



Analitikai módszerek validálása, érvényesítése

Segédlet Méréselmélet című tárgyhoz Környezetmérnök hallgatók részére

Összeállította: Horváthné Drégelyi-Kiss Ágota főiskolai tanársegéd
2008.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	2
2.	A módszerek validálásának lépései.....	4
2.1.	A módszer dokumentációjának elkészítése.....	4
2.2.	A validálási protokoll (terv)	4
2.3.	Validálási jegyzőkönyv	4
3.	A validálás során vizsgált fontosabb analitikai paraméterek	5
3.1.	Szelektivitás	5
3.2.	Linearitás, lineáris tartomány	5
3.3.	Érzékenység	6
3.4.	Kimutatási határ	6
3.5.	Meghatározási határ	7
3.6.	Robusztusság (állékonyság, szilárdság)	7
3.7.	Merevség (rigiditás)	7
3.8.	Pontosság (helyesség, torzítatlanság).....	8
3.9.	Precizitás	8
3.9.1.	Ismételhetőség	8
3.9.2.	Reprodukálhatóság	9
3.9.3.	Közbenső precizitás.....	9
4.	Felhasznált irodalom	10



1. Bevezetés

Az MSZ EN ISO 9000:2001 szabvány 3.8.5. fejezete szerint: az érvényesítés/jóváhagyás (validálás): „annak megerősítése objektív bizonyíték szolgáltatásával, hogy az adott szándék szerinti használathoz vagy alkalmazáshoz előírt követelmények teljesültek”.

Az analitikai eredményeket szolgáltató laboratóriumokkal szemben ma már általános az elvárás, hogy megfelelő minőségű, megbízható, más laboratóriumokkal és nemzetközi vonatkozásban is összevethető elemzési eredményeket szolgáltatassanak. Ezt a követelményt úgy lehet elérni, ha a laboratórium szervezetét, műszaki hátterét, felszerelését, személyzetét és működtetését nemzetközi tapasztalatok alapján kidolgozott elveknek megfelelően alakítják ki.

„A vizsgáló laboratóriumokban végzett analitikai mérések minőségbiztosításának alapeleme annak igazolása, hogy az adott mérési módszer (analitikai rendszer) a megkívánt analitikai cél, feladat megoldására alkalmas. Ez az igazolás, „érvényesítés” dokumentálja is az adott méréssel kapott analitikai eredmény hitelességét, hitelességét” [1]. Ezt az igazolást nevezzük a módszer validálásának. Analitikai módszert (eljárást) tehát csak valamilyen konkrét feladatra lehet validálni. A validálási folyamatot a következő esetekben kell elvégezni:

- új módszer bevezetésekor,
- igazolt módszer új feladatra való kiterjesztésekor,
- az igazolt módszert eddig nem használták az adott laboratóriumban, vagy ha változik a mérést végző személy vagy műszer,
- ha a módszer az ellenőrzés során nem bizonyul megfelelőnek.

Egy adott módszer bizonytalanságának becslése mellett egyéb ellenőrzésekre is szükség van annak bizonyítására, hogy a módszer teljesítményjellemzőit kézben tartjuk és a módszer az alkalmazni kívánt körülmények között tudományosan megalapozott. Ezeket az ellenőrzéseket gyűjtőnéven validálásnak, érvényesítésnek nevezzük. Egy módszer validálása bizonyítja, rendszerezett laboratóriumi vizsgálatokon keresztül, hogy a módszer teljesítményjellemzői kielégítik az analitikai mérési eredmények tervezett felhasználására vonatkozó követelményeket. A meghatározott teljesítményjellemzők többek között:

- szelektivitás és specifitás (selectivity, specificity),
- linearitás, lineáris tartomány (linearity, range),
- érzékenység (sensitivity),
- kimutatási határ (limit of detection: LOD; minimum detection limit: MDL)



- meghatározási határ (limit of quantitation: LOQ; minimum quantitation limit: MQL),
- robusztusság (robustness),
- merevség (ruggedness),
- pontosság (accuracy),
- precizitás (precision): ismételhetőség (repeatability) és reprodukálhatóság (reproducibility).

A dokumentált módszerek ezek a paramétereket egyértelműen tartalmaznia kell, hogy a felhasználó eldönthesse, alkalmas-e a módszer a saját igényeire.

A szabványos módszereket szakértők csoportja egymással együttműködve dolgozza ki. Elméletileg ez a fejlesztés a validálás valamennyi aspektusának figyelembevételét jelenti. A felelősség azonban kizárólag a felhasználót terheli abból a szempontból, hogy ellenőrizze, vajon a módszer dokumentált validálás foka megfelel-e az ő igényeinek. Még ha a validálás teljes körű is, a felhasználónak a dokumentált teljesítményjellemzőket ellenőriznie kell. Magától értetődően a fenti paraméterek kiszámítása mögötti elméletben különböző nézetek vannak.



2. A módszerek validálásának lépései

2.1. A módszer dokumentációjának elkészítése

A módszer dokumentáció teljes körűen megadja a módszer adott laboratóriumban történő alkalmazásának menetét részletezve a használt műszereket, azok beállítását, a vegyszereket, eszközöket, a műveletek szabatos leírását, a kalibrálást, az eredmények értékelését stb.

2.2. A validálási protokoll (terv)

Megfogalmazzuk az analitikai célt, a feladatot. Felmérjük, hogy az adott analitikai cél eléréséhez milyen tárgyi (készülékek, eszközök, infrastruktúra, vegyszerek, oldatok, referencia anyagok) és személyi feltételek szükségesek. Megadjuk a validálandó analitikai teljesítményjellemzőket és azok elfogadási szintjeit (módszer alkalmasságának vizsgálata). Megadjuk a rendszeralkalmasság ellenőrzéséhez szükséges paraméterek körét (műszer megfelelőségének vizsgálata). Részletesen meghatározzuk a módszer menetét (mintavétel, minták tárolása, szállítása, kalibrálás, vak minta, mintaelőkészítés, mérés menete, kísérleti körülmények, mennyiségi értékelés, eredmények megadási módja, mérési adatok hibái és számszerű jellemzésük). Határidőket jelölünk ki a validálás lépéseinek elvégzésére, megjelölve a felelősségi szinteket.

2.3. Validálási jegyzőkönyv

Ebben a dokumentumban leírják a protokoll szerint elvégzett vizsgálatok menetét, megadják a vizsgálatok primer adatait, valamint a számításokat és az eredményeket. Összevetik a kiválasztott analitikai paraméterek értékeit a tervezett értékekkel.



3. A validálás során vizsgált fontosabb analitikai paraméterek

3.1. Szelektivitás

„Egy módszer szelektivitása arra vonatkozik, hogy a módszer milyen mértékben képes adott alkotó(k) meghatározására egy komplex mintamátrixban a mátrix egyéb komponenseinek jelenlétében (zavaró hatása mellett). Azt a módszert, amely egy komponensre vagy a komponensek egy csoportjára tökéletesen szelektív, specifikusnak nevezzük. A módszer alkalmazhatóságát különböző, ismert összetételű mintákkal, a tiszta standard oldatoktól a komplex mátrixokig kell tanulmányozni. Minden esetben a kérdéses alkotó(k) visszanyerési értékét meg kell határozni és a feltételezett zavaró hatásokat kell jellemezni. A felismert zavaróhatásokat modell vizsgálatokkal lehet tanulmányozni és bemutatni a kiküszöbölés hatékonyságát. A módszer alkalmazására vonatkozó bármilyen korlátozást a módszer dokumentációjában rögzíteni kell.” [2]

Csoport szelektív módszer az anyagok csoportját mutatja egy közös tulajdonságuk alapján. Univerzális módszer az anyagok széles spektrumára érzékeny. A zavaró jelek a vak mintában is jelet adnak, a kalibráló egyenesnek nem origó a tengelymetszete [3]. A szelektivitás tehát minőségi fogalom. Sok műszer, pl. az UV/VIS spektrofotométer is, önmagában nem, vagy igen kevésbé szelektív mérést biztosít. Ezért általában az összetett mintáknál mérés előtt el kell távolítani a zavaró komponenseket. Esetenként a meghatározandó anyagot teljesen el kell választanunk a minta többi komponensétől, miközben hozzá is tehetünk olyan anyagokat, melyek eredetileg nem voltak a mintában. A nitrogén-dioxid meghatározásánál lényegében ez történik, mivel a mintavételnél kémiai reakcióval kötjük meg a levegőben levő NO₂-t, és így elkülönítjük a többi komponensétől. Minthogy a mintavétel módja nem változott, csak a mérőműszert cseréljük, így a szelektivitás vizsgálatával az újvalidálásnál nem foglalkozunk.

3.2. Linearitás, lineáris tartomány

„A kalibráló görbe linearitásán azt értjük, hogy a görbe adott tartományában, az ún. lineáris tartományban, adott megbízhatósággal egyenesnek tekinthető. A linearitást a méréstartományt lefedő koncentrációjú minták elemzésével határozzuk meg. Az eredményekből a legkisebb négyzetek módszerével kiszámítjuk a regressziós egyenest a komponens koncentrációja függvényében.” [4] Általános elvárás, hogy az $R^2 > 0,98$ legyen, esetleg $R^2 > 0,99$.



A linearitás számszerű értékét a regressziós egyenes meredekségének varianciájaként jelöli meg. A lineáris tartomány a meghatározandó komponensnek azon koncentráció-tartománya, melynél a komponens az adott módszer szerint adott pontossággal, precizitással és linearitással mérhető. Előnyös, ha a lineáris tartomány minél szélesebb, egyes műszereknél elérheti az 5-8-szoros koncentrációt [5].

Egy módszer alkalmazhatóságának valójában nem szükséges feltétele, hogy a komponens válaszjele és a koncentráció között lineáris összefüggés legyen. Az UV-VIS spektrofotometriás módszerek, a HPLC, GC és GC-MS módszerek általában lineáris kalibrációt adnak, míg az atomabszorpciós módszer kalibrációja mérés technikai okokból (egyes elemek esetén) nem lineáris. „A jó linearitású módszerek esetén (pl. UV-VIS spektrofotometria) nulla vagy vak és 5 különböző koncentrációt reprezentáló pont általában elégséges az kalibráló függvény vagy kiértékelő függvény elkészítéséhez. Nem lineáris analitikai függvény esetén esetleg több kalibráló pont alkalmazása is indokolt lehet. Amennyiben a linearitás elengedhetetlen egy adott eljáráshoz, a számítás megfelelő algoritmusát meg kell határozni. A linearitás jellemzésére felhasználjuk a reziduumok eloszlásának vizsgálatát, és az F-próbát is.” [2]

3.3. Érzékenység

A kalibrációs görbe meredeksége (deriváltja). Lineáris függvény esetén egy adott érték, nem lineáris kalibrációs függvény esetén viszont az érzékenység változik a koncentráció függvényében (lokális meredekség). Ez utóbbi esetben a módszer érzékenységét általánosan a mérőgörbe kezdeti, lineáris szakaszának meredekségével jellemezhetjük. Az érzékenység jele: S.

3.4. Kimutatási határ

Független vak minták ismételt elemzésével állapíthatjuk meg, és a meghatározandó komponensnek azon legkisebb koncentrációját (anyagmennyiségét) jelenti, amely a vak mintától megbízhatóan megkülönböztethető. Megállapodás szerint az a koncentráció, amelyre adott válaszjel értéke (J_{KH}) a vak minta közepes válaszjele ($\bar{J}_{vak}$) plusz a tapasztalati szórás háromszorosa, vagyis:

$$J_{KH} = \bar{J}_{vak} + 3 * SD_{vak}$$

a koncentráció pedig:

$$c_{KH} = \frac{J_{KH} - \bar{J}_{vak}}{S} = \frac{3 * SD_{vak}}{S}$$



ahol S a korábban már említett érzékenység. Az SD/S értéknek a 2,5-5 -szeresét tekinthetik a kimutatási határnak. Ha a vak minta szórása nem mérhető az adott módszerrel, akkor a kalibráló sorozat legkisebb koncentrációjú tagjával közelíthetjük annak értékét.

Vak mintához adjunk a meghatározandó komponensből a becsült kimutatási határ 3 – 5-szörösének megfelelő mennyiségben, és mérjünk párhuzamosokat, majd számítsuk ki a tapasztalati szórást, melyet megszorozva a t Student-faktorral (99% konfidencia intervallumhoz és $n-1$ szabadságfokhoz tartozó érték) kapjuk a kimutatási határt.

3.5. Meghatározási határ

A mennyiségi mérés alsó határa, az a legkisebb koncentráció, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg. Az elfogadható szintet mindig definiálni kell, ez az analízis céljától függ. A meghatározási határ ismert koncentrációjú minták segítségével felvett koncentráció és szórás összefüggésből határozható meg, vagy a kimutatási határból becsülhető (annak 5-10-szeresét szokták venni).

Értéke meghatározható a vakminta válaszcijéhez tartozó tapasztalati szórás tízszereséből számolva:

$$c_{MH} = \frac{\bar{J}_{vak} + 10 * SD_{vak}}{S}$$

Ezen kívül az alapvonalzaj tízszereséből is meg lehet határozni.

3.6. Robusztusság (állékonyság, szilárdság)

A kísérleti körülmények változásának a hatása. A módszer robusztusságát úgy vizsgáljuk, hogy szándékosan, ki mértékben változtatjuk a mérési módszer paramétereit, vizsgáljuk azok következményeit, meghatározzuk hatásukat, annak szignifikáns voltát. Igen sok tényezőt lehetne vizsgálni, de mivel többségüknek a hatása elhanyagolhatóan kicsi, több tényező együttes vizsgálatára is lehetőség van az ún. kísérlettervezési statisztikai módszerek alkalmazásával. A robusztusság vizsgálatát célszerű a módszer fejlesztésének már a korai szakaszában elvégezni.

3.7. Merevség (rigiditás)

A különböző mérési körülmények hatása a módszer teljesítményére. A módszer merevségét úgy vizsgáljuk, hogy változtatjuk a mérés körülményeit (laboratóriumok, elemző személyek, készülékek, reagensek, elemzési napok, stb.) és vizsgáljuk azok következményeit.



Szokásos számértékkel való kifejezése a reprodukálhatósághoz hasonló, relatív szórás, RSD % .

3.8. Pontosság (helyesség, torzítatlanság)

A kapott érték és a valódi érték egyezésének mértéke. A pontosság többféleképp is vizsgálható. Megfelelő hiteles referenciaanyagot, vagy modell mintát (pl. mesterséges esővíz) elemzünk a módszerrel és összevetjük az elemzési eredményt a deklarált értékkel.

Ha megfelelő hiteles vagy tanúsított referenciaanyag nem áll rendelkezésre, a helyesség becslése úgy is elvégezhető, hogy a mintához az elemzés megfelelő fázisában hozzáadjuk a vizsgált komponens ismert mennyiségét (addicionálás, „spike”). Az adott módszerrel meghatározzuk a hozzáadott anyag koncentrációját, és azt összehasonlítjuk az ismert valódi koncentrációval (a visszanyerést százalékos alakban adjuk meg). A visszanyerés vizsgálat érvénye korlátozott, a helyesség meghatározására csak a módszernek a hozzáadást követő szakaszára alkalmas, korlátozásokkal (pl. a kioldásos előkészítésnél másként viselkedik a hozzáadott anyag, a mintában található anyaghoz képest).

A helyességet egy elfogadott módszer, vagy más független eljárás eredményeivel történő összehasonlítás, vagy laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálat (körvizsgálat) alapján is meghatározhatjuk. A pontosságot célszerű a tartomány legalább három pontján vizsgálni, minimum kilenc párhuzamos méréssel. A pontosság mennyiségi megadásakor a valódi értékre vonatkoztatott relatív (%-os) adatot adjuk meg, vagy az átlag és a valódi érték különbségét a konfidencia intervallumokkal.

3.9. Precizitás

Kölcsönösen független vizsgálati eredmények közötti egyezés mértéke, rendszerint a tapasztalati szórással kifejezve. Értéke általában függ a komponens koncentrációjától, ezért a precizitás koncentráció függését is meg kell határozni és dokumentálni kell. A módszer precizitása függ attól, hogy meghatározása milyen körülmények között történt.

3.9.1. Ismételhetőség

Az ismételhetőség a precizitás azon fajtája, aminél a minta elemzését az adott módszerrel, azonos anyagok felhasználásával, azonos kezelő, azonos laboratóriumban, rövid időintervallumban (a mérés időtartamától függően, egy-két nap) 7-11-szer megismételi, és ezen mérések szórását számítjuk. Az ismétlések száma lehet 6-10. A precizitást célszerű a tartomány legalább három pontján vizsgálni.

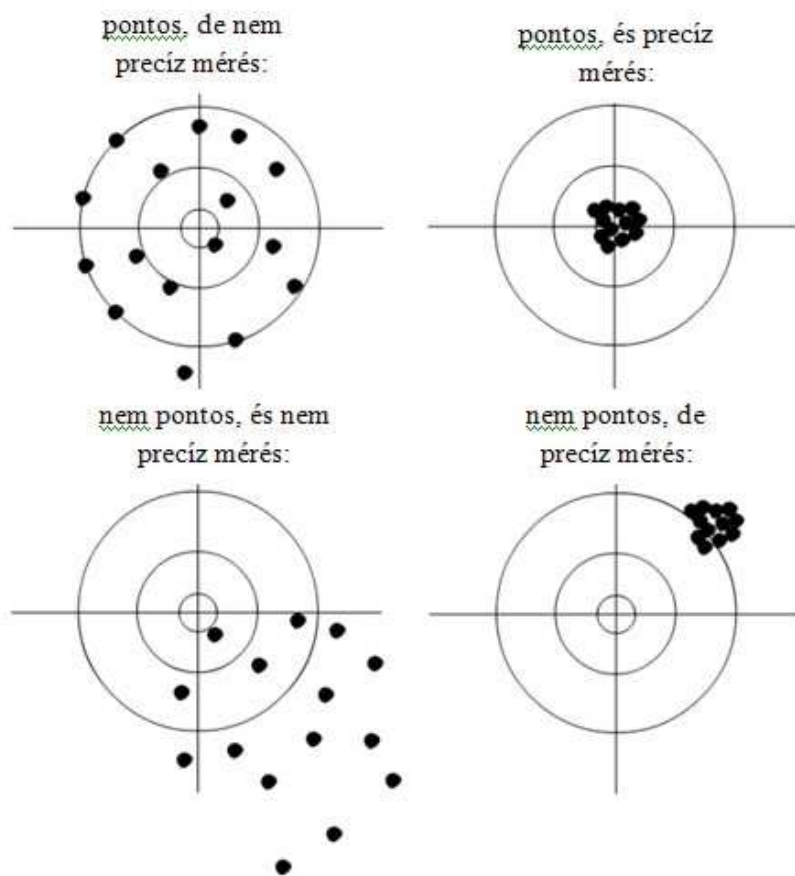
3.9.2. Reprodukálhatóság

A reprodukálhatóság a „precizitás azon fajtája, aminél a minta elemzését a tanulmányozott módszerrel különböző laboratóriumokban (körmérés), különböző műszerekkel, hosszú időintervallumban különböző analitikusok 7-11-szer megismételik, és kiszámítják a kapott összes eredmény szórását. A reprodukálhatóságot célszerű a tartomány legalább három pontján vizsgálni. Ha az adott vizsgálati módszert csak egy laboratórium használja, akkor a reprodukálhatóság vizsgálatánál a más laboratórium elmarad és csak a többi tényezőt változtatjuk. Ha az ismételőképesség és reprodukálhatóság jelentős eltérést mutat, fel kell tárni a különbség okát (eszköz, művelet, kezelő, vegyszer stb.).”

3.9.3. Közbenső precizitás

Az ismételhetőségen és reprodukálhatóságon kívül a külföldi irodalmak használják a közbenső vagy átmeneti precizitás (intermediate precision) fogalmát, mely közbenső időtávú (napok), más analitikus által vagy másik műszeren végzett mintaismétléseket jelent. Régebben ennek meghatározása a merevség vizsgálatához tartozott.

A pontosság és a precizitás fogalma jól illusztrálható a klasszikus célbalövési példával.



Az alábbi négy ábrán a céltábla közepe jelenti a valódi értéket, a lövedékek becsapódási helye pedig a mérési adatokat. Ha a mérési hiba kicsi, akkor a mérés pontos, a mért értékek a céltábla közepe körül helyezkednek el. Ha az adatok szórása kicsi, akkor a mérés precíz, a mért értékek egymáshoz közel, sűrűn vannak.



4. Felhasznált irodalom

1. Dr. Balla József: A kromatográfiás módszerek validálása. B&B Analitika, Továbbképző tanfolyam, 2007.03.12-14.
2. Dr Horvai György, Dr. Bezur László: Analitikai kémia II., Analitikai laboratóriumok minőségirányítása, analitikai módszerek validálása
3. http://www.kmf.hu/kmi/dokument_elemei/kornyanalitika/szenzorszabvány.ppt
4. Dr Gáspár Attila: Elválasztási módszerek validálása.
<http://delfin.unideb.hu/~agaspas/validalas.pdf>
5. Galbács G., Galbács Z., Sipos P.: Néhány fontos alapfogalom a műszeres analitikai kémiában, www.sci.u-szeged.hu/inorg/segedletek.pdf