

Környezetvédelmi analitikai módszerek validálása

Dr. JUVANCZ ZOLTÁN
Óbudai Egyetem

Dr. FENYVESI ÉVA
CycloLab Kft

Környezetvédelmi mérések követelményei

- A mérések megbízhatóságát megbízhatóan igazolni kell.
- Az elvégzett méréseknek máshol is elvégezhetőnek kell lenniük.
- A mérés határait (koncentráció, mátrix, műszer) be kell tartani.
- A mérések legyenek összhangban a rendeletekben megadott határértékekkel.
- Az eredményeknek jogilag is védhetőeknek kell lenniük.

Validálás és hitelesítés értelme

Az analitikai laboratóriumokkal szemben támasztott igények megkövetelik, hogy a laboratóriumok mérési eredményei megbízhatóak, ellenőrizhetőek és visszakereshetőek legyenek. Ennek megfelelően egy analitikai módszer kidolgozásakor feltétlenül szükséges a tevékenység teljesítményét jellemző paraméterek meghatározása, statisztikai értékelése és megfelelő jelentés formájában történő dokumentálása.

Validálást, egy teljes hitelesítési folyamatot egy új módszer bevezetésénél végig kell csinálni.

Máshol bevezetett módszer, szabvány átvételénél csak részleges **hitelesítést** kell végrehajtani.

Minden mérés sorozat előtt, a mintával összhangban **kalibrálni** kell a mérőműszert.

A méréssorozat során 5-8 mérésenként **minőségi ellenőrző méréssel** (quality control QC) ellenőrizni kell a rendszer változatlanóságát.

Referenciaanyag (RM, Reference Material)

Ahhoz, hogy a mérés hiteles legyen megfelelő referencia anyaggal, standarddal kell rendelkezni a minőségi azonosításhoz, és a mennyiségi viszonyításhoz.

A hitelesített referencia anyagok, mérési eszközök (ISO tanúsítvány) használatával elkerülhető ezek saját hitelesítése.

Egyes jellemző mátrixokra is lehet referencia anyagot (pl. agyag) kapni.

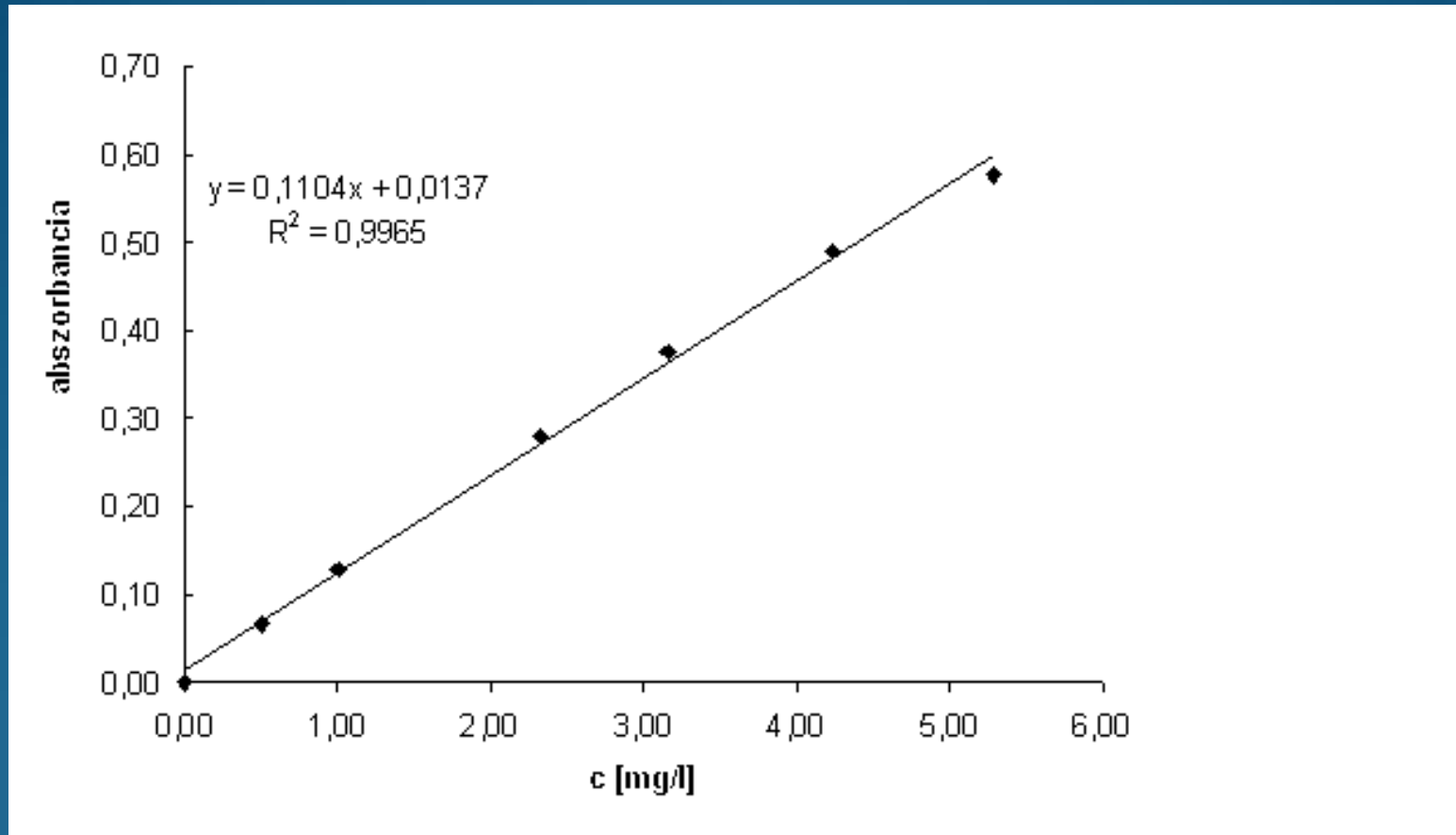
Szelektivitás és/vagy specifikusság (Selectivity / specificity)

- Egy módszer szelektivitása arra vonatkozik, hogy a módszer milyen mértékben képes az adott alkotó meghatározására egyéb zavaró alkotók jelenlétében.
- Specifikus az a módszer, ami csak egyetlen anyagra vonatkozik (pl. MS fragmentáció, O₂ elektród).
- Csoportszelektív módszer az anyagok csoportját mutatja egy közös tulajdonságuk alapján (pl. NPD, immunreakciók).
- Univerzális módszer az anyagok széles spektrumára érzékeny (pl. savasság, FID, 254 nm abszorbancia).
- **A zavaró jelek a vak mintában is jelet adnak, a kalibráló egyenesnek nem origó a tengelymetszete.**

Linearitás (Linearity)

- Az analitikai mérőgörbe (jel – koncentráció görbe) linearitásán azt értjük, hogy a mérőgörbe adott tartományában, az ún. lineáris tartományban, adott megbízhatósággal egyenesnek tekinthető. A linearitást a méréstartományt lefedő koncentrációjú minták elemzésével határozzuk meg. Az eredményekből a legkisebb négyzetek módszerével számítjuk ki a regressziós egyenest az alkotó koncentrációja függvényében.

Mérés kalibráló egyenese



A kalibrálás egyenesét regressziós egyenessel, a legkisebb négyzetek módszere alapján számítjuk. Általános elvárás, hogy az $R^2 > 0,98$ legyen.

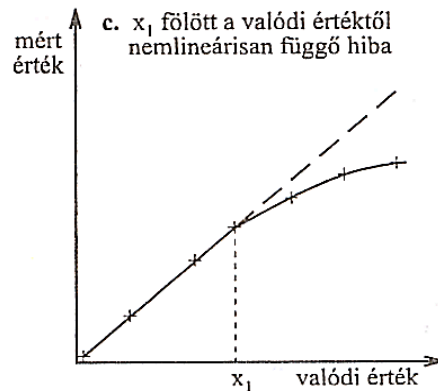
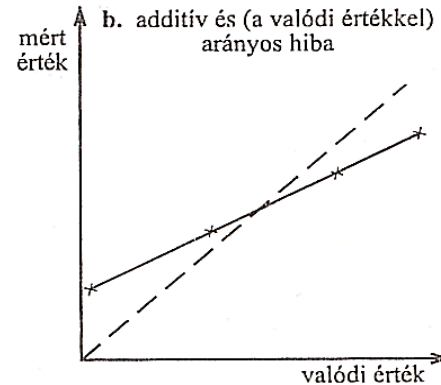
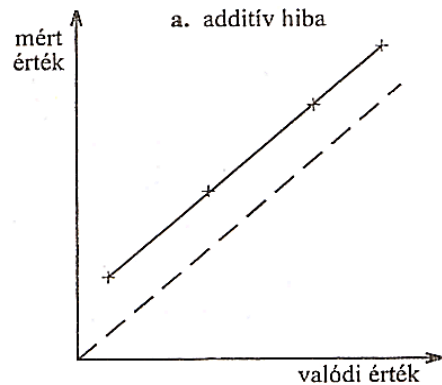
Érzékenység (Sensitivity)

- Az mérés érzékenysége (a) az analitikai mérőgörbe meredeksége, a mért analitikai jelnek (J) a koncentráció (c) vagy az anyagmennyiség szerinti deriváltja. Ily módon az érzékenység, azaz az egységnyi koncentrációváltozásra eső jelváltozás egyszerűen számítható, az $a = \Delta J / \Delta c$ összefüggés alapján (pl. UV, AAS).
- *Relatív érzékenység (f):* a mérés érzékenységének és egy vonatkoztatási anyagra (belső standard, s index) kapott érzékenységnek a viszonya (hányadosa), a relatív jelek és a hozzájuk tartozó koncentráció (vagy tömeg) hányadosok adataiból szerkesztett analitikai mérőgörbe meredeksége. $J/J_s = f(c/c_s)$ a mennyiségi elemzés belső standard módszerének alkalmazásakor használatos (pl GC).

Torzítatlanság (Accuracy)

- A torzítatlanság (vagy pontosság) a rendszeres hiba kimutatására szolgál, a különböző koncentrációknál meghatározható rendszeres hibák átlagolódásával keletkező mérési jellemző (pl. vakérték). A rendszeres hibát úgy definiálhatjuk, mint a hiba egy olyan elemét, amely ugyanazon alkotó ismételt mérése során állandó marad vagy kiszámítható módon változik. Független az elvégzett mérések számától és ezáltal azonos mérési körülmények között a mérések számának növelésével nem csökkenthető.

Rendszeres hibák



A 45°-os egyenes a hibamentes értékeknek felel meg.

A hiba, torzítás (bias) leírható matematikai függvényvel.

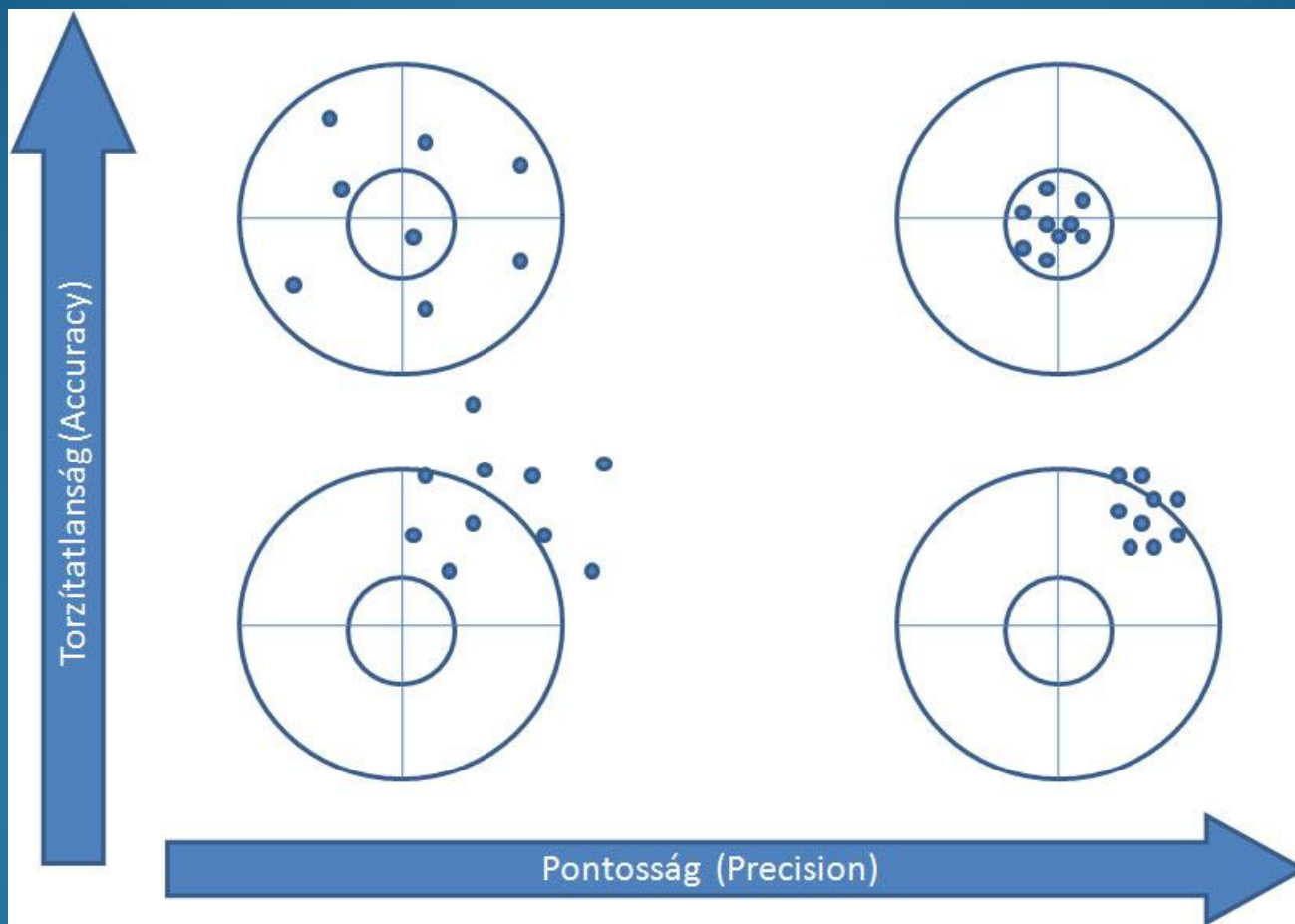
Precizitás (Precision)

- A precizitás a mérési gyakorlatban a véletlen hiba mérőszáma. A véletlen hiba rendszerint a befolyásoló mennyiségek előre nem látható változásaiból ered. Az analitikai eredmény véletlen hibája nem korrigálható, de a mérések számának növelésével rendszerint csökkenthető. Értéke általában függ az alkotó koncentrációjától, ezért a koncentrációfüggést is meg kell határozni és dokumentálni kell. Mértéke a becsült tapasztalati szórás (standard deviáció, SD), vagy a százalékos szórás (relatív standard deviáció, $RSD\%$).

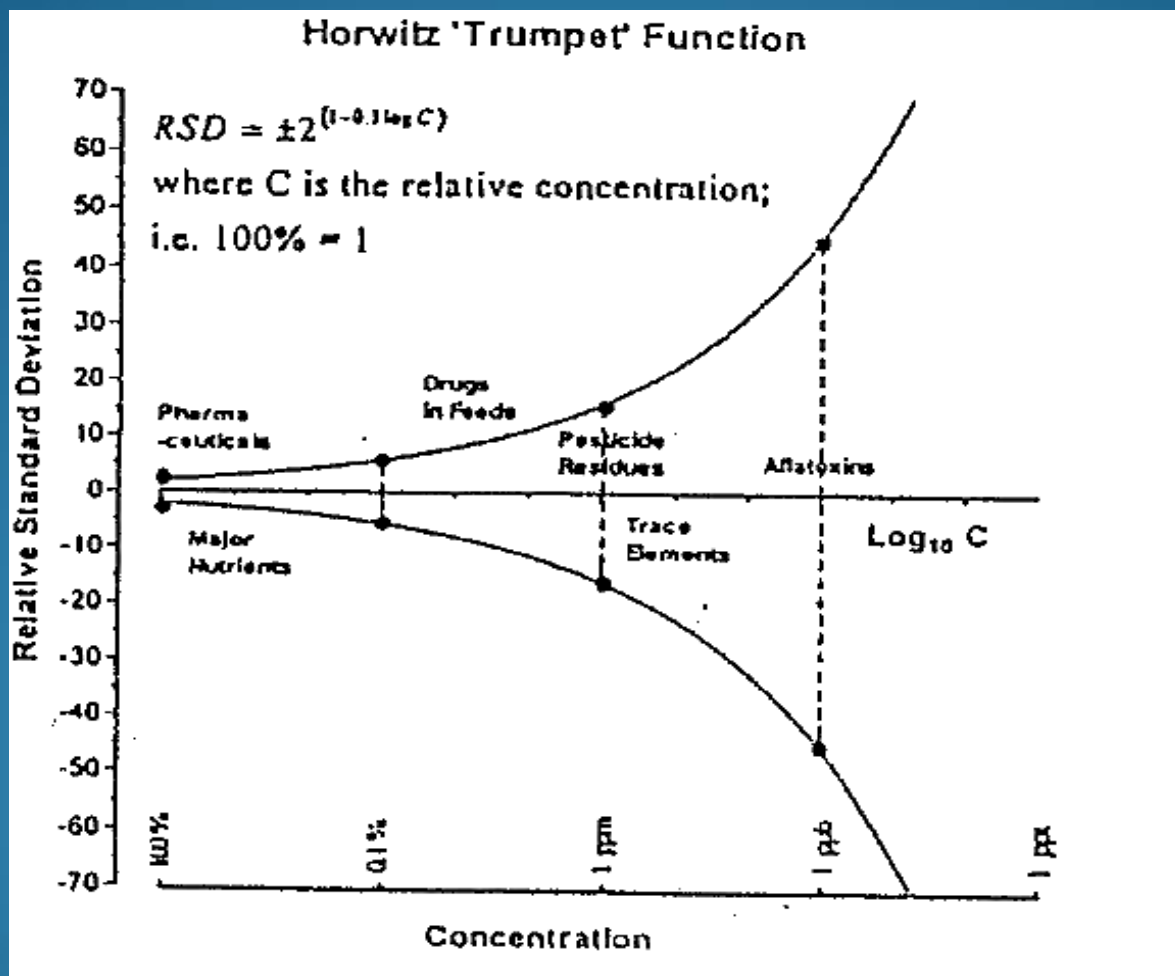
$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x}_i - x_i)^2}{n - 1}}$$

x_i az egyes mérések értéke, \bar{x}_i az n párhuzamos mérés átlaga.

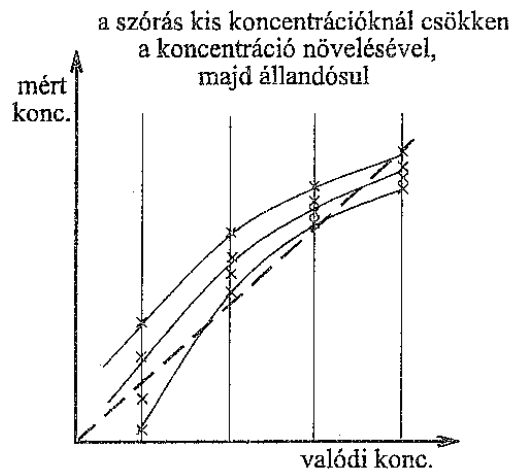
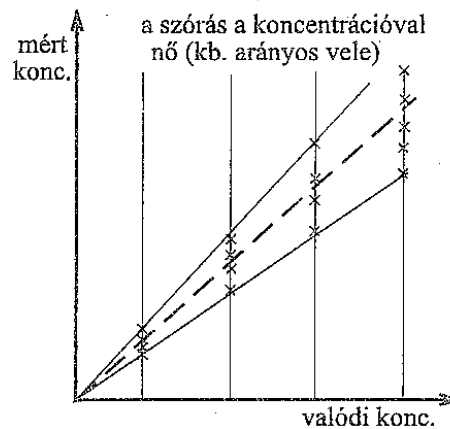
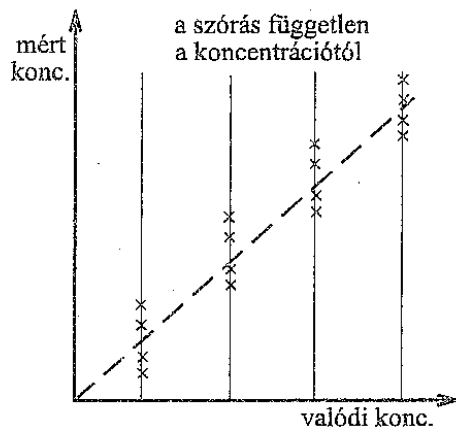
A torzítatlanság és a pontosság egyidejű javítása vezet a jó eredményhez



A relatív szórás egyre nagyobb lesz a koncentráció tartomány csökkenésével



Szórás függhet a koncentrációtól



Ismételhetőség és/vagy reprodukálhatóság (Repeatibility/Reproducibility)

- Az ismételhetőség a precizitás azon fajtája, amely ismételhető körülmények között elvégzett kísérletekre vonatkozik: **azonos** minta, **azonos** módszer, **azonos** műszer, **azonos** kezelő, **azonos** laboratórium, **rövid időintervallum** a párhuzamos mérések között.
- A reprodukálhatóság a precizitás azon fajtája, amely reprodukálható körülmények között elvégzett kísérletekre vonatkozik: **azonos** minta, **azonos** vagy **különböző** módszer, **különböző** műszer, **különböző** analitikus, **különböző** laboratórium, **hosszabb időintervallum** a párhuzamos mérések között.

Stabilitás (Stability)

- A stabilitásvizsgálat a mérésre előkészített minta kémiai stabilitásának (pl. párolgás, hidrolízis, rohadás) meghatározását jelenti. Segítségével ugyanis a mérés időbeni korlátai határozhatók meg, azaz egy olyan időintervallum, amelyen belül az előkészített minták elemzési folyamatát be kell (lehet) fejezni.
- Az eredmények szórása, és az átlagtól való eltérésük változása nem követhet egyirányú tendenciákat.
- A méréssorozat közben kontrol (QC) mintákkal kell a mérés körülményeinek változatlanóságát ellenőrizni.

Kimutatási határ (Limit of detection, LOD)

- Egy alkotó kimutatási határa (C_k) az a koncentráció, vagy anyagmennyiség, amelyhez tartozó válaszjel (J_k) értéke megegyezik a vakminta közepes válaszjelének (J_{vak}) és a vakminta válaszjeléhez tartozó tapasztalati szórás (SD_{vak}) háromszorosának összegével.

$$J_k = J_{vak} + 2SD_{vak}$$

Meghatározási határ

(Limit of quantitation, LOQ)

- Egy alkotó meghatározási határa (*alsó méréshatár*) az a legkisebb koncentráció, vagy anyagmennyiség, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg. A meghatározási határ megfelelő standard minta segítségével állapítható meg. Általában ez az analitikai mérőgörbe legalsó értékelhető pontja. Extrapolációval történő meghatározása nem fogadható el. A meghatározási határ megadásakor fel kell tüntetni az ehhez elfogadott pontossági és precizitási követelményt is. Értékének meghatározásához a vakminta válaszjeléhez tartozó tapasztalati szórás tízszeresével kell számolnunk.

$$J_k = J_{vak} + 10SD_{vak}$$

Zavartűrőképesség (Ruggedness)

- Zavartűrés (eszköz- és környezetállóság) különböző mérési körülmények (laboratóriumok, hőmérséklet, reagens/oldószer minőség, stb. „külső” paraméterek változása) hatása a módszer teljesítményére. A módszer zavartűrését úgy vizsgáljuk, hogy ugyanazt a mintát szándékosan változtatott mérési körülmények között (laboratóriumok, elemző személyek, készülékek, reagensek, elemzési napok, stb.) mérjük és vizsgáljuk a változtatások következményeit. Szokásos számértékkel való kifejezése a reprodukálhatósághoz hasonló, relatív szórás, RSD %. Gyakran a precizitás meghatározása során, annak részeként adják meg.

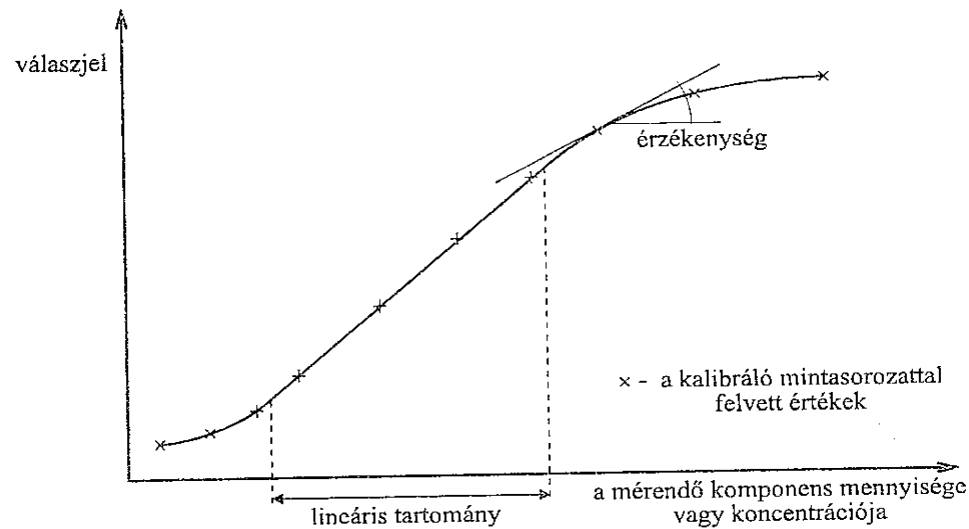
Robosztusság (Robustness)

- A módszer robusztusságát úgy vizsgáljuk, hogy szándékosan változtatjuk kis mértékben a mérési módszer paramétereit (pl. pH, ionerősség, oszlop, áramlási sebesség, stb. „belső” paraméterek) és vizsgáljuk azok következményeit, meghatározzuk hatásukat (ha van), annak szignifikáns voltát. A megállapításokat jegyzőkönyvben dokumentáljuk. A robusztusság vizsgálatát sokszor érdemes a módszer fejlesztésének már a korai szakaszában elvégezni.

Méréstartomány (Range)

- A mennyiségi elemzés céljára a módszer mérésstartományát az alkotókat különböző koncentrációban tartalmazó minták elemzésével, a válaszjel meghatározásával kell megállapítani, amelyre az adott feladatnál kielégítő pontosság és precizitás érhető el.
- Az analitikai mérőgörbét (min 5 pont + vak) az alkotókat különböző koncentrációban tartalmazó minták elemzési eredményeiből regresszióval számíthatjuk ki, általában a legkisebb négyzetek módszerének alkalmazásával.
- A mérés érvényességét csak interpolációval lehet meghatározni.

Kalibrációs görbe



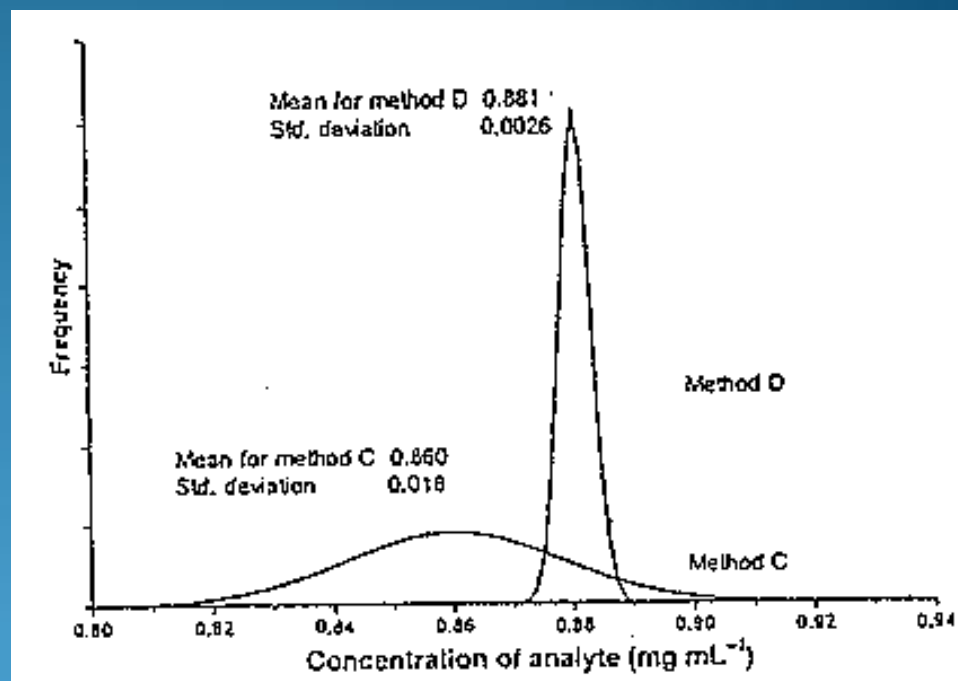
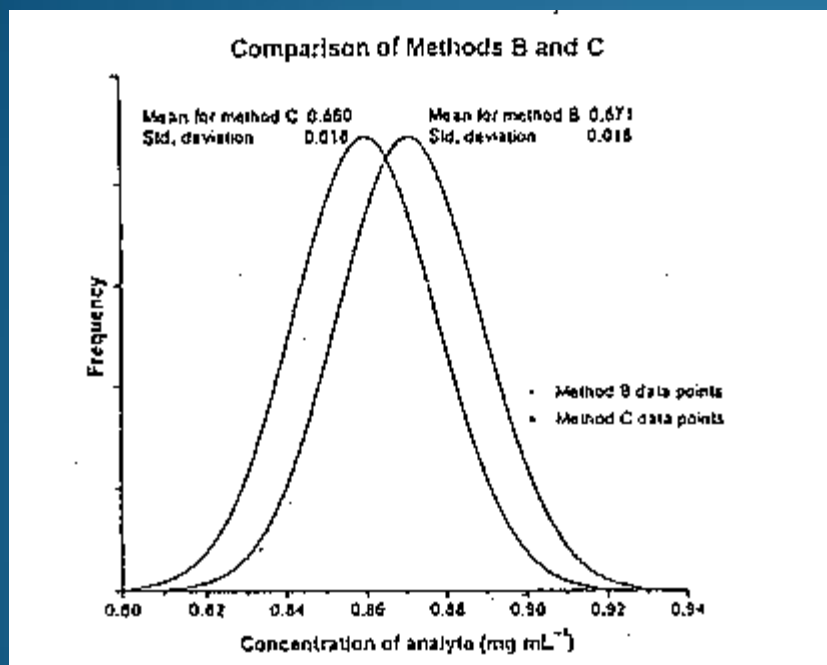
A görbe alján a háttérzaj vagy másodlagos effektusok (pl. adszorpció), a görbe tetején a túltelítés miatt tér el a görbe az egyenestől.

A méréseknél ellenőrizni kell, hogy a lineáris szakaszon vagyunk, ha egyenes görbeillesztést használunk. Hígítással, töményítéssel a minta koncentrációját az egyenes szakaszra vihetjük.

Az eredmények elfogadásának kritériumai

- Az eredményeknek a 95% konfidencia intervallumba (Student eloszlás t értéke, SD) kell esni.
- A szórások elfogadhatóságát több körülmény befolyásolja (pl.mátrix, minta előkészítés, mérési eszköz).
- Ismételhetőséget varianciaanalízissel határozzuk meg (F-próba, t-próba).

Két módszer eredményeinek összehasonlítása



Az F és a t próbák szolgálnak a módszerek összehasonlítására, felcserélhetőségére.

Visszanyerési tényező (Recovery)

- A környezeti mérések során rendszerint nem tudjuk a jelenlévő anyagok teljes koncentrációját mérni (pl. extrakciós veszteség, anyag visszamarad a mátrixban), ezért a visszanyerés határfokát az adott mátrixra és méréstartományra meg kell mérni.

$$R = c_i / c_{ref} 100\%$$

Ahol R , visszanyerés; c_i , mért érték; c_{ref} , várt érték.

A várt értéket irodalmi adatok, vagy a hozzáadott (spike, surrogate standard) anyagok mennyisége adja.

Standard almafafa levél analízis bizonylata

National Institute of Science and Technology Certificate of Analysis

Standard Reference Material 1515 Apple Leaves

Certified Concentrations of Constituent Elements¹

Element	Concentration (wt%)
Calcium	1.526 ± 0.015
Magnesium	0.271 ± 0.008
Nitrogen (total)	2.25 ± 0.19
Phosphorus	0.159 ± 0.011
Potassium	1.61 ± 0.02

Element	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) ²	Element	Concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$) ²
Aluminium	286 ± 9	Mercury	0.044 ± 0.004
Arsenic	0.038 ± 0.007	Molybdenum	0.094 ± 0.013
Barium	49 ± 2	Nickel	0.91 ± 0.12
Boron	27 ± 2	Rubidium	10.2 ± 1.5
Cadmium	0.013 ± 0.002	Selenium	0.050 ± 0.009
Chlorine	579 ± 23	Sodium	24.4 ± 1.2
Copper	5.64 ± 0.24	Strontium	25 ± 2
Iron	83 ± 5	Vanadium	0.26 ± 0.03
Lead	0.470 ± 0.024	Zinc	12.5 ± 0.3
Manganese	54 ± 3		

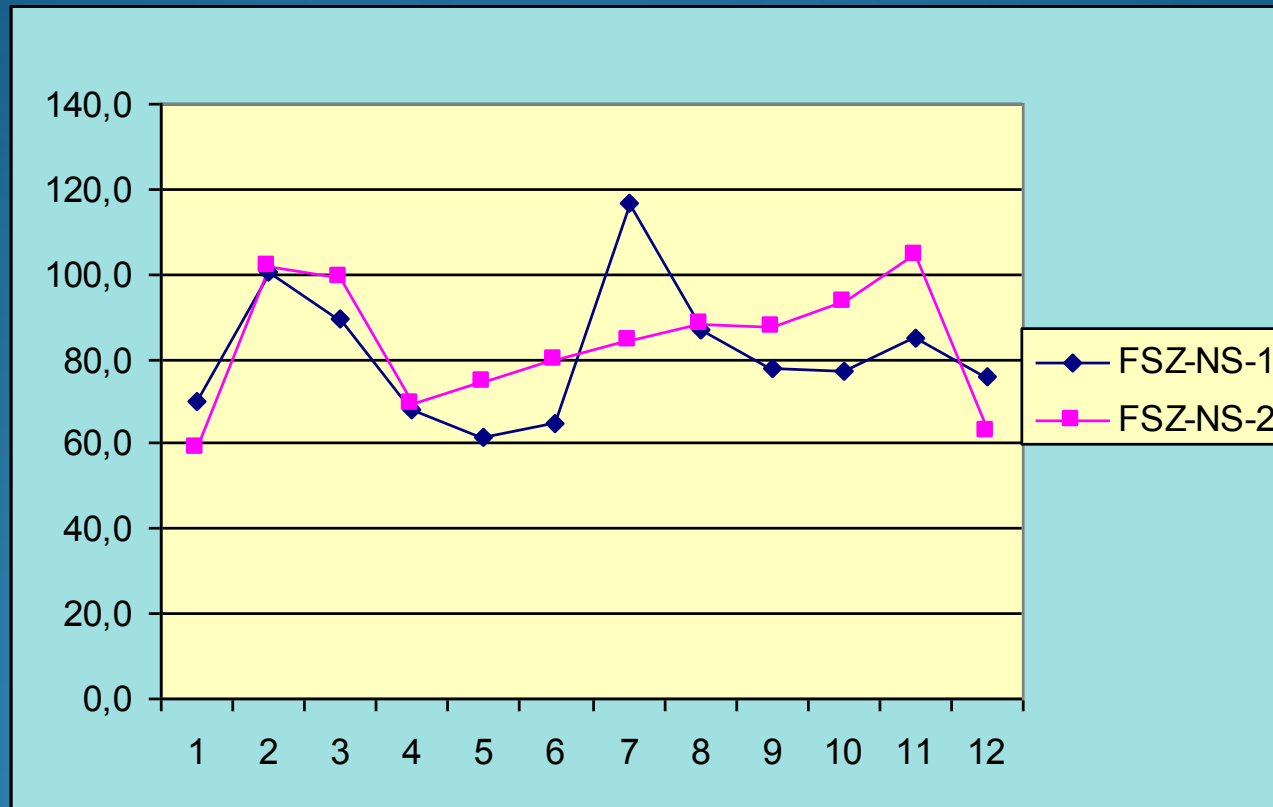
¹The certified concentrations are equally weighted means of results from two or more different analytical methods or the means of results from a single method of known high accuracy.

²The values are based on dry weights. Samples of this SRM must be dried before weighing and analysis by, for example, drying in a desiccator at room temperature (ca. 22°C) for 120 h over fresh anhydrous magnesium perchlorate. The sample depth should not exceed 1 cm.

Környezetvédelmi analitikai szabványok

- Ha meglévő szabványt használunk, akkor csak annak a laborban, mátrixban való alkalmazhatóságát kell vizsgálni.
- Saját, egyedi szabvány esetén teljes validálás szükséges.
- Számos cég a megfelelő ISO tanúsítvánnyal adja termékeit vagy rendszeresen hitelesíti (műszer, vegyszer, standard), amivel a saját hitelesítést meg lehet spórolni.
- Bizonyos hitelesítéseket rendszeresen el kell végezni a mérőnek .

Új szabvánnyal körmérést szoktak végezni bevezetésük előtt



Standard hiba: FSZ-NS-1 minta esetén

4,6 %

FSZ-NS-2 minta esetén

4,3 %