

KVALIMETRIE

21

Referenční materiály v chemické analýze

Bedřich Friedecký, Josef Kratochvíla, Eva Klokočnicková, Jan Kučera, Zbyněk Plzák,
Miloslav Suchánek, Václav Sychra a Jan Tichý

Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních

Pokyn Eurachem/CITAC

Eurachem



ZAOSTŘENO
NA ANALYTICKOU CHEMII
V EVROPĚ

První část

Bedřich Friedecký, Josef Kratochvíla, Eva Klokočnicková, Jan Kučera, Zbyněk Plzák, Miloslav Suchánek, Václav Sychra a Jan Tichý: Referenční materiály v chemické analýze

V roce 2003 vznikla v pracovní skupině EURACHEM-ČR pro referenční materiály metodická příručka *Používání referenčních materiálů v chemické analýze* v rámci řešení úkolu Programu rozvoje metrologie ÚNMZ jako dílo autorského kolektivu českých autorů, jehož členy byli Ing. Karel Bičovský, Ing. Josef Dempír, CSc., RNDr. Luděk Dohnal, RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D., RNDr. Josef Kratochvíla, doc. Ing. Jan Kučera, CSc. a doc. Ing. Zbyněk Plzák, CSc.

Cílem příručky, která byla publikována jako součást svazku 14 příruček EURACHEM-ČR Kvalimetrie, bylo poskytnout analytickým a klinickým laboratorům a jejich posuzovatelům stručný návod k výběru a používání referenčních materiálů chemického složení.

Příručka vycházela z tehdejšího znění pokynů ISO (ISO Guide) řady 30. Uplynulé desetiletí přineslo zásadní inovaci všech těchto pokynů a vývoj jak v oblasti terminologie, užití referenčních materiálů, jejich přípravy v laboratořích pro vlastní použití při řízení kvality tak i při posuzování způsobilosti výrobců referenčních materiálů. Tyto změny si vyžádaly zásadní revizi znění příručky, která je zpracována opět v rámci řešení úkolů Programu rozvoje metrologie jako úkol č.VII/6/16 roku 2016. Na jejím znění se podíleli RNDr. Bedřich Friedecký, Ph.D.(kapitola 8, příklad 3), RNDr. Josef Kratochvíla (kapitola 8, příklad 3), Ing. Eva Klokočnicková (kapitola 2.5), prof. Ing. Jan Kučera, CSc. (kapitola 3, příklady 1 a 2), doc. Ing. Zbyněk Plzák, CSc. (kapitoly 1, 2 a 6 kromě 1.4 a 2.5, celková redakce), prof. Ing. Miloslav Suchánek, CSc. (kapitola 7), doc. RNDr. Václav Sychra, CSc. (kapitoly 4 a 5, celková redakce) a Ing. Jan Tichý (kapitola 1.4).

Jednotlivé postupy hodnocení a přenosu hodnot prostřednictvím referenčních materiálů doprovází několik příkladů praktických řešení. Stěžejní zásady práce s referenčními materiály – zlatá pravidla – jsou opět uvedena v rámečcích.

Druhá část:

Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních

Přeloženo z: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement. EURACHEM/CITAC Guide.

Vydalo sdružení EURACHEM-ČR, Technická 5, 166 28 Praha 6, jako 21. publikaci v řadě Kvalimetrie. První české vydání, Praha 2016

Přeložil David Milde

K tisku připravil Ivan Koruna

Editoři: Miloslav Suchánek a David Milde

Poděkování za finanční podporu patří MŠMT v rámci projektu LG 14029 a ÚNMZ v rámci projektu PRM 2016/VII/6/16.

© Eurachem-ČR, Praha 2016

© 2015. Autorská práva k Pokynu EURACHEM/CITAC jsou majetkem přispívajících autorů.

ISBN 978-80-86322-09-4

Obsah

Referenční materiály v chemické analýze

1	Úvod	7
1.1	Úloha referenčních materiálů v chemické analýze	7
1.2	Typy referenčních materiálů	7
1.3	Terminologie referenčních materiálů	8
1.4	Komise pro referenční materiály ISO	10
2	Podmínky a předpoklady pro použití referenčních materiálů	13
2.1	Výběr vhodného referenčního materiálu	13
2.2	Kritéria obecná – formální	14
2.3	Kritéria obecná – metrologická a technická	15
2.4	Kritéria specifická	15
2.5	Posuzování způsobilosti výrobců RM – akreditace	18
3	Použití referenčních materiálů k hodnocení	20
3.1	Test vychýlení	20
3.1.1	Využití dat o vychýlení	21
3.2	Validace metody	21
3.3	Kvantifikace nejistoty chemického měření (analýzy)	22
3.4	Posouzení výkonu laboratoře nebo analytika	22
4	Referenční materiály při přenosu hodnot	24
4.1	Kalibrace	24
4.1.1	Definice a základní pojmy	24
4.1.2	Kalibrační modely	25
4.1.3	Příspěvek nejistoty kalibrace k celkové nejistotě výsledku měření	25
4.2	Metrologická návaznost výsledků měření	26
4.2.1	Úvod	26
4.2.2	Definice	26
4.2.3	Realizace návaznosti	27
4.3	Přidělení hodnot dalším materiálům	28
5	Zacházení s referenčními materiály	29
6	Informace o dostupnosti referenčních materiálů	30
7	Vlastní příprava materiálů pro řízení kvality	33
7.1	Úvod	33
7.2	Terminologie	33
7.3	Použití materiálů pro řízení kvality	34
7.4	Algoritmus při přípravě QCM	34
7.5	Specifikace materiálu	34
7.6	Získání výchozího materiálu	35
7.7	Zpracování materiálu	35
7.8	Rozdělování a balení	35
7.9	Homogenita	36

7.10	Charakterizace a přidělení (indikativní) hodnoty	37
7.11	Stabilita QCM	37
7.12	Dokumentace u materiálů pro řízení kvality (QCM)	38
7.13	Skladování	39
7.14	Používání materiálů pro řízení kvality (QCM)	39
7.14.1	Použití QCM při tvorbě regulačních diagramů	39
7.14.2	Použití QCM při porovnání dvou analytických postupů	39
8	Použití referenčních materiálů v laboratorní medicíně	41
8.1	Funkce referenčních materiálů v laboratorní medicíně	41
8.2	Nedostatek referenčních materiálů v laboratorní medicíně a jeho příčiny	41
8.3	Referenční materiály a trh s <i>in vitro</i> diagnostiky (IVD MD)	42
8.4	Komutabilita referenčních materiálů IVD MD	42
8.5	Souhrn požadavků na referenční materiály v laboratorní medicíně	43
8.6	Procesy validace, dokumentace návaznosti, stanovení nejistoty a posouzení výkonnosti v klinických laboratořích pomocí referenčních materiálů	43
8.7	Certifikované referenční materiály	44
9	Literatura a doporučené prameny	48
10	Příklady	51
10.1	Příklad 1	51
10.2	Příklad 2	51
10.3	Příklad 3	52

Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních

Předmluva	59
1 Úvod	61
2 Oblast použití	62
3 Terminologie	63
4 Výběr vstupů pro stanovení cílové nejistoty měření	64
5 Použití existujících informací pro nastavení cílové nejistoty	65
5.1 Legislativa nebo specifikace produktu	65
5.1.1 Definovaná cílová nejistota	65
5.1.2 Definovaný interval shody	65
5.1.3 Definované výkonnostní charakteristiky měření	66
5.1.4 Definované rozhodovací riziko	69
5.2 Hodnotící kritérium způsobilosti nebo shody	70
5.2.1 Zkouška způsobilosti	70
5.2.2 Reprodukovatelnost měření	70
5.3 Studie cena/užitek	71
5.4 Závažnost studovaných trendů	71
5.5 Informace z jiných oblastí	72
6 Změna cílové nejistoty v závislosti na hodnotě veličiny	73
7 Porovnání odhadnuté nejistoty s cílovou nejistotou	74

8	Optimalizace nejistoty měření	75
9	Použití cílové nejistoty k usměrňování validace	76
10	Příklady	77
10.1	Definovaný interval shody	77
10.2	Definované výkonnostní charakteristiky měření	77
10.3	Definované rozhodovací riziko	77
10.4	Zkoušky způsobilosti	78
10.5	Reprodukovatelnost měření	78
10.6	Závažnost studovaných trendů	78
10.7	Informace z jiných oblastí	78
10.8	Změna cílové nejistoty v závislosti na hodnotě veličiny	79
	Literatura	80

1 Úvod

1.1 Úloha referenčních materiálů v chemické analýze

Zvláštnosti chemické analýzy se ve srovnání s jinými obory měření projevují i v postavení referenčních materiálů (RM) chemického složení. Převážně složitý vztah mezi obsahem stanovované složky (analytu) a měřeným analytickým signálem, jeho výrazné ovlivňování maticí vzorku i značný počet různých analytů jsou důvodem, proč jsou RM v chemické analýze nepostradatelné a nenahraditelné. Nepřekvapí proto, že RM chemického složení řádově převyšují jak počtem typů, tak celkovou spotřebou ostatní RM a etalony.

Pro chemickou laboratoř představují RM nástroj k dosažení a prokázání požadované kvality*, na druhé straně však často i nezanedbatelné náklady. Efektivní využití této investice záleží především na analytici. Uplynulé desetiletí přineslo zásadní inovaci všech základních pokynů ISO o RM (viz kapitolu 1.4) a vývoj jak v oblasti terminologie, užití referenčních materiálů, jejich přípravy v laboratořích pro vlastní použití při řízení kvality i při posuzování způsobilosti výrobců referenčních materiálů. Důsledkem tohoto vývoje bylo, že publikace zabývající se používáním referenčních materiálů v analytických a zdravotnických laboratořích, vydané začátkem tohoto tisíciletí [1–3] zastaraly, včetně prvního vydání této příručky [4]. Nové znění této příručky má napomoci laboratořím dokumentem v nepříliš rozsáhlém formátu získat stěžejní poznatky o současném pohledu na efektivní využívání referenčních materiálů v laboratorní praxi.

RM se uplatňují ve dvou hlavních směrech:

- **hodnocení:**
 - validace metody
 - vyhodnocování nejistoty výsledku
 - verifikace správného provedení metody
- **přenos hodnot:**
 - kalibrace měřicího (analytického) přístroje nebo systému
 - zajištění metrologické návaznosti výsledků
 - zajištění metrologické návaznosti hodnot RM nižších tříd a standardů

1.2 Typy referenčních materiálů

RM chemického složení se obvykle rozlišují podle typu (charakteru výchozího materiálu) anebo podle metrologické klasifikace (viz 1.3). Podle typu se RM dělí na:

- **čisté látky** s certifikovaným obsahem hlavní složky, případně nečistot

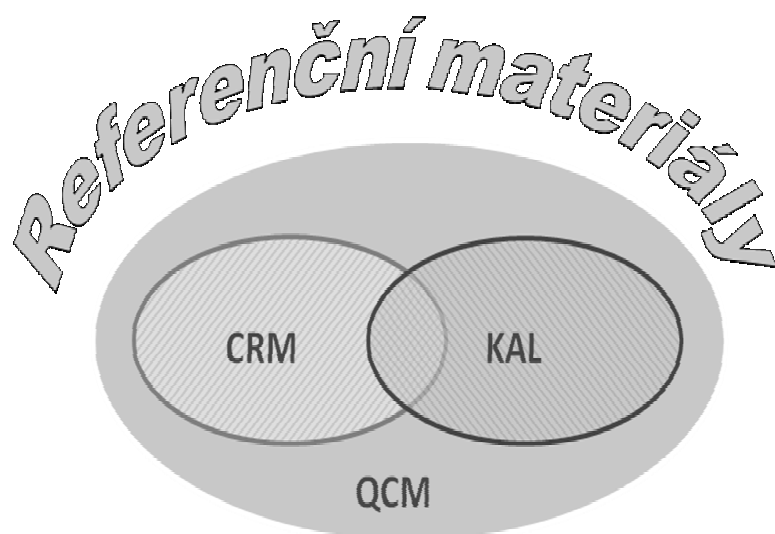
* Užitečnost analýzy lze vyjádřit nejistotou analytické informace. Tu tvoří nejistota analytického výsledku a nejistota vzorkování. Pokud není nejistota vzorkování pod kontrolou a ve srovnání s nejistotou výsledku nízká, mohou být práce analytika a přínos použitých referenčních materiálů znehodnoceny. Její odhad by proto měl předcházet řešení každého analytického problému.

Referenční materiály v chemické analýze

- **standardní roztoky a směsi plynů** (připravené obvykle gravimetricky)
- **matriční RM**, připravené z reálných přírodních nebo technických materiálů, výjimečně i synteticky tak, aby co nejvíce odpovídaly složení analyzovaných vzorků. Tento typ je v chemické analýze používán nejčastěji; obvykle se také jedná o materiál s více nebo všemi certifikovanými relevantními složkami.

1.3 Terminologie referenčních materiálů

V současné době se používá několik druhů referenčních materiálů, které se liší způsobem svého použití a svojí kvalitou, přičemž pojem referenční materiál je nově používán jako generický pojem ve smyslu, který je znázorněn na obrázku 1:



Obrázek 1. Mezi referenční materiály patří: certifikované referenční materiály (CRM), kalibrátory (kalibrační standardy, KAL) a materiály pro řízení kvality – (QCM – Quality Control Material)

Podle Pokynu ISO 30 (ISO Guide 30) [5], a obdobně podle definic uvedených v Mezinárodním metrologickém slovníku [6] a v jeho českém překladu [7], se rozlišují dvě základní metrologické třídy referenčních materiálů.

Referenční materiál RM

materiál, dostatečně homogenní a stabilní vzhledem k jedné či více specifikovaným vlastnostem, u kterého se stanovilo, že se hodí pro jeho zamýšlené použití v měřicím procesu.

POZNÁMKA 1. RM je generický termín.

POZNÁMKA 2. Vlastnosti mohou být kvantitativní nebo kvalitativní, např. identita látek nebo specií (druhů).

POZNÁMKA 3. Použití může zahrnovat kalibraci měřicího systému, posuzování měřicího postupu, přidělení hodnot jiným materiálům a řízení kvality.

POZNÁMKA 4. Pokyn ISO/IEC 99:2007 (TNI 010115 [3]) obsahuje analogickou definici (5.13), ale omezuje použití termínu „měření“ jen na kvantitativní hodnoty. Avšak poznámka 3 Pokynu ISO/IEC 99:2007, 5.13 (VIM) výslovně zahrnuje kvalitativní vlastnosti, které nazývá „jmenovitými vlastnostmi“.

Certifikovaný referenční materiál CRM

referenční materiál (RM) charakterizovaný metrologicky platným postupem pro jednu či více specifikovaných vlastností, doprovázený certifikátem referenčního materiálu, který poskytuje hodnotu specifikované vlastnosti, její přidruženou nejistotu a prohlášení o metrologické návaznosti.

POZNÁMKA 1. Pojem hodnoty zahrnuje jmenovitou vlastnost nebo kvalitativní znak jako je identita či sekvence. Nejistoty pro takové znaky mohou být vyjádřeny jako pravděpodobnosti nebo konfidenční úrovně.

POZNÁMKA 2. O metrologicky platných postupech pro výrobu a certifikaci referenčních materiálů pojednává, mezi jinými, Pokyny ISO 34 a 35.

POZNÁMKA 3. Pokyn ISO 31 je směrnici o obsahu certifikátů RM.

POZNÁMKA 4. Pokyn ISO/IEC 99:2007 (TNI 010115 [3]) obsahuje analogickou definici (5.14).

Pro úplnost je ještě třeba uvést značení dvou tříd RM, s nimiž se analytik setkává v poslední době stále častěji jak v literatuře, tak i v analytické praxi. Jsou to:

- **Materiál pro řízení kvality (QCM)**, (Quality Control Material – QCM, in-house RM, pracovní standard, aj.) je dostatečně homogenní materiál, který se používá při řízení kvality – zjišťování a kontrole stavu statistické regulace analytického systému kontrolními vzorky. Zásady pro vlastní přípravu těchto materiálů jsou předmětem příručky publikované jako nový Pokyn ISO 80 [8, 9]. Podrobně se těmito zásadami zabývá kapitola 7 této publikace.
- **Kalibrátor** je referenční materiál použitý pro kalibraci zařízení nebo měřicího postupu.

Postup přípravy a certifikace, požadavky na způsobilost organizace zabývající se výrobou RM a CRM a závazný obsah doprovodných dokumentů certifikátu referenčního materiálu nebo informačního listu produktu uvádějí podrobně pokyny ISO 34 a 31 (ISO Guide 34, 31) [10–12]. Přehled jednotlivých pokynů ISO zabývajících se RM a CRM uvádí následující kapitola. CRM připravované v americkém National Institute of Standards and Technology (NIST) se tradičně nazývají Standardní referenční materiály (SRM). Zkratka SRM[®] je chráněnou obchodní značkou.

Hlavními typy referenčních materiálů chemického složení jsou

- čisté látky
- standardní roztoky a směsi plynů
- matricové referenční materiály

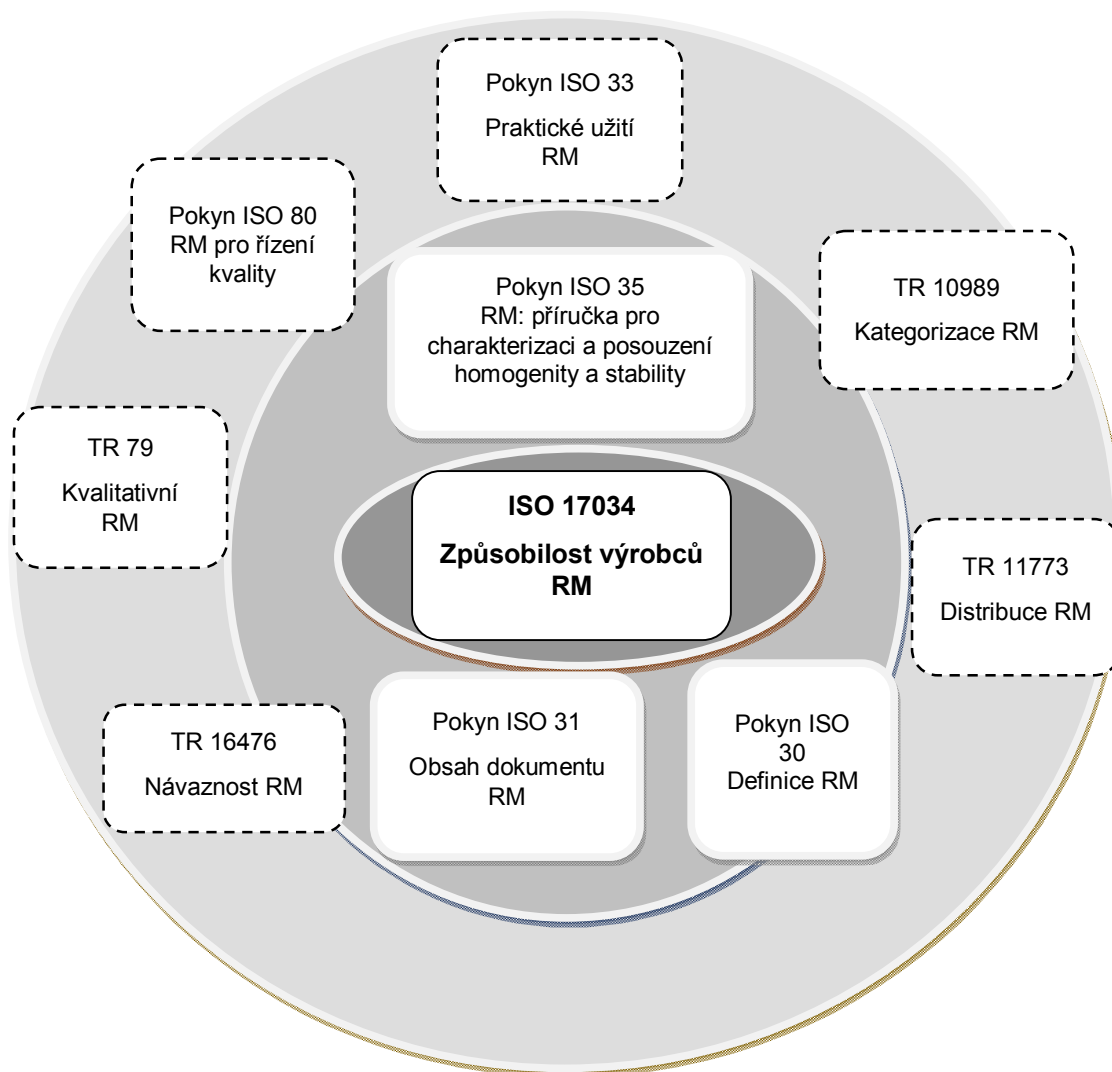
1.4 Komise pro referenční materiály ISO

Výbor pro referenční materiály Mezinárodní organizace pro normalizaci (ISO/REMCO) poprvé zasedal v Ženevě v roce 1976. V průběhu 80. let minulého století začal vydávat své první návody a doporučení v oblasti referenčních materiálů („Guides“ – pokyny). Postupem doby se zpříšňovaly požadavky na referenční materiály a s tím se i měnila pravidla, což se přirozeně odrazilo v jednotlivých dokumentech. Také se postupem času změnil význam RM v jednotlivých odvětvích. Jestliže nejprve převažovaly průmyslové RM z oblasti hutnictví, metalurgie včetně barevných kovů, skla a silikáty, geologické materiály, postupem času se do popředí dostaly RM v oblasti kvality života, zejména životního prostředí a zdraví.

Svoji roli sehrál i další vývoj a vliv souvisejících požadavků a zejména norem kvality a posuzování shody. Neméně významným aspektem byla zvyšující se role akreditace, harmonizované legislativy EU a národní legislativy. Původní návody byly tak v posledním desetiletí zcela přepracovány v „duchu doby“, rostoucích požadavků a dalších vlivů. Např. Pokyn ISO 34 se původně zabýval kvalitou při přípravě a certifikaci referenčních materiálů, následně se změnil na požadavky na způsobilost výrobců referenčních materiálů. V roce 2009 byl publikován jako první z přepracovávaných dokumentů, zatímco u navazujících předpisů probíhaly revize. V roce 2016 bude Pokyn ISO 34 nahrazen normou ISO 17034, aby se vyhovělo právnímu rámci jeho použití při akreditaci. Problém vznikl tím, že Pokyn ISO 34:2009 není harmonizovanou normou a tudíž nevyhovuje nařízení ES č. 765/2008, kterým se stanoví požadavky na akreditaci a dozor nad trhem. Podaří-li se v tomto roce též vydat nové znění Pokynu ISO 35, bude mít „celá rodina“ pokynů ISO/REMCO nové, vzájemně sladěné znění.

Dokumenty v přehledném hierarchickém uspořádání uvádí obrázek 2. Základem je norma ISO 17034 (způsobilost výrobců RM), která přímo odkazuje na normativní reference, kterými jsou Pokyn ISO 31 (Obsah doprovodné dokumentace, certifikátu RM), Pokyn ISO 30 (Definice a termíny) a Pokyn ISO 35 (RM: příručka pro charakterizaci a posouzení homogenity a stability). Ostatní dokumenty jsou především podpůrné. V tabulce 1.1 je uveden přehled dokumentů ISO se zřetelem na jejich vydání a překlad do českého jazyka.

Přehled reflektuje především způsobilost výrobců a jejich akreditaci podle připravované normy shody ISO 17034. Všechny dokumenty nyní vycházejí ze základního přístupu – pravidla jsou psána pro všechny RM (obecně). V případě CRM jsou kritéria přísnější, tj. platí ještě něco navíc.



Obrázek 2. Hierarchie dokumentů ISO/REMCO

POZNÁMKA. Dokumenty (TR), uvedené v obrázku 2, již byly vydány, kromě dokumentu TR 16476 Ná vaznost RM, který bude vydán pravděpodobně v roce 2016.

Referenční materiály v chemické analýze

Tabulka 1.1. Přehled dokumentů ISO/REMCO

Název a označení	Publikace, současný stav
Guide 30	
RMs — Selected terms and definitions (Vybrané termíny a definice)	Vydán: únor 2015 Připravuje se vydání českého překladu jako TNI
Guide 31	
RMs — Contents of certificates and accompanying documentation (Obsah certifikátů a přidružené dokumentace)	Vydán: listopad 2015 Připravuje se vydání českého překladu, jako TNI
Guide 33	
RMs — Good practice in using reference materials (Správná praxe při užití RM)	Vydán: únor 2015 Připravuje se vydání českého překladu, jako TNI
Guide 34	
General requirements for the competence of reference material producers	Vydán: listopad 2009 Bude nahrazen normou ISO 17034 Předpokládaný termín vydání srpen 2016 TNI POKYN ISO 34: 2013 Obecné požadavky na způsobilost výrobců referenčních materiálů [11]
Guide 35	
RM: Guidance for the characterization and assessment of homogeneity and stability (RM: příručka pro charakterizaci a posouzení homogeneity a stability)	Revize (probíhající) Fáze závěrečný D-Draft Předpokládaný termín vydání přelom roku 2016/2017
Guide 80	
Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs)	Vydán červenec 2014 Český překlad vydán jako TNI POKYN ISO 80:2015 Příručka pro vlastní přípravu materiálů pro řízení kvality (QCM) [9]

Od poloviny 90. let se práce v ISO/REMCO účastní i zástupci ČR. Výkon sekretariátu ISO/REMCO v ČR zajišťuje ÚNMZ, zprvu prostřednictvím odboru mezinárodní spolupráce, později odboru metrologie. Práce národního sekretariátu spočívá v připomínkování a schvalování dokumentů přicházejících z ISO/REMCO, účasti na plenárních zasedáních, případně práce v ustavených pracovních skupinách.

2 Podmínky a předpoklady pro použití referenčních materiálů

Použití referenčních materiálů je oprávněné jen tehdy, jsou-li nejvhodnějším zdrojem relevantní a využitelné informace. Je proto vždy třeba dobře uvážit i ostatní alternativy jako mezilaboratorní experiment, nebo jiný přístup. Neplatí automaticky přiřazení: používám certifikovaný referenční materiál, tudíž moje výsledky jsou správné a kvalitní. Správný výběr a použití RM je komplexní odborný proces, který vyžaduje vyhodnocení a zvážení mnoha parametrů. Pokud je použití RM nepromyšlené, nepřipravené nebo jen formální, poškozuje nejen laboratoř (plýtvání poměrně značnými prostředky, vytváření falešných signálů o vyhovující práci apod.), ale i ostatní potenciální uživatele (dostupnost RM je omezená v závislosti na velikosti vyrobené šarže). Proto je třeba zvážit následující skutečnosti:

- Úloha: K jakému z účelů uvedených v článku 1.1 má být RM použit?
- Analyt a jeho koncentrační rozmezí: existuje RM pro daný analyt (prvek, jeho chemickou formu či sloučeninu) a uvažované koncentrační rozmezí? (Obecně i další parametry a hodnoty obsahu).
- Míra shody matrice RM s analyzovanými vzorky: Vystihuje matrice RM dostatečně matici vzorků? Jsou případné rozdíly významné z hlediska matričního efektu a případných interferencí? Vykazuje daný materiál komutabilitu?
- Nejistota certifikované hodnoty: Je nejistota certifikované hodnoty dostatečně nízká, aby umožnila provést zamýšlený test s dostatečnou rozlišovací schopností?
- Další případná omezení nebo upřesnění, např. u složek definovaných chemickou vazbou (speciace) nebo u empirických metod.
- Určení analytického systému (metoda, postup včetně případných korekcí matričního ovlivnění, přístroj, chemikálie) a záruky kontroly a udržování stavu statistické regulace.
- Uspořádání experimentu tak, aby byly vyloučeny možné vnější vlivy (např. drift) a aby se přiměřeným počtem opakování (obvykle 6 až 12) dosáhlo dobrého rozlišení.

2.1 Výběr vhodného referenčního materiálu

Po dostatečném a jednoznačném určení podmínek použití následuje výběr a zajištění RM. V prvním kroku je třeba podle požadovaných parametrů úlohy zvolit třídu a typ RM podle charakteristiky analytické metody. Rozhodování může usnadnit kategorizace metod, ve které se rozlišují typy metod:

- I. Metody s výpočtem**, u nichž se měří fyzikální veličiny (hmotnost, objem, elektrický proud, atd.) a výsledek se počítá podle exaktního fyzikálně-chemického vztahu mezi bezprostředně měřenou veličinou a hodnotou stanovené složky. Mezi metody s výpočtem* patří
 - a) gravimetrie,
 - b) titrace,
 - c) coulometrie,
 - d) hmotnostní spektrometrie s izotopovým zředěváním.

* Uvedené metody vyhovují též požadavkům na *primární metody*, tedy metody nejvyšší metrologické třídy.

Referenční materiály v chemické analýze

Nově byla mezi tyto metody zařazena [13]

e) neutronová aktivační analýza.

II. Relativní metody, kde se obsah stanovené složky ve vzorku zjistí porovnáním detekovaného signálu vzorku se sadou kalibračních vzorků o známém obsahu analytu, přičemž se předpokládá, že je vliv matrice zanedbatelný nebo se eliminuje vhodnou operací (separace, maskování, korekce, apod.). Relativní metody v analytické chemii převažují. Jejich příkladem jsou spektrofotometrie, atomová absorpční spektrometrie, chromatografie, polarografie.

III. Komparativní metody, u nichž se porovnává vlastnost analyzovaného vzorku s vlastnostmi kalibračního souboru v detekčním systému, který je citlivý nejen k obsahu analytu, ale i k celkovému složení vzorku, tedy i druhu a charakteru matrice. Z technických důvodů lze kalibrovat komparativní metody jen vhodnými matričními RM. Mezi takové metody se řadí např. rentgenová fluorescenční spektrometrie, infračervená spektrometrie pevných vzorků nebo atomová absorpční spektrometrie pevných vzorků.

U metod **typu I** slouží RM k prověření (verifikaci) postupu, zejména pokud se tyto metody používají k analýze vzorků s reálnými maticemi. Zde se CRM analyzuje jako neznámý vzorek a výsledek analýzy se porovnává s certifikovanou hodnotou obsahu analytu. Při zjištění nepřijatelného vychýlení (bias) musí laborator identifikovat příčinu a odstranit ji.

U relativních metod (**typ II**) se CRM používají rovněž k prověření postupu analýzy a referenční materiály–kalibrátory ke kalibraci, jak se popisuje v odstavci 4.1. I když lze k prověření použít RM čistých látek, jsou pro použití matričních RM praktické důvody. Ty totiž umožňují dokonalou simulaci celého analytického postupu pro analyzovaný vzorek určitého typu. Uměle připravenou směsí nebo čistým roztokem nelze některé operace (např. převádění do roztoku) simulovat úplně, a výsledek experimentu tak nemusí zcela platit pro celý analytický postup. Dalším využitím CRM v této skupině analýz je použití CRM k přípravě kalibračních roztoků s přídavkem analytu (spikování). Tento způsob využití CRM lze však uplatnit jen v případě přídavku analytu ve stejné chemické formě jakou stanovujeme nebo tehdy, je-li analytický signál nezávislý na speciaci (chemické formě).

U komparativních metod **typu III** je kalibrace postupu měření s využitím CRM metodou, které by se měla dávat přednost. Je zřejmé, že pro metody typu III nemá smysl uvažovat o jiných než matričních RM.

Po zvolení typu a třídy lze přistoupit k výběru konkrétního RM. Přehled informačních zdrojů o existujících a dostupných RM je uveden dále v kapitole 6, str. 30. Jejich počet je na první pohled úctyhodný. Uvědomíme-li si ale, že se běžně stanovuje okolo 10^5 složek v koncentračním rozmezí mnoha řádů a v nejrůznějších kombinacích a maticích, je jasné, že skutečná potřeba je mnohem vyšší a že existující deficit sortimentu RM ještě poroste. Při výběru proto často půjde spíše o hledání nejbližšího přijatelného kompromisu než o optimální volbu z mnoha vyhovujících možností.

Výběr RM vyžaduje znalost řady základních údajů z dokumentace k referenčnímu materiálu, jež nebývají vždy v databázích ani v katalogích uvedeny. Proto je ve fázi užšího výběru někdy nezbytné stáhnout nebo vyžádat od potenciálního dodavatele kopie dokumentů k referenčnímu materiálu.

Kritéria výběru jsou jednak obecná, tj. pro zvolenou třídu a typ na úloze nezávislá, jednak specifická pro danou úlohu a podmínky.

2.2 Kritéria obecná – formální

Tato kritéria nemají přímý vliv na vlastní použití RM. Dokládají ale serióznost výrobce a pro uživatele RM mají zásadní význam při prokazování oprávněnosti použití RM posuzovatelům akreditace, manažerovi kvality nebo zákazníkovi.

RM je nedílnou jednotou hmotného objektu a příslušného informačního dokumentu. V případě RM jiných než CRM, je takový dokument nově nazýván informačním listem produktu (product information sheet),

u CRM je to povinný certifikát. Oba dokumenty musí vyhovovat požadavkům uvedeným pro tyto kategorie v Pokynu ISO 31 [12]. Obecně řečeno, jak informační list produktu, tak i certifikát musí obsahovat informace, které jsou nezbytné pro správné použití referenčního materiálu. U certifikátu, jehož vystavení je pro výrobce CRM povinné, musí být navíc povinně uvedeny informace potřebné pro použití CRM, jako jsou popis materiálu, předmětná vlastnost, její hodnota a přidružená nejistota, prohlášení o metrologické návaznosti. Pokud jsou hodnoty vlastnosti CRM definovány postupem měření, pak i informaci o použité měřicí metodě a jméno a funkce pracovníka reprezentujícího výrobce CRM.

Dokument k referenčnímu materiálu by měl podle těchto požadavků mimo jiné obsahovat:

- plný název RM a jeho jedinečný identifikátor například ve formě kombinace kódu a čísla šarže, jeho třídu (RM, CRM);
- plný název a kontaktní údaje výrobce (uvedení jména pracovníka odpovědného za obsah certifikátu je povinné jen u CRM);
- dobu platnosti nebo datum expirace.

POZNÁMKA. Stabilita výchozího materiálu není dostatečným důvodem pro neomezenou dobu platnosti.

2.3 Kritéria obecná – metrologická a technická

Metrologická a technická kritéria rozhodují o použitelnosti RM pro určený analytický systém (metodu, přístroj) a jsou stejně jako kritéria podle odstavce 2.2 uvedena v dokumentaci k referenčnímu materiálu.

Dokument k referenčnímu materiálu by měl obsahovat tyto údaje [12]:

- technický popis RM a oblast jeho předpokládaného použití,
- pokyny pro zacházení a použití, včetně např. minimálního množství vzorku, když to připadá v úvahu (hmotnost pevného analytického vzorku, pro niž platí údaje v dokumentaci),
- podmínky a pokyny pro skladování a operativní uchovávání,
- informace o komutabilitě, pokud připadá v úvahu,
- předmětné vlastnosti, jejich hodnoty a přidružené nejistoty (povinné u certifikátu),
- údaj o zajištění metrologické návaznosti certifikované hodnoty (povinné u CRM),
- indikativní hodnoty a další doplňující informace, které jsou pro použití relevantní (charakteristiky matrice, obsah ovlivňujících složek),
- bezpečnostní údaje (detaily možných rizik a potřebných bezpečnostních opatření musí být uvedeny v doprovodném bezpečnostním listu – material safety data sheet),
- odkaz na certifikační zprávu dostupnou na vyžádání nebo jinak přístupnou.

Výroba RM je finančně i časově náročnou činností. Není výjimkou, že výroba CRM trvá několik let. Nelze tedy očekávat, že se nové koncepty vyjadřování nejistoty a metrologické návaznosti projeví u několika desítek tisíc existujících RM okamžitě.

2.4 Kritéria specifická

Teprve specifická kritéria rozhodují, zda lze obecně přijatelný RM úspěšně použít také pro konkrétní analytické zadání a metrologickou úlohu. Klíčem k použití RM je velikost jeho příspěvku k celkové nejistotě. Tento příspěvek, který spolu s nejistotou experimentu nesmí převýšit meze definované příslušnou úlohou, sestává z

Referenční materiály v chemické analýze

- nejistoty certifikované hodnoty, velikosti matričního ovlivnění – zvolený RM by měl být uvnitř oboru matric vymezených zadáním a obsah jeho hlavních interferentů by měl být blízký obsahu v analyzovaných vzorcích,
- chyby extrapolace – certifikovaná hodnota by měla být blízká obsahu stanovované složky. U metod s lineární kalibrační funkcí se doporučuje ideálně rozmezí $\{0,5x; 2x\}$, kde x je měřená koncentrace, u nelineárních ještě užší. Toto doporučení má své omezení, pokud je stanovovaná hodnota blízko hranice pracovního rozsahu

Poslední dva požadavky lze obtížně splnit jediným RM – u širších koncentračních rozmezí nebo simultánního stanovení více složek je už vůbec nelze splnit. Proto je pak nutno volit účelovou sestavu několika RM. Pokud se podaří vybrat několik vhodných RM od různých výrobců (různého původu), věrohodnost výstupu experimentu to jen posílí.

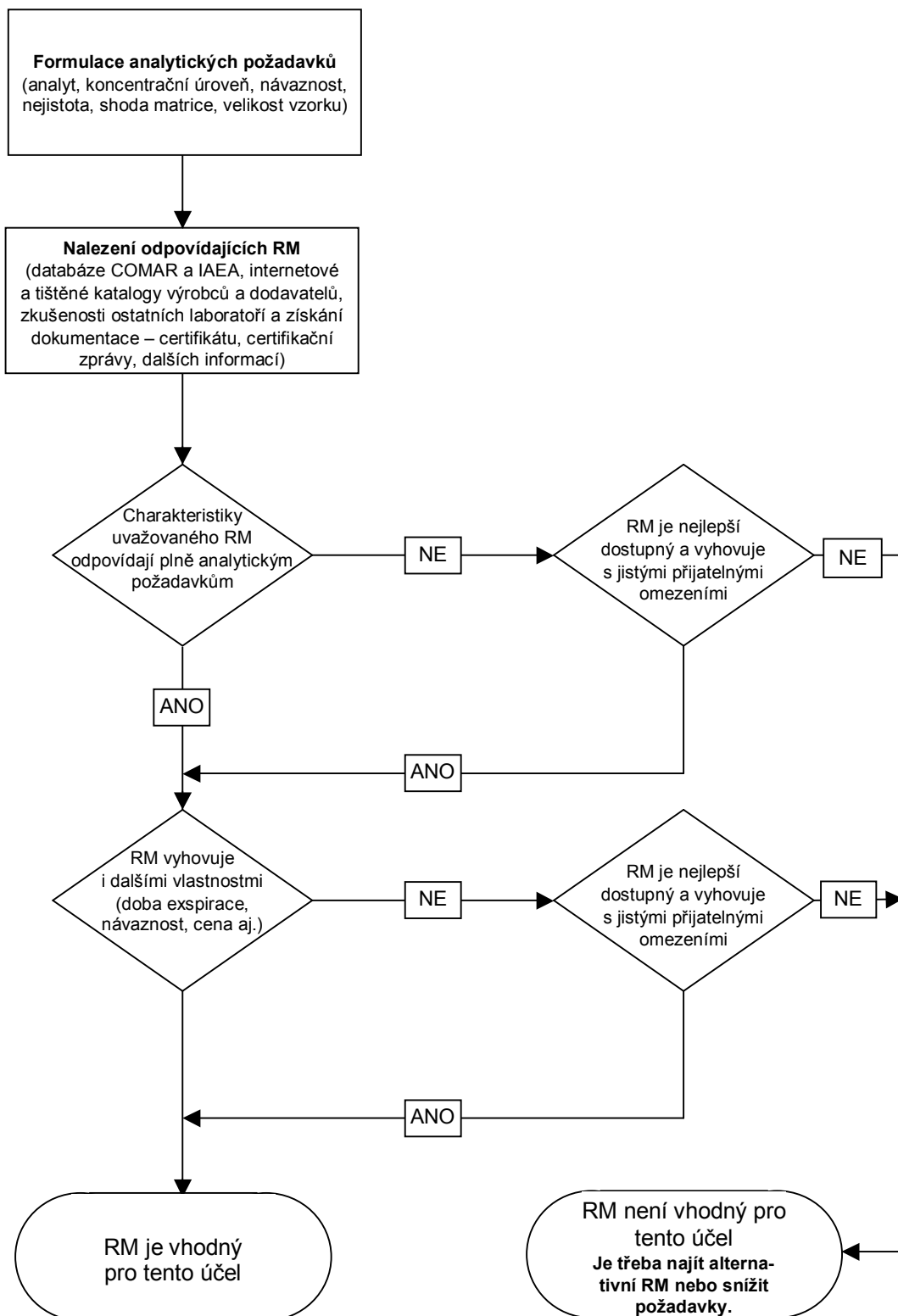
Vedle těchto základních kritérií nelze opomenout ani další praktické údaje, jakými jsou konečná cena, dodací lhůta, předepsané podmínky skladování, popřípadě záruka budoucích dodávek téhož RM, zvláštní požadavky na dopravu apod., jež mohou konečné rozhodnutí též ovlivnit. Pokud se nejedná o jednorázové použití, je účelné ověřit, zda výrobce a dodavatel zaručují včasné oznámení případných změn platnosti nebo recertifikace dodaného RM.

POZNÁMKA. V této kapitole jsou uvedena pouze kritéria výběru RM, nikoli pravidla jeho použití. Těm jsou určeny kapitoly 3 a 4.

Postup při výběru RM ilustruje postupový diagram na obrázku 3 na následující straně.

Je výhodné, když se podaří získat RM, jehož nejistota je menší nebo rovna jedné třetině nejistoty metody vlastní analýzy. Při výběru RM chemického složení mohou mít charakter matrice a koncentrační úroveň větší důležitost než hodnota nejistoty.

Uvádí-li dokument k RM hodnotu minimálního množství vzorku, tj. nejmenší doporučenou hmotnost navážky RM, pak údaje certifikátu platí jen tehdy, je-li analyzované množství rovno nebo větší než udaná hodnota, i když by pro použitý postup analýzy postačovalo množství menší.



Obrázek 3. Schematický postup výběru vhodného referenčního materiálu chemického složení

2.5 Posuzování způsobilosti výrobců RM – akreditace

U nás i ve světě jsou kladeny stále větší požadavky na kvalitu referenčních materiálů, které se používají ve zkušebních a zdravotnických laboratořích zejména k zajištění metrologické návaznosti a k zajištění kvality výsledků zkoušek. Jejich používání vyžaduje i norma ČSN EN ISO/IEC 17025 pro zkušební laboratoře a norma ČSN EN ISO 15189 pro zdravotnické laboratoře. Posuzování způsobilosti výrobců referenčních materiálů je další pomocí laboratořím k výběru a nákupu kvalitních referenčních materiálů pro zajištění kvality svých výsledků.

Potřeba akreditace výrobců referenčních materiálů historicky vznikla v roce 2000, kdy se Austrálie snažila posílit význam dopingové kontroly při olympijských hrách v Sydney. Hlavními dokumenty, které se v té době k akreditaci výrobců CRM používaly, byly norma ISO/IEC 17025:2000, dokument ILAC–G12:2000 Guidelines for the requirements for the competence of reference material producers a Pokyn ISO 34:2000 s požadavky na výrobce referenčních materiálů.

Dle resoluce ILAC GA 8.12 z roku 2004 byly akreditace výrobců referenčních materiálů prováděny podle harmonizovaných kritérií v Pokynu ISO 34 a ISO/IEC 17025. Tato resoluce byla v roce 2012 nahrazena resolucí ILAC GA 16.20 z listopadu roku 2012, podle které by měla být akreditace výrobců referenčních materiálů probíhat pouze podle požadavků Pokynu ISO 34:2009 [10], neboť tento dokument obsahuje i požadavky na zkušební a zdravotnické laboratoře ve shodě s normami ČSN EN ISO/IEC 17025 a ČSN EN ISO 15189. Ve státech Evropské unie se však posuzování způsobilosti výrobců referenčních materiálů provádí vzhledem ke společné evropské legislativě (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 765/2008 ze dne 9. července 2008, kterým se stanoví požadavky na akreditaci a dozor nad trhem týkající se uvádění výrobků na trh) podle obou výše zmíněných normativních dokumentů.

Akreditace výrobců RM zatím není součástí multilaterálních dohod EA (The European Co-operation For Accreditation) a ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation). Multilaterální dohoda APLAC (Asia Pacific Laboratory Accreditation Cooperation) pro akreditaci výrobců RM je již uzavřena. Dle resoluce ILAC GA 9.28 se počítá s rozšířením ILAC MRA (ILAC Mutual Recognition Arrangement ILAC) i pro akreditaci výrobců RM.

Výrobce referenčního materiálu je organizace nebo společnost, veřejná nebo soukromá, která je plně odpovědná za projekt, plánování a management, stanovení a rozhodování o hodnotách vlastností a odpovídajících nejistotách, schvalování hodnot vlastností a vydání certifikátu nebo jiného prohlášení o referenčních materiálech, které vyrábí. Dle rozhodnutí ILAC se jedná o orgán posuzující shodu. Požadavky na způsobilost výrobců RM jsou v ČR dány normou ČSN EN ISO/IEC 17025 společně s požadavky TNI Pokynu ISO 34:2013, který odkazuje na požadavky dalších Pokynů ISO 30 Referenční materiály – vybrané termíny a definice, ISO 31 Referenční materiály – obsah certifikátů, označení a doprovodných informací a ISO 35 Referenční materiály – pokyny pro charakterizaci a posuzování homogenity a stability materiálů. Tým posuzovatelů pro udělení akreditace by měl na základě informací o aktivitách výrobce RM určit, která kritéria z těchto dokumentů je potřeba posoudit.

TNI Pokyn ISO 34 [11] obsahuje všeobecné požadavky, které musí výrobce referenčních materiálů při své činnosti prokazatelně splňovat, pokud chce být uznán způsobilým pro výrobu referenčních materiálů. Pokyn zahrnuje výrobu certifikovaných i necertifikovaných referenčních materiálů, na jejichž výrobu nejsou kladeny tak přísné požadavky. Požadavky jsou rozděleny do kapitoly, zahrnující požadavky na systém managementu a dále do kapitoly s odbornými a výrobními požadavky. Tato kapitola obsahuje požadavky na pracovníky, subdodavatele, plánování a řízení výroby, prostory a podmínky prostředí, manipulaci s materiály a skladování, zpracování materiálů, měřicí metody a měřicí zařízení, vyhodnocení dat, metrologickou návaznost, hodnocení homogenity a stability, charakterizaci a přidělení hodnot vlastností a jejich nejistot. Dále tato kapitola obsahuje požadavky na certifikáty nebo dokumentaci pro uživatele a požadavky na distribuci materiálů.

Výrobce RM může pro část svých aktivit využívat subdodavatele. Subdodavatel je organizace nebo společnost, státní nebo soukromá, které se podílí na posuzování zpracování, manipulace, homogenity a stability, charakterizace, skladování nebo distribuce referenčních materiálů za výrobce referenčních

materiálů na smluvním základě jak za úplatu, tak i bezúplatně. Za činnosti prováděné subdodavatelem je výrobce RM plně odpovědný. Musí být zajištěno, aby splňoval příslušné požadavky ČSN EN ISO/IEC 17025 a TNI Pokynu ISO 34. Klíčové úkoly a hlediska procesu výroby referenčních materiálů, které nemohou být prováděny externě, jsou: plánování projektu, posuzování a rozhodování o hodnotách vlastností a odpovídajících nejistotách, schvalování hodnot vlastností a vydávání certifikátů či jiných prohlášení o referenčních materiálech. Pro splnění požadavků normy ČSN ISO/IEC 17025 je uznávána akreditace laboratoře akreditačním orgánem, který je členem EA MLA/ILAC MRA. Pokud laboratoř tyto podmínky nesplňuje, musí se akreditační orgán přesvědčit o tom, že výrobce RM sám posuzuje splnění těchto požadavků vlastní nebo subdodavatelskou laboratoří. Pokud je referenční materiál testován laboratoří výrobce RM, je nutné pečlivě posoudit, zda tyto činnosti splňují požadavky na nezávislost laboratoře (článek 4.1.4 normy ČSN EN ISO/IEC 17025).

Osvědčení o akreditaci výrobce referenčních materiálů musí obsahovat informaci, že výrobce RM splňuje požadavky obou normativních dokumentů ČSN EN ISO/IEC 17025 a TNI Pokynu ISO 34. Pro vydávání certifikátů/osvědčení na vyrobené RM musí výrobce RM dodržet požadavky nejen TNI Pokynu ISO 34, odstavec 5.17, ale i požadavky Pokynu ISO 31, které jsou zásadní pro využití a odbornou platnost daného CRM.

V roce 2015 vyšla novela zákona o metrologii 505/1990 Sb. a došlo k revizi § 8, jíž byl změněn text odstavce 1: „Certifikované referenční materiály jsou materiály, jejichž složení nebo vlastnosti byly certifikovány Českým metrologickým institutem nebo autorizovaným metrologickým střediskem, nebo byly opatřeny certifikátem od akreditovaného výrobce certifikovaného referenčního materiálu“. Změna zákona měla za cíl umožnit výrobcům certifikovaných referenčních materiálů (CRM) vedle současného centralizovaného systému certifikace také vyrábět a uvádět na trh CRM na základě akreditace výrobce CRM národním (vnitrostátním) akreditačním orgánem.

Certifikovat referenční materiály mohl do zmíněné novely zákona o metrologii v roce 2015 pouze Český metrologický institut (ČMI). V ČMI byl certifikací referenčních materiálů pověřen certifikační orgán pro referenční materiály (CORM). Vedoucí CORM měl při rozhodování o schválení daného CRM k dispozici poradní orgán, složený z odborníků z oboru referenčních materiálů. Certifikace RM se v ČMI řídila metodickým pokynem 017-MP-C001 [14], který byl zpracován v souladu s tehdejšími zněním Pokynů ISO 31, 34 a 35. Tento metodický pokyn popisoval kroky, směřující k vydání certifikátu a zapsání CRM do databáze COMAR. Pokyn stanovil obecně postup a požadavky přípravy, charakterizace a certifikace CRM chemického složení, za jejichž kvalitu a metrologické parametry odpovídal CORM ČMI. Nejdůležitější součástí přípravy a certifikace RM bylo vypracování Technického projektu, což bylo povinností výrobce RM. Technickým projektem byl dokument, jímž se po jeho schválení řídili všichni účastníci až do ukončení charakterizace a předložení Certifikační zprávy a dále podle potřeby i po celou dobu platnosti certifikace CRM. Specifikoval cílové parametry připravovaného CRM, způsob provedení testování homogenity a stability, použití technik pro stanovení hodnot vlastností a jejich nejistot a další parametry přípravy CRM.

Český institut pro akreditaci, o.p.s. zavedl službu akreditace výrobců referenčních materiálů v roce 2015. Akreditace výrobců referenčních materiálů se řídí normou ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří [15], požadavky TNI Pokynu ISO 34:2013 Obecné požadavky na způsobilost výrobců referenčních materiálů [11] a dokumentem MPA 10-03-15 Metodické pokyny pro akreditaci, k aplikaci ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 a TNI Pokynu ISO 34:2013 pro posouzení způsobilosti výrobců referenčních materiálů v akreditačním systému ČR. Ke konci roku 2015 byli touto službou akreditováni první dva výrobci referenčních materiálů. Informace o akreditovaných výrobcích referenčních materiálů jsou uvedeny na internetových stránkách ČIA (www.cai.cz).

V současné době je spojenou pracovní skupinou ISO/CASCO/REMCO 43 připravována nová harmonizovaná norma ISO 17034, která vychází z Pokynu ISO 34, jež po dokončení plně nahradí. Bude využívána pro akreditaci výrobců referenčních materiálů. Norma má v konečné podobě vyjít koncem roku 2016. Tato norma může laboratořím sloužit také k posuzování způsobilosti dodavatelů referenčních materiálů.

3 Použití referenčních materiálů k hodnocení

3.1 Test vychýlení

Kontrola vychýlení je pro laboratoře při hodnocení kvality výsledků stěžejní záležitostí a představuje základní činnost při validaci měřicího postupu. Může se provádět jako součást zajišťování kvality výsledků měření, validace metod nebo obojího. Pro kontrolu vychýlení je podstatné, aby reference, vůči které je vychýlení kontrolováno, byla spolehlivá a metrologicky návazná. CRM, který má být použit pro hodnocení vychýlení, je vhodný, pokud druh materiálu a předmětné vlastnosti jsou relevantní pro zamýšlené použití. Uživatel by měl potvrdit vhodnost CRM před hodnocením vychýlení, např. v předběžném experimentu. Pokud výsledky měření používají stejný CRM, vztahující se ke stejné měřené veličině a jsou metrologicky návazné, pak by takové výsledky měly být prosty významného vychýlení. V takovém případě generují měřicí postupy výsledky, které jsou návazné ke stejné referenci.

Test vychýlení (bias) analýzou CRM je založen na porovnání experimentálně stanovené hodnoty x_{meas} s certifikovanou hodnotou x_{CRM} a příslušných nejistot. Jednotný postup testování předepisuje Pokyn ISO 33:2015 [16].

Vychýlení je nevýznamné, jestliže platí vztah [16]

$$|x_{meas} - x_{CRM}| \leq k \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2} \quad 3.1$$

ve kterém k je koeficient rozšíření a u_{meas} a u_{CRM} jsou kombinované nejistoty experimentálně stanovené a certifikované hodnoty. Hodnota k závisí na předpokládaném rozdělení pravděpodobnosti (často normální nebo Studentovo rozdělení) a úrovni pokrytí (pro $k = 2$ přibližně 95 %). Při použití vztahu 3.1 je potřeba převést rozšířenou nejistotu U_{CRM} certifikované hodnoty, obvykle uváděnou v certifikátu, na kombinovanou nejistotu u_{CRM} dělením koeficientem rozšíření k . Pokud platí podmínka 3.1, jsou naměřená hodnota a hodnota vlastnosti vůči sobě konzistentní v rámci svých příslušných nejistot. Jelikož je hodnota vlastnosti CRM metrologicky návazná k nějaké udané referenci, v ideálním případě SI, potvrzuje za těchto podmínek výsledek získaný pro CRM metrologickou návaznost výsledků získávaných předmětným metrologickým postupem.

Příklady 1 a 2 v kapitole 10 demonstrují přítomnost významného vychýlení (bias) postupu s použitím vztahu 3.1. O použití tohoto vztahu spolu ukázkovým příkladem pojednává Metodický list 3 EURACHEM-ČR [17].

Pro případy, kdy bylo povoleno určité vychýlení zadavatelem analýz předpisem, normou apod., se dříve uváděl pro jeho testování vztah [3]

$$|x_{meas} - x_{CRM}| \leq k \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2} + a \quad 3.2$$

Hodnota a , nazývaná nastavovací faktor, musela být stanovena předem, nemohla být volena libovolně, a musel pro ni být specifikován důvod. Tento způsob kontroly vychýlení však v novém pokynu [16] již uváděn není.

Zhodnocení vychýlení výsledků metody se neomezuje na použití jednoho CRM. Je-li k dispozici více než jeden vhodný CRM, doporučuje se použít ke kontrole metody více než jediný CRM v rozsahu hodnot měřené veličiny, který odpovídá měřicímu rozsahu metody.

3.1.1 Využití dat o vychýlení

Odhady vychýlení získané pomocí CRM při kalibraci mohou být přímo použity k provedení korekcí. Takové korekce mohou být aditivní, multiplikativní, nebo jejich kombinací. Znalost kalibračního modelu a jeho detailů je nutná pro to, aby se korekce aplikovala správně.

Korekce na vychýlení je komplikovanou záležitostí, protože chování jednoho nebo více CRM nemusí zcela odrážet chování rutinních vzorků. Proto se doporučuje vylepšit metodu tak, aby bylo vychýlení eliminováno, spíše než se snažit vychýlení korigovat. U některých standardních metod jsou uvedena kritéria pro přijatelnost vychýlení.

Výraz pro vychýlení je

$$d = x_{meas} - x_{CRM} \quad 3.3$$

a jeho přidružená standardní nejistota se vyhodnotí

$$u(d) = \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2} \quad 3.4$$

Pokud je vychýlení významné, tedy je-li $|d| > U(d)$, kde $U(d)$ je rozšířená nejistota daná vztahem

$$U(d) = k \cdot u(d) \quad 3.5$$

a k je vhodně zvolený koeficient rozšíření (viz výše), je obvykle snaha najít příčinu vychýlení a snížit nebo eliminovat je.

Pokud není možné podstatné snížení nebo kompletní eliminace vychýlení, měl by se výsledek měření korigovat o vychýlení a nejistota přidružená vychýlení by se měla zahrnout do vyhodnocení nejistoty. Korekce může být aditivní nebo multiplikativní v závislosti na tom, zda závisí na hodnotě korigované veličiny. Pokud pozorované vychýlení není korigováno a je významné, mělo by být zahrnuto do bilance nejistoty. Hrubou aproximací je přidat čtverec vychýlení (tedy d^2) do bilance nejistoty jako příspěvek za nekorigované, významné vychýlení. Pokud se vychýlení vyhodnocuje v rozsahu hodnot měřené veličiny, může se vypočítat průměrná hodnota vychýlení s přidruženou nejistotou. O odhadu nejistoty chemických měření se započtením vychýlení pojednává též Metodický list Eurachem-ČR č. 16 [18]. Obecný přístup uvádí Pokyn ISO/IEC 98-3:2008, F.2.4.5 [19], který je korigovaným vydáním Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM).

3.2 Validace metody

Podle definice [7] je validace **ověřování**^{*}, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití. Je tedy experimentálním a dokumentovaným potvrzením, že jsou splněny požadavky pro specifikované zamýšlené použití [20]. Validace metody pomocí laboratorní studie (v jedné nebo více laboratorích) tedy zjišťuje, zda metoda splňuje požadavky pro zamýšlené analytické použití. Vlastnosti metody se vyjadřují v pojmech výkonnostních parametrů metody, mezi něž patří:

- selektivita a specifická
- měřicí rozsah
- pravdivost
- preciznost
- kalibrace a metrologická návaznost
- linearita
- mez detekce/mez stanovitelnosti
- robustnost

^{*} Ověřováním v legální metrologii, definovaném zákonem o metrologii č. 505/1990 Sb. ve znění pozdějších předpisů, rozumíme přezkoušení a označení anebo vydání ověřovacích listů pro měřicí systém. Ověřením stanoveného měřidla se potvrzuje, že stanovené měřidlo má požadované metrologické vlastnosti.

Referenční materiály v chemické analýze

Výklad těchto pojmů a metodika jejich výběru a stanovení jsou uvedeny v literatuře [20]. Z výčtu činností při validaci je zřejmé, že se CRM může uplatnit při vyhodnocení téměř všech výkonnostních parametrů. Nejdůležitější je však použití při vyhodnocování nepřítomnosti vychýlení a návaznosti (viz odstavce 3.1 a 4.2). Ostatní výkonnostní parametry lze vyhodnotit i bez použití CRM. Např. preciznost je výhodné stanovit, zejména z ekonomických důvodů, opakovanou analýzou dostatečně homogenního a matricově a koncentračně vhodného vzorku (např. interního RM či QCM).

3.3 Kvantifikace nejistoty chemického měření (analýzy)

Současné pojetí nejistoty měření a základní metodika jejího vyhodnocení vycházejí z dokumentů International Organization for Standardization, ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements (GUM) [19], který definuje nejistotu jako „parametr přidružený k výsledku měření, který charakterizuje míru rozptýlení hodnot, jež by mohly být důvodně přisuzovány měřené veličině“. Jinou definici nejistoty, možná obtížněji srozumitelnou, podává nedávne vydání Mezinárodního metrologického slovníku – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM) [7] jako “nezáporný parametr charakterizující rozptýlení hodnot veličiny přiřazených k měřené veličině na základě použité informace”.

Vyhodnocení nejistoty dle ISO definičně zahrnuje všechny vlivy, ať již náhodné či nekorigovatelné systematické, které mohou mít na vztah výsledku ke skutečné hodnotě významný vliv. Principy GUM byly pro oblast nejistoty výsledků chemické analýzy rozpracovány v příručce EURACHEM/CITAC [21], jejíž verze je dostupná v českém překladu [22]. Analýza certifikovaných referenčních materiálů (CRM) nabízí vhodná data pro odhad nejistoty, protože poskytuje informace o kombinovaném vlivu řady potenciálních zdrojů nejistoty a umožňuje doplnit bilanci nejistoty o příspěvek odrážející vychýlení výsledků použitého analytického postupu. Taková analýza může být součástí studie pravdivosti měření, s cílem získat věrohodný odhad nejistoty. V rámci validace postupu nebo jako součást řízení kvality se zjišťuje existence systematického vychýlení. RM je při tom analyzován jako kontrolní vzorek a výsledky se obvykle vynášejí do regulačního diagramu správnosti (v případě řízení kvality) anebo se zpracují v samostatné studii. Nutnými předpoklady a způsobem využití výsledků analýzy RM k odhadu nejistoty se zabývá kapitola 5 příručky Kvalimetrie 13 [23], která v příloze též obsahuje řešený příklad odhadu nejistoty stanovení benzo[a]pyrenu v zeminách, opírající se o výsledky analýz CRM. Nebudeme se zde touto problematikou zabývat. Je pouze nutné připomenout, že vyhodnocení nejistoty s využitím RM by mělo uvažovat následující příspěvky:

- nejistotu deklarované hodnoty RM,
- reprodukovatelnost měření RM,
- příspěvek, odrážející rozdíl mezi naměřenou a deklarovanou hodnotou RM,
- rozdíl mezi složením vzorku a RM,
- operace prováděné se vzorkem, nikoliv však s RM (např. předúprava vzorku apod.).

Věrohodnost kvantifikace nejistoty z výsledků analýz RM závisí významně na tom, jak podobné jsou matrice a koncentrace vzorku a RM, zejména u metod významně závislých na matrici, jak je popsáno při použití RM pro kalibraci (viz odstavec 4.1).

3.4 Posouzení výkonu laboratoře nebo analytika

Ani u řádně validované a dobře zavedené metody nelze vyloučit, že se v určité laboratoři nebo u určitého analytika neobjeví chyby, které nebylo možno předvídat. V dobrém systému řízení kvality jsou pro jejich včasné zjištění a odstranění připraveny účinné mechanismy. Ty jsou založeny mj. na již popsaném použití RM.

Alternativou k používání RM je účast v mezilaboratorních experimentech (proficiency testing, zkoušení způsobilosti) jako jedné z účelových variant mezilaboratorního experimentu. Zásady organizování a hodnocení zkoušení způsobilosti jsou náplní normy ISO/IEC 17043 a navazujících dokumentů [24].

Právě ve zkoušení způsobilosti se mohou RM výhodně uplatnit. Zpravidla ne jako vlastní zkušební vzorek, to by bylo zbytečně nákladné a pro velký počet potřebných vzorků i těžko schůdné. Kromě toho

nelze vždy vyloučit odhalení hodnot RM při jeho poměrně snadné identifikaci a tím možnost ovlivnění výsledků, zvláště v případech, kdy je vhodných druhů RM omezený počet. RM lze s výhodou využít především při kontrole přesnosti vztažné hodnoty, která se často stanovuje jako střední hodnota (aritmetický průměr nebo medián) průměrů účastnických laboratoří. Pokud má totiž významnější část účastníků vychýlené výsledky, způsob vyhodnocení zkoušení způsobilosti vychýlení neodhalí a paradoxně tak mohou být laboratoře s objektivně nejlepšími výsledky v menšině a mít horší výsledné z-skóre.

Tomu lze předejít tak, že se u měřené veličiny ve zkušebním vzorku zajistí návaznost na CRM s co nejbližším obsahem analyzované složky a podobnou maticí co nejpreciznějším (a matričně nezávislým) postupem. Nejistota takto návazné hodnoty u je potom

$$u = \sqrt{u_{CRM}^2 + \frac{s_l^2}{m}} \quad 3.6$$

kde s_l je opakovatelnost návaznosti postupu a m počet opakování. Potom lze testovat hypotézu o nepřítomnosti významného rozdílu mezi konsensuální vztažnou hodnotou $\bar{x}_{PT}$ a nezávisle návaznou hodnotou μ

$$|\bar{x}_{PT} - \mu| \leq 2\sqrt{\frac{s_0^2}{n} + \frac{s_l^2}{m} + u_{CRM}^2} \quad 3.7$$

kde s_0 je opakovatelnost průměru účastníků.

Výhodou zkoušení způsobilosti je nezávislost a prokazatelnost výpovědi daná tím, že na rozdíl od používání RM test neorganizuje a nehodnotí sama laboratoř. Naproti tomu jsou četnost a sortiment jednotlivých programů omezeny. Pro operativní potřebu laboratoří je tak použití RM pohodovějším nástrojem.

Dosud jsme pojednávali o ověření práce laboratoře z hlediska jednoho výkonnostního parametru. Kompetenci laboratoře jako celku se zabývá akreditace, a při ní je posouzení nepřítomnosti vychýlení významným aspektem.

Správné provedení testu vychýlení podle vztahu 3.1 vyžaduje správný převod rozšířené nejistoty certifikované hodnoty na kombinovanou nejistotu dělením koeficientem rozšíření k . Hodnotu k je nutné zjistit z certifikátu CRM.

4 Referenční materiály při přenosu hodnot

Zatímco předchozí kapitola se zabývala diagnózou a hodnocením stavu analytického systému, cílem této kapitoly je poskytnout obecná doporučení pro používání referenčních materiálů při kalibracích zařízení a měřicích postupů stanovení, pro zajištění metrologické návaznosti a pro přidělování hodnot dalším referenčním materiálům.

4.1 Kalibrace

4.1.1 Definice a základní pojmy

Kalibrace je definována jako *činnost, která za specifikovaných podmínek v prvním kroku stanoví vztah mezi hodnotami veličiny s nejistotami měření poskytnutými etalony (standards) a odpovídajícími indikacemi s přidruženými nejistotami měření a ve druhém kroku použije tyto informace ke stanovení vztahu pro získání výsledku měření z indikace* [7, 8]. V definici se indikacemi míní hodnota analytického signálu.

POZNÁMKA. Kalibrace může být vyjádřena kalibrační funkcí, kalibračním diagramem (tabulkou) nebo kalibrační křivkou. V některých případech se smí skládat ze součtových nebo násobných korekcí indikace s přidruženou nejistotou měření. Kalibrace analytické metody je klíčovým krokem v celém analytickém procesu. Kalibrace není zapotřebí jen u přímých primárních analytických metod, jak vyplývá z jejich definice (odstavec 2.1). Většina instrumentálních analytických metod je nepřímá a vyžaduje tudíž aplikaci určitého kalibračního modelu.

Matematicky spočívá kalibrace v určení funkční závislosti mezi měřeným signálem a koncentrací (obsahem) analytu. Na výstupu analytického systému nepřímých metod je signál y_A , z jehož intenzity se stanovuje obsah analytu x_A . Toho se dosahuje tak, že se s kalibračními vzorky se známým obsahem analytu x (pokud možno s malou přidruženou nejistotou) určí odpovídající intenzita signálu y a vyjádří se závislost intenzity signálu y na obsahu analytu x_A .

Regresní závislost $y = f_k(x_A)$ nazýváme kalibrační funkcí a její první derivaci

$$\frac{\partial y}{\partial x_A} = \frac{\partial f_k(x_A)}{\partial x_A} \quad 4.1$$

nazýváme citlivostí. Při vlastní analýze, která probíhala za stejných experimentálních podmínek jako kalibrace, najdeme střední hodnotu signálu $\bar{y}_A$ z n_A paralelních stanovení. K určení obsahu analytu x_A z $\bar{y}_A$ se použije funkce inverzní ke kalibrační funkci, tj. analytická funkce $x_A = f_A(\bar{y}_A)$. Do kalibrační funkce je u matričně závislých metod nutné zahrnout i matriční efekt a psát ji jako $y = f_k(x_A) + g_M(x_i)$, kde je matriční efekt g_M funkcí koncentrace ostatních složek $x_i \neq A$ a jejich vzájemných interakcí. Pak však dostáváme pro určitou hodnotu x_A pro různé matrice rozdílné hodnoty analytického signálu $\bar{y}_A$, což je podstatou problému s matričním efektem. Analýza je schůdná zpravidla jen tehdy, platí-li

$$\frac{\partial f_k(x_A)}{\partial x_A} \gg \frac{\partial g_M(x_i)}{\partial x_i} \quad 4.2$$

Uvedené zákonitosti platí pro jakýkoliv kalibrační model (kalibrační přímku, metodu standardních pří-
davků, aj.), u nelineárních závislostí však bývají komplikovanější než u lineárního modelu.

4.1.2 Kalibrační modely

Jednobodová kalibrace

Jednobodová kalibrace je nejjednodušším kalibračním modelem. Ke kalibraci měřicího zařízení stačí jeden kalibrátor (CRM). Z odezvy y_{CRM} a y_{vzorek} , získané měřením CRM a vzorku v uvedeném pořadí a z hodnoty vlastnosti x_{CRM} se výsledek vypočítá ze vztahu

$$x_{vzorek} = x_{CRM} \cdot \frac{y_{vzorek}}{y_{CRM}} \quad 4.3$$

Nejistota $u(x_{vzorek})$ zahrnuje pouze vlivy z opakovatelnosti měření a nejistotu přidruženou hodnotě vlastnosti CRM. Tato bilance nejistoty by se měla doplnit o příspěvky nejistoty spojené s manipulací se vzorkem (vzorkování, ředění apod.). Použití tohoto modelu kalibrace a vyhodnocení přidružené nejistoty by mělo být omezeno na situaci, kdy vztah mezi x a y lze přesně modelovat pomocí vztahu $y = a_1 \cdot x$, kde a_1 označuje směrnici.

Kalibrace ohraničením (bracketing)

Kalibrace ohraničením vyžaduje dva kalibrátory (CRM), jeden s hodnotou vlastnosti vyšší než hodnota vzorku a druhý s hodnotou vlastnosti nižší než tyto hodnoty. Prostřednictvím lineární interpolace mezi oběma kalibrátory se přiřadí hodnoty dalším vzorkům. Zvolený interval by měl být dostatečně malý, aby eventuální nelinearita detektoru nevedla k vychýlení hodnoty, která bude přiřazena neznámému vzorku.

Model pro kalibraci ohraničením lze vyjádřit vztahem

$$x_{vzorek} = \frac{x_2 - x_1}{y_2 - y_1} (y_{vzorek} - y_1) + x_1 \quad 4.4$$

kde y značí odezvu a x měřenou veličinu (např. koncentraci). Hodnoty CRM jsou označeny x_1 a x_2 , odpovídající odezvy y_1 a y_2 , odezva vzorku y_{vzorek} a jeho hodnota x_{vzorek} .

Vícebodová kalibrace

Vícebodová kalibrace je nejpoužívanějším kalibračním modelem v analytické chemii. Ze získaných změřených odezev souboru kalibrátorů se následně pomocí regrese stanoví křivková (v ideálním případě přímková) závislost mezi změřenou odezvou a příslušnou veličinou. Údaje z vícebodové kalibrace vyžadují tudíž určitý způsob „prokládání“ závislosti a vhodný model pro získání hodnoty pro neznámý vzorek z dané odezvy tohoto vzorku (tyto modely jsou obvykle součástí softwaru u většiny moderních analytických přístrojů). Ve většině případů k získání parametrů kalibračního modelu používá metoda nejmenších čtverců.

Zvláštním případem vícebodové kalibrace je metoda standardních přídavků. Namísto použití oddělených kalibrátorů je kalibrační standard přidáván přímo do (upraveného) vzorku. Prostřednictvím extrapolace se určí hodnota měřené veličiny. Další podrobnosti o kalibračních modelech a přidružených nejistotách jsou uvedeny v příloze B pokynu ISO 33 [16].

4.1.3 Příspěvek nejistoty kalibrace k celkové nejistotě výsledku měření

Nejistoty se při kalibraci šíří podle obecného zákona o šíření nejistot. Použijeme-li ke kalibraci certifikovaný referenční materiál (pro jednoduchost označený jako CRM), pak pro nejistoty kalibrace u_{kal} platí

$$u_{kal} = \sqrt{u_{CRM}^2 + u_{CRM,p}^2 + u_{CRM,m}^2} \quad 4.5$$

kde u_{CRM} je nejistota koncentrace (obsahu) analytu v CRM, $u_{CRM,p}$ je nejistota přípravy kalibračního vzorku a $u_{CRM,m}$ je nejistota měření kalibračního vzorku. U matričně závislých metod platí pro kombinovanou nejistotu výsledku u_c vztah

Referenční materiály v chemické analýze

$$u_c = \sqrt{u_{kal}^2 + u_{m,v}^2} \quad 4.6$$

kde $u_{m,v}$ je nejistota měření vzorku pro dokonalou shodu matrice kalibračního vzorku (CRM) s matricí analyzovaného materiálu. V případě rozdílných matic kalibračního a analyzovaného vzorku pak platí

$$u_c = \sqrt{u_{kal}^2 + u_{m,v}^2 + u_{mat}^2} \quad 4.7$$

kde u_{mat} je nejistota způsobená matričním efektem.

Snaha o odstranění problémů s matričním vlivem vede někdy k používání matričních CRM ke kalibraci. Nejistota certifikovaných hodnot matričních CRM je však většinou vyšší než u CRM čistých látek, takže se musí uvážit, zda odstranění (nebo alespoň částečné zmírnění) nejistoty u_{mat} přispěje tímto způsobem ke snížení nejistoty u_c . Náklady na pořizování celé škály matričních CRM ke kalibraci mohou někdy podstatně zvýšit cenu analýzy. Navíc jsou matriční CRM určeny zejména k hodnocení a ne pouze ke kalibraci.

Další informace o úloze CRM při kalibraci a o různých strategiích pro dosažení optimální nejistoty jsou uvedeny v literatuře [3].

Je-li referenční materiál použit ke kalibraci, pak nelze stejný materiál použít k validaci ani k verifikaci tohoto postupu měření. Oba postupy musí být nezávislé.

Použije-li laboratoř ke kalibraci chemikálie od komerčních dodavatelů nebo z výzkumných programů, může často z těchto zdrojů získat údaje prokazatelně deklarující jejich identitu a čistotu. Uživatel odpovídá za posouzení takových údajů o kvalitě použitých chemikálií včetně rozhodnutí provést případné doplňující experimenty.

4.2 Metrologická návaznost výsledků měření

4.2.1 Úvod

Cílem metrologické návaznosti chemických měření je zajistit porovnatelnost výsledků měření získaných v různém čase, na různých místech a pomocí různých měřicích postupů jak na národní, tak na mezinárodní úrovni. Za tímto účelem byl v roce 1999 podepsán 38 státy metrické dohody dokument o vzájemném uznávání a porovnávání metrologických systémů [25]. Jedním z výstupů této dohody jsou i mezinárodní klíčová porovnání, která umožňují posuzovat odbornou kompetenci národních metrologických (referenčních) laboratoří. Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO) zařadila prokazování metrologické návaznosti jako jeden z hlavních požadavků do normy ISO 17025, která se týká akreditace zkušebních laboratoří. Výrobci a distributoři CRM jsou povinni uvést v příložené dokumentaci metrologické charakteristiky svých CRM, včetně realizace návaznosti [10].

4.2.2 Definice

Mezinárodní metrologický slovník [7, 26] definuje metrologickou návaznost jako „vlastnost výsledku měření, pomocí níž může být výsledek vztažen ke stanovené referenci přes dokumentovaný nepřerušovaný řetězec kalibrací, z nichž každá se podílí svým příspěvkem na stanovené nejistotě měření“. (V původní definici byl požadován pouze „nepřerušovaný řetězec porovnávání, jejichž nejistoty jsou uvedeny“.) V poznámce 5 k výkladu současné definice se říká, že „Porovnání mezi dvěma etalony smí být považováno za kalibraci, jestliže je toto porovnání použito ke kontrole, a pokud je to nutné, ke korekci hodnoty

veličiny a její nejistoty měření přiřazené k jednomu z etalonů“. Volnější výklad pak v některých dokumentech říká, že vlastní návaznost může doplnit (a v některých případech i nahradit) porovnatelnost s obdobnými referencemi (např. CRM), zjištěná nejlépe jejich paralelní analýzou v rámci laboratorního experimentu. Podle VIM 3 je metrologická porovnatelnost (srovnatelnost) definována jako „srovnatelnost výsledků měření pro veličiny daného druhu, které jsou metrologicky návazné ke stejné referenci“. Podmínkou je, aby porovnávané naměřené hodnoty veličiny a přidružené nejistoty měření byly řádově stejné velikosti.

4.2.3 Realizace návaznosti

Na základě dikce definice návaznosti je pro realizaci návaznosti zapotřebí zabezpečení dvou základních požadavků, a to zajištění vhodné reference (pro daný účel) a výběr vhodné validované metody měření pro danou veličinu.

Stanovenou referencí může být

- a) definice měřicí jednotky, obvykle základní nebo odvozené jednotky mezinárodního systému jednotek SI prostřednictvím její praktické realizace (např. kg, g, mol l⁻¹, mg kg⁻¹), ale také např. definovaná stupnice jako je pH, tvrdost atp.,
- b) postup měření zahrnující měřicí jednotku pro veličinu, která není řadovou veličinou, tj. hodnota plynoucí z použití metody popsané v národní či mezi národní normě (např. ISO metoda pro stanovení tuku v sušeném mléce),
- c) etalon (kalibrátor, standard), tj. hodnota reprezentovaná certifikovaným referenčním materiálem (primární čistou látkou, maticovým CRM, kalibračním roztokem).

Při výběru metody měření je třeba zajistit

- a) specifikování měřené veličiny, rozsahu měření a požadované nejistoty,
- b) zvolení vhodného měřicího postupu a výpočtu hodnoty měřené veličiny,
- c) prokázání (pomocí validace), že výpočet a podmínky měření zahrnují všechny potenciální faktory (veličiny), které mohou významně ovlivnit hodnotu přiřazenou standardu (vzorku),
- d) výběr a použití vhodných referencí,
- e) odhad celkové nejistoty měření.

V metrologii v chemii je návaznost zajišťována především pomocí referenčních materiálů použitých ke kalibraci metody měření a pomocí definovaných primárních metod měření, které mají nejblíže k přímé návaznosti na základní jednotky SI.

Jak rovněž vyplývá z definice návaznosti, řetězec metrologické návaznosti je realizován prostřednictvím tzv. hierarchie kalibrace. Hierarchie kalibrace je sled kalibrací od reference ke konečnému měřidlu, kde závěr každé kalibrace závisí na závěru předchozí kalibrace. Prvky hierarchie kalibrace jsou jednotlivé kalibrátory a měřicí postupy používané při příslušných postupech měření. Je evidentní, že nejistota měření se nevyhnutelně zvyšuje s počtem kalibrací ve sledu kalibrací, z čehož vyplývá, že nejistota výsledku měření nemůže být lepší než nejistota pocházející z použitých kalibrátorů měření (referencí). Požadavky na celkovou nejistotu měření proto výrazně ovlivňují výběr vhodné reference. Velmi názorným příkladem je např. nevhodnost použití SRM NIST 3145a pro rubidium (certifikovaná koncentrace 10,04 mg g⁻¹ ± 0,06 mg g⁻¹) pro realizaci návaznosti vodných kalibračních roztoků rubidia, kde je požadována cílová celková nejistota 0,3 %–0,5 % (rel.).

Problematikou návaznosti chemických měření se zabývá celá řada publikací, přehledných referátů a pokynů různých mezinárodních organizací [27–30]. V české literatuře lze podrobnější informace získat v Kvalimetrii 14 [4]. Informativní příloha pokynu ISO 34 pojednává přímo o Metrologické návaznosti certifikovaných hodnot vlastností referenčních materiálů [10]. Eurachem vydal leták o metrologické návaznosti, obsahující příklad jak zajistit návaznost hodnot stanovení rtuti v tkáni tuňáka. Jeho překlad je Metodickým listem 13 EURACHEM-ČR [31].

- ✓ Návaznost mohou ve skutečnosti vykazovat jen hodnoty; mluvit o návaznosti metod, postupů, instrumentace ap. je z principu nesprávné a svědčí o neporozumění problému,
- ✓ Návaznost může nabývat jen dvou stavů: je nebo není,
- ✓ Nejdůležitějším parametrem návaznosti je její nejistota – i perfektně návazná hodnota je nepoužitelná, přesahuje-li nejistota návaznosti nejistotu požadovanou nebo obvyklou pro určité stanovení.

Velmi málo RM chemického složení vykazuje explicitně návaznost na SI (mol). Způsob návaznosti není vždy v certifikátu formálně uveden a uživatel musí na základě rozboru certifikátu nebo údajů certifikační zprávy a jiných odborných pramenů usoudit, jaký typ implicitní návaznosti daný RM vykazuje nebo nevykazuje.

4.3 Přidělení hodnot dalším materiálům

Z certifikovaných referenčních materiálů se zvláště pro účely kalibrace zařízení připravují další referenční materiály mísením, ředěním nebo jinými způsoby. Hodnota vlastností (hodnoty vlastností) nově připraveného materiálu se odvíjí od hodnoty (hodnot) CRM použitého při přípravě. Takovéto aplikace CRM zahrnujeme pod obecný název „přidělení hodnot dalším materiálům“. Mezi nejčastější metody přípravy patří gravimetrie a volumetrie. Koncentrace, látkový zlomek nebo nějaká míra složení se může vypočítat na základě údajů o přípravě. Tyto operace s CRM se nepovažují za přerušení řetězce metrologické návaznosti, nejistota metody přípravy však musí být zahrnuta do kombinované nebo rozšířené nejistoty přidělené hodnoty. Pokud je zařízení použité v procesu řádně kalibrováno a okolní podmínky jsou monitorovány odpovídajícím způsobem, je možno získat hodnoty vlastností, které vykazují metrologickou návaznost.

Doporučuje se kontrolovat konzistenci hodnot vlastností a jejich přidružených nejistot u nově připravených kalibrátorů. Takové kontroly lze provádět např. porovnáním nového kalibrátoru se starším, validovaným. Hodnota vypočtená z přípravy nového kalibrátoru ($x_{\text{nový}}$) by se měla porovnat s hodnotou získanou měřením za použití starého kalibrátoru ($x_{\text{měř}}$). Starý, validovaný kalibrátor se použije pro kalibraci přístroje, na němž je prováděno porovnávací měření. Nový kalibrátor je metrologicky slučitelný se starým pokud

$$|x_{\text{nový}} - x_{\text{měř}}| \leq 2\sqrt{u_{\text{nový}}^2 + u_{\text{měř}}^2} \quad 4.8$$

kde konstanta 2 ($k = 2$) značí vhodně zvolený koeficient rozšíření na 95% úrovni pokrytí, $u_{\text{nový}}$ a $u_{\text{měř}}$ jsou odpovídající přidružené nejistoty kalibrátorů. Ve většině případů je $k = 2$ vhodnou volbou (viz ISO/IEC Guide 98-3:2008 [19], kapitulu 7 pro další pokyny k výběru koeficientů rozšíření).

Kromě použití shora uvedeného kritéria se může nový kalibrátor považovat za validovaný, pokud pozorovaný rozdíl ($x_{\text{nový}} - x_{\text{měř}}$) je malý ve srovnání s nejistotou vyžadovanou při měření nebo pro zkušební metodu.

5 Zacházení s referenčními materiály

Zásady a povinnosti při zacházení s RM nejsou, na rozdíl od vybraných měřidel, regulovány zákonem, jsou však nedílnou a neopomenutelnou součástí systému managementu kvality laboratoře. Metrologické zabezpečení laboratoře je zpravidla popsáno v metrologickém řádu laboratoře, který je součástí příručky kvality, anebo přímo v příslušném oddílu příručky kvality. V chemické laboratoři by měla být v těchto dokumentech věnována RM taková pozornost, která odpovídá stěžejní roli, jakou mají RM v metrologii v chemii. Norma ČSN EN ISO/IEC 17025 ukládá laboratorům povinnost mít postupy pro bezpečnou manipulaci, přepravu, skladování a používání RM, aby se zabránilo jejich znečištění a znehodnocení a aby se uchránila jejich integrita. RM a CRM musí být zřetelně označeny, aby je bylo možno identifikovat a aby byla zjevná příslušnost k původním certifikátům nebo jiné dokumentaci. Pro používání RM musí být též k dispozici informace o skladovatelnosti, podmínkách uchovávání, použitelnosti a jejich omezeních, zejména např. o minimální navážce. Obdobné zásady je třeba stanovit pro všechny chemikálie a z nich připravené roztoky, jejichž použití ke kalibraci je uvedeno v jednotlivých standardních pracovních postupech (SOP) analýzy. Některé chemikálie je možno koupit s certifikátem výrobce, udávajícím čistotu šarže, nebo si certifikát od dodavatele vyžádat. Uživatel je plně odpovědný za zhodnocení těchto informací, a pokud nejsou dostačující k prokázání jakosti chemikálie používané ke kalibraci nebo nejsou vůbec, odpovídá za další experimenty vedoucí k potřebné charakterizaci.

Příslušná laboratorní směrnice by měla dále upravovat

- **přejímku, uskladnění a evidenci**
U RM, pro něž platí zvláštní podmínky skladování, je nutno ověřit, zda byly tyto podmínky dodrženy i v průběhu dopravy na místo určení a zda je distributor pověřen výrobcem RM pro tuto činnost. Součástí přejímky je kontrola neporušenosti balení, úplnosti dokumentace a její příslušnosti k typu a šarži RM. Dále by měla být zajištěna trvalá komunikace s výrobcem tak, aby se veškeré nepředvídatelné změny (doby platnosti, údajů o stabilitě, hodnot a jejich nejistot, recertifikace nebo certifikace dalších složek) mohly neprodleně uplatnit. Závěrem přejímky je zařazení materiálu do evidence a uskladnění za podmínek předepsaných certifikátem.
- **používání**
Při každém odběru materiálu z příslušného balení se musí zamezit kontaminaci nebo jinému znehodnocení materiálu a tedy zneplatnění jeho certifikované hodnoty. Pro všechny RM se musí vést a archivovat záznamy o použití.
- **opatření po ukončení platnosti** (uplynutí lhůty, znehodnocení ap.), přeřazení do nižší třídy (CRM → RM → QCM), likvidace.
- **kontroly dodržování směrnic** a vazby na další dokumentaci.

6 Informace o dostupnosti referenčních materiálů

Optimální strategii může mít jen laboratoř s pohotovou a aktuální informací o existenci, parametrech a dostupnosti relevantních RM a CRM. Její získání není snadné; žádná databáze není úplná a univerzální a jejich využitelnost se navíc liší mezi jednotlivými aplikačními obory. Informační zdroje se dělí do dvou skupin

- **katalogy výrobců a distributorů**

Uvádí se, že existuje asi 20 000 referenčních materiálů od několika stovek výrobců. Neznámější výrobci a jejich internetové stránky jsou uvedeni v tabulce 2. Úroveň informace v katalozích nebývá obvykle dostatečná (jen certifikované obsahy nebo pouze orientační složení, bez údaje o nejistotách) pro kvalifikované rozhodování, takže je nutno ještě získat kopii certifikátu. U některých výrobců ji lze najít na jejich internetových stránkách (např. IRMM zpřístupňuje i certifikační zprávy). Údaje v katalozích bývají pravidelně revidovány a umožňují i porovnávat ceny a dodací podmínky.

- **souhrnné databáze institucí**

Poskytují obvykle dostatek informací pro volbu RM (nejistoty, případně i celý certifikát). Nevýhodou je zaměření převážně na CRM a někdy neaktuální údaj o skutečné dostupnosti. Nejdokonalejším zdrojem informací tohoto typu je databáze COMAR, vytvářená pod záštitou ISO/REMCO od konce sedmdesátých let minulého tisíciletí. Významným mezníkem byl převod databáze COMAR do internetové podoby, který byl dovršen začátkem roku 2003 za finanční podpory německého BAM. Od té doby je databáze volně přístupná na internetu na adrese www.comar.bam.de po registraci, která je bezplatná. Vzhledem k tomu, že se informace v databázi jednotlivými kódovacími centry (jedním z dvaceti je i Český metrologický institut) a od roku 2008 i vybranými výrobci referenčních materiálů průběžně aktualizují a prověřují, získává uživatel převážně aktuální informace. Databáze COMAR obsahuje v současné době údaje o více než deseti tisících převážně certifikovaných referenčních materiálech 230 výrobců z 26 zemí. Bližší údaje o struktuře databáze COMAR byly publikovány v článku, uveřejněném v Chemických listech [32] přehled o současném stavu podává [33]. Další významnou předností této verze databáze COMAR jsou hypertextové odkazy u mnoha RM, které vedou až k certifikátům či certifikačním zprávám, jež je možno ve formě pdf souborů stáhnout a vytisknout. Hledání v databázi není přes její relativně přátelské rozhraní vzhledem k její genezi zcela bezproblémovou záležitostí. COMAR registruje měsíčně přihlášení kolem 500 uživatelů, kteří si stáhnou výsledky 2500 rešerší, což svědčí o jejím přijetí jako základní reference v oblasti referenčních materiálů.

Další informačními zdroji na internetu jsou databáze Mezinárodní agentury pro atomovou energii IAEA [<https://nucleus.iaea.org/rpst/ReferenceProducts/ReferenceMaterials/index.htm>], pro oblast laboratorní medicíny je relevantní databáze JCTLM, která je součástí internetových stránek BIPM [www.bipm.org/jctlm/]. Existují i databáze, do nichž není vstup bezplatný, jako European Virtual Institute for Reference Materials (www.virm.net), všechny tyto adresy a další lze výhodně najít na internetových stránkách COMAR v oddílu „other directories“.

Vedle těchto hlavních zdrojů informací existují ještě nabídky výrobců chemikálií a analytických instrumentálních systémů. Zde je třeba určité opatrnosti – jednak může být výběr jednostranně ovlivněn firemními zájmy, jednak mohou být RM nižší třídy (QCM) označovány za třídu vyšší – RM nebo i CRM

v rozporu s úrovní certifikace a dokumentů. Na druhou stranu existuje koncept ERM jako spolupráce tří evropských výrobců referenčních materiálů, německého BAM, britské LGC a Evropské komise používající označení ERM (European Reference Materials) pro certifikované referenční materiály vyhovující náročnému posouzení na kvalitu a spolehlivost (www.erm-crm.org).

Konečně, analytik by se měl vždy opřít o to nejbližší – a tím jsou rady a zkušenosti kolegů z jeho oboru.

Mezinárodní databáze RM COMAR od roku 2003

- je volně dostupná na internetu
- je průběžně aktualizována
- umožňuje pohodlný přístup k plným textům certifikátů a certifikačních zpráv, pokud je výrobce zpřístupnil.

Tabulka 6.1. Vybraní producenti a dodavatelé referenčních materiálů

Organizace	Popis informace
LGC Standards, Teddington, Velká Británie www.lgcstandards.com/CZ/en	
National Institute of Standards and Technology – NIST, Gaithersburg, USA www.nist.gov/srm/index.cfm	katalog 1300 SRM (Standard reference materials), dostupné certifikáty
Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Společné výzkumné středisko Evropské komise, Geel, Belgie. ec.europa.eu/jrc/en/reference-materials	katalog referenčních materiálů IRRM, ERM a BCR, dostupné certifikáty a certifikační zprávy
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM), Berlín, Německo www.bam.de/de/fachthemen/referenzmaterialien/index.htm	dostupné certifikáty
Mezinárodní agentura pro atomovou energii, Vídeň, Rakousko nucleus.iaea.org/rpst/referenceproducts/ReferenceMaterials/index.htm	IAEA CRM, databáze
National Research Council of Canada, Ottawa, Kanada www.nrc-cnrc.gc.ca/eng/solutions/advisory/crm_index.html	environmentální CRM, dostupné certifikáty
National Institute for Biological Standards and Control Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts., EN6 3QG, Velká Británie Britský národní ústav pro biologické referenční a kontrolní materiály www.nibsc.org/products/brm_product_catalogue.aspx	CRM a RM biologických referenčních materiálů pro laboratorní medicínu
Chinese National Research Centre for Certified Reference Materials, Beijing, Čínská lidová republika www.gbw365.com/en/	vstup na internetovou stránku čínských referenčních materiálů - v angličtině
National metrology Institute of Japan www.nmij.jp/english/service/C/	významný výrobce CRM, uznávaný i v oblasti laboratorní medicíny

7 Vlastní příprava materiálů pro řízení kvality

7.1 Úvod

Certifikované referenční materiály (CRM) jsou používány především pro validaci analytických postupů a kalibraci, tedy pro zajištění metrologické návaznosti. Referenční materiály, které jsou určeny pro metrologické řízení kvality měření, jsou materiály vhodné pro každodenní prokazování skutečnosti, že je měřicí systém pod statistickou kontrolou. Takové materiály nevyžadují charakterizaci metrologicky platným postupem a mohou být připraveny v dané laboratoři.

V roce 2014 komise ISO-REMCO po dlouhé diskusi vytvořila pokyn pro vlastní přípravu vnitrolaboračních materiálů pro řízení kvality (QCM). Pokyn byl vydán pod označením ISO GUIDE 80 [8, 9]. Laboratoře mohou připravovat tyto materiály pouze pro specifické potřeby a rozhodně jimi nemohou nahradit certifikované referenční materiály (CRM).

Odůvodnění k výrobě materiálů pro řízení kvality (QCM) se může zakládat na kombinaci následujících potřeb:

- vlastnit RM odpovídající v nejvyšší možné míře rutinním vzorkům a vhodné pro řízení kvality,
- vlastnit RM pro každodenní použití, které by doplňovaly komerčně dostupné CRM,
- když neexistuje vhodný CRM,
- aplikace nevyžaduje materiál, který by měl úplné charakteristiky CRM (např. návaznost a nejistotu).

Příprava QCM má ovšem vazbu k výrobě certifikovaných referenčních materiálů (CRM) a je tedy nutné při jejich výrobě respektovat Pokyny ISO 34 [10] a ISO 35 [34]. Požadavky na QCM však mohou být méně náročné, např. nemusí splňovat požadavky na snadný transport a pod.

Při přípravě v laboratoři se s výhodou mohou používat vzorky z reálných produktů, u kterých jsou k dispozici analytické údaje. Je třeba zdůraznit jednu důležitou okolnost: QCM nemohou být použity pro stanovení návaznosti, pro kalibraci a pro stanovení pravdivosti výsledů měření.

7.2 Terminologie

Pro QCM platí terminologické termíny, které jsou uvedeny v Mezinárodním metrologickém slovníku VIM 3 [7].

Hodnoty přiřazené QCM mohou být pouze indikativní, tj. nevykazují metrologickou návaznost. V oblasti použití QCM je tedy místo vztažné hodnoty používána **indikativní** hodnota.

Termín „materiál pro řízení kvality“ nebo „QCM“ byl zaveden pro Pokyn ISO 80 pouze za účelem zjednodušit opakované odvolávání na materiály, které se rutinně používají k hodnocení preciznosti zkušebních postupů. Není účelem definovat novou třídu referenčních materiálů. O takových materiálech se v literatuře hovoří jako o „vlastních referenčních materiálech“, „vzorcích pro řízení kvality“, „kontrolních vzorcích“, „nastavovacích vzorcích“ atd.

7.3 Použití materiálů pro řízení kvality

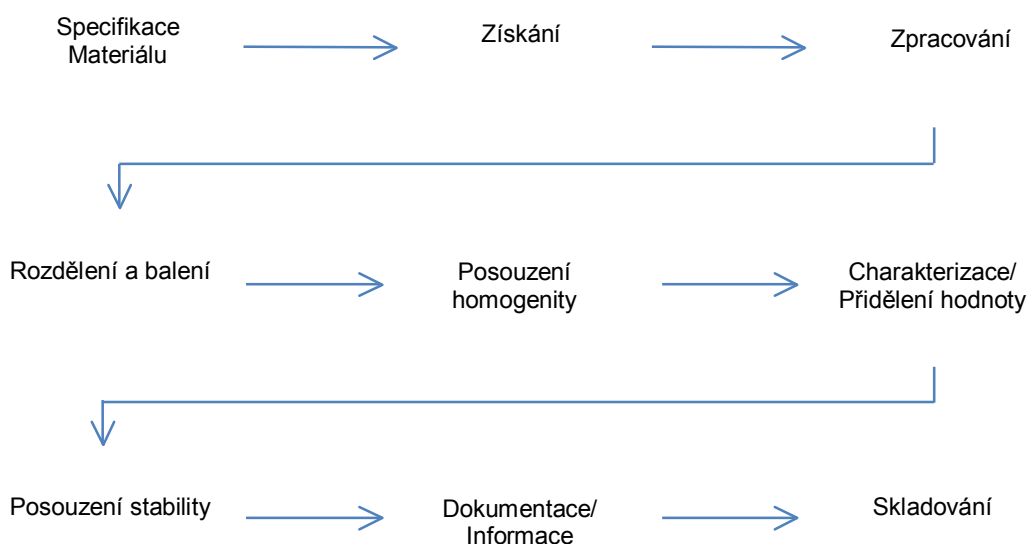
Základní funkcí QCM je poskytnout laboratorům ekonomický způsob kontroly preciznosti jejich měřicích postupů na pravidelném základě, např. v definovaných časových intervalech.

Použití QCM zahrnuje např.

- konstrukci regulačních diagramů,
- vývoj měřicího postupu (včetně optimalizace),
- kontrolu měřicích přístrojů a zařízení (set up),
- opakovatelnost a reprodukovatelnost,
- robustnost měřicího postupu (včetně vlivu teploty a vlhkosti),
- zkoušení způsobilosti (PT); musí být použit stabilní materiál,
- srovnání dvou různých měřicích technik.

7.4 Algoritmus při přípravě QCM

Klíčové kroky při přípravě QCM jsou uvedeny v postupovém diagramu, který byl převzat z českého překladu Pokynu ISO 80 [9]



Obrázek 3. Klíčové kroky přípravy typického QCM

Všechny kroky mohou být předmětem subdodávky od odborně kompetentního subdodavatele.

7.5 Specifikace materiálu

Materiál se musí podobat reálným vzorkům a být dostupný ve vhodném množství. Matrice daného QCM by měla být stejná nebo pokud možno podobná matici rutinních zkušebních vzorků tak, aby vyhovující výsledek u QCM opravdu indikoval vyhovující výsledky u zkušebních vzorků. Tato shodnost v matici vyžaduje znalost analytického postupu používaného u rutinních vzorků, aby se mohlo posoudit, jaký stupeň změny fyzikálních/chemických vlastností matrice zkušební vzorku může způsobit odlišné

chování v předemném měřicím postupu. QCM by měly být komutabilní, což je zvláště důležité v oblasti klinických měřicích postupů.

QCM by se měl charakterizovat vlastnostmi, které mají specifický význam při měření rutinních vzorků. Vlastnosti QCM by se měly podobat vlastnostem zkušebních vzorků.

Velikost jednotky je množství materiálu, který představuje jednu jednotku balení QCM. Velikost jednotlivých jednotek můžeme odvodit od pravděpodobného používání, tj. množství materiálu, který je požadován pro příslušné měření a zda jednotka bude obsahovat dostatek materiálu pro jednotlivou analýzu nebo pro několikanásobné měření.

Odhad celkového množství materiálu, které by laboratoř měla získat, je možno učinit na základě:

- počtu jednotek za rok, které laboratoř bude potřebovat,
- velikosti jednotky,
- výtěžnosti přípravy,
- množství materiálu, které může být snadno homogenizováno,
- doby, po kterou má být dodávka skladována a předpokládané stability materiálu,
- druhu a velikosti skladovacích prostor.

7.6 Získání výchozího materiálu

Pro získání a zpracování výchozích materiálů pro přípravu QCM můžeme využít např.

- zajištění přebytku vzorkovaného materiálu,
- přesnou gravimetrickou přípravu (vhodné pro kapalné vzorky).

Během přípravy QCM je třeba zabránit kontaminaci interferujícími látkami. To je zvláště důležité při přípravě materiálů s nulovým obsahem dané látky (blank).

Při získávání biologických materiálů pro přípravu QCM musíme zvažovat i další specifické otázky jako:

- etiku uchovávání a používání zbylých vzorků od pacientů pro přípravu QCM,
- právní regulace uchovávání a používání zbylých vzorků od pacientů pro přípravu QCM,
- zdravotnické laboratoře připravující QCM musí ve vysoké míře důvěřovat v pravost vybraných materiálů, aby se vyhnuly použití špatně identifikovaných organismů,
- materiály získávané pro přípravu QCM by měly být předběžně zkoumány z hlediska potenciálních zdravotních rizik, zvláště pokud příprava zahrnuje použití kontaminovaných ostrých (špičatých) předmětů nebo riziko vzniku aerosolů.

7.7 Zpracování materiálu

Po získání výchozího materiálu existuje musíme učinit celou řadu kroků, abychom získali homogenní a stabilní materiál. Některé z kroků lze v závislosti na charakteru materiálu vynechat. Nejběžnější postupy zpracování jsou: sušení, mletí a drcení, síťování, míchání a mísení, filtrace, stabilizace, sterilizace.

7.8 Rozdělování a balení

Po zpracování výchozího materiálu se musí materiál rozdělit a zabalit.

Po přípravě výchozího materiálu následuje jeho dělení. Základní podmínkou procesu dělení je zachování homogenity materiálu. Existují specifické postupy pro různé typy maticí. V každém případě musí dělení proběhnout co nejrychleji, aby se minimalizovalo nebezpečí vzniku nehomogenity. U QCM pro stopovou analýzu je důležité zajistit podmínky dělení tak, aby se do materiálu nezanesly další nečistoty, např. z atmosféry, aparatury, laboratorního nádobí, apod.

Referenční materiály v chemické analýze

Pro zajištění dostatečné homogenity a stability QCM je třeba vybrat vhodné formy balení. Pokud se použije nevhodné balení, materiál může rychle degradovat, ztrácet či přijímat vlhkost. Některé materiály jsou citlivé na kyslík a proto se musí připravovat v inertní atmosféře. Je nutné brát v úvahu i adsorpci některých složek na stěny balicího materiálu a případné loužení nečistot. Důležitý je i způsob balení těkavých materiálů. Výběr nejvhodnějšího typu balení pro daný QCM může vyžadovat i předběžné experimenty včetně slepých (blank) studií.

7.9 Homogenita

Homogenita je relativní pojem. Požadovaná úroveň homogenity QCM závisí na pochopení očekávaných změn u množství vzorku používaného pro studovaný měřicí proces. Ve všech případech by měla mít úroveň nehomogenity menší vliv na výsledek měření než je variabilita měřicího procesu, nebo by měla být pod stanovenou kritériální hodnotou.

Homogenita má dvě hlediska, mezijednotkovou homogenitu a homogenitu uvnitř jednotky. Homogenita mezi jednotkami odráží proměny výsledků měření odpovídající jednotlivým jednotkám materiálu. Homogenita jednotky se odráží v minimálním velikost podvzorku (podílu vzorku), který je reprezentativní pro celou jednotku. Je třeba zajistit, aby byly typicky používané velikosti vzorků v každodenní analýze větší nebo přinejmenším shodné s touto velikostí.

Statistické vyhodnocení homogenity QCM používá stejný postup jako u CRM. Postup je popsán v Pokynu ISO 35 [34] a využívá analýzu rozptylu. Měřenou charakteristiku (měřená veličina, measurand) analyzujeme vhodným měřicím postupem. Jako příklad statistického vyhodnocení použijeme příklad z Kvalimetrie 16 [35]. Jedná se o testování homogenity laktózy v potravinové matrici. Vstupní matice je uvedena v následující tabulce.

Tabulka 7.1. Vstupní matice pro test homogenity. Hmotnostní obsah laktózy, w, g/g

Jednotka RM	Opakování 1	Opakování 2	Průměr	Rozptyl	Počet opakování, <i>r</i>
1	7,98	7,88	7,930	0,00500	2
2	7,93	7,86	7,895	0,00245	2
3	7,50	7,61	7,555	0,00605	2
4	7,28	7,65	7,465	0,06845	2
5	7,38	7,62	7,500	0,02880	2
6	7,46	7,51	7,485	0,00125	2
7	7,48	7,39	7,435	0,00405	2
8	7,66	7,48	7,570	0,01620	2
9	7,79	7,51	7,650	0,03920	2
10	7,42	7,25	7,335	0,01445	2

Analýza rozptylu

Výstup z Excelu

Zdroj variability	SS	St. volnosti	MS	<i>F</i>	<i>F</i> krit
Mezi výběry	0,67402	9	0,074891	4,029	3,02
Uvnitř výběrů	0,18590	10	0,018590		
Celkem	0,85992	19			

Vzhledem k tomu, že je vypočtená hodnota F (4,029) větší než příslušný kvantil F -rozdělení (3,02), můžeme konstatovat nehomogenitu materiálu na 95% hladině významnosti.

Mezivýběrová („mezibaničková“) směrodatná odchylka, s_{bb} se vypočte podle vztahu

$$s_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{mezi} - MS_{uvnitř}}{r}} = \sqrt{\frac{0,07489 - 0,01859}{2}} = 0,168$$

Směrodatná odchylka opakovatelnosti, s_r , je dána vztahem

$$s_r = \sqrt{MS_{uvnitř}} = \sqrt{0,01859} = 0,136$$

Nejistota odpovídající homogenitě je dána větší hodnotou z obou směrodatných odchylek, tedy

$$u_{hom} = 0,168$$

7.10 Charakterizace a přidělení (indikativní) hodnoty

Účelem QCM je kontrolovat změny měřicího procesu. Aby se toho účinně dosáhlo, je třeba znát údaje hodnoty vlastností QCM, které se používají pro sledování procesu. Je též nutné mít údaj o pravděpodobné variabilitě hodnot, která je způsobena heterogenitou mezi jednotlivými jednotkami QCM.

Effektivním způsobem stanovení údaje hodnoty vlastnosti je použití celkového průměru získaného ve studiu homogenity. Rozpětí hodnot, ve kterých lze přiměřeně očekávat, že hodnota vlastnosti leží, lze odhadnout z odchylky od její celkové průměrné hodnoty. Tato odchylka od průměru se může použít ke stanovení varovných mezí regulačního diagramu. Konvenčně se varovné a akční meze (též uváděné jako dolní a horní akční meze) stanovují jako dvojnásobek a trojnásobek směrodatné odchylky.

7.11 Stabilita QCM

Zjištění stability je nákladný, zdlouhavý a komplikovaný proces. Pokud existuje domněnka, že je formální hodnocení stability nutné, je třeba postupovat v souladu s principy Pokynu ISO 35.

Uvedeme příklad zjištění dlouhodobé stability QCM, neboť ta může (ale nemusí) přispívat k celkové nejistotě hodnoty charakteristiky QCM [lit. 35, str. 76]

Při tom postupujeme takto:

Změříme charakteristiku v čase 0 a poté v čase t . Při odhadu významnosti difference hodnot charakteristiky v čase 0 a t používáme z -test ($z \leq 2$).

PŘÍKLAD

Průměrná hodnota charakteristiky v čase 0: $x_0 = 26,7 \mu\text{g kg}^{-1}$

Nejistota výsledku, $u_0 = 1,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($k = 1$)

Průměrná hodnota charakteristiky v čase t : $x_t = 22,8 \mu\text{g kg}^{-1}$

Nejistota výsledku, $u_t = 1,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($k = 1$)

Rozdíl, $D = 22,8 - 26,7 = -3,9 \mu\text{g kg}^{-1}$

Standardní nejistota rozdílu, u_D :

$$u_D = \sqrt{u_0^2 + u_t^2} = \sqrt{1^2 + 1,25^2} = 1,6 \mu\text{g kg}^{-1}$$

$$z = \frac{|D|}{u_d} = \frac{3,9}{1,6} = 2,43$$

Materiál vykazuje nestabilitu v čase t .

7.12 Dokumentace u materiálů pro řízení kvality (QCM)

Jako u laboratorních reagentů tak i QCM musí být vhodným způsobem označeny a opatřeny dokumenty pro jejich bezpečné a účinné použití. Pokyn ISO 31 uvádí detailní požadavky na obsah certifikátů a označování referenčních materiálů.

Informace, které by měly být k dispozici u materiálů pro řízení kvality (QCM)

Následující informace by měly být uživateli QCM snadno dostupné:

- název a popis materiálu,
- referenční číslo anebo číslo šarže,
- datum přípravy,
- zamýšlené použití materiálu a jakékoliv speciální instrukce pro jeho použití (např. v případě potřeby uvedení specifických postupů sušení při použití nebo instrukcí o korekci na sušinu),
- indikativní hodnota (γ), pokud existuje,
- minimální množství materiálu pro dosažení konzistentních výsledků (v závislosti na veličinách použitých ve studiu homogenity), tj. minimální navážku,
- pokyny pro skladování,
- informace o očekávané životnosti (trvanlivosti),
- speciální bezpečnostní opatření.

Označení QCM jednotek

Každá jednotka QCM musí nést jasné označení způsobem, který ji jednoznačně spojuje s informacemi o materiálu. Označení by tedy mělo obsahovat následující zásadní informace:

- název a popis materiálu,
- referenční číslo nebo číslo šarže,
- označení rizika a bezpečnosti v případě potřeby,
- způsob skladování a podmínky prostředí včetně teploty a vlhkosti,
- datum přípravy,
- očekávané datum expirace.

Je vhodné, aby označení obsahovalo i následující dodatečné informace:

- velikost jednotky (např. 20 g),
- číslo jednotlivé jednotky (to může napomoci při identifikaci trendů u jednotlivých lahvíček, pokud se vyskytnou neočekávané výsledky).

Užitečné informace, které se mají zachovat

Informace o přípravě QCM jsou potřebné v případě dotazu k materiálu během jeho používání, nebo při přípravě další šarže materiálu. Je dobrým zvykem uchovávat/archivovat v dostupném formátu následující údaje týkající se přípravy QCM:

- odpovídající specifikaci,
- původ a přípravu výchozího materiálu,

- druhy balení použitých u jednotlivých jednotek,
- použité postupy rozdělování,
- jakékoliv speciální zpracování použité pro stabilizaci nebo sterilizaci materiálu,
- doplňující údaje o materiálu (např. velikost částic, obsah vlhkosti, atd.),
- úplné údaje o všech metodách použitých k přípravě materiálu,
- užitečné zkušenosti, např. jak se vyhnout úskalím a nákladným chybám při přípravě dalších várek nebo podobných QCM.

7.13 Skladování

Jednotlivé QCM by se měly skladovat za podmínek, které zajistí jejich stabilitu. Musí se tedy zajistit, aby byla jednotlivá balení bezpečně uzavřena a skladována v chladu, tmě a suchu.

7.14 Používání materiálů pro řízení kvality (QCM)

7.14.1 Použití QCM při tvorbě regulačních diagramů

Regulační diagram (RD) je grafické zobrazení funkce $X = f(t)$, kde t je časová funkce nebo číslo pokusu. Výpočet parametrů RD závisí na typu RD. Při konstrukci RD používáme obvykle QCM maticového typu s maticí podobnou předpokládaným vzorkům. Základy konstrukce RD popisují publikace [36–38].

7.14.2 Použití QCM při porovnání dvou analytických postupů

QCM se mohou použít i při porovnání dvou analytických měřicích postupů, např. při validaci nového postupu srovnáním s referenční metodou. Vyžaduje to ovšem existenci více QCM o různém obsahu měřené látky. Pro srovnání dvou metod měříme sadu QCM oběma metodami, tj. referenční a novou. Pro srovnání musíme znát nejistotu výsledků získaných oběma analytickými postupy. Pro testování zvolíme bivariátní lineární regresi [lit. 35, str. 38]. V následující tabulce jsou uvedena data a výsledky statistického zpracování.

Výsledky statistického zpracování

úsek	Test pro úsek:	$H_0: \beta_0 = 0$	0,037
směrnice	Test pro směrnici:	$H_0: \beta_0 = 1$	0,057
		$t_{krit} \quad 2,10$	
test pro úsek	T = 0,93	H_0 platí	
test pro směrnici	T = 2,69	proporcionální chyba	

Nová metoda vykazuje proporcionální kladnou chybu při vyšších obsazích.

Tabulka 7.2. Porovnání nového měřicího postupu s referenčním postupem měření

Vzorek	Referenční	$u(x)$	Nový	$u(y)$
1	0,294	0,080	0,409	0,048
2	0,327	0,030	0,248	0,085
3	0,704	0,110	0,672	0,064
4	1,297	0,225	1,461	0,145
5	1,297	0,088	1,339	0,065
6	0,268	0,019	0,324	0,058
7	0,279	0,138	0,166	0,015
8	1,704	0,169	1,915	0,079
9	0,344	0,051	0,380	0,078
10	0,312	0,023	0,326	0,067
11	0,475	0,098	0,274	0,087
12	1,076	0,200	1,213	0,099
13	1,697	0,622	1,111	0,082
14	1,229	0,171	1,673	0,160
15	0,169	0,072	0,217	0,055
16	0,735	0,093	0,855	0,016
17	0,982	0,102	1,180	0,023
18	0,755	0,151	0,710	0,086
19	0,684	0,092	0,768	0,090
20	1,116	0,086	1,266	0,029

RM pro řízení kvality se používají ke sledování výkonnosti metod, které již byly validovány s cílem zjistit, zda je metoda ve stavu statistické kontroly. Obecně však jsou požadavky na takový RM menší než na CRM. Pokyn ISO 80 shrnuje požadavky na jejich přípravu a uvádí několik případových studií dokumentujících doporučený postup.

8 Použití referenčních materiálů v laboratorní medicíně

V principu platí při použití referenčních materiálů (RM) stejné zásady, jako při použití jiných referenčních materiálů chemického složení. Některé zvláštnosti použití v klinických laboratořích jsou dány specifickým charakterem oboru laboratorní medicíny a budou uvedeny v dalším textu.

8.1 Funkce referenčních materiálů v laboratorní medicíně

Funkce referenčních materiálů v laboratorní medicíně je fakticky totožná s funkcí RM v obecné analytické chemii. Je však třeba respektovat některé zvláštnosti od běžného použití RM v analytické chemii.

V laboratorní medicíně se používají ke kalibraci v naprosté většině případů pracovní matriční kalibrátory (pojem *kalibrátor* je shodný s pojmem *kalibrační standard*). Kalibrují se převážně nikoliv analytické postupy nebo přístroje, ale komplexní souborné analytické měřicí systémy (soubor postupů, přístrojů, měřidel, analytického a řídicího softwaru) často až robotického charakteru. Používání matričních, více-složkových kalibrátorů je dáno nejen nutností eliminovat časté matriční vlivy, ale zejména technickými podmínkami měření v klinických laboratořích.

Vyhodnocení pravdivosti měření analýzou referenčních a certifikovaných referenčních materiálů (RM, CRM, SRM) v programech mezilaboratorních porovnávání, při validaci měření a vnitřním (operačním) řízení kvality má naprosto klíčový význam pro efektivitu výsledků v diagnostických rozhodovacích procesech při péči o pacienty. Analytiku v klinických laboratořích lze chápat jako **získávání specifických informací** o hodnotách analytů a parametrů potřebných k diagnostickým rozhodovacím procesům a v procesech sledujících průběh terapie chorob.

Používání analytických postupů (analytických měřicích systémů) s přetrvávajícím pozitivním vychýlením (bias) vede k falešné klasifikaci přítomnosti choroby a k následným nepředstavitelným finančním ztrátám v důsledku zbytečných nákladů na léčbu a farmakoterapii. Přetrvávající negativní vychýlení (bias) pak vede k falešné klasifikaci nepřítomnosti choroby a k následně pozdní diagnostice se všemi následky v oblasti patofyziologie, zdraví a morálky.

8.2 Nedostatek referenčních materiálů v laboratorní medicíně a jeho příčiny

Předmětem měření v klinické laboratoři jsou velmi často nedostatečně, nebo jen konvenčně definované analyty/směsi (např. celková bílkovina v moči, TSH – thyreotropin, karbohydrátové markery CA atd.). Tato skutečnost znemožňuje při mnoha měřeních realizovat metrologickou návaznost výsledku měření na SI jednotku látkového množství. Kalibrace takových měření tedy často neposkytuje výsledky s návazností na SI jednotku látkového množství a proto v těchto případech nelze objektivně posoudit jejich pravdivost, jakkoliv jde (viz výše) o naprosto zásadní požadavek. Jen asi u 50 % veličin, které jsou v klinických laboratořích předmětem měření, je dostatečně známa struktura nebo složení analytu, které jsou potřebné pro realizaci návaznosti na SI jednotky.

8.3 Referenční materiály a trh s *in vitro* diagnostiky (IVD MD)

Ve směrnici IVD MD (In vitro diagnostic medical devices) [39] jsou definovány zákonné předpisy, přijaté v roce 2001 a doplněné v letech 2015 až 2016 zákonodárnými a vládními orgány zemí EU jako národní zákony, jejichž účelem je regulace trhu na bázi metrologie.

Zásadním požadavkem je existence metrologické návaznosti hodnot pracovních kalibrátorů a referenčních materiálů určených pro stanovení pravdivosti – vychýlení měřicích systémů. Zásady metrologické návaznosti v klinických laboratořích jsou popsány normami ISO 17 511 a ISO 18 153 [40, 41]. Vlastnosti referenčních materiálů IVD MD definuje norma ISO 15 194 [42].

Návaznost hodnot referenčních materiálů pro klinické laboratoře je zde chápána takto:

- Kdykoliv to lze, realizuje se úplným řetězcem metrologické návaznosti na SI jednotku.
- Pokud nelze metrologickou návaznost plně uskutečnit (v důsledku výše uvedených skutečností), realizuje se alespoň do stupně, kterého lze dosáhnout. Počátek řetězce návaznosti pak bývá stanoven „referenční metodou“ určenou mezinárodní dohodou (měření katalytických koncentrací enzymů), nebo mezinárodním konsensuálním referenčním materiálem (měření koncentrací imunoglobulinů a specifických proteinů), nebo i jinak konsensuálně pomocí mezilaboratorního porovnávání a srovnávacích pokusů výrobce dle IVD MD (karbohydrátové markery používané v onkologii, TSH, hemokoagulační parametry aj.).
- Neúplnost řetězce návaznosti je důvodem pro urychlený vývoj nových referenčních materiálů, schopných rámec návaznosti podle ISO 17 511 [40] a ISO 18 153 [41] zkompletovat, nebo aspoň rozšířit (jedná se přibližně o 1000 analytů a parametrů).

Referenční materiály s návazností hodnot na SI jednotky mají podle směrnice IVD MD [39] výslovnou funkci hodnocení pravdivosti – vychýlení (bias) výsledků měření.

Programy mezilaboratorního porovnávání zkoušek mají na rozdíl od pojetí v obecné analytické chemii normativně definovanou funkci dozoru nad kvalitou IVD MD výrobců dle EN 14 136 [43] a nejsou tedy pouze nástroji zkoušení způsobilosti (proficiency testing).

8.4 Komutabilita referenčních materiálů IVD MD

V ostatních oborech chemické analýzy se pro termín komutabilita používá výraz matriční přiměřenost (matrix match). Jedná se o zásadní problém při používání referenčních materiálů (RM) v laboratorní medicíně. Tuto schopnost referenčního materiálu poskytovat stejný matematický vztah mezi analytickým signálem a látkovým množstvím jako reálné vzorky [43] (s respektem k rozsahu nejistot měření), tedy vykazovat při měření a při hodnocení kvality stejné chování jako analytické vzorky, musí zajistit u referenčních materiálů pro klinické laboratoře IVD MD jejich výrobci. Pro uživatele těchto RM materiálů by měl výrobce dle IVD MD zajistit dostatečnou dokumentaci v souladu s ISO 15 193 a ISO 15 195 [44, 45]. Systematické a řádné provádění operativního řízení kvality (vnitřní kontroly kvality a účast v metodicky řádně vedených externích hodnoceních kvality) slouží uživatelům IVD MD referenčních materiálů k detekci dostatečného stupně komutability. Nedostatek komutability vede k chybným výsledkům měření a k chybným závěrům o kvalitě analytické činnosti. Nekomutabilní (nedostatečně komutabilní) referenční materiály bývají v klinické laboratoři jednou z nejčastějších příčin vychýlení výsledků (bias) se všemi výše uvedenými důsledky. Stupeň komutability referenčního materiálu se může posoudit:

- regresní analýzou výsledků měření materiálů po stanovení referenční a rutinní laboratorní metodou; podrobný popis je v citaci [46],
- porovnáním hodnot vychýlení rutinních laboratorních metod a referenční metody.

8.5 Souhrn požadavků na referenční materiály v laboratorní medicíně

1. Výroba a popis RM je v souladu s ISO 15 194 [42] a ISO 15 193 [44], ISO 15 195 [45].
2. Metrologická návaznost hodnot je popsána dle ISO 17 511 a ISO 18 153 [40, 41].
3. Nejistota hodnot je deklarována a uvedena.
4. Komutabilita je otestovaná.

Materiály pro řízení kvality, QCM, vnitřní RM (in-house)

Měly by být v souladu s požadavky Pokynu ISO 80 [8, 9].

1. Odvození hodnot od materiálů vyšší metrologické úrovně.
2. Přístupnost potřebných dat (dostupnost, charakteristika, nejistota hodnot).
3. Stabilita, homogenita, skladování, akceptovatelná nejistota.

8.6 Procesy validace, dokumentace návaznosti, stanovení nejistoty a posouzení výkonnosti v klinických laboratořích pomocí referenčních materiálů

Validace, verifikace

Výrobci IVD MD jsou povinni poskytovat klinickým laboratořím ve své dokumentaci validované hodnoty indikátorů analytické kvality postupů a systémů měření. Laboratoře musí potvrzovat hodnoty těchto indikátorů za konkrétních podmínek, v nichž jsou výrobky IVD MD používány. Tato povinnost verifikace je uvedena v normě pro akreditaci klinických laboratoří ISO 15189. Za základní indikátory analytické kvality měření v laboratorní medicíně jsou považovány:

- preciznost
- pravdivost (vychýlení – bias)
- nejistota
- pracovní rozsah a linearita
- mez stanovitelnosti

Verifikace se provádí laboratorními experimenty, výsledky vnitřního řízení analytické kvality a pomocí programů externích hodnocení kvality. Nezbytnou součástí těchto procesů jsou referenční materiály.

Dokumentování metrologické návaznosti

Výrobce IVD MD musí ve své pracovní dokumentaci, která je k dispozici uživatelům, dokumentovat metrologickou návaznost a nejistotu hodnot referenčních materiálů a kalibrátorů. Laboratoře uživatelů dokumentují návaznost výsledků měření účastí v programech mezilaboratorních porovnávání. Součástí dokumentace standardních operačních postupů klinické laboratoře jsou i experimentální data, související s dokumentací návaznosti: výsledky analýz referenčních materiálů, kvantifikované jako hodnoty vychýlení (bias). Vhodným nástrojem pro tuto činnost jsou zejména analýzy kontrolních materiálů, validovaných předem použitím v dřívějších cyklech programů mezilaboratorních porovnávání.

Výpočet nejistoty

Analýza referenčních materiálů je zdrojem většiny potřebných dat, sloužících k stanovení nejistoty výsledků měření. Jsou to data:

- vnitřní kontroly kvality (dlouhodobá reprodukovatelnost měření, monitorující několik výrobních šarží reagentů a referenčních materiálů),
- externího hodnocení kvality, které charakterizuje systematické složky nejistoty jako je vychýlení (bias),

Referenční materiály v chemické analýze

- kalibrační dokumentace a měření kalibrátorů, které poskytnou data o nejistotě kalibrace při výměně pracovních kalibrátorů,
- nejistot hodnot pracovních kalibrátorů, uváděných výrobcí IVD MD ve validačních dokumentech a v certifikátech referenčních materiálů.

Podrobnosti o provedení výpočtu jsou uvedeny v textu Doporučení k výpočtu nejistot kvantitativních výsledků měření v klinických laboratořích z roku 2014 [sekk.cz/infoservis/2014_nejistoty_doporuceni.pdf]. Na této internetové adrese je k dispozici i Excelový kalkulátor pro ulehčení vlastního výpočtu. V Metodickém listu 16, který vydal Eurachem-ČR [18], se pojednává o odhadu nejistoty chemických měření se započtením vychýlení.

8.7 Certifikované referenční materiály

Aktuální přehled a jejich využití

Přehled současného stavu RM a jejich využití udávají tabulky 8.1 až 8.3 [47], vzniklé ve spolupráci se spojenou komisí JCTLM (Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine – Mezinárodní společná komise zajišťující návaznost v laboratorní medicíně; www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/) a BIPM (Mezinárodního úřad pro váhy a míry v Sèvres; www.bipm.org).

Spojená komise JCTLM má dvě základní pracovní skupiny (Working Groups): WG 1 pro referenční materiály a referenční měření a WG 2 pro referenční laboratoře a jejich síť. WG 1 se zabývá nominací a schvalováním referenčních materiálů pro použití v laboratorní medicíně, WG 2 vlastními referenčními měřicími postupy a sítí referenčních laboratoří. Referenční laboratoře JCTLM provádějí měření pomocí schválených referenčních měřicích postupů kalibrovaných schválenými referenčními materiály. Průběžně jsou ustanovovány ad-hoc komise pro jednotlivé analyty, referenční materiály a referenční měření (například PTH (parathormon), cystatin C, vitamin D a další). JCTLM má svou databázi (www.ifcc.org ikona JCTLM – IFCC Media). Data z ní uvádějí tabulky 8.3 a 8.4.

Tabulka 8.1. Výběr z dat JCTLM pro klinické laboratoře

Položka	Počet
Certifikované referenční materiály (CRM, ERM, SRM)	295
Referenční metody měření	170
Schválené referenční laboratoře (RL)	130

Tabulka 8.2. Uživatelé databáze JCTLM

Uživatel	Podíl (%)
Referenční laboratoře	20
IVD výrobci	20
Klinické laboratoře	33
Výrobci referenčních materiálů	5
Národní metrologické orgány	7
Akreditační orgány	2
Ostatní průmysl a ne-IVD výrobci	3
Ostatní, včetně poskytovatelů EHK	10

Referenční materiály v chemické analýze

V oblasti referenčních materiálů (CRM, ERM a SRM) jsou k červnu 2015 v databázi JCTLM k dispozici následující počty referenčních materiálů pro účely laboratorní medicíny.

Tabulka 8.3. Referenční materiály v databázi JCTLM

Skupiny analytů	Čisté referenční materiály	Matricové referenční materiály
Vitaminy	–	9
Proteiny	7	18
Nukleové kyseliny	9	1
Nepeptidické hormony	12	11
Stopové kovy a prvky	–	58
Metabolity a substráty	53	33
Enzymy	6	6
Elektrolyty	15	21
Léčiva a drogy	12	19
Koagulační faktory	–	2
Krevní skupiny	–	3

Komerčně přístupné matriční referenční materiály pro klinické laboratoře

Jsou stanoveny mezinárodně akceptovanými referenčními metodami, založenými často na separačních principech. Obvykle jde o nativní biologické vzorky, bez přídavku konzervačních přísad, nelyofilizované, skladované a distribuované ve hluboce zmrazeném stavu.

Jsou určeny:

- k přenosu hodnot na pracovní kalibrátory,
- k stanovení hodnot vychýlení.

Materiály SRM (Standard Reference Materials)

Jsou produkovány organizací NIST (National Institute for Standards and Technology) USA. Jejich popis včetně certifikovaných hodnot a jejich nejistot je k dispozici na internetových stránkách www.nist.gov.

Materiály IRMM

Jsou produkovány organizací Institute for Reference Materials and Measurements Geel, Belgie a jejich druhy, certifikáty, hodnoty a nejistoty jsou k dispozici na příslušných internetových stránkách IRMM (www.irmm.jrc.be). Do skupiny těchto materiálů patří materiály IRMM/IFCC, vyvinuté ve spolupráci s Mezinárodní federací klinické chemie a laboratorní medicíny (IFCC) a materiály typu ERM (Evropské referenční materiály). Databáze praktického použití uvedených certifikovaných referenčních materiálů je uvedena na stránkách JCTLM (www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm) v portálu “Laboratory Service”.

Demonstrace dat certifikovaného referenčního materiálu pro laboratorní medicínu

Typ/Označení v katalogu: SRM NIST 967

Analyt: Kreatinin v séru/plasmě

Referenční metoda: ID-LC/MS Izotopové zředování – kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie

Referenční materiály v chemické analýze

Hodnoty: Vzorek 1: $75 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($U_c = 2,1 \%$)

Vzorek 2: $343 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($U_c = 2,1 \%$)

Matrice: Lidské sérum, u vzorku 2 spikované přidavkem kreatininu

Skladování: Hluboce zmrazené

Určení: Zajistit návaznost rutinních laboratorních metod, k dosažení pravdivosti výsledku měření.

Hodnocení kvality referenčních a kalibračních laboratoří RELA

Je prováděno programem RELA (Reference Laboratories) od roku 2003. Program je pod záštitou IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), BIPM a JCTLM. Organizačně program RELA zajišťuje německá společnost DGKL (Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, e.V.) a její součást Referenzinstitut für Bioanalytik DGKL Bonn (RfB Bonn). RELA je určen akreditovaným referenčním laboratořím a kalibračním laboratořím výrobců IVD. Zásadní podmínkou účasti je akreditace referenční/kalibrační laboratoře podle normy ISO/IEC 17025 anebo ISO 15195. Výsledky referenčních měření v systému RELA jsou zveřejňovány každoročně na stránce (www.dgkl-rfb.de:81/index.shtml) včetně identifikace totožnosti každého účastníka RELA, tedy i kalibračních laboratoří výrobců IVD. Kontrolní cykly RELA jsou realizované dvěma zaslanými kontrolními vzorky $1 \times$ ročně. Vedle výsledků měření uvádí každá zúčastněná laboratoř i nejistoty výsledků měření vypočtené dle určeného algoritmu. Od roku 2003 se počet stanovovaných analytů a parametrů (anorganické a organické analyty, substráty, enzymy, proteiny, hormony, léčiva, glykovaný hemoglobin, vitamíny) průběžně rozšiřuje. Postupně roste i počet referenčních laboratoří, které splňují požadovaná kritéria a účastní se EHK programu RELA. Vybrané údaje o programu RELA uvádí tabulky 8.4 a 8.5.

Tabulka 8.4. EHK program RELA

	Počet
Referenční laboratoře v rámci JCTLM	50
Kontrolované analyty	39
Nově kontrolované analyty	4 (HDL a LDL cholesterol 25-OH vitamin D; fT4)
Referenční laboratoře v rámci task force (pracovní skupiny IFCC) pro stanovení hemoglobinu HbA _{1c}	19 (2 noví kandidáti)

Tabulka 8.5. Počty referenčních laboratoří v rámci JCTLM

Stát	Počet
Čína	24
Německo	6
Itálie	3
Francie, Nizozemsko, Španělsko	po 2
USA, Kanada, Argentina, Singapur, Jižní Korea, Japonsko, Belgie, Švédsko, Velká Británie, Turecko	po 1

Pravděpodobné trendy standardizace v blízké budoucnosti

V procesu standardizace jsou měření klíčových biomarkerů složitější struktury (pracovní skupiny IFCC):

- PTH (Pracovní skupina IFCC)
- troponiny cTnI (NIST)

- 25-OH vitamin D (VDSP – Vitamin D standardization program)
- thyroidní hormony
- insulin (jeho metody stanovení)
- proteomika (peptidy a proteiny metodami MS)
- CSF – proteiny (proteiny v likvoru)
- růstové hormony
- kostní markery a další

Řeší se problémy související přímo se standardizací RM a to mimo jiné:

- komutabilita referenčních materiálů (potřeba jejího jednoznačného určení)
- odhad nejistoty měření (potřeba obecně akceptovaného celosvětového jednotného algoritmu výpočtu)
- využití objektivních indikátorů analytické kvality

Tyto problémy jsou intenzivně testovány a publikovány a názory na ně, či závěry o nich, jsou doposud kontroverzní a nejednotné.

Principy, pracovní a výpočetní postupy používání RM v laboratorní medicíně jsou obdobné těm, jež jsou uvedeny v základní části příručky a proto je lze uplatňovat i zde. Určité zvláštnosti a specifické normy a názvosloví oboru byly ale důvodem pro jeho popsání ve zvláštní kapitole.

9 Literatura a doporučené prameny

1. The selection and use of reference materials. A basic guide for laboratories and accreditation bodies. EEE/RM/062rev3. Eurachem 2002.
www.eurachem.org/index.php/publications/guides
2. Jenks P. J., Zeisler R.: Proper Usage of Reference Materials, In: Reference Materials for Chemical Analysis, Certification, Availability and Proper Usage. M. Stoeppler, W. R. Wolf, P. J. Jenks (eds.), Wiley–VCH, Weinheim, New York, Chichester, Brisbane, Singapore, Toronto 2001. ISBN 3-527-30162-3
3. Roper P., Burke S., Lawn R., Barwick V., Walker R.: Applications of Reference Materials in Analytical Chemistry. LCG (Teddington) Limited, 2001.
4. Kvalimetrie 14. Návaznost chemických měření. Použití referenčních materiálů v chemické analýze. M. Suchánek, Ed. EURACHEM-ČR, Praha 2004. ISBN 80-86322-02-5
5. ISO Guide 30:2015 Reference materials – selected terms and definitions.
6. ISO/IEC Guide 99:2007 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM).
7. TNI 01 0115:2009 Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM).
8. ISO Guide 80:2014 Guidance for the in-house preparation of quality control materials (QCMs).
9. TNI POKYN ISO 80:2015 Příručka pro vlastní přípravu materiálů pro řízení kvality (QCM). ÚNMZ Praha 2015.
10. ISO Guide 34:2009 General requirements for the competence of reference material producers.
11. TNI POKYN ISO 34:2013 Obecné požadavky na způsobilost výrobců referenčních materiálů. ÚNMZ Praha 2013.
12. ISO Guide 31:2015 Reference materials – Contents of certificates, labels and accompanying documentation.
13. Greenberg R. R., Bode P., De Nadai Fernandes E. A.: Neutron activation analysis: A primary method of measurement. Spectrochim. Acta B **66**, 193–241 (2011).
14. Metodický pokyn 017-MP-C001, Český metrologický institut, Praha 2013.
15. ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří ČSNI, Praha 2005.
16. ISO Guide 33:2015 Reference materials — Good practice in using reference materials. ISO, Geneva, 2015.
17. Metodický list Eurachem-ČR č 3. www.eurachem.cz/metodicke-listy.php
18. Metodický list Eurachem-ČR č 16. www.eurachem.cz/metodicke-listy.php
19. ISO/IEC Guide 98-3:2008. Uncertainty of measurement – Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement. ISO, Geneva, 2008.
20. KVALIMETRIE 20 Vhodnost analytických metod pro daný účel. (Přeloženo z The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics Ed.

- B. Magnusson, U. Örnemark. Second Edition 2014.) Editoři: Miloslav Suchánek a David Milde, EURACHEM-ČR, Praha 2015. ISBN 978-80-86322-00-1
21. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Third Edition, EURACHEM/CITAC Guide CG4, QUAM:2012.P1. www.eurachem.org
22. KVALIMETRIE 19 Stanovení nejistoty analytického měření. (Přeloženo z Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, EURACHEM/CITAC Guide. Editoři S. L. R. Ellison, A. Williams. Third Edition 2012.) Editoři: Miloslav Suchánek a David Milde. Čtvrté české přepracované vydání, EURACHEM-ČR, Praha 2014. ISBN 978-80-86322-07-0
23. KVALIMETRIE 13 Doškářová Š., Janoš P., Plzák Z., Suchánek M., Šubrt P.: Odhad nejistot chemických a biochemických měření., EURACHEM-ČR, Praha 2003. ISBN 80-86322-01-7
24. ČSN EN ISO/IEC 17043:2010 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na zkoušení způsobilosti. ÚNMZ Praha.
25. Mutual recognition of national measurement standards and of calibration and measurement certificates issued by national metrology institutes, International Committee of Weights and Measures (CIMP). Ujednání CIMP MRA o vzájemném uznávání státních etalonů, kalibračních listů a výsledků měření vydaných národními metrologickými instituty. Paříž (1999). www.bipm.org/en/cipm-mra
26. KVALIMETRIE 18 Názvosloví analytického měření. Úvod k 3. vydání Mezinárodního metrologického slovníku. (Přeloženo z Introduction to VIM 3. Terminology in Analytical Measurement. V. Barwick, E. Prichard, eds. First edition, EURACHEM 2011.) Eds: M. Suchánek a D. Milde, EURACHEM-ČR, Praha 2013. ISBN 80-86322-06-8
27. ISO/TR 16476 Reference materials – Current status of establishing and expressing metrological traceability of quantity values assigned to reference materials. N1330, ISO-REMCO Geneva 2015.
28. Ehrlich D. CH., Rasberry D. S.: Metrological Timelines in Traceability, NIST, USA, 1998.
29. Salit M. L., Turk C.G.: Traceability of Single-Element Calibration Solutions. Anal. Chem. **77**, 136A–141A (2005).
30. ERM Application Note 3 (2008) Using Reference Materials to Establish Metrological Traceability. www.erm-crm.org/ERM_products/application_notes/Pages/index.aspx
31. Metodický list 13 - Eurachem Leaflet: Metrologická návaznost analytických výsledků. www.eurachem.cz/publikace.php
32. Suchánek M., Plzák Z., Mestek O.: Databáze ISO-REMCO COMAR. Chem. listy **89**, 89 (1995).
33. Steiger T., Pradel R.: COMAR: The international database for certified reference materials – an overview. Accred. Qual. Assur. **20**, 47–52 (2015).
34. ISO Guide 35:2006 Reference materials – General and statistical principles for certification.
35. Kvalimetrie 16 Suchánek M.: Statistické metody v metrologii a analytické chemii, Ed. M. Suchánek, EURACHEM-ČR, Praha 2009. ISBN 80-86322-04-1
36. ČSN ISO 8258 Shewhartovy regulační diagramy. ÚMNZ Praha 1994.
37. ISO 7870-2:2013 Control charts – Part 2: Shewhart control charts. ISO Geneva.
38. Internal Quality Control – Handbook for Chemical laboratories (Trollboken – Troll book). Nordtest Technical report 569 – 4th English Edition, Oslo 2011. www.nordtest.info
39. Proposal for a Regulation of the European Parliament and of the Council on *in vitro* diagnostic medical devices. Council of the European Union – 2015.

Referenční materiály v chemické analýze

40. ČSN EN ISO 17511:2004 Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro – Měření veličin v biologických vzorcích – Metrologická návaznost hodnot přiřazených kalibrátorům a kontrolním materiálům. ÚNMZ 2004.
41. ČSN EN ISO 18153:2004 Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro – Měření veličin v biologických vzorcích – Metrologická návaznost hodnot katalytické koncentrace enzymů přiřazených kalibrátorům a kontrolním materiálům. ÚNMZ 2004.
42. ČSN EN ISO 15194:2009 Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro – Měření veličin ve vzorcích biologického původu – Požadavky na certifikované referenční materiály a na obsah podpůrné dokumentace. ÚNMZ 2009.
43. EN 14136:2003 Use of external quality assessment schemes in the assessment of the performance of in vitro diagnostic examination procedures.
44. ČSN EN ISO 15193 Diagnostické zdravotnické prostředky in vitro – Měření veličin ve vzorcích biologického původu – Požadavky na obsah a prezentaci referenčních postupů měření. ÚNMZ 2009.
45. ČSN EN ISO 15195 Laboratorní medicína – Požadavky na referenční měřicí laboratoře. ÚNMZ 2004.
46. EP30-A Characterization and qualification of commutable reference materials for laboratory medicine. Approved guideline. CLSI, May 2010.
47. Wielgosz R.: JCTLM Database, reference materials, methods, measurement services for IVD industry. Euromedlab, Paris 2015.
48. U.S. National Institute of Standards and Technology: Certificate of Analysis, Standard Reference Material® 1648. Urban Particulate Matter. Gaithersburg, 28 April 1998.
49. U.S. National Institute of Standards and Technology: Certificate of Analysis, Standard Reference Material® 1633b. Constituent Elements in Coal Fly Ash. Gaithersburg, 10 December 2004.

10 Příklady

10.1 Příklad 1

Test významnosti vychýlení s použitím kritéria 3.1

Analýzou CRM městského aerosolu (NIST SRM 1648 Urban Particulate Matter, [48]), jenž má certifikovaný hmotnostní podíl As $115 \mu\text{g g}^{-1} \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$ (rozšířená nejistota U_{CRM} , která je přibližně na hladině 95% spolehlivosti, tedy $k = 2$) byl zjištěn hmotnostní podíl As $111,8 \mu\text{g g}^{-1} \pm 3,0 \mu\text{g g}^{-1}$ (kombinovaná nejistota).

Řešení

Pro testování podle kritéria

$$|x_{meas} - x_{CRM}| \leq k \sqrt{u_{meas}^2 + u_{CRM}^2} \quad 3.1$$

nejprve převedeme certifikovanou rozšířenou nejistotu U_{CRM} na kombinovanou nejistotu u_{CRM} dělením koeficientem rozšíření $k = 2$, čímž dostaneme

$u_{CRM} = 10/2 = 5$. Dosazením do vztahu 3.1 za $x_{meas} = 111,8$; $x_{CRM} = 115$; $u_{meas} = 3,0$; $u_{CRM} = 5$ a $k = 2$ (volíme přibližně 95% hladinu významnosti) zjistíme, že je (neostrá) nerovnost

$$|111,8 - 115| \leq 2\sqrt{3,0^2 + 5^2}$$

$$3,2 \leq 11,7$$

splněna a že stanovený hmotnostní podíl As není vychýlen na uvedené hladině významnosti.

10.2 Příklad 2

Analýzou CRM uhelného popílku (NIST SRM 1633b Constituent Elements in Coal Fly Ash, [49]) jenž má certifikovaný hmotnostní podíl As $136,2 \mu\text{g g}^{-1} \pm 2,6 \mu\text{g g}^{-1}$ (poloviční šířka 95% predikčního intervalu* pro nějž $k = 1,96$) byla zjištěna hodnota $140,0 \mu\text{g g}^{-1} \pm 1,3 \mu\text{g g}^{-1}$ (kombinovaná nejistota).

Řešení

Po dosazení $x_{meas} = 140,0$; $x_{CRM} = 136,2$; $u_{meas} = 1,3$; $u_{CRM} = 2,6/1,96 = 1,33$ a $k = 2$ (volíme přibližně 95% hladinu významnosti) do vztahu 3.1 zjistíme, že nerovnost

$$|140,0 - 136,2| \leq 2\sqrt{1,3^2 + 1,33^2}$$

$$3,8 \leq 3,72$$

není splněna a že stanovená hodnota obsahu As je vychýlena na uvedené hladině významnosti.

* Interval pro budoucí pozorování, které do něj padne s 95% pravděpodobností.

Závěr k příkladům 10.1 a 10.2

Tyto dva příklady ukazují, jak závisí výsledek testu vychýlení na nejistotě stanovené a certifikované hodnoty. V obou případech činila relativní odchylka experimentální hodnoty od certifikované 2,8 % při prakticky stejné koncentrační hladině analytu. V prvním případě bylo vychýlení vlivem větší nejistoty měřené a zejména certifikované hodnoty nevýznamné, zatímco v druhém případě bylo vychýlení v důsledku nižší nejistoty měřené a certifikované hodnoty významné. Čím nižší jsou obě nejistoty, tím nižší je i mez detekce vychýlení. K odhalení i relativně malých vychýlení tedy potřebujeme vysokou preciznost stanovení a CRM s malou nejistotou certifikované hodnoty.

Oba příklady rovněž ukazují, že je potřeba pečlivě studovat způsob vyjádření nejistoty v certifikátu příslušného CRM, protože se v nich (zejména u starších CRM) používá více metod vyjadřování nejistoty, většinou s odkazem na ref. 19.

10.3 Příklad 3

Zajištění metrologické návaznosti hodnoty dalšího RM pro albumin v krevním séru s uvažovanou korelací veličin a bez této korelace

Zadání a úvodní rozvaha

Určete střední hodnotu a nejistotu při stanovení koncentrace albuminu ve vzorku (novém RM) v analyzátoru. Ve standardním operačním protokolu tohoto stanovení je uveden rozsah stanovitelných koncentrací asi 4 g l⁻¹ až 55 g l⁻¹. Analyzátor dávákuje 75 µl pracovního činidla, 300 µl vody a 3 µl vzorku (krevního séra). Inkubuje při 37 °C po dobu 72 sekund, měří absorbanci bichromaticky end-point při vlnové délce λ = 600 nm (pozadí při vlnové délce λ = 800 nm).

Kalibrace je jednobodová, počet replikátů $n = 4$, kalibrační závislost je přímka procházející počátkem. Typická koncentrace kalibrátoru (RM, na nějž je navazováno) je 38,1 g l⁻¹ a jeho absorbance 0,447 jednotek, tedy hodnota kalibračního faktoru je $f = 85,2$; vše pro optickou dráhu (tloušťku kyvety) $l = 6$ mm.

Z dokumentace k analyzátoru nelze zjistit údaje o nejistotě dávkovaných objemů (činidlo, voda, sérum) ani o nejistotě fotometrického měření. Pro zjednodušení tedy nejistotu způsobenou dávkováním zanedbáme a nejistotu fotometrie kvalifikovaně odhadneme. Další možností by bylo nejistotu fotometrie nebo dávkování určit experimentálně.

Používané činidlo je dodáno výrobcem v kapalném stavu, použije se přímo. Výrobce uvádí složení: sukcinátový pufr (pH = 4,2) 500 mmol l⁻¹, bromkresolová zeleň 1,0 mmol l⁻¹. Nejistota uvedených koncentrací není známa. Budeme uvažovat případ, že se kalibruje v každé sérii stanovení. Na základě tohoto předpokladu je případný vliv kolísání koncentrace účinných látek v činidle na výsledky prakticky nulový, tedy nejistoty koncentrací komponent v činidle zanedbáme.

Matematický model a vstupní data

Koncentraci albuminu c_{alb} ve vzorku séra počítáme podle vzorce

$$c_{alb} = \frac{c_{kalib}}{A_{kalib}} \times A_{alb} \quad 10.1$$

c_{alb}	je koncentrace albuminu ve vzorku, 40,5 g l ⁻¹
c_{kalib}	koncentrace albuminu v kalibrátoru, 38,1 g l ⁻¹ (z dokumentace)
A_{kalib}	absorbance kalibrátoru, 0,447 (průměr ze 4 měření analyzátoru)
A_{alb}	absorbance vzorku, 0,500 (jedno měření analyzátoru)

Rozptyl koncentrace kalibrátoru $s^2(c_{kalib})$ určíme odhadem, poněvadž výrobce neuvádí nejistotu koncentrace analytu v kalibrátoru. Odhadneme-li směrodatnou odchylku určení koncentrace kalibrátoru $s(c_{kalib}) = 1,91 \text{ g l}^{-1}$ (5 %), potom $s^2(c_{kalib}) = 1,91^2 \text{ g l}^{-1} = 3,65 \text{ g l}^{-1}$.

Rozptyl absorbance vzorku $s^2(A_{alb})$ odhadujeme pouze pomocí horní a dolní meze (rovnoměrné rozdělení) mezní chyby měřicího přístroje, v daném případě fotometru analyzátoru. Tuto mezní chybu odhadujeme na $\pm 0,0005$ jednotek absorbance. Potom rozpětí $R = 0,001$.

Podle vztahu pro výpočet odhadu směrodatné odchylky z rozpětí platí

$$s^2(A_{alb}) = \frac{1}{3} R^2 = \frac{1}{3} \times 0,001^2 = 3,33 \times 10^{-7} \quad 10.2$$

Směrodatná odchylka absorbance kalibrátoru je 0,009 a z důvodu malého počtu měření je nutno ji vynásobit koeficientem $k = 1,7$. Výsledek 0,0153 dosadíme za $s(\bar{x}_i)$ do vztahu 10.3 pro výpočet rozptylu průměru:

$$s^2(A_{kalib}) = \frac{1}{4} s^2(\bar{x}_i) = \frac{1}{4} \times 0,0153^2 = 5,85 \times 10^{-5} \quad 10.3$$

Výstupní data

Vypočtená koncentrace albuminu ve vzorku séra c_{alb} je podle vztahu 10.1

$$c_{alb} = \frac{38,1}{0,447} \times 0,500 = 42,6 \text{ g l}^{-1} \quad 10.4$$

Za předpokladu nekorelujících vstupních proměnných (absorbance vzorku, absorbance kalibrátoru, koncentrace kalibrátoru) se rozptyl $s^2(c_{alb})$ výstupní proměnné c_{alb} počítá

$$\begin{aligned} s^2(c_{alb}) &= \left(\frac{\partial c_{alb}}{\partial c_{kalib}} \right)^2 s^2(c_{kalib}) + \left(\frac{\partial c_{alb}}{\partial A_{kalib}} \right)^2 s^2(A_{kalib}) + \left(\frac{\partial c_{alb}}{\partial A_{alb}} \right)^2 s^2(A_{alb}) = \\ &= \left(\frac{A_{alb}}{A_{kalib}} \right)^2 s^2(c_{kalib}) + \left(-\frac{c_{kalib} A_{alb}}{A_{kalib}^2} \right)^2 s^2(A_{kalib}) + \left(\frac{c_{kalib}}{A_{kalib}} \right)^2 s^2(A_{alb}) = \\ &= \left(\frac{0,500}{0,447} \right)^2 \times 3,65 + \left(-\frac{38,1 \times 0,500}{0,200} \right)^2 \times 5,85 \times 10^{-5} + \left(\frac{38,1}{0,447} \right)^2 \times 3,33 \times 10^{-7} = \\ &= 4,57 + 0,531 + 0,00241 = 5,103 \end{aligned} \quad 10.5$$

Směrodatná odchylka stanovené koncentrace albuminu je pak

$$s(c_{alb}) = \sqrt{5,103} = 2,26 \text{ g l}^{-1} \quad 10.6$$

Z principu způsobu stanovení však plyne, že nutně koreluje absorbance kalibrátoru a koncentrace kalibrátoru – A_{kalib} je přibližně přímo úměrné c_{kalib} .

Uvažujeme tedy korelační koeficient mezi absorbancí kalibrátoru a koncentrací kalibrátoru $r(A_{kalib}, c_{kalib}) = 1$, korelační koeficient mezi absorbancí kalibrátoru a absorbancí vzorku roven nule a korelační koeficient mezi koncentrací kalibrátoru a absorbancí vzorku rovněž roven nule. Podle vztahu 10.7 vypočteme korekci na korelaci vstupních veličin a přičteme ji k $s^2(c_{alb})$. Tak dostaneme rozptyl korigovaný na korelaci $s^2_{kor}(c_{alb})$, vztah 10.8.

$$\begin{aligned} \frac{\partial c_{alb}}{\partial A_{kalib}} \times \frac{\partial c_{alb}}{\partial c_{kalib}} \times s(A_{kalib}) \times s(c_{kalib}) \times 1 = \\ = -95,25 \times 1,12 \times 0,00765 \times 1,91 = -1,56 \end{aligned} \quad 10.7$$

$$s^2_{kor}(c_{alb}) = 5,103 - 1,56 = 3,543 \quad 10.8$$

Referenční materiály v chemické analýze

Směrodatná odchylka korigovaná na korelaci $s_{kor}(c_{alb})$ je potom

$$s_{kor}(c_{alb}) = \sqrt{3,543} = 1,88 \quad 10.9$$

Z posledního součtu ve vztahu 10.5 vidíme, že k celkovému rozptylu nejvíce přispívá první člen (neurčitost koncentrace albuminu v kalibrátoru), druhý člen málo (neurčitost absorbance kalibrátoru) a třetí člen (neurčitost měření absorbance vzorku) je vůči dvěma předcházejícím zanedbatelně malý.

Závěr

Když neuvažujeme korelaci vstupních veličin, je rozšířená (celková) nejistota měření rovna dvojnásobku $s(c_{alb})$ ze vztahu 10.6, tedy hodnotě $4,5 \text{ g l}^{-1}$ albuminu. Příklad lze pak uzavřít výrokem

Koncentrace albuminu ve vzorku (novém RM) je $42,6 \text{ g l}^{-1} \pm 4,5 \text{ g l}^{-1}$.

Uvažujeme-li korelaci dvou vstupních veličin (absorbance kalibrátoru a koncentrace kalibrátoru) s korelačním koeficientem $r = +1$, což je v daném příkladu velmi blízké fyzikální realitě, pak je rozšířená (celková) nejistota měření rovna dvojnásobku $s_{korig}(c_{alb})$ ze vztahu 10.9, tedy hodnotě $3,8 \text{ g l}^{-1}$. Pak lze příklad uzavřít výrokem

Koncentrace albuminu ve vzorku (novém RM) je $42,6 \text{ g l}^{-1} \pm 3,8 \text{ g l}^{-1}$.

V našem příkladu způsobí uvažování korelace uvedených vstupních veličin výrazné snížení nejistoty měření proti tomu, kdybychom tuto korelaci neuvažovali.

Tabulka 2. Vstupní a výstupní veličiny – souhrn

Veličina [jednotka]		Střední hodnota	Směrodatná odchylka	Poznámka
c_{kalib}	$[\text{g l}^{-1}]$	38,1	1,91	
A_{kalib}	[j]	0,447	0,0076	
A_{alb}	[j]	0,500	0,00058	
c_{alb}	$[\text{g l}^{-1}]$	40,5	2,26	bez korekce na korelaci c_{kalib} a A_{kalib}
			1,88	s korekcí na korelaci c_{kalib} a A_{kalib}

KVALIMETRIE

**Nastavení a používání cílové nejistoty
v chemických měřeních**

Pokyn Eurachem/CITAC

Eurachem



**ZAOSTŘENO
NA ANALYTICKOU CHEMII
V EVROPĚ**

Nastavení a používání cílové nejistoty v chemických měřeních

První vydání

Poděkování

Tento dokument byl vytvořen členy pracovní skupiny Eurachem/CITAC Nejistota měření a návaznost v níže uvedeném složení. Autoři jsou vděční dalším osobám a organizacím za připomínky, rady a pomoc.

Příprava pokynu byla zčásti podpořena Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugalsko.

Editoři

Ricardo Bettencourt da Silva
Alex Williams

Centro de Química Estrutural da Universidade de Lisboa, PT
předseda pracovní skupiny, UK

Složení pracovní skupiny

Alex Williams, předseda, editor	United Kingdom
Stephen L. R. Ellison, sekretář	LGC, Teddington, United Kingdom
Ricardo Bettencourt da Silva, editor	CQE-FCUL, Universidade de Lisboa, Portugal
Andrzej Brzyski	Eurachem Poland
Ivo Leito	University of Tartu, Estonia
Ovsiy Levbarg	Ukrmetrteststandart, Ukraine
Bertil Magnusson	SP Technical Research Institute of Sweden
Olivier Pellegrino	Instituto Português da Qualidade, Portugal
Máire Walsh	Eurachem Ireland
Wolfhard Wegscheider	Montanuniversität, Leoben, Austria

Zástupci CITAC

Alan Squirrell	ILAC
Ilya Kuselman	National Physical Laboratory of Israel

Zástupce Eurolab

Manfred Golze	BAM
---------------	-----

Doporučená forma citování

Tato publikace by měla být citována* následovně: “R. Bettencourt da Silva, A. Williams (Eds), Eurachem/CITAC Guide: Setting and Using Target Uncertainty in Chemical Measurement, (1st ed. 2015). Available from www.eurachem.org.”

* Změna podle požadavků časopisu je možná.

Předmluva

Pracovní skupina Eurachem/CITAC Nejistota měření a návaznost připravila tento dokument se záměrem doplnit sérii pokynů cílících na podporu produkce výsledků měření, které jsou návazné na adekvátní referenci a uváděné se spolehlivou a přiměřeně nízkou nejistotou pro zamýšlené použití měření. Tyto znaky jsou nezbytné pro adekvátní interpretaci výsledku měření a jsou též diskutovány v pokynu Eurachem/CITAC.

Dokument uvádí, jak kontrolovat, zda je kvalita měření, kvantifikovaná nejistotou měření, vhodná pro zamýšlené použití tím, že se nastaví maximální přípustná nejistota definovaná ve třetím vydání Mezinárodního metrologického slovníku jako „cílová nejistota“.

Tento pokyn lze použít v analytických oborech, kde není cílová nejistota nastavena regulačním orgánem, zákazníkem nebo minimálním rozdílem studovaného parametru ve stejných nebo jiných položkách, které musí být detekovány při výzkumné a vývojové činnosti. Pokyn pojednává o nastavení cílové nejistoty pro vývoj procesu a pro aplikovaný a základní výzkum za použití informace o nejmenším rozdílu nebo trendu systému, který musí být spolehlivě odlišitelný.

Pokyn může být užitečný také pro úřady a partnery, kteří vnímají potřebu nastavit nebo aktualizovat kritéria kvality měření. Při nastavení cílových hodnot pro tzv. běžné výkonnostní charakteristiky (preciznost, pravdivost, atd.) může chybět kontrola nad důležitými složkami nejistoty zahrnutými v důkladném vyhodnocení nejistoty.

Pracovní skupina Eurachem/CITAC je přesvědčena, že tento dokument vyplní mezeru v současném seznamu návodů pro měření v chemii a může přispět k zajištění, že měření hrají svou roli v managementu socioekonomických zájmů a v technologickém a vědeckém vývoji společnosti.

1 Úvod

Všechna měření jsou prováděna s cílem sahajícím od posouzení shody produktu s jeho specifikací k charakterizaci nového materiálu. Adekvátní splnění tohoto cíle závisí na vhodnosti nejistoty měření [1–4] pro zamýšlené použití. Například posouzení shody slitiny zlata s požadavkem na obsah zlata musí být vzhledem k jeho ceně provedeno s nízkou nejistotou. Měření glukózy v krvi by mělo být ovlivněno natolik nízkou nejistotou, aby umožňovalo spolehlivě určit odchylky v hodnotách glukózy od skupiny zdravých jedinců. Charakterizace meteoritu musí být provedena s dostatečně nízkou nejistotou, která umožní odlišit složení od ostatních minerálů. Proto je nezbytné při nastavování požadavků měření, kromě specifikace výkonnostních charakteristik jako jsou výtěžnost, opakovatelnost a vychýlení, nastavit cílovou hodnotu nejistoty [5].

Podle posledního vydání Mezinárodního metrologického slovníku [1] určuje „horní mez“ nejistoty „stanovená na základě zamýšleného použití výsledků měření“ „cílovou nejistotu“.

Rozhodnutí o vhodnosti postupu měření pro zamýšlené použití závisí nejen na nejistotě měření, ale také na dalších informacích jako jsou analytický rozsah, nekorigovaná výtěžnost v některých oborech nebo cena a doba analýzy.

V mnoha analytických oborech definují cílovou nejistotu požadovanou pro posouzení vhodnosti specifikace anebo legislativa [6, 7]. Nicméně v mnoha jiných oborech se provádějí důležitá měření bez stanovení tohoto parametru. Skutečnost, že je nejistota uváděna spolu s výsledkem měření, nezaručuje vhodnost pro zamýšlené použití.

2 Oblast použití

Tento dokument poskytuje návod analytikům, regulačním orgánům a dalším konečným uživatelům analytických informací o nastavení cílové nejistoty měření.

Kapitola 4 se zabývá dostupnými informacemi napomáhajícími k nastavení cílové nejistoty.

Kapitola 5 pokrývá využití těchto informací k nastavení cílové hodnoty.

Kapitola 6 se zabývá nastavením cílové nejistoty pro řadu hodnot veličin v případě, že je původně definována pouze pro některé hodnoty veličiny.

Odhadnutá nejistota se může měnit z důvodu proměnlivosti složek odhadované nejistoty. Kapitola 7 se věnuje tomu, jak dokáže nejistota

spojená s odhadem nejistoty ovlivnit rozhodnutí, zda je měření vhodné pro daný účel. Kapitola 8 se zabývá snižováním nejistoty v případě, že se odhadnutá nejistota ukáže být větší než cílová hodnota, a 9. kapitola popisuje využití cílové nejistoty k usměrnění validace měřicího postupu pomocí návrhu hodnot specifických výkonnostních charakteristik.

Kapitola 10 pak přináší příklady nastavení cílové nejistoty s využitím různých druhů informací a algoritmů, které byly představeny v předchozích kapitolách.

Následující 3. kapitola Terminologie diskutuje důležité aspekty terminologie, které používá tento pokyn.

3 Terminologie

Tento dokument používá terminologii uvedenou v posledním vydání Mezinárodního metrologického slovníku (VIM) [1].

VIM definuje (viz položku 2.34 [1]) cílovou nejistotu měření jako „nejistotu měření specifikovanou jako horní mez a stanovenou na základě zamýšleného použití výsledků měření“.

Měření jsou často prováděna k prověření, zda je měřená veličina (viz položku 2.3 [1]) nad nebo pod maximální nebo minimální přípustnou hodnotu veličiny. Pojem „mez specifikace“ nebo

pouze „mez“ bude používán pro každý z těchto případů.

V tomto pokynu je upřednostňován obecný pojem „veličina“ před konkrétními příklady, jakými jsou koncentrace, hmotnostní zlomek, úbytkový poměr, pH atd.

Výklad a používání pojmů VIM v chemických měřeních je diskutován v Pokynu Eurachem [2].

4 Výběr vstupů pro stanovení cílové nejistoty měření

Když je pro měřenou veličinu definována maximální anebo minimální mez, typicky v legislativě nebo v technické specifikaci, musí se tento dokument zkoumat s ohledem na doporučení týkající se přijatelné velikosti nejistoty (odstavec 5.1.1). Tato informace může být také dostupná ve směrnících a zprávách o posuzování shody s legislativou nebo technickou specifikací. Původ těchto referencí a odkazů na výše uvedené dokumenty musí být ověřen.

Na cílovou nejistotu lze usuzovat ze specifikačních intervalů definovaných minimální a maximální mezí (odstavec 5.1.2), nebo z hodnoty veličiny nad nebo pod jedinou mezí, za níž by měla být malá pravděpodobnost nesprávného rozhodnutí o shodě (odstavec 5.1.4).

V některých oborech jsou uvedeny cílové hodnoty charakteristik měřicího postupu, jako jsou mez detekce, preciznost, průměrná výtěžnost analytu. V těchto případech, pokud tyto výkonnostní charakteristiky odrážejí nejdůležitější náhodné a systematické vlivy ovlivňující měření, je lze převést na cílovou nejistotu (odstavec 5.1.3). Tato cílová nejistota je dodatečným požadavkem k definovaným výkonnostním charakteristikám, a má výhodu ve shrnutí požadavků pro všechny zdroje nejistoty do jednoho parametru, včetně

některých, které obvykle zůstávají nekontrolovány, protože se neprojevují v běžných výkonnostních charakteristikách.

Pokud nejsou pro relevantní výkonnostní charakteristiky cílové hodnoty definovány, lze cílovou nejistotu určit z posuzování výkonnosti měření z výsledků zkoušení způsobilosti (odstavec 5.2.1) za předpokladu, že je výsledek odhadován pro zamýšlené použití měření. Výsledky mezilaboratorních studií nebo jiných mezilaboratorních porovnání lze použít pro definování cílové nejistoty (odstavec 5.2.2), pokud usuzovaná shoda mezi výsledky odpovídá záměru analýzy. V některých případech může být užitečné stanovit cílovou nejistotu ze studie ekonomických přínosů kontroly produktů nebo procesů pomocí dražšího postupu měření vykazujícího menší nejistotu (odstavec 5.3).

Je-li třeba studovat trend ve složení systému nebo musí být rozeznávány změny v analyzovaných položkách, nejmenší změna hodnoty veličiny, které má být rozeznána, může být použita k definování cílové nejistoty (odstavec 5.4).

V některých případech lze cílovou nejistotu odvodit z té, která je definována pro technicky podobné nebo blízké problémy (odstavec 5.5).

5 Použití existujících informací pro nastavení cílové nejistoty

Tato část podrobně popisuje použití různých typů odkazů nebo údajů uvedených v kapitole 4, s jejichž pomocí nastavujeme cílovou nejistotu měření. Pořadí, ve kterém jsou typy údajů představovány, postupuje od ideálních zdrojů cílové nejistoty k méně konsenzuálním.

5.1 Legislativa nebo specifikace produktu

V ideálním případě je cílová nejistota explicitně uvedena v odkazovaném dokumentu (odstavec 5.1.1). Další možností je, že její hodnota vyplývá z cílových hodnot nebo jiných výkonnostních charakteristik (odstavec 5.1.3) nebo ze specifikačních mezí (odstavce 5.1.2 a 5.1.4).

5.1.1 Definovaná cílová nejistota

Ideální případ nastává tehdy, když legislativa nebo specifikace definuje cílovou nejistotu. Bohužel takové případy jsou v současnosti vzácné. Aktuální případy zahrnují:

- Nařízení komise (ES) 333/2007 [6], které definuje cílovou standardní nejistotu (určenou jako „maximální standardní nejistotu měření“) pro stanovení Pb, Cd, Hg, anorganického cínu, 3-MCPD a benzo-[a]pyrenu v potravinách. Definovaná cílová nejistota je funkcí meze detekce a maximální mez specifikace, $Q^{\max}$, (v Nařízení uvedená jako „předmětná koncentrace“).
- Směrnice 2008/50/ES o kvalitě vnějšího ovzduší a čistším ovzduší pro Evropu [7] určuje cílovou relativní rozšířenou nejistotu pro měření relevantních parametrů. Cílová nejistota je jiná pro „stacionární“ a „orientační“ měření. Stacionární měření jsou prováděna v zónách, kde je vysoké riziko, že polutanty překročí meze. Orientační měření provádíme, abychom mohli vyhodnocovat geografickou distribuci škodlivin.

Cílová nejistota se obvykle stanovuje pro výsledky měření blízké mezi specifikace.

5.1.2 Definovaný interval shody

V některých analytických oborech je definována mez specifikace bez uvedení souvislosti s kvalitou měření, která se provádí pro ověření shody s mezí.

Pokud je definována minimální nebo maximální mez specifikace, musí se posoudit alespoň kvalita měření blízko této meze.

Pokud je definován interval shody pro veličinu (tj. minimální nebo maximální mez), musí se posoudit kvalita měření v tomto intervalu a v jeho blízkosti.

Cílová nejistota pro ověření shody s jednou mezí specifikace (minimum nebo maximum) se musí definovat tak, že bereme v úvahu kritéria stanovená dále v textu.

Pokud je interval shody definován pro měřenou veličinu, např. obsah aktivní látky v léku nebo pesticidu v přípravku na ochranu obilí, může analytik vyvozovat, že nejistota musí být dostatečně malá, aby odlišila množství v tomto intervalu. Pokud je interval shody definován maximálním $Q^{\max}$ a minimálním $Q^{\min}$ množstvím, cílová nejistota U^{tg} , by měla typicky být osmkrát menší než velikost intervalu

$$U^{tg} = \frac{Q^{\max} - Q^{\min}}{8} \quad (1)$$

Faktor 8 je zvolen, protože teoreticky umožňuje umístění čtyř nepřekrývajících výsledků měření s rozšířenou nejistotou, bereme-li v úvahu minimální rozlišovací schopnost uvnitř intervalu. Hodnota faktoru větší nebo menší než 8 vede k růstu odhadu nejistoty, který je pak příliš přísný nebo příliš mírný pro typicky zamýšlený interval shody.

Nastavení a používání cílové nejistoty

5.1.3 Definované výkonnostní charakteristiky měření

V některých legislativních nebo technických pokynech jsou definovány cílové hodnoty výkonnostních charakteristik měření, vztahující se k odstatným složkám nejistoty. Takovými příklady jsou maximální mez detekce anebo stanovitelnosti, maximální difference výsledků duplikátních měření nebo maximální variační koeficient výsledků z opakovaných měření za různých podmínek měření preciznosti či přijatelné výtěžnosti.

PŘÍKLAD 1. AOAC publikuje ve svých požadavcích (SMPR – Standard Method Performance Requirements) cílové charakteristiky výkonnosti metody pro rozsáhlý seznam analytů, které jsou vhodné pro odhad cílové nejistoty. Současné požadavky již nyní zahrnují i cílovou nejistotu [8].

Občas se uvádějí výkonnostní charakteristiky s terminologií odlišnou od VIM [1] (příklad 2). Proto analytik musí před posuzováním výkonnosti měření zkontrolovat, jak jsou pojmy definovány v odkazovaném dokumentu. Pokud tyto dokumenty nejsou v detailech, jako jsou podmínky pro preciznost, jednoznačné, je třeba nahlédnout do dalších dokumentů nebo zpráv souvisejících s použitým odkazem.

PŘÍKLAD 2. Směrnice 98/83/EK [9] o kvalitě pitné vody definuje maximální hodnoty pravdivosti, ta ale není shodná s definicí ve VIM [1].

Jsou-li definovány cílové hodnoty výkonnostních charakteristik měření tak, že odrážejí náhodné anebo systematické vlivy, lze toho využít k odhadu cílové nejistoty. Cílová nejistota je dalším požadavkem k těm, které jsou stanoveny jako povinné v předpisu nebo specifikaci. Cílová nejistota také umožní posouzení, zda jsou složky nejistoty, které jsou v předpisu či specifikaci uvažovány jako zanedbatelné, skutečně zanedbatelné.

Tabulka 1 uvádí některé výkonnostní charakteristiky, pro které jsou občas udávány cílové hodnoty a které mohou být použity k definování cílových hodnot nejistoty přidružených buď náhodným, nebo systematickým vlivům.

Cílová mez detekce (LOD^{tg}) je definována jako cílová hodnota směrodatné odchylky výsledků s^{tg} , získané za specifikovaných podmínek preciznosti mezi „nulovou hodnotou“ a mezí stanovitelnosti (LOQ), kde se preciznost předpokládá přibližně konstantní. Cílová hodnota směrodatné odchylky se bude rovnat $\underline{s^{tg}} = LOD^{tg}/3$ nebo $s^{tg} = LOD^{tg}/3,3$ v závislosti na konvenci použité pro výpočet LOD. LOD lze odhadnout jako $3\times$ nebo $3,3\times$ směrodatná odchylka výsledků měření získaných za podmínek opakovatelnosti nebo mezilehlé preciznosti (zkráceně směrodatné odchylky opakovatelnosti nebo mezilehlé preciznosti). Cílovou preciznost měření prováděných v blízkosti LOD lze použít nejméně do LOQ, protože obě meze leží v úzkém intervalu hodnot veličiny.

Hodnota s^{tg} definovaná z cílových údajů LOQ, LOQ^{tg} ($s^{tg} = LOQ^{tg}/10$) je obvykle použitelná mezi LOD a 5LOQ.

Pokud jsou LOD anebo LOQ určeny za podmínek mezilehlé preciznosti, je výsledná směrodatná odchylka (tj. s^{tg}) dostačující ke kvantifikaci náhodných jevů ovlivňujících měření. Směrodatná odchylka opakovatelnosti podhodnocuje náhodné jevy pozorované v různých sériích.

Dokument SANCO [14] navrhuje pro případ, kdy není dostupná směrodatná odchylka reprodukovatelnosti, použít $3/2$ násobek směrodatné odchylky opakovatelnosti. Odstavec 5.2.2 popisuje použití cílových hodnot směrodatné odchylky reprodukovatelnosti k odhadu cílové nejistoty.

Pokud se měření provádějí nad LOQ, lze použít k odhadu cílové směrodatné odchylky mezilehlé preciznosti s^{tg} cílový variační koeficient nebo cílové rozpětí z opakovaných měření (tabulka 1). Cílová standardní nejistota příslušných náhodných vlivů, u_{ra}^{tg} , je pak odhadnuta jako s^{tg} (tj. $u_{ra}^{tg} = s^{tg}$).

Tabulka 1. Výkonnostní charakteristiky měření, pro něž lze použít uváděné cílové hodnoty k odhadu cílové nejistoty

Výkonnostní charakteristika měření	Popis
Mez detekce (LOD)	Mez detekce (LOD) může být odhadnuta za podmínek opakovatelnosti nebo mezilehlé preciznosti. Pro instrumentální analytické metody, které vyžadují denní kalibraci přístroje, je LOD odhadnutá za podmínek opakovatelnosti použitelná v daný den. Mez detekce odhadnutá z preciznosti měření z různých kalibrací může být použita v delším časovém období. Na této úrovni veličiny je relativní směrodatná odchylka měření 33 % nebo 30 %, za předpokladu, že je LOD vypočtena vynásobením směrodatné odchylky měření číslem 3 nebo 3,3 [10]. Vzhledem k tomu, že preciznost je konstantní v úzkém rozmezí veličiny, lze směrodatnou odchylku měření na úrovni LOD použít k odhadu preciznosti mezi „nulovou hodnotou“ a mezi stanovitelností (LOQ) (přibližně 3 nebo 3,3 % větší než LOD). Pouze zřídka je nejistota ze systematických vlivů důležitá pro měření v blízkosti LOD (tj. mezi „nulou“ a dvojnásobkem LOD: $[0, 2LOD]$). Směrodatná odchylka použitá při výpočtu LOD je rovna $LOD/3$ nebo $LOD/3,3$ v závislosti na konvenci použité pro odhad LOD. Pokud je definována cílová mez detekce LOD^{tg}, je cílová směrodatná odchylka pro preciznost, s^{tg}, za specifikovaných podmínek preciznosti LOD rovna: $s^{tg} = \frac{LOD^{tg}}{3} \quad \text{nebo} \quad s^{tg} = \frac{LOD^{tg}}{3,3} \quad (2)$ v závislosti na tom, jak je LOD vypočtena.
Mez stanovitelnosti (LOQ)	Výpočet meze stanovitelnosti (LOQ) je obdobný tomu, který provádíme pro odhad LOD, jen faktor kterým násobíme směrodatnou odchylku je 10 místo 3 nebo 3,3. Na této koncentrační úrovni mohou být systematické vlivy významné. Směrodatná odchylka získaná za stejných podmínek preciznosti, jaké byly použity při odhadu LOQ, je rovna $LOQ/10$. Obvykle lze takto odhadnutou směrodatnou odchylku použít mezi LOD a dvou až pětinašobkem LOQ. Obdobně jako u rovnice (2) je cílová mez stanovitelnosti LOQ^{tg} definována $s^{tg} = \frac{LOQ^{tg}}{10} \quad (3)$ kde s^{tg} je cílová preciznost za podmínek specifikovaných při definování LOQ^{tg}.
Rozpětí opakovaných měření	Pokud je definováno cílové rozpětí pro výsledky z duplikátních měření, je třeba ověřit konfidenční hladinu a podmínky preciznosti. Není-li konfidenční hladina uvedena, lze předpokládat hodnotu 95 %. Vzhledem k tomu, že meze opakovatelnosti nebo mezilehlé preciznosti odhadnuté pro konfidenční hladinu 95 % jsou 2,8krát větší než směrodatná odchylka za stejných podmínek preciznosti, lze cílové rozpětí převést na cílovou směrodatnou odchylku dělením 2,8. Pokud je definována cílová hodnota rozpětí výsledků získaných z více měření než duplikátních, měly by být k výpočtu preciznosti z definovaného cílového rozpětí použity násobící faktory použité při odhadu kritického rozpětí z odhadů preciznosti [11].

Nastavení a používání cílové nejistoty

Výkonnostní charakteristika měření	Popis
Variační koeficient	Pokud je variační koeficient definován bez specifikování podmínek preciznosti (typicky opakovatelnost nebo mezilehlá preciznost), lze předpokládat, že byla použita více vypovídající mezilehlá preciznost. Řada odkazů na výkonnostní charakteristiky měření nepoužívá názvosloví posledního, dokonce ani předchozích vydání VIM, což vyžaduje pečlivou kontrolu významu termínů. V minulosti byl v posledním vydání VIM termín reprodukovatelnost použit pro pojem označující mezilehlou preciznost. Podle posledního vydání VIM [1], odkazuje reprodukovatelnost na shodu výsledků stejné měřené veličiny získaných z různých laboratoří za použití stejného nebo odlišných postupů měření. Některé dokumenty definují požadavky preciznosti jako cílovou hodnotu dvojnásobku směrodatné odchylky výsledků odhadnutých za definovaných podmínek [9]. Směrodatná odchylka opakovatelnosti odráží pouze náhodné vlivy za specifických podmínek týkajících se okolí nebo provozu (tj. kombinace analytik a přístroj), a mezilehlá preciznost nebude odrážet systematické vlivy, které jsou relevantní pro některá měření jako tzv. vychýlení laboratoře nebo metody [12].
Maximální přípustná chyba	Některé literární odkazy definují maximální přípustné vychýlení, které ovlivňuje měření. Častěji bývají definovány maximální a minimální přípustné relativní chyby. Relativní chyby se obvykle uvádějí jako výtěžnosti (tj. poměr mezi odhadnutou a očekávanou hodnotou veličiny). V některých analytických oblastech jsou pro různé situace definovány přípustné průměrné výtěžnosti nebo výtěžnosti pro jedno měření [13]. Přípustné výtěžnosti pro jednu zkoušku jsou definovány za účelem kontroly kvality měření pro sérii vzorků kontrolovanou analýzou jednoho testu výtěžnosti. Přípustná průměrná výtěžnost se používá v průběhu validace postupu měření, aby se zjistilo, zda je vychýlení přijatelné. Rozpětí přípustných chyb jsou širší pro test výtěžnosti jednoho vzorku než pro průměrný test výtěžnosti. Vzhledem k tomu, že průměrná chyba je odhadem vychýlení měření, lze ji použít k přibližnému určení složky nejistoty (nejistota vychýlení). Pokud jsou definovány maximální ($\bar{E}_{\max}$) a minimální ($\bar{E}_{\min}$) průměrná chyba, nad a pod nulou nebo průměrnou hodnotou, můžeme vypočítat standardní nejistotu nekorigovaného vychýlení zmenšením konfidenční hladiny polovičního rozpětí chyby $(\bar{E}_{\max} - \bar{E}_{\min})/2$ dělením adekvátním koeficientem v závislosti na zvoleném rozdělení rozpětí. Bereme-li v úvahu trojúhelníkové nebo rovnoměrné rozdělení se 100% konfidenční hladinou, použije se koeficient $\sqrt{3}$ nebo $\sqrt{6}$. Trojúhelníkové rozdělení upřednostňujeme, když očekáváme střední chybu s větší pravděpodobností uprostřed intervalu $[\bar{E}_{\min}; \bar{E}_{\max}]$. Rovnice (4) poskytuje odhad cílové standardní nejistoty vychýlení u_{sy}^{tg} pro měření nekorigované na střední chybu: $u_{sy}^{tg} = \frac{\bar{E}_{\max} - \bar{E}_{\min}}{2\sqrt{6}} \quad (4)$

Přípustná průměrná chyba $|\bar{E}|^{tg}$, definovaná jako maximální rozpětí mezi průměrem z opakovaných měření hodnoty veličiny a referenční hodnoty získané z analýzy referenčních materiálů v průběhu validace, může být použita k odhadu cílové standardní nejistoty přidružené k nekorigovanému vychýlení, u_{sy}^{tg} , jako $u_{sy}^{tg} = |\bar{E}|^{tg} / l$, kde l závisí na předpokládaném rozdělení. Tento vztah lze použít, pokud je

vychýlení odhadnuto z velkého počtu měření referenčních materiálů (tabulka 1).

Cílovou kombinovanou nejistotu u_c^{tg} , odrážející kombinaci odhadu preciznosti a nejistotu vychýlení, lze vypočítat s využitím zákona propagace nejistot následovně:

$$u_c^{tg} = \sqrt{(u_{ra}^{tg})^2 + (u_{sy}^{tg})^2} \quad (5)$$

kde u_{ra}^{tg} lze odhadnout z cílových hodnot LOD, LOQ, variačního koeficientu nebo rozpětí z opakovaných měření. Hodnotu u_{sy}^{tg} můžeme odhadnout z přípustné průměrné chyby nebo obdobného parametru.

Porovnáním cílové nejistoty s nejistotou výsledku měření je diskutováno v 7. kapitole.

5.1.4 Definované rozhodovací riziko

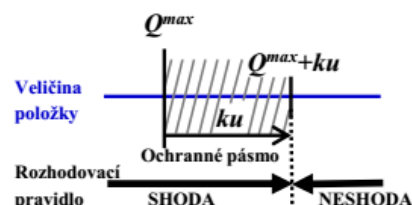
Jak bylo uvedeno v úvodu, důležitým důvodem pro stanovení cílové nejistoty je použití nejistoty při posuzování shody, což je detailně popsáno v odkazu [15]. Klíčem k posouzení shody je pojem „rozhodovací pravidla“. Tato pravidla poskytují doporučení pro přijetí nebo zamítnutí výrobku na základě hodnoty měřené veličiny, její nejistoty a meze či meze specifikace, přičemž bereme v úvahu přijatelnou hladinu pravděpodobnosti špatného rozhodnutí. Na základě rozhodovacích pravidel, jsou stanoveny „oblast přijetí“ a „oblast odmítnutí“ tak, že pokud měřená hodnota veličiny leží v oblasti přijetí, je výrobek prohlášen za shodný, pokud leží v oblasti odmítnutí, je výrobek prohlášen za neshodný. Efekt použití rozhodovacího pravidla je v podstatě zvýšení nebo snížení meze Q pomocí ku , což nazýváme ochranné pásmo. Hodnotu k a to, zda je ochranné pásmo přičteno nebo odečteno ke Q závisí na volbě rozhodovacího pravidla. Cílová hodnota standardní nejistoty u se pak volí podle přijatelné hodnoty velikosti ochranného pásma.

Například pokud testujeme shodu s maximální mezí Q^{max} , kde rozhodovací pravidlo vyžaduje vysokou pravděpodobnost, že mez je překročena před vyhlášením neshody, přičítá se ochranné pásmo ke Q^{max} . To znamená, že výsledek měření velký jako $(Q^{max} + ku)$ povede k prohlášení shody [15] a cílovou hodnotu u musíme volit tak, aby byla přijatelná (obrázek 1).

Je-li definována hodnota veličiny q^{max} v analyzované položce větší než Q^{max} , nad níž by položka měla být správně prohlášena za neshodnou s pravděpodobností větší než P_1 , můžeme toho využít k definování cílové nejistoty.

Dále je diskutován zvláštní scénář kontroly rizika přijetí položky, kdy činíme rozhodování o shodě na základě měřené hodnoty laboratorního vzorku, ale bez přihlídnutí k tomu, jak reprezentativní je měřená hodnota ve vztahu ke vzorkovanému cíli. U většiny nařízení je rozhodnutí o shodě činěno

na základě výsledků měření laboratorního vzorku odebraného podle regulovaného postupu, a proto nebývá nejistota vzorkování nebo reprezentativnost vzorku zpochybňována. Jestliže měření cílí na odvozování informace o složení velkého vzorku, musí cílová nejistota zahrnovat i nejistotu vzorkování a následných úprav.



Obrázek 1. Rozhodovací kritérium pro shodu veličiny položky s maximální hodnotou Q^{max} , kde „ochranné pásmo“ zabezpečuje rozhodnutí, že měřená hodnota veličiny má malou pravděpodobnost nesprávného výroku o neshodě

Například pokud lze použít následující podmínky (C1 až C4) pro rozhodování o shodě výrobku

- C1) Rozdělení měření: hodnoty přiřaditelné k měřené veličině Q , odvozené z měřené hodnoty veličiny q , mají normální rozdělení.
- C2) Je definována maximální mez Q^{max} .
- C3) Rozhodovací pravidlo: výrobek považujeme za neshodný, pokud je alespoň vysoká pravděpodobnost P_1 , že hodnota Q překročí Q^{max} , tedy pokud měřená hodnota veličiny q minus příslušný násobek její standardní nejistoty ku je nad Q^{max} (tj. $(q - ku) > Q^{max}$). Násobící koeficient k standardní nejistoty u bude typicky jednostranné Studentovo t , t_1 , pro konfidenční hladinu P_1 a stupně volnosti pro u [15]. Hodnota ku je ochranné pásmo pro posouzení shody a musí být stanovena maximální hodnota u , abychom udrželi velikost ochranného pásma na přijatelné úrovni.
- C4) Rozhodovací riziko: jeden ze způsobů, jak nastavit maximální hodnotu u implicitně, je nastavit mez maxima měřené hodnoty veličiny q^{max} , jež je přijatelná pro prohlášení vzorku za shodný, např. $Q^{max}(1 + x)$. Při nastavování hodnoty x je třeba mít na mysli, že pro měřenou hodnotu veličiny $Q^{max}(1 + x)$ je 50% pravděpodobnost, že ji hodnota Q překročí,

a pravděpodobnost $(1 - P_1)$, že překročí $Q^{\max}(1 + 2x)$.

V tomto případě je u^{tg} odhadnuta pomocí následujícího vztahu

$$u^{\text{tg}} = \frac{q^{\max} - Q^{\max}}{t_1} \quad (6)$$

Pokud je definovanou podmínkou minimální mez $Q^{\min}$, rozhodovací pravidlo odpovídá C3 pro hodnoty menší než $Q^{\min}$ (tj. $(q + ku) < Q^{\min}$), a maximální hodnota u je implicitně nastavena stejným způsobem, tedy u^{tg} je odhadnuta rovnici (7):

$$u^{\text{tg}} = \frac{Q^{\min} - q^{\min}}{t_1} \quad (7)$$

kde $q^{\min}$ je minimální měřená hodnota veličiny, jež je přijatelná pro prohlášení vzorku za shodný.

5.2 Hodnotící kritérium způsobilosti nebo shody

Pokud odkazované dokumenty mezi specifikace měřené veličiny nedefinují požadavky na kvalitu měření, lze tuto informaci dovodit z toho, jak jsou měření hodnocena při zkoušení způsobilosti (5.2.1), nebo z rozptýlení výsledků z různých laboratoří, pokud postačuje posuzovat shodu takových výsledků (5.2.2).

5.2.1 Zkouška způsobilosti

Ve většině analytických oblastí je úspěšnost ve zkoušení způsobilosti hodnocena výpočtem z-skóre z , určeného z poměru mezi chybou měření a vztaznou směrodatnou odchylkou:

$$z = \frac{x_i - X_{\text{Ref}}}{\sigma} \quad (8)$$

kde x_i je hodnota uvedená laboratoří, X_{Ref} je referenční hodnota a σ je směrodatná odchylka definovaná pro toto posouzení. Když je σ stanovena poskytovatelem zkoušení způsobilosti k vyhodnocení, zda je studovaná metoda vhodná pro zamýšlené použití, lze ji použít k definování cílové standardní nejistoty ($u_c^{\text{tg}} = \sigma$). U analýz pitné vody na hlavní složky se obvykle používá σ mezi 7,5–10 % X_{Ref} [16, 17]. Pro evropský monitoring reziduí pesticidů v potravinách je σ rovna 25 % referenční hodnoty X_{Ref} [13].

5.2.2 Reprodukovatelnost měření

Vždy, když je dostupná reprodukovatelnost měření s^R , nebo mez reprodukovatelnosti R (kde $R = 2,83s^R$) [11] u standardního postupu nebo ve zprávě z mezilaboratorního porovnání konkrétní metody, jež byla přijata jako vhodná pro zamýšlené použití, pak lze s^R použít pro nastavení cílové standardní nejistoty specifické hodnoty veličiny. Tyto experimentální údaje lze převést na hodnotu cílové výkonnosti, pokud je odhadnutá s^R považována jako vhodná pro posouzení shody výsledků z různých laboratoří (např. pomocí výpočtu meze reprodukovatelnosti). Je-li s^R získána z mezilaboratorní studie, kde je shoda mezi hodnotami měřené veličiny přijatelná, lze s^R použít přímo k nastavení u_c^{tg} ($u_c^{\text{tg}} = s^R$). Pokud je však s^R odhadnuta z výsledků z laboratoří, u nichž je pozorován vážný nedostatek ve shodě výsledků, informace z mezilaboratorního experimentu nebude vhodná k určení u_c^{tg} .

Je třeba prozkoumat podmínky, za kterých byla studie reprodukovatelnosti provedena, abychom zjistili, zda je třeba pro odhad uvažovat další zdroje nejistoty. V některých případech se reprodukovatelnost odhaduje pro poslední fáze měřicího procesu a je třeba provést posouzení nejistoty relevantních preanalytických anebo počátečních analytických operací a vychýlení metody.

Pro racionální měření*, kde může být vychýlení přiřazené fyzikálně-chemickým principům postupu δ významné, pokud není s^R odhadnuta z přiměřené rozmanitosti postupů měření**, by mělo být při výpočtu u^{tg} zohledněno cílové

* Racionální měření jsou měření měřené veličiny (racionálních měřených veličin), která je definována nezávisle na použitém postupu měření. Naproti tomu empiricky nebo postupem definovaná měření jsou měření měřených veličin (empirické měřené veličiny), které jsou definovány pro konkrétní postup měření. Stanovení celkového zlata ve vzorku těžařské suroviny je příkladem racionálního měření, protože lze použít různé postupy měření ke změření stejné veličiny. Před samotným stanovením lze použít různé způsoby přípravy vzorku.

Naproti tomu stanovení extrahovatelného zlata do lučavky královské ve vzorku těžařské suroviny s využitím postupu A odhaduje empirickou veličinu závislou na relativním zastoupení analytického podílu, na směsi kyselin a na teplotě, definované v postupu A. Postup A definuje měřenou veličinu.

** Podle VIM [1], odkazuje reprodukovatelnost měření na shodu výsledků z různých laboratoří, které používají stejné, nebo odlišné postupy měření ke stanovení stejné měřené veličiny.

vychýlení δ^g . V tomto případě s_R a vychýlení δ^g můžeme kombinovat podle rovnice (9) [18]:

$$u^{tg} = \sqrt{s_R^2 + (\delta^g / l)^2} \quad (9)$$

kde l je $\sqrt{3}$ nebo $\sqrt{6}$ za předpokladu, že δ^g má rovnoměrné nebo trojúhelníkové rozdělení a konfidenční hladinu 100 %. Tato rovnice není postačující k definování cílových výkonnostních hodnot, pokud pozorované rozptýlení výsledků z laboratorii považujeme za příliš vysoké pro obvyklý účel měření.

V potravinářství se k definování cílové reprodukovatelnosti s_R^{tg} při analýze minoritních nebo majoritních, anorganických či organických složek používá Horwitzova rovnice [19] nebo modifikovaná Horwitzova rovnice [20]. Proto můžeme tento vztah použít k definování cílové nejistoty. Vzhledem k tomu, že Horwitzova rovnice je prediktivním modelem reprodukovatelnosti, který používá hmotnostní zlomek analytu, musí se ověřit vhodnost cílové nejistoty pro zamýšlené použití.

5.3 Studie cena/užitek

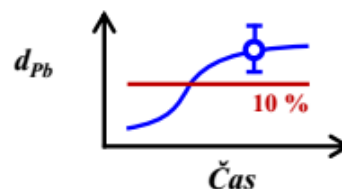
Fearn a kol. [21] diskutuje použití modelů změny ceny měření ve spojitosti s nejistotou, ekonomickým dopadem špatných rozhodnutí z měření a pravděpodobnostního rozdělení měřené veličiny ve studovaných položkách, aby vybral podmínky měření umožňující minimalizaci celkových nákladů prováděné kontroly. Nicméně tento přístup je obtížný v případech, kdy je ekonomický dopad měření obtížné kvantifikovat nebo modelovat.

5.4 Závažnost studovaných trendů

Mnoho důležitých měření provádíme za účelem změření trendu, k odlišení položek podle odlišného původu, nebo tam kde nejsou informace o složení analyzované položky nebo jejich málo. Monitoring úbytku kontaminantu v říční vodě, studie distribuce léčiva v různých orgánech testovaného zvířete či složení meteoritu, to je jen pár příkladů. Kvalita měření by v těchto případech měla být přiměřená, aby bylo možné detekovat významné trendy nebo rozdíly v analyzovaných položkách. Standardní nejistota

měření by měla být alespoň 4× menší než trendy nebo rozdíly, které potřebujeme zaznamenat (pro vyvození tohoto faktoru viz další odstavce, příklad 3).

PŘÍKLAD 3. Pokud je třeba detekovat ztrátu olova (d_{pb}) v kontaminované půdě větší než 10 %, postup měření by měl být vyvinut tak, aby zajistil výpočet rychlosti ztráty se standardní nejistotou, která nebude větší než 2,4 % (tj. 2,4 % = 10 % / 4,2).



Násobek 4 pochází z rovnice používané k ověření kompatibility výsledků měření na konfidenční hladině 99 % [1]. Tato hodnocení jsou obvykle prováděna na konfidenční hladině 99 %, abychom zajistili, že chyba I. druhu (tj. pravděpodobnost zamítnutí pravdivé rovnocennosti) je pouze 1 %.

Pro dva výsledky měření $[(x_A \pm k_A u_A)]$ a $(x_B \pm k_B u_B)$, kde x_i je měřená hodnota veličiny, k_i koeficient rozšíření a u_i standardní nejistota měření i ($i = A$ nebo B), je standardní nejistota rozdílu u_d , $(x_A - x_B)$:

$$u_d = \sqrt{(u_A)^2 + (u_B)^2} \quad (10)$$

Aby byl rozdíl na konfidenční hladině 99 % významný,

$$\rho_{AB} = |x_A - x_B| > t_d \sqrt{(u_A)^2 + (u_B)^2} \quad (11)$$

kde ρ_{AB} je rozpětí hodnot a t_d je Studentovo t pro konfidenční hladinu 99 % a počet stupňů volnosti u_d .

Jestliže jsou x_A a x_B odhadnuty s vysokým počtem stupňů volnosti, k_d je přibližně 3. Za předpokladu, že u_A a u_B jsou ekvivalentní ($u_A = u_B = u$), protože x_A a x_B jsou podobné, nejsou výsledky měření metrologicky kompatibilní a proti mohou představovat odlišné hodnoty veličiny, je-li splněna následující podmínka:

$$\rho_{AB} > 3\sqrt{2}u \quad (12)$$

Cílová standardní nejistota u_{tg} , požadovaná na rozlišení minimálního rozpětí ρ_{min} mezi x_A a x_B , je $(\rho_{min} / (3\sqrt{2}))$; tedy u by měla být nejméně $(3\sqrt{2} = 4,2)$ krát menší než ρ_{min} , abychom rozlišili toto minimální rozpětí.

Nastavení a používání cílové nejistoty

Jestliže očekáváme u_d s nízkým počtem stupňů volnosti, je nezbytné hodnotu k_d patřičně přizpůsobit.

Pokud víme, že nějaké systematické vlivy, které ovlivňují stanovení x_A a x_B jsou stejné, nemohou se zahrnovat do odhadu u_d . Např. pokud nějaké systematické vlivy ovlivní stanovení obsahu olova ve stejné laboratoři s použitím stejné kalibrace jednotlivě x_A a x_B , neovlivní ρ_{AB} . V tomto případě je namísto slučování odhadů u_A a u_B , s použitím rovnice 10 vhodnější vyhodnotit funkci ρ_{AB} se všemi jejími sdílenými a nezávislými proměnnými (příklad 4). V těchto komplexních situacích je obzvláště vhodné použít numerické metody kombinování složek nejistoty, jako jsou Kragtenův postup nebo metoda Monte Carlo [4].

PŘÍKLAD 4. Pokud je použita stejná kalibrace ke spektrofotometrickému měření chemické spotřeby kyslíku (CHSK) v odpadní vodě před a po provedené úpravě a pokud se oba roztoky vzorků ředí, aby je bylo možné měřit v podobném koncentračním rozsahu, zruší vychýlení spojené s kalibrací odhadovaný trend hodnoty CHSK.

5.5 Informace z jiných oblastí

Mnoho analytických měření se provádí v oblastech, kde nejsou dostupné cílové hodnoty výkonnostních charakteristik a kde zkoušky způsobilosti či jiná porovnání nemají pravidelnou podporu. V těchto případech lze cílovou nejistotu definovat s využitím cílových hodnot pro výkonnostní charakteristiky z měření pro podobné nebo blízké účely.

Meze specifikace a cílové nejistoty měření jsou definovány se zřetelem na využití měřené veličiny v rozmezí od managementu individuálních nebo veřejných zdravotních potřeb po management finančních podílů. Jestliže nalezneme podobnost mezi použitími, může být cílová nejistota, definovaná pro jednu kombinaci „analyt/matrice/cíl měření“, použita k definování cílové nejistoty jiných analytických problémů. Tato extrapolace je tím snazší, čím podobnější nebo více související jsou analytické problémy.

Když pozorujeme zřetelný rozdíl v požadavcích na kontrolu dvou veličin, můžeme to využít k odůvodnění definovaného poměru mezi jednotlivými cílovými nejistotami měření (příklady 5 a 6).

PŘÍKLAD 5. Cílová nejistota spojená se stanovením zlata v čistých slitinách zlata musí být nižší než ta, která je definována pro analýzu zlata v produktech těžby.

PŘÍKLAD 6. Cílová nejistota měření olova v pitné vodě by měla být menší než ta, která je přidružena k měřením olova v odpadních vodách.

Tato extrapolace je méně zřejmá, pokud jsou studovány odlišné parametry, ale je také možná (příklad 7).

PŘÍKLAD 7. Cílová nejistota měření kontaminantů v aerosolu vzduchu, jako je celkové olovo, by měla být menší než ta, která se používá při měření síranů ve vodorozpustné frakci aerosolu, sloužícím k identifikaci antropogenního nebo přirozeného původu [22].

Cílovou nejistotu lze také převádět v rámci stejného analytického sektoru. Tyto hodnoty se obvykle mění mezi hlavními a vedlejšími složkami. V některých případech jsou cílové nejistoty měření větší pro organické ukazatele než pro anorganické ukazatele a to kvůli analytickým omezením.

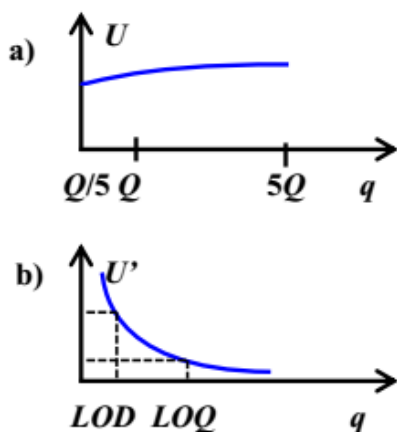
Každé použití cílové nejistoty z jiné analytické oblasti musí být jasně zdůvodněno. Musíme se vyvarovat následné extrapolace cílové nejistoty mezi různými analytickými problémy, protože obvykle vede k menšímu souladu.

V některých případech vyvažuje definování cílové nejistoty nutnost zajistit přijetí ať již jednotlivcem nebo veřejností a dosažitelnost cílové nejistoty s využitím moderních postupů měření. Ti, kdo nemají analytické a metrologické vzdělání, mají sklon požadovat nerealisticky nízkou nejistotu. V těchto případech musí analytik vysvětlit, proč je navrhovaná cílová nejistota přiměřená.

6 Změna cílové nejistoty v závislosti na hodnotě veličiny

Pokud je nebo může být cílová nejistota definována pouze pro nějaké hodnoty veličiny a výkonost se musí posuzovat v celém intervalu hodnot veličiny, lze k definování u_{ig} v celém rozsahu použít očekávanou proměnlivost nejistoty v závislosti na hodnotě spolu s hodnotou u_{ig} definovanou pro některé konkrétní hodnoty.

Nejistota U má tendenci mírně růst s množstvím a je přibližně konstantní v úzkých množstevních intervalech. Pro jednoduchost lze v mnoha případech předpokládat, že nejistota je konstantní mezi pětinou ($Q/5$) a pětinasobkem ($5Q$) hodnoty veličiny Q (tj. od $Q/5$ do $5Q$) (obrázek 2a).

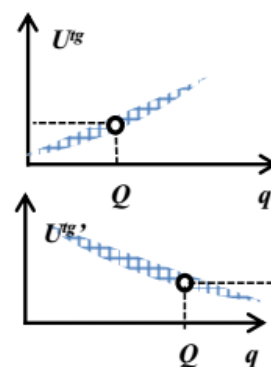


Obrázek 2. Očekávané trendy proměnlivosti absolutní (U) nebo relativní (U') nejistoty v závislosti na hodnotě veličiny (q). Q představuje hodnotu veličiny, pro níž je cílová nejistota definována

Relativní nejistota U' s růstem hodnoty veličiny klesá, tento pokles je prudký od LOD do přibližně $2LOQ$. Nad $2LOQ$ bývá relativní nejistota přibližně konstantní (obrázek 2b).

Tyto časté trendy [22, 23] vedou k tomu, že cílová relativní nejistota nastavená pro určitou hodnotu veličiny je vhodná nad touto hladinou a cílovou nejistotu lze použít po úroveň pětikrát nižší (příklad 8). V mnoha případech lze cílovou nejistotu aplikovat ještě níž, vzhledem k tomu, že nejistota má sklon se u nižších hodnot snižovat.

PŘÍKLAD 8. Pokud je cílová nejistota definována pro hodnotu veličiny Q , můžeme použít stejnou cílovou nejistotu i pod Q , a případně cílovou relativní nejistotu i nad Q :



kde  představuje očekávaný trend U nebo U' v závislosti na hodnotě veličiny.

Vzhledem k tomu, že cílová nejistota je důležitá zejména u meze specifikace, musí každá extrapolace k této kritické hodnotě zahrnovat posouzení přiměřenosti cílové nejistoty.

7 Porovnání odhadnuté nejistoty s cílovou nejistotou

Principiálně by nejistota měla být menší než cílová hodnota, ale pokud není cílová nejistota definována v nařízení nebo specifikaci, lze pokládat dodatečnou toleranci 20–30 % za kompenzaci variability v procesu odhadu nejistoty. GUM [3] zmiňuje, že analytici by si měli být vědomi variability při odhadu nejistoty a ilustruje

to na variabilitě výpočtu směrodatné odchylky z rozdělení s malým počtem výsledků (odstavec E.4.3 v [3]).

Tolerance 20–30 % je stanovena s předpokladem obvyklého počtu stupňů volnosti pro standardní nejistoty měření v chemii a modely jejich variability.

8 Optimalizace nejistoty měření

Nejistota měření se musí snížit, když porovnání s cílovou nejistotou prokáže, že měření není vhodné pro daný účel. Nejistota měření může být snížena, pokud lze snížit důležité složky nejistoty. Přístup vyhodnocování nejistoty zdola nahoru [12] předkládá nejvhodnější modely pro tuto optimalizaci, když vznikne přímé propojení mezi zlepšením analytických kroků nebo vlivů a sníže-

ním celkové nejistoty. Pokud není taková informace dostupná anebo nevedou změny v postupu měření nebo používaných referenčních materiálů ke snížení nejistoty na přiměřenou úroveň a přitom je složka preciznosti významná, může analytik snížit nejistotu uváděním průměru z opakovaných měření vzorků.

9 Použití cílové nejistoty k usměrňování validace

Definovaná cílová nejistota může být použita k usměrňování validace postupu měření tím, že naznačuje cílové hodnoty různých výkonnostních charakteristik, stanovených před vyhodnocením nejistoty, např. opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti, meze stanovitelnosti nebo průměrné výtěžnosti. Při tomto hodnocení bychom měli používat algoritmy pro převod těchto výkonnostních dat na složky nejistoty (tabulka 1).

Vnitrolaboratorní validace nebo verifikace postupu obvykle zahrnuje hodnocení opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti, pravdivosti, linearitu, meze stanovitelnosti a nejistoty.

Směrodatná odchylka opakovatelnosti by neměla být větší než $\frac{1}{5}$ až $\frac{1}{3}$ cílové standardní nejistoty tak, aby umožnila zahrnout očekávané příspěvky dalších složek nejistoty.

Směrodatná odchylka mezilehlé preciznosti, hlavní složka nejistoty u většiny měření v chemii, by neměla být větší než $\frac{1}{3}$ až polovina [24] cílové standardní nejistoty.

Cílová nejistota nás může navést k nadefinování cílové meze stanovitelnosti za předpokladu, že je tato mez odhadována za podmínek mezilehlé preciznosti. Vzhledem k tomu, že variační koeficient je pro LOQ 10 % [25], měla by hodnota veličiny tam, kde je tato preciznost očekávána, odpovídat LOQ. Za předpokladu, že druhá mocnina mezilehlé preciznosti tvoří polovinu druhé mocniny standardní nejistoty, je očekávaná relativní standardní nejistota na úrovni LOQ 14 %

$(0,14 = \sqrt{(0,1)^2 + (0,1)^2})$. Můžeme tedy k definování cílové hodnoty této meze použít prediktivní modely nejistoty v blízkosti LOQ (příklad 9).

Testy pravdivosti zahrnují stanovení chyby měření (tj. měřená hodnota veličiny minus referenční hodnota veličiny). Na rozdíl od pravdivosti je chyba kvantitativní vlastnost. Chyba pozorovaná během vyhodnocení linearitu nebo během analýzy referenčního materiálu by neměla být větší než polovina cílové standardní nejistoty. Kritéria pro pozorované chyby se zdají být méně přísná než pro preciznost, ale odrážejí, jakou měrou tato složka přispívá k nejistotě (tabulka 1).

PŘÍKLAD 9. Aby stanovení chemické spotřeby kyslíku v odpadních vodách splňovalo požadavky nařízení 91/271/EHK, je definována cílová standardní nejistota 10 % [23] pro mez 125 mg l⁻¹ [26]. Tedy pro 125 mg l⁻¹ je standardní cílová nejistota 12,5 mg l⁻¹. Vzhledem k tomu, že by nejistota měla být přibližně konstantní mezi 25 a 625 mg l⁻¹ (tj. méně než pětina a více než pětinašobek 125 mg l⁻¹), je u' 14 % pro 89 mg l⁻¹ ($0,14 = 12,5/89$). Z toho důvodu by maximální hodnota pro mez stanovitelnosti byla 89 mg l⁻¹.

Toto kritérium pro různé výkonnostní charakteristiky by mělo být pouze indikační, protože nižší hodnota jednoho vlivu umožňuje flexibilní posouzení ostatních.

10 Příklady

Následující oddíly představuje příklady určení cílové nejistoty měření pro variantu popsané výše.

10.1 Definovaný interval shody

V Evropské unii je kvalita tekoucí či stojaté vody ke koupání, čerstvé nebo mořské vody regulována směrnicí 76/160/EHK [27], která je základem národních monitorovacích programů. Tato legislativa stanovuje meze pro mikrobiologické a fyzikálně-chemické ukazatele a některé znečišťující látky. pH vody ke koupání by mělo být mezi 6–9, avšak existují opatření pro překročení těchto mezí za určitých okolností. Stanovení pH ve vodě ke koupání by proto mělo být schopno rozlišit hodnoty pH v tomto intervalu. Podle metodiky navržené v odstavci 5.1.2 by měla být rozšířená nejistota menší nebo rovna $[(9 - 6)/8] = 0,38$ jednotek pH (tj. $U^g = 0,38$). Těto výkonnosti snadno dosáhneme potenciometrickým stanovením s kombinovanou skleněnou elektrodou.

10.2 Definované výkonnostní charakteristiky měření

V Evropské unii musí být monitoring kvality pitné vody podpořen měřeními, která jsou prováděna postupy splňujícími požadavky uvedenými ve Směrnici rady 98/83/ES [9]. Tato směrnice stanoví maximální hodnoty pro „mez detekce“, „pravdivost“ a „preciznost“, které jsou definovány odlišně od posledního vydání VIM [1]. Tyto definované maximální hodnoty jsou násobky „parametrické hodnoty“, která je regulační mezi studovaného analytu.

Ve Směrnici 98/83/ES, je „pravdivost“ definována jako rozdíl mezi průměrnou hodnotou odhadnutou z velkého počtu opakovaných měření a konvenční pravou hodnotou. Jelikož ta není známa, vyžaduje to určité vysvětlení. Preciznost φ je „dvojnásobek relativní směrodatné odchylky“ měření prováděných „v sériích a mezi sériemi“. Podle VIM terminologie [1] souvisí „pravdivost“

s chybou τ (tedy měřená hodnota veličiny minus referenční hodnota veličiny) a „preciznost“ podle definice je ve Směrnici dvojnásobek směrodatné odchylky opakovatelnosti nebo mezilehlé preciznosti.

Pro Cd v pitné vodě je parametrická hodnota (tj. horní mez) $5 \mu\text{g l}^{-1}$, τ a φ jsou $0,5 \mu\text{g l}^{-1}$ ($\tau = \varphi = 10 \% \cdot 5 \mu\text{g l}^{-1}$).

Podle rovnice (13):

$$u_c^{tg} = \sqrt{(u_{ra}^{tg})^2 + (u_{sy}^{tg})^2} = \sqrt{\left(\frac{\tau}{\sqrt{6}}\right)^2 + \left(\frac{\varphi}{2}\right)^2} = 0,32 \mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \quad (13)$$

Například pokud je standardní nejistota měření u $0,39 \mu\text{g l}^{-1}$, nesplňuje měření tento požadavek, který je přidán k povinnému výkonnostnímu požadavku určenému ve směrnici. Pokud je ve skutečnosti u větší než u_c^{tg} , nebyl splněn alespoň jeden z výkonnostních požadavků z legislativy. Pokud však jsou kvantitativní výsledky pro Cd získány jako průměr ze dvou duplikátů naměřených dvěma analytiky, je $u_{(mean)}$ menší než u_c^{tg} ($u_{(mean)} = 0,31 \mu\text{g l}^{-1}$) (viz kapitolu 8). Uvedením výsledků z duplikátního měření dvou analytiků je preciznost finálního výsledku přiměřená v porovnání k výkonnostnímu kritériu specifikovanému ve směrnici. V tomto případě lze rozhodnout, že neshoda obsahu kadmia v pitné vodě podle směrnice 98/83/ES je založena na průměru z duplikátních výsledků provedenými dvěma analytiky.

10.3 Definované rozhodovací riziko

O správné výrobní praxi výroby slitin zlata, stříbra a mědi, používané ve zlatnictví, je známo, že produkuje slitiny s obsahem zlata s odchylkou od cílového složení ne větší než 5 % [28] vzhledem k nejistotě známé čistoty a vážení čistých kovů. Proto lze odchylky v obsahu zlata v těchto slitinách větší než 5 % očekávat pouze při nesprávné výrobní praxi nebo při podvodech. Výrobky

mohou být označeny obsahem 19,2 karátů (tj. 800 ‰ zlata), pokud je prokázáno, že obsah zlata je nad touto mezí, a posouzení shody je provedeno bez příspěvku nejistoty. Výrobek je shodný s obsahem 19,2 karátů, pouze pokud je změřen obsah zlata nad 800 ‰. Abychom zajistili rozhodnutí, že je výrobek s obsahem zlata nejméně 5 ‰ nad 800 ‰ (tj. 805 ‰) s nejméně 99 % pravděpodobností shodný, musí se stanovení provést se standardní nejistotou, která nebude větší než 2,1 ‰ [$u^{ig} = 5 ‰ / t_l = 5 ‰ / 2,33 = 2,1 ‰$] (odstavec 5.1.4), kde $t_l = 2,33$ je jednostranné Studentovo t pro vysoký počet stupňů volnosti a konfidenční hladinu 99 %.

10.4 Zkoušky způsobilosti

Pančování rostlinného oleje minerálním bylo zaznamenáno u produktů obchodovaných v Evropě. Tato situace vedla k vytvoření zkoušky způsobilosti na stanovení obsahu minerálního oleje ve slunečnicovém oleji [29], který organizoval Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) Evropské komise s cílem zhodnotit kvalitu měření prováděných v Evropě. Poskytovatel zkoušení způsobilosti vyhodnotil úspěšnost laboratorní výpočetem z -skóre stanoveného z mediánu výsledků účastníků a přiřadil mediánu směrodatnou odchylku 25 %. Tato referenční směrodatná odchylka byla definována na mezinárodním semináři, a proto lze očekávat, že bude odrážet stanovisko reprezentativního počtu odborníků.

Cílová relativní standardní nejistota u^{ig} je pro tato měření 25 %.

10.5 Reprodukovatelnost měření

Vzhledem k vysoké toxicitě a stálosti bylo v několika evropských státech zakázáno nebo omezeno používání pentachlorofenolu (PCP) ke konzervaci kůže. Norma ISO 17070 [30] popisuje postup měření PCP v kůži. Tato norma uvádí hodnoty reprodukovatelnosti, odhadnuté z mezilaboratorního testu pro různé hmotnostní zlomky. Např. pro 5 mg kg^{-1} je uvedena směrodatná odchylka reprodukovatelnosti $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$. Proto pro měření v rozsahu 1 do 25 mg kg^{-1} můžeme použít cílovou standardní nejistotu $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$.

10.6 Závažnost studovaných trendů

Optimalizace programů úpravy odpadní vody změnou podmínek ve zkušebním provozu je kontrolována procentuálním snížením chemické spotřeby kyslíku (CHSK) během úpravy. Je-li snížení CHSK o 5 % považováno za významné, pak musí být snížení CHSK stanoveno s nejistotou, která nepřesáhne 1,2 % (tj. $1,2 = 5/4,2$) (viz odstavec 5.4). Nejistota stanovení snížení CHSK, kterou uvažujeme při porovnání různých programů úpravy, musí brát v úvahu pouze složky nejistoty odpovědné za odchylky porovnávaných snížení CHSK. Například pokud se podíly stejné odpadní vody zpracují v porovnatelných programech úpravy, musí se z těchto výpočtů vypustit nejistota stanovení vstupní hodnoty CHSK. Obdobně neovlivní nejistota přidružená k referenci poměr, pokud je používána stejná reference pro obě stanovení CHSK.

10.7 Informace z jiných oblastí

Směrnice 2008/50/EC [7] o kvalitě okolního ovzduší definuje maximální meze pro několik kontaminantů ve vzduchu a cílové nejistoty pro jejich stanovení. Měření kvality ovzduší se dělí na stacionární a orientační. Požadavky na kvalitu orientačních měření jsou méně přísné než pro stacionární měření.

Tato směrnice doporučuje doplnit stanovení kontaminantů stanovením antropogenního nebo přirozeného původu aerosolů. Klíčovými parametry pro určení původu aerosolů jsou hmotnostní zlomky některých iontů ve vodě rozpustném podílu. Nicméně ve směrnici nejsou pro tyto parametry definovány žádné specifikační meze nebo cílové nejistoty měření.

Protože hmotnostní zlomek určitého iontu ve vodorozpustném podílu aerosolu není srovnáván s žádnou mezí specifikace, požadavky na kvalitu lze při orientačním měření kontaminantů považovat za přiměřené pro měření těchto složek s nízkou toxicitou.

Orientační měření odlišných parametrů mají cílovou relativní rozšířenou nejistotu v rozmezí mezi 25–50 %. Vzhledem k tomu je cílová relativní rozšířená nejistota 40 % přiměřená pro stanovení hmotnostního zlomku ve vodě rozpustných chloridů, dusičnanů nebo síranů obsažených v aerosolech [22].

Nastavení a používání cílové nejistoty

Bereme-li v úvahu proměnlivost procesu odhadu nejistoty, můžeme rozhodnout, že u' má být menší než 48 % ($u'^{max} = 1,2 \cdot 40 = 48$ %).

10.8 Změna cílové nejistoty v závislosti na hodnotě veličiny

Identifikace a stanovení pentachlorofenolu (PCP) v kůži lze provést podle postupů v normě [30]. V tomto dokumentu jsou uvedeny opakovatelnosti a reprodukovatelnosti odhadnuté z mezilaboratorních studií pro tři hmotnostní zlomky PCP. Tabulka 2 uvádí reprodukovatelnost pozorovanou pro tyto hmotnostní zlomky*.

Měření popsaná v tabulce 2 považujeme za vhodná pro zamýšlené použití a příslušné výkonnostní údaje přiměřené k definování cílové nejistoty, jak bylo popsáno v odstavci 5.2.2.

Tabulka 2. Směrodatná odchylka s_R , a relativní směrodatná odchylka s'_R reprodukovatelnosti měření hmotnostního zlomku PCP w_{PCP} , v kůži podle normy ISO 17070 [30]

w_{PCP} mg kg ⁻¹	s_R mg kg ⁻¹	s'_R %
5,0	0,6	12,0
6,7	0,8	11,9
16,8	2,1	12,5

Vzhledem k tomu, že relativní nejistota klesá s hodnotou veličiny a nejistota zůstává konstantní v úzkém intervalu, můžeme použít následující model proměnlivosti cílové nejistoty (tabulka 3).

Tabulka 3. Model proměnlivosti cílové standardní nejistoty u'^g , nebo relativní cílové standardní nejistoty u'^g , v závislosti na hmotnostním zlomku PCP, w_{PCP}

w_{PCP} mg kg ⁻¹	u'^g mg kg ⁻¹	u'^g %
1–5,0	0,6	–
5,0–16,8	–	12,5*
16,8–(...)	–	12,5

* maximální hodnota s'_R (tabulka 2).

Vzhledem k tomu, že je odhad nejistoty proměnlivý, je maximální povolená odhadnutá standardní nejistota u'^{max} 1,2násobně větší než cílová nejistota u'^g . Tabulka 4 uvádí u'^{max} v širokém intervalu hmotnostních zlomků.

Tabulka 4. Model proměnlivosti maximální přípustné odhadnuté standardní nejistoty u'^{max} , nebo relativní standardní nejistoty u'^{max} , v závislosti na hmotnostním zlomku PCP, w_{PCP}

w_{PCP} mg kg ⁻¹	u'^{max} mg kg ⁻¹	u'^{max} %
1–5,0	0,72	–
5,0–16,8	–	15
16,8–(...)	–	15

Cílová nejistota odhadnutá s využitím směrodatné odchylky reprodukovatelnosti pro tři hmotnostní zlomky je přesnější, než cílová hodnota odhadnutá s využitím informace na jedné úrovni (viz oddíl 10.5).

* Příklad 10.5 diskutuje použití dat reprodukovatelnosti, pozorovaných při jedné úrovni, k definování cílové nejistoty.

Literatura

1. International vocabulary of metrology – basic and general concepts and associated terms (VIM), 3rd edition 2008 with minor corrections. Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) 200, 2012 (www.bipm.org)
[Český překlad: TNI 010115. Mezinárodní metrologický slovník – Základní a všeobecné pojmy a přidružené termíny (VIM), ÚNMZ, Praha 2009.]
2. V. J. Barwick, E. Prichard (eds.): Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3, Eurachem 2011. ISBN 978-0-948926-29-7, www.eurachem.org
[Český překlad: KVALIMETRIE 18. Názvosloví analytického měření: Úvod k 3. vydání Mezinárodního metrologického slovníku. Eurachem-ČR, Praha 2013. ISBN 80-86322-06-8]
3. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM) 100, 2008. www.bipm.org
[Český překlad: TNI 014109-3:2011. Nejistoty měření – Část 3: Pokyn pro vyjádření nejistoty měření (GUM:1995) (Pokyn ISO/IEC 98-3), ÚNMZ, Praha 2011.]
4. S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.): Eurachem/CITAC Guide CG4: Quantifying uncertainty in analytical measurement, 3rd ed. Eurachem 2012. www.eurachem.org
[Český překlad: KVALIMETRIE 19. Stanovení nejistoty analytického měření. Pokyn Eurachem/CITAC, 4. české rozšířené vydání, Eurachem-ČR, Praha 2014. ISBN 978-80-86322-07-0]
5. M. L. J. Weitzel, W. M. Johnson: Using target uncertainty to determine fitness for purpose, *Accred. Qual. Assur.* **17**, 491 (2012).
6. Commission Regulation (EC) 333/2007 of 28 March 2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo[a]pyrene in foodstuffs.
[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.]
7. Directive 2008/50/EC of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe.
[Směrnice evropského parlamentu a rady 2008/50/ES ze dne 21. května 2008 o kvalitě vnějšího ovzduší a čistším ovzduší pro Evropu.]
8. AOAC: Guidelines for standard method performance requirements, AOAC Official Methods of Analysis, USA, 2012.
9. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
[Český překlad: Směrnice rady 98/83/ES ze dne 3. listopadu 1998 o jakosti vody určené k lidské spotřebě.]
10. B. Magnusson, U. Örnemark (eds.): Eurachem Guide: The Fitness for purpose of analytical methods – A Laboratory guide to method validation and related topics, 2nd ed. Eurachem 2014. ISBN 978-91-87461-59-0, www.eurachem.org
[Český překlad: KVALIMETRIE 20. Vhodnost analytických metod pro daný účel. Pokyn Eurachem. Eurachem-ČR, Praha 2015. ISBN 978-80-86322-00-1]

11. ISO5725-6:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 6: Use in practice of accuracy values, ISO, Geneva, Switzerland, 1994.
[Český překlad: ČSN ISO 5725-6:1994 Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření – část 6: Použití hodnot měř přesnosti v praxi. ČNI Praha 1996.]
12. Analytical Methods Committee: Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science, *Analyst*, **120**, 2303 (1995).
13. SANCO: Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013, 2013.
14. SANCO... Technical material and preparations: Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre-and post-registration data requirements for Annex II (part A, Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414, SANCO/3030/99 rev.4 11/07/00, 2000.
15. S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.): Eurachem/CITAC Guide: Use of uncertainty information in compliance assessment, Eurachem 2007. www.eurachem.org
[Český překlad: KVALIMETRIE 15. Použití informací o nejistotě k posuzování shody. Pokyn Eurachem/CITAC. Eurachem-ČR, Praha 2008. ISBN 80-86322-03-3]
16. RELACRE, EAA: Ensaio de Aptidão de Águas. Programa de Execução, EAA 2012 ed.: 01, 2012/02/02.
17. LGC Standards: Aquacheck Proficiency Testing Scheme – Scheme Description. January 2015.
18. ISO 21748:2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation, ISO, Geneva, Switzerland 2010.
[Český překlad: ČSN ISO 21748. Návod pro použití odhadů opakovatelnosti, reprodukovatelnosti a pravdivosti při odhadování nejistoty měření, ÚNMZ, Praha 2012.]
19. W. Horwitz: Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, *Anal. Chem.*, **54**(1), 67A (1982).
20. M. Thompson: Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, *Analyst*, **125**, 385 (2000).
21. T. Fearn, S. A. Fisher, M. Thompson, S. L. R. Ellison: A decision theory approach to fitness for purpose in analytical measurement, *Analyst*, **127**, 818 (2000).
22. A. Arias, R. J. N. B. Silva, M. F. G. F. C. Camões, C. M. R. R. Oliveira: Evaluation of the performance of the determination of anions in the water soluble fraction of atmospheric aerosols, *Talanta*, **104**, 10 (2013).
23. A. M. E. V. Silva, R. J. N. B. Silva, M. F. G. F. C. Camões: Optimization of the determination of chemical oxygen demand in wastewaters, *Anal. Chim. Acta*, **699**, 161 (2011).
24. H. Hovind, B. Magnusson, M. Krysell, U. Lund, I. Mäkinen: Internal quality control - Handbook for chemical laboratories. Nordtest Report TR 569. Oslo, Norway 2011.
25. A. G. Correia, R. J. N. B. Silva, F. Pedra, M. João Nunes: Assessment of the determination of heavy metals in organic soil improvers by ICP-OES, *Accred. Qual. Assur.*, **19**, 87 (2014).
26. Council Directive 91/271/EEC of 21 May 1991 concerning urban waste-water treatment.
[Směrnice Rady ze dne 21. května 1991 o čištění městských odpadních vod (91/271/EHS).]
27. Council Directive 76/160/EEC of 8 December 1975 concerning the quality of bathing water.
[Směrnice Rady 76/160/EHS ze dne 8. prosince 1975 o jakosti vod ke koupání.]
28. C. Corti, R. Holliday (Ed.): *Gold – Science and Application*. CRC Press – Taylor & Francis Group, NW, USA 2010.

Nastavení a používání cílové nejistoty

29. L. Karasek, T. Wenzl and F. Ulberth: Proficiency test on the determination of mineral oil in sunflower oil – Final Report, EUR 23811EN, 2009.
30. ISO 17070:2006 Leather – Chemical tests – Determination of pentachlorophenol content, ISO, Geneva, Switzerland 2006.