  $U_{95\%} = 10\%$ , wynik można przedstawić jako:

$$6,6 \text{ [g/kg]} \pm 0,66 \text{ [g/kg]}$$

Obliczona powyżej niepewność (złożona i rozszerzona) jest niepewnością pomiaru. Taka niepewność obejmuje czynniki związane z badaniami w jednym laboratorium, w odniesieniu do konkretnej metody oznaczania danego składnika. Niepewność ta może być również rozszerzona o czynniki związane z badaniami w innych laboratoriach i badaniami porównawczymi między różnymi sposobami oznaczania tego samego składnika. Wtedy można mówić o niepewności metody. Ma ona szersze znaczenie (obejmuje więcej czynników) niż niepewność pomiaru i nie odnosi się tylko do analiz wykonywanych określoną metodą w jednym laboratorium. Dodatkowym źródłem informacji o niepewności metody (czyli niepewności w szerszym znaczeniu) mogą być wyniki badań międzylaboratoryjnych, wyniki badań porównawczych między różnymi metodami oznaczania tego samego składnika (mogą to być metody stosowane przez różne laboratoria) oraz wyniki analiz materiałów referencyjnych.

## Literatura

Arendarski J. (2003). Niepewność pomiarów. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa.

Dobecki M. (2004). Zapewnienie jakości analiz chemicznych. Instytut Medycyny Pracy im. prof. dra med. J. Nofera Press, Łódź.

Ellison S.L.R., Rosslein M., Williams A. (eds). (2000). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Eurachem/Citac Guide 2000.

PN-71/N-02050 (1971). Metrologia. Nazwy i okre-

ślenia. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.

PN-EN ISO 10012 (2004). System zarządzania pomiarami. Wymagania dotyczące procesów pomiarowych i wyposażenia pomiarowego. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.

PN-EN ISO/IEC 17025 (2005). Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa.

## SOME ASPECTS OF VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS

### Summary

Recent years have seen growing demands on research laboratories performing chemical analyses and physical or physicochemical measurements. Increasingly high emphasis is placed on the quality of analytical techniques that have been adequately verified and defined in terms of usefulness for testing and estimation of validation parameters. Laboratories should use documented research methods that are reliable and free of systematic errors.

The requirements concerning the competence of research and calibration laboratories are defined by the PN-EN ISO/IEC 17025 standard (2005). It specifies the use of methods published in international, regional or national standards as well as methods based on these standards or on texts published in research journals and supplemented, extended and adapted by laboratories. It also allows the use of the laboratory's own procedures.

In addition, the PN-EN ISO/IEC 17025 standard sets out that the developed method should be properly validated before use (p. 5.4.4.). By testing and presenting objective evidence, validation confirms that the requirements concerning the intended application have been fulfilled and the method is useful for solving a given problem.

This paper discusses selected aspects of validation of analytical methods, which are a very important issue related to the elaboration of research procedures.



Tokarnia k. Kielc (fot. red.)