



OPTIMALIZACJA PROCESU WALIDACJI/WERYFIKACJI Z UWZGLĘDNIENIEM NIEPEWNOŚCI POMIARU W LABORATORIACH BADAWCZYCH

dr inż. AGNIESZKA WIŚNIEWSKA

SPOTKANIE KOMISJI DS. METROLOGII
KLUB POLLAB

29.12.2023 r.

WALIDACJA / WERYFIKACJA



WALIDACJA / WERYFIKACJA



Walidacja / weryfikacja jest potwierdzeniem, przez zbadanie i przedstawienie obiektywnego dowodu, że zostały **spełnione** szczególne **wymagania** dotyczące konkretnie **zamierzonego zastosowania**.

Walidacja / weryfikacja ma zatem na celu sprawdzenie, czy w warunkach danego laboratorium jesteśmy w stanie wykonać oznaczenie daną metodą analityczną co najmniej z **założoną precyzją, poprawnością i niepewnością**.

PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02

7.2.1 WYBÓR I WERYFIKACJA METOD



Laboratorium powinno stosować właściwe metody i procedury dla całej działalności laboratoryjnej oraz jeżeli jest to właściwe, do oceny niepewności pomiaru, jak również techniki statystyczne stosowane do analizy danych.

Jeżeli klient nie określił metody, która ma być zastosowana, laboratorium powinno wybrać właściwą metodę i poinformować klienta o wybranej metodzie.

Laboratorium powinno zweryfikować, czy jest w stanie prawidłowo realizować metody przed ich wprowadzeniem, poprzez upewnienie się, że może osiągnąć wymagane parametry.

PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02

7.2.1 WYBÓR I WERYFIKACJA METOD



Jeżeli wymagane jest opracowanie metody, powinna to być planowana działalność, a jej realizacja powinna być powierzona **personelowi posiadającemu odpowiednie kompetencje i zasoby**.

Podczas opracowywania metody należy przeprowadzać **okresowe przeglądy**, aby potwierdzić, że **potrzeby klienta są nadal spełniane**.

PN-EN ISO/IEC 17025:2018-02

7.2.2 WALIDACJA METOD



Laboratorium powinno przeprowadzić walidację metod nieznormalizowanych, metod opracowanych przez laboratorium oraz metod znormalizowanych wykorzystywanych poza przewidzianym dla nich zakresem lub w inny sposób zmodyfikowanych.

Walidacja powinna być na tyle obszerna, na ile jest to konieczne, aby **spełnić potrzeby danego zastosowania lub obszaru zastosowania.**

Cechy charakterystyczne walidowanych metod, ocenione z punktu widzenia zamierzonego zastosowania, powinny być **odpowiednie do potrzeb klienta i spójne z wyspecyfikowanymi wymaganiami.**

PLAN WALIDACJI / WERYFIKACJI



PRZED PRZYSTĄPIENIEM DO PROCESU WALIDACJI / WERYFIKACJI



Przed przystąpieniem do procesu walidacji należy określić podstawowe cechy procedury analitycznej:

- ✓ czy ma to być analiza jakościowa, czy ilościowa;
- ✓ rodzaj oznaczanego analitu;
- ✓ matryce, w których będzie oznaczany dany analit;
- ✓ zakres stężeń oznaczanego analitu;
- ✓ obecność substancji przeszkadzających (interferentów) i sposoby eliminowania ich działania;
- ✓ istnienie regulacji prawnych lub innych wymogów, którym powinna sprostać dana procedura analityczna;

PRZED PRZYSTĄPIENIEM DO PROCESU WALIDACJI / WERYFIKACJI



Przed przystąpieniem do procesu walidacji należy określić podstawowe cechy procedury analitycznej:

- ✓ wymagana wartość granicy wykrywalności i granicy oznaczalności;
- ✓ wymagany poziom dla precyzji metody;
- ✓ wymagany poziom dla poprawności metody;
- ✓ wymagany zakres stosowania;
- ✓ wymagana niepewność;
- ✓ wymagana odporność metody;
- ✓ wymagana aparatura pomiarowa i sprzęt pomocniczy.

ZAŁOŻENIA WALIDACYJNE / WERYFIKACYJNE



Przykładowy plan weryfikacji / walidacji:

PARAMETRY METODY	Zakres metody: 0,15 ÷ 20,0 [mg/l]	
	SYMBOL	ZAŁOŻENIE:
Liniowość	r	> 0,995
Granica wykrywalności	LOD	≤ 0,05 [mg/l]
Granica oznaczalności	LOQ	≤ 0,15 [mg/l]
Poprawność metody	D	< 10%
Powtarzalność	Powt.	< 10%
Precyzja pośrednia	Prec. pośr.	< 10%
Odzysk	R	90 ÷ 110%
Niepewność rozszerzona	U(y)	< 20%

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA PARAMETRÓW WALIDACYJNYCH / WERYFIKACYJNYCH



PARAMETRY WALIDACYJNE / WERYFIKACYJNE

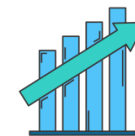


- 1) zakres pomiarowy;
- 2) liniowość (dla metod ilościowych opartych na krzywych kalibracyjnych);
- 3) granica wykrywalności (jeśli to właściwe);
- 4) granica oznaczalności (jeśli to właściwe);
- 5) precyzja (powtarzalność, precyzja pośrednia, odtwarzalność);
- 6) poprawność;
- 7) selektywność;
- 8) niepewność.

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA ZAKRESU POMIAROWEGO



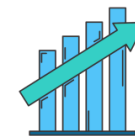
OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA ZAKRESU POMIAROWEGO



Zakres pomiarowy metody powinien zawsze być wyznaczony i potwierdzony zgodnie z zapotrzebowaniem klientów laboratorium lub zgodnie z poziomami, na których laboratorium zamierza badać rutynowo wprowadzając metodykę.

Zdeklarowany **zakres pomiarowy** należy potwierdzić zarówno w warunkach **precyzji**, jak i w warunkach **poprawności** metody.

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA ZAKRESU POMIAROWEGO



Dobłą praktyką jest aby **dolny poziom zakresu pomiarowego** był równy wartości **granicy oznaczalności**, tj. aby dolny zakres badań determinowała wartość granicy oznaczalności.

Jeśli **górny poziom zakresu pomiarowego** dla metod opartych na krzywych kalibracyjnych jest wartością większą niż ostatni punkt krzywej kalibracyjnej, to należy potwierdzić ten zakres z uwzględnieniem rozcieńczeń badanych próbek.

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA LINIOWOŚCI



OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA LINIOWOŚCI



Linowość metody wyznacza się podczas kalibracji wyposażenia dla metod opartych na krzywych kalibracyjnych.

Dobłą praktyką jest aby **najniższy punkt na krzywej kalibracyjnej** być równy wartości **granicy oznaczalności**.

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA LINIOWOŚCI



Zakres liniowości zależy w dużej mierze od **czułości metody**, tj. im większa czułość metody, tym węższy zakres liniowości i odwrotnie im mniejsza czułość metody, tym szerszy zakres liniowości. Wielkość tę charakteryzuje **współczynnik nachylenia krzywej kalibracyjnej (b)**.

Wielkością charakteryzującą rozmieszczenie wartości sygnałów analitycznych zależnych od stężenia jest **współczynnik korelacji liniowej krzywej kalibracyjnej (r)**. Im równomierniej rozłożone są punkty na krzywej kalibracyjnej, tym współczynnik ten ma wyższą wartość, dążącą do jedności.

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA LINIOWOŚCI



Do budowania krzywej kalibracyjnej wykorzystywane są **certyfikowane materiały odniesienia (CRM)** wyprodukowane przez kompetentnego producenta i zapewniające spójność pomiarową.

Roztwory kalibracyjne przygotowuje się z certyfikowanych materiałów odniesienia, które są dedykowane do kalibracji wyposażenia.

Podczas przygotowania roztworów kalibracyjnych należy postępować tak, aby nie przerwać łańcucha spójności pomiarowej.

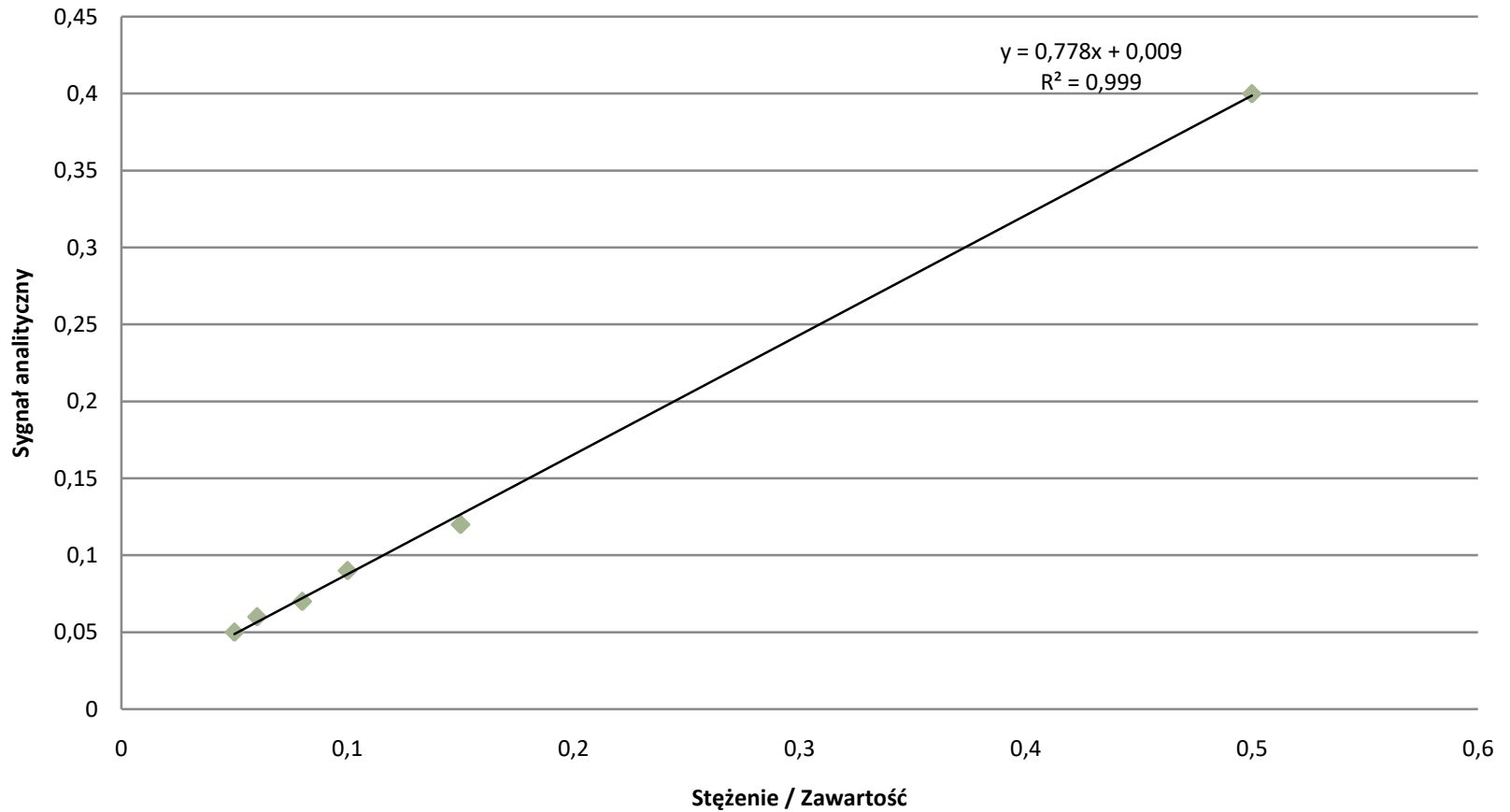
OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA LINIOWOŚCI



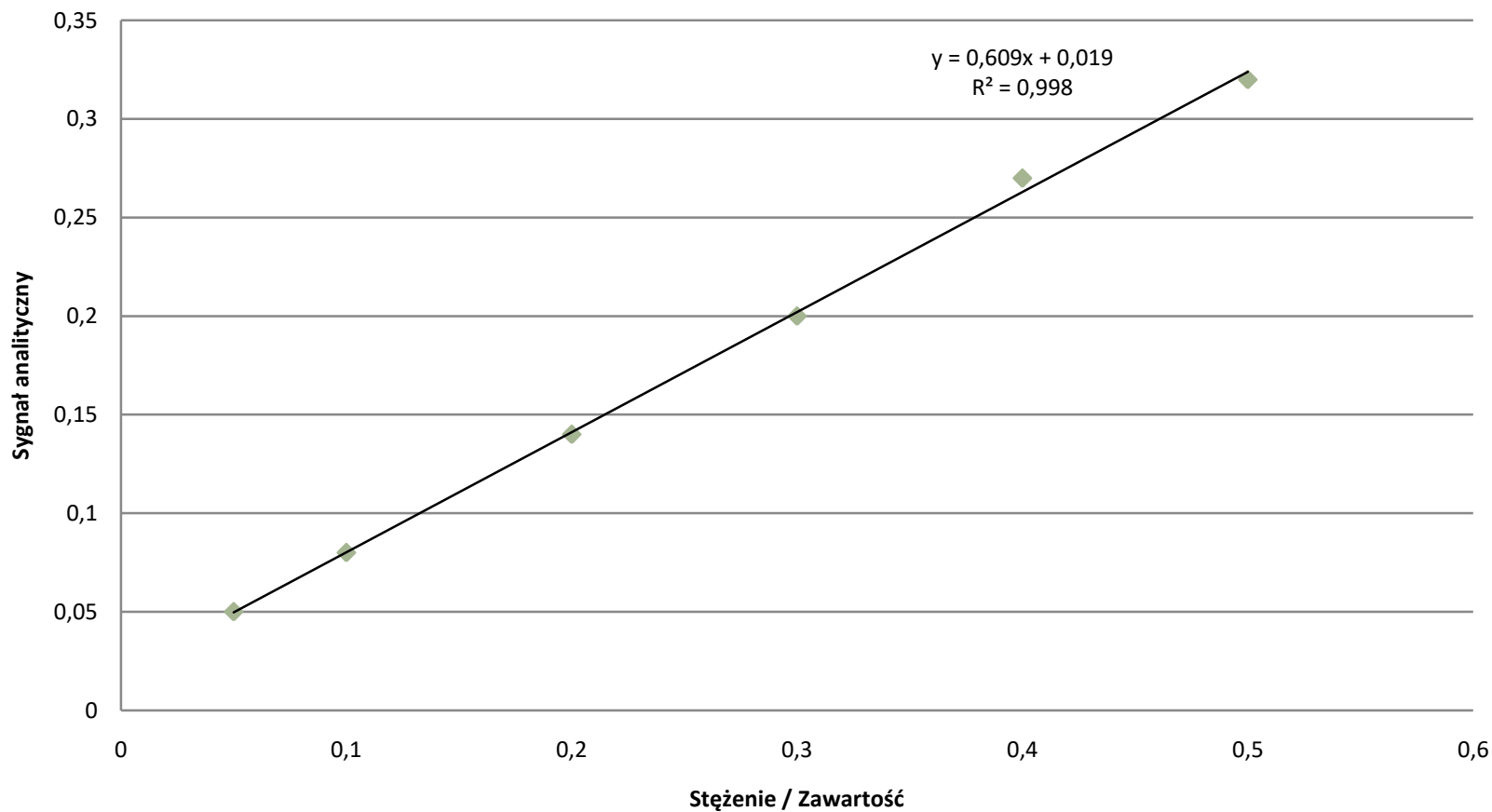
Wielkością charakteryzującą rozmieszczenie wartości sygnałów analitycznych zależnych od stężenia jest **współczynnik korelacji liniowej krzywej kalibracyjnej (r)**. Im równomierniej rozłożone są punkty na krzywej kalibracyjnej, tym współczynnik ten ma wyższą wartość, dążącą do jedności.

Należy pamiętać aby do kalibracji wyposażenia przygotować roztwory o takich stężeniach, aby równomiernie były rozłożone na krzywej kalibracyjnej.

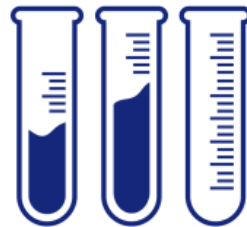
KRZYWA KALIBRACJI – niewłaściwe rozmieszczenie punktów



KRZYWA KALIBRACJI – właściwe rozmieszczenie punktów



OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA GRANICY WYKRYWALNOŚCI



OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA GRANICY WYKRYWALNOŚCI



O poprawności obliczonej wartości granicy wykrywalności mówią nam dwie następujące zależności:

$$10 \cdot \text{LOD} > c$$

$$\text{LOD} < c$$

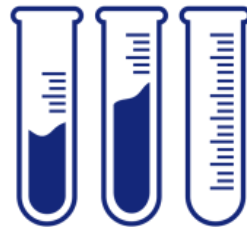
gdzie:

c – stężenie analitu w próbkach badanych

Jeżeli nie jest spełniony warunek pierwszy ($10\text{LOD} > c$), to oznacza, że stężenie przygotowanych analitów (tych na poziomie zbliżonym do spodziewanej LOD) jest za wysokie i należy wówczas przeprowadzić cały tok wyznaczania LOD na nowych roztworach wzorcowych o mniejszym stężeniu.

Jeżeli nie jest spełniony warunek drugi ($\text{LOD} < c$), wówczas stężenie w przygotowanych wzorcach jest za małe i należy przeprowadzić cały tok wyznaczania LOD na nowych roztworach wzorcowych o większym stężeniu.

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA GRANICY OZNACZALNOŚCI



OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA GRANICY OZNACZALNOŚCI

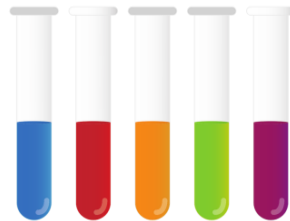


Wyznaczoną **granice oznaczalności** należy **zweryfikować**, wykonując materiały odniesienia oraz próbki rzeczywiste o stężeniach na poziomie wyznaczonej wartości granicy oznaczalności, aby potwierdzić na poziomie precyzji oraz na poziomie poprawności metody w odniesieniu do przyjętych na etapie planu walidacji / weryfikacji kryteriów.

Poziom	Powtarzalność [%]
0,15	7,95

Poziom	Poprawność [%]
0,15	7,89

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA PRECYZJI



OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA PRECYZJI METODY



Precyzja metody powinna być potwierdzona w całym zakresie pomiarowym przede wszystkim na **próbkach rzeczywistych**, które rutynowo badane są w danym laboratorium.

Należy zbadać i potwierdzić precyzję minimum na **najniższym** oraz na **najwyższym** poziomie wartości badanego parametru z wykorzystaniem różnych matryc, które badane są rutynowo lub które zamierza badać rutynowo laboratorium wprowadzając metodykę, tak aby potwierdzić metodę w całym zakresie.

Dodatkowo dobrą praktyką jest wyznaczanie precyzji na poziomach, na których najczęściej występuje dany parametr w próbkach różnych matryc badanych w laboratorium rutynowo lub które zamierza badać rutynowo laboratorium wprowadzające metodykę.

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA PRECYZJI METODY



Precyzję należy wyznaczyć w warunkach:

- ✓ powtarzalności,
- ✓ precyzji pośredniej,
- ✓ odtwarzalności (jeśli to możliwe i uzasadnione).

Należy rozpatrywać uzyskane wyniki pod względem ich sensu analitycznego.

Poziom	Powtarzalność [%]	Precyzja pośrednia [%]
0,15	7,90	9,18
0,50	3,78	5,61
2,00	3,38	5,46
5,00	2,28	5,29
10,0	2,09	3,60
20,0	2,02	2,38

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA POPRAWNOŚCI



OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA POPRAWNOŚCI METODY



Poprawność metody powinna być potwierdzona w całym zakresie pomiarowym przede wszystkim na **próbkach certyfikowanych materiałów odniesienia (CRM)**, lub poprzez **wzorcowanie wyposażenia pomiarowego w odpowiednich punktach** w całym zakresie pomiarowym, tak aby zapewnić **spójność pomiarową**.

Podczas przygotowania próbek CRM należy postępować tak, aby nie przerwać łańcucha spójności pomiarowej.

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA POPRAWNOŚCI METODY



Należy zbadać i potwierdzić poprawność **minimum** na **najniższym** oraz na **najwyższym** poziomie wartości badanego parametru, tak aby potwierdzić metodę w całym zakresie.

Dodatkowo dobrą praktyką jest wyznaczanie poprawności na poziomach, na których badana była precyzja w próbkach rzeczywistych różnych matryc podczas wyznaczania precyzji.

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA POPRAWNOŚCI METODY



Należy rozpatrywać uzyskane wyniki pod względem ich sensu analitycznego.

Poziom	Poprawność [%]
0,15	7,86
0,50	5,79
2,00	5,14
5,00	4,93
10,0	4,86
20,0	3,75

OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA ODZYSKU



OPTYMALIZACJA WYZNACZANIA ODZYSKU



Wzbogacanie próbek i badanie odzysku dodanej substancji do próbki rzeczywistej ma na celu **kontrolowanie wpływu matrycy** na badany analit, czyli wpływu czynników przeszkadzających. Może być więc **miarą selektywności metody**.

Przy wzbogacaniu próbek należy pamiętać o tym, żeby dodawać **możliwie małą ilość substancji wzorcowej do próbki o możliwie dużym stężeniu**, tak, aby próbki **zbytnio nie rozcieńczyć i nie zmienić przez to jej matrycy**.

Dodatek materiału odniesienia do próbki powinien być proporcjonalny do stężenia / zawartości oznaczonego analitu w próbce rzeczywistej (50-150%).

OPTIMALIZACJA WYZNACZANIA ODZYSKU



Dobłą praktyką jest wyznaczanie odzysku na różnych poziomach zakresu wartości badanego parametru z wykorzystaniem różnych matryc, które badane są rutynowo lub które zamierza badać rutynowo laboratorium wprowadzając metodykę, tak aby potwierdzić metodę w całym zakresie.

Poziom	Dodatek CRM	Odzysk [%]	BIAS [%]
0,15	0,10	92,57	7,43
0,50	0,50	94,46	5,54
2,00	3,00	104,36	4,36
5,00	5,00	95,79	4,21
10,0	10,0	104,19	4,19

OPTYMALIZACJA SZACOWANIA NIEPEWNOŚCI



OPTIMALIZACJA SZACOWANIA NIEPEWNOŚCI



Dobłą praktyką jest szacowanie niepewności na różnych poziomach zakresu wartości badanego parametru, tak aby dokonać oceny niepewności i podjąć decyzję, czy przyjmujemy dla całego zakresu pomiarowego metody maksymalną wartość niepewności, czy rozdzielamy na podzakresy z charakterystycznymi wartościami oszacowanej niepewności.

Budżet niepewności złożonej szacujemy propagując niepewności względne charakteryzujące **różne parametry walidacyjne / weryfikacyjne (cechy charakterystyczne)** na różnych poziomach zakresu.



OPTYMALIZACJA SZACOWANIA NIEPEWNOŚCI

		Stężenie 0,2 [mg/l]	Stężenie 4,0 [mg/l]	Stężenie 20,0 [mg/l]	Stężenie 200 [mg/l]	Stężenie 400 [mg/l]	Stężenie 800 [mg/l]
	u_{wzgdna} [%]	u_{wzgdna} [%]	u_{wzgdna} [%]	u_{wzgdna} [%]	u_{wzgdna} [%]	u_{wzgdna} [%]	u_{wzgdna} [%]
Niepewność powtarzalności		2,99	1,43	1,28	0,86	0,79	0,76
Niepewność precyzji pośredniej		3,47	2,12	2,06	2,00	1,36	0,90
BIAS CRM		7,41	5,27	4,79	4,63	3,82	3,48
BIAS - odzysk		5,48	4,73	4,18	3,27	3,90	
Niepewność krzywej kalibracyjnej		18,80	0,90	0,20	0,30	0,40	0,40
Niepewność związana z rozcieńczeniem próbki					0,13	0,21	0,21
Niepewność przygotowania roztworów kalibracyjnych	0,12						
Niepewność złożona analityczna [%]		19,50	5,75	5,22	5,06	4,08	3,63
Niepewność rozszerzona analityczna [%]		39,00	11,50	10,45	10,12	8,17	7,25
Niepewność pobierania próbek	10,54						
Niepewność złożona z etapem pobierania próbek		22,17	12,01	11,77	11,69	11,31	11,15
Niepewność rozszerzona z etapem pobierania próbek		44,34	24,02	23,53	23,39	22,61	22,30

REWALIDACJA / PONOWNA WERYFIKACJA



REWALIDACJA / PONOWNA WERYFIKACJA



Walidacja/weryfikacja metody **nie jest procesem jednorazowym**, tzn. nie powinna być wykonana raz na wiele lat stosowania metodyki w laboratorium.

Powinien być to **proces ciągły** tak, jak procesem ciągłym jest zapewnianie ważności wyników.

REWALIDACJA / PONOWNA WERYFIKACJA



Rewalidacja / ponowna weryfikacja, bądź jej elementy, powinny być przeprowadzane, kiedy:

- 1) stwierdza się w wyniku kontroli jakości stosowanej metodyki zmienność jej parametrów walidacyjnych w czasie;
- 2) zmieniają się osoby wykonujące dane analizy;
- 3) zmieniają się przyrządy pomiarowe;
- 4) zmienia się lokalizacja wykonywanych badań, a co za tym idzie warunki prowadzonych badań.

**DZIĘKUJĘ
ZA UWAGĘ**
