

Универзитет „Св. Кирил и Методиј“
Природно-математички факултет
Институт за хемија
Скопје



УПРАВУВАЊЕ СО КВАЛИТЕТ ВО ХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

Проф. Д-р Горан Стојковиќ,

Институт за хемија, Природно-математички факултет

Научен советник Д-р Елизабета Димитриеска-Стојковиќ,

Институт за храна, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје

Податоци за предметот

Наслов на наставниот предмет	УПРАВУВАЊЕ СО КВАЛИТЕТ ВО ХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА			
Код	ХЕМ-519*, ХМ-719**			
Студиска програма	хемија			
Организатор на студиската програма (единица, односно институт, катедра, оддел)	Природно-математички факултет, Институт за хемија			
Степен (прв, втор, трет циклус)	прв			
Академска година/семестар	V, VII	7.	Број на ЕКТС кредити	4
Наставник	проф. д-р Горан Стојковиќ			
Предуслови за запишување на предметот	*Аналитичка хемија, познавање на програмскиот пакет Microsoft Office Excel, **Примена на компјутери во хемијата, Инструментални аналитички методи			

Цели на предметот

Цели на предметната програма (компетенции):

Овој курс го запознава студентот со нормите на добра лабораториска пракса (GLP) и нивна имплементација, согласно Стандардот ISO 17025, во хемиска лабораторија за тестирање. Студентот ќе научи за основите на воведување и валидација на аналитички методи, контрола на квалитетот во хемиски лаборатории за тестирање преку употреба на повеќе алатки (употреба на контролен примерок, Shewart-ов дијаграм, учество во меѓулабораториски споредби, обезбедување следливост во тестирањето). Знаењата стекнати во овој предмет му овозможуваат на студентот да ја разбере филозофијата на акредитацијата на лабораторија за тестирање и успешно спроведување на нејзините основни принципи во пракса.

Оценување

Методи на учење:			
Вкупен расположив фонд на време		140	
Распределба на расположивото време			
Форми на наставните активности	15.1	Предавања-теориска настава	часови 30
	15.2	Вежби (лабораториски , аудиториски), семинари, тимска работа	часови 30
Други форми на активности	16.1	Проектни задачи	Часови 15
	16.2	Самостојни задачи	часови 15
	16.3	Домашно учење	Часови 50
Начин на оценување			
17.1.	Тестови (2 парцијални испити + испит–задачи во Excel = 2x35 + 10)	бодови 80	
17.2.	Семинарска работа/проект (презентација:писмена и усна)		
17.3.	Активност и учество	бодови 20	
Критериуми за оценување (бодови/оценка)		до 50 бода	5 (пет) (F)
		од 51 до 60 бода	6 (шест) (E)
		од 61 до 70 бода	7 (седум) (D)
		од 71 до 80 бода	8 (осум) (C)
		од 81 до 90 бода	9 (девет) (B)
		од 91 до 100 бода	10 (десет) (A)
Услови за потпис и полагање на завршен испит		редовност	
Јазик на кој се изведува наставата		македонски	
Метод на следење на квалитетот на наставата			

Литература

Литература					
Задолжителна литература					
22.1	Ред.број	Автор	Наслов	Издавач	Година
	1.	Горан Стојковиќ, Елизабета Димитриеска- Стојковиќ	Предавања - интерна скрипта		2019
	2.	Werner Funk, Vera Dammann, Gerhild Donnevert	Quality Assurance in Analytical Chemistry	WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany	2007.
	3.				
22.2	Дополнителна литература				
	Ред.број	Автор	Наслов	Издавач	Година
	1.	D. Brynn Hibbert	Quality assurance for the analytical chemistry laboratory,	Oxford University Press, Inc., New York, New York, USA,	2007
	2.	Roger Wood, Anders Nilsson, Harriet Wallin	Quality in the Food Analysis Laboratory	The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK	1998
	3.				

Што ќе учиме(те)?

- **Метрологија - следливост во метрологијата**
- **Калибрација на лабораториска опрема** (вага, мензура, одмерна колба, микропипетор) ----->вежби
- **Аналитички процес - метод**
- **Валидација на методи** (Видови на валидација, Стандардна оперативна процедура -СОП, Основни параметри на валидација)
- **Вежби во Excel** – калибрациона права, точност, прецизност, ...
- **Добра лабораториска пракса**
- **Систем, обезбедување и контрола на квалитетот во лабораторија**
- **Алатки за контрола на квалитетот во лабораторијата (контролни дијаграми)**
- **Мерна неодреденост (главни причини за мерна неодреденост, типови и проценка на мерна неодреденост)**
- **Вежби во Excel** – конструирање на калибрациона права, процена на содржина на аналитот во пробата, придружена со процена на проширена мерната неодреденост
- **МКС EN ISO/IEC 17025: 2018**



1. Метрологија. Следливост во метрологијата

Метрологија

- Метрологија – неодвоив дел од општество (трговија, сообраќај, градежништво, земјоделие, здравство, лекови,наука)
- Наука – во целост зависна од мерењето
- - употреба на заеднички мерни единици и мерни постапки
- - признавање, акредитација и испитување на мерни еталони
- Зголемување на свеста за метрологијата
- Воспоставување на национални метролошки системи (заеднички метролошки систем во ЕУ, и на ЕУ со остатокот од светот)
- Метрологија – стандарди – историја:
 - Пред 3000 год. – Египет, фараони – кралевски лакат
 - 1799 – метричен систем – два платински еталони за метар и килограм ($\Rightarrow$ SI)

Метрологија - задачи

- Метрологија е наука за мерење
- Метрологија има три главни задачи:
 1. **дефинирање на меѓународно прифатени мерни единици** (нпр. метар)
 1. **остварување – репродукција на мерни единици** со научни методи (пример – репродукција на метар со користење на ласери)
 2. **утврдување на непрекинат ланец на следливост** во одредувањето и документирање на точноста на мерење и пренесување на сознанијата (нпр. документирана врска помеѓу микрометарска завртка во калибрациона лабораторија и примарна лабораторија за оптичка метрологија на должина)

Категории на метрологија

- **Метрологија на ЕУ** е поделена во **три категории** со различни нивоа на сложеност и точност:
 1. **Научна метрологија** – организацијата и развој на стандардите за мерење (еталони) и нивното одржување (**највисоко ниво**).
 2. **Индустриска метрологија** – треба да обезбеди соодветно функционирање на инструменти што се користат во индустриски и производствени процеси и тестирање.
 3. **Законска метрологија** - се занимава со точноста на мерења, каде што тие влијаат на транспарентноста на економски трансакции, здравјето и безбедноста.

Индустриска и научна метрологија

- Метролошки активности, тестови и мерења се важни за функционирање на квалитет во многу индустриски сектори.
- За ова е потребна **следливост**, која станува подеднакво важна како и само мерење.
- Признавање на метролошка меродавност на секое ниво во ланецот на следливост се воспоставува со договори или аранжмани на меѓусебно признавање, нпр:
 - *на пример: CIPM, MRA*

Индустриска и научна метрологија

- CIPM (International Committee for Weights and Measures -
Меѓународен комитет за тегови и мери)
<https://www.bipm.org/en/committees/ci/cipm>
- MRA (*Mutual Recognition Arrangement*-
Аранжман за меѓусебно признавање)
- ILAC (*International Laboratory Accreditation Cooperation*) (<http://ilac.org/about-ilac/>)

Индустриска и научна метрологија

- ILAC е меѓународна организација за соработка на лабораториски и инспекциски тела за акредитација формирана со цел да помогне во отстранување на техничките бариери во меѓународната трговија.
- ILAC MRA е позната како Меѓународната акредитација на лаборатории (ILAC) и е формирана со цел унапредување на меѓународната соработка за олеснување на трговијата преку унапредување на меѓународното признавање на акредитирани лаборатории и резултати од калибрација,
- аранжманот на ILAC заемно признавање (MRA) (често се нарекува како ILAC аранжман) со цел да се промовира меѓународното признавање на резултати од техничко тестирање и калибрација за извезената стока што резултира во "производи тестирани еднаш, и прифатени насекаде".

Индустриска и научна метрологија

ILAC е меѓународна организација за тела за акредитација која работи во согласност со ISO/IEC 17011 и е вклучена во акредитација на:

- тела за оцена на сообразност* вклучувајќи лаборатории за калибрација (со користење на ISO/IEC 17025),
- лаборатории за тестирање (со користење ISO/IEC 17025),
- лаборатории за медицински тестирања (со користење на ISO 15189),
- инспекциски тела (со користење на ISO/IEC 17020),
- даватели на услуги за тестови за оспособеност - proficiency тестови (со користење на ISO/IEC 17043) и
- производители на референтни материјали (со користење на ISO 17034).

***сообразност** — значи дека производот, услугата или системот ги исполнуваат специфични барања.

Научна метрологија

BIPM - Bureau International des Poids and Mesures

- Научна метрологија на BIPM (Bureau International des Poids and Mesures = Меѓународно биро за тегови и мери) е поделена во девет технички области:
 1. маса,
 2. електрична енергија,
 3. должината,
 4. времето и магнетизам,
 5. јонизирачко зрачење и радиоактивност,
 6. фотометрија и радиометрија,
 7. проток,
 8. акустика и
 9. количеството на супстанцијата.

Област, подрачје и мерни еталони - примери

област	подрачје	Мерни еталон
Маса и сродни величини	Мерење на маса	Стандарди за маса, Стандарди за баланс-ваги,
	Волумен , вискозитет	Стаклени аерометри, лабораториски садови, Дензиметри, Вискозиметри,
Должина	Бранова должина и интерферометрија	Стабилизаторски ласер, Интерферометри, Ласерски интерферометриски мерни системи
	Димензионална метрологија	Мерни плочки, линиска скала, мерни микроскопи, оптички стандарди
Количество супстанца	Екологија, клиничка хемија	Сертифициран референтен маеријал
	Хемија на материјали	Чисти материјали, Сертифициран референтен маеријал
	Хемија на храна Микробиологија, рН мерења	Сертифициран референтен маеријал

Мерни стандарди - еталони

- Мерен стандард е мерка, мерен инструмент, референтен материјал или мерен систем наменет за определување, достигнување, чување или обновување на мерна единица или на една или повеќе вредности на некоја величина за да бидат во можност да послужат како референца.

Пример: метар

- Метар се дефинира како пат кој го поминува светлина во вакуум за време на движење од $1/299\,792\,458\text{ s}$.
- На примарно ниво, метар се дефинира (обновува-репродуцира) преку бранова должина на, со јод стабилизирани, хелиум-неонски ласер.
- На пониски нивоа, се користат материјални мерки (мерни блокови), и следливост се обезбедува со помош на оптичка интерферометрија, преку која се одредува должината на мера со доведување во врска со бранова должина на горенаведената ласерска светлина.

Definitions of the metre since 1795^[99]

Basis of definition	Date	Absolute uncertainty	Relative uncertainty
$\frac{1}{10\,000\,000}$ part of the quadrant along the meridian , measurement by Delambre and Méchain (443.296 lines)	1795	500–100 μm	10^{-4}
First prototype Mètre des Archives platinum bar standard	1799	50–10 μm	10^{-5}
Platinum-iridium bar at melting point of ice (1st CGPM)	1889	0.2–0.1 μm (200–100 nm)	10^{-7}
Platinum-iridium bar at melting point of ice, atmospheric pressure, supported by two rollers (7th CGPM)	1927	n.a.	n.a.
Hyperfine atomic transition; 1 650 763.73 wavelengths of light from a specified transition in krypton-86 (11th CGPM)	1960	4 nm	4×10^{-9} ^[100]
Length of the path travelled by light in a vacuum in $\frac{1}{299\,792\,458}$ second (17th CGPM)	1983	0.1 nm	10^{-10}

Сертифициран референтен материјал

- Сертифициран референтен материјал, кој во САД е наречен стандарден референтен материјал, е референтен материјал со приложен сертификат, за кој една или повеќе вредности на некое својство се потврдени со постапка со која се воспоставува следливост во однос на точна вредност на мерна единица со која се изразува величина на тоа својство, при што секоја вредност е проследена со мерна несигурност за определено ниво на веројатност.

Референтен материјал

- Материјал, доволно хомоген и стабилен во однос на една или повеќе специфицирани својства, за кој е утврдено дека е погоден за неговата намена во процесот на мерење.

Сертифициран референтен материјал

- Референтен материјал кој се карактеризира со метролошки валидна процедура за едно или повеќе специфицирани својства, придружена со сертификат кој ја дава вредноста на наведеното својство, неговата поврзана несигурност и изјава за метролошка следливост.

Видови референтен материјал

- ILAC ги опишува следните пет типа референтен материјал:
 1. **Чисти материи**; суштински чисти хемикалии, кои се карактеризираат по хемиска чистота и/или нечистотии во трагови.
 2. **Стандардни раствори и гасни смеси**, често подготвени гравиметриски од чисти материи.
 3. **Матрични референтни материјали**, карактеристични за составот на одредени главни, минорни или хемиски состојки во трагови. Таквите материјали може да се подготват од матрици кои ги содржат компонентите од интерес или со подготовка на синтетички смеси.
 4. **Физичко-хемиски референтни материјали**, карактеристични за својства како точка на топење, вискозност или оптичка густина.
 5. **Референтни предмети или артефакти**, карактеристични за функционални својства како што се вкус, мирис, октански број, точка на палење и цврстина. Овој тип вклучува и микроскопски примероци кои се карактеризираат со својства кои се движат од тип на влакна до микробиолошки примероци.

Сертифициран референтен материјал

- Сертифицирани референтни материјали обично се подготвени во групи за кои вредности на својствата се одредуваат (во рамките на дефинирани граници на несигурност) преку мерења на примероци репрезентативни за цела група.

prMKТИ CEN/TR 10317:2013 (CEN/TR 10317:2013, IDT) (ен) (уин)

Европски сертифицирани референтни материјали (EURONORM-CRMs) за определување на хемискиот состав на железни и челични производи подготвени под надзор на Европскиот комитет за стандардизација за железо и челик

European certified reference materials (EURONORM-CRMs) for the determination of the chemical composition of iron and steel products prepared under the auspices of the European Committee for Iron and Steel Standardization (ECISS)

ICS: 77.150.10, 71.040.30

Naturally Contaminated Certified Reference Material Certificate of Analysis



Description of the Certified Reference Material (CRM)

Name	Naturally contaminated ochratoxin A in wheat
Product Code	TCRM-M1612-100
Batch Code	121202(15.7B)
Expiration date	February 1, 2023
Quantity	100g
Storage	≤ 8° C
Physical description of RM	Finely ground wheat naturally contaminated with ochratoxin A
Packaging	Zippered sealed foil pack

Certified values and uncertainties

Compound	Mass Concentration	
	Certified Value	*Uncertainty
Ochratoxin A	15.7 µg/kg	± 7.7 µg/kg
* Expanded uncertainty at a 95% confidence level (k = 2). All calculations of expanded uncertainty are based on the criteria outlined in the JCGM 100:2008; Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement.		

Metrological traceability

The corresponding parameters for this naturally contaminated material are assigned value based on results from multiple methods. All equipment calibrations are performed using Certified Reference Materials. Measurements utilized for value assignment of the certified value are traceable to SI units through an unbroken chain providing metrological traceability.

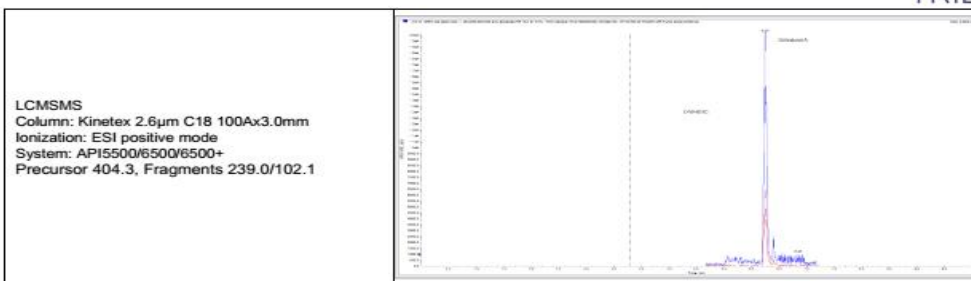
Julie Brunkhorst – VP of the Technical Division

April 23, 2019



This CoA verifies the reference material passes the required specifications and is released for sale. This Certified Reference Material is produced and certified under the Trilogy Analytical Laboratory ISO 17034:2016 scope of accreditation. This certificate has been electronically signed.

Method of analyte verification



Method reference for characterization

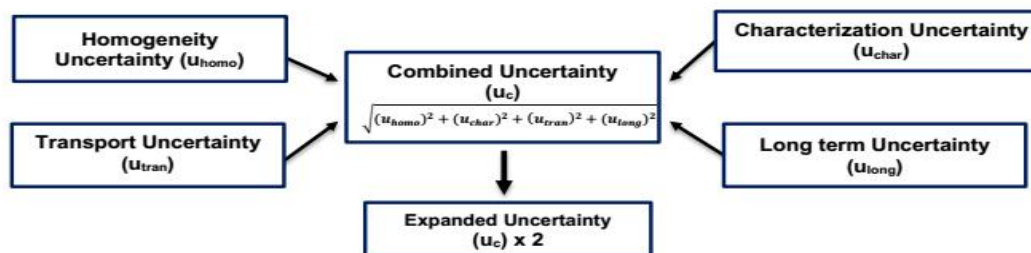
AOAC 2000.03 Modified, Technology: LC-MS/MS

LC-MS/MS using stable isotope labeled internal standards, Technology: LC-MS/MS

In-house method Li, Wei; Herrman, Tim J.; Dai, Susie Y. Determination of Aflatoxins in Animal Feeds by Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry with isotope dilution, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011, 25, 1222-30. Li, Wei; Herrman, Tim J.; Dai, Susie Y. Rapid Determination of Fumonisin in Corn-based Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, The Journal of AOAC International, 2010, 93(5): 1472-81., Technology: LC-MS/MS

Measurement of uncertainty

All calculations of expanded uncertainty ($k = 2$) are based on the criteria outlined in the ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM). Expanded combined uncertainty, which is calculated and presented for all Naturally Contaminated Certified Reference Materials, represents an estimated range of confidence equal to the root sum squared of all total inherent variance of pertinent components expanded with a coverage factor providing 95% confidence ($k = 2$).



*Uncertainty from transport stability and long-term stability have been evaluated and are considered negligible.



General information

This material represents a food/feed agricultural product commonly contaminated with mycotoxins. It has been ground to a fine consistency (30 mesh; 0.595 mm) and thoroughly homogenized to ensure uniform distribution of the analyte(s). Samples are analyzed numerous times by multiple methods over the course of several analytical runs utilizing the reference methods listed above. The assigned value(s) come from the robust statistical means of the technically evaluated results. This data is corrected for recovery loss which represents the best estimate of the true value.

Intended use of the Naturally Contaminated Certified Reference Materials (CRM)

Naturally contaminated Certified Reference Materials can be used for laboratory quality control, training tools, method comparisons, method validations, intra laboratory comparisons, inter laboratory comparisons, method bias indicators, verification of laboratory performance and method troubleshooting by HPLC, GC, MS, MSMS, or TLC.

Instructions for use

Allow material to come to room temperature before use to prevent moisture condensation in packet. Samples should be sealed promptly and returned to recommended storage conditions after use.

Homogeneity and stability

Homogeneity and stability are verified through extensive studies performed at Trilogy Analytical Laboratory. Homogeneity was verified using a sample size of 5g. A recommended minimum sample for use is $\geq 5g$ for extraction to ensure a representative sample. All variability of assigned values attributed from heterogeneity is included in the measurement of uncertainty. Naturally contaminated Certified Reference Material stabilities, stored under proper conditions, are verified through short term (transportation) stability studies, long term stability studies and stability monitoring.

Safety precautions

Good laboratory practices should be observed while handling all Trilogy Reference Materials. Follow the recommended precautionary measures (OSHA 29 CFR 1910.1450) for handling chemicals and powders. Avoid contact with eyes, skin, and clothing. Use adequate general or local exhaust ventilation to keep airborne concentrations below the permissible exposure limits. This product is for laboratory use only and is not intended for animal or human consumption. For specific product Safety Data Sheets contact Trilogy Analytical Laboratory.

Further information

Trilogy naturally contaminated Certified Reference Materials are for laboratory use only. Trilogy does not make any warranties, expressed or implied, in connection to reference materials, other than that the product meets the quality control specifications at Trilogy Analytical Laboratory. Trilogy naturally contaminated Certified Reference Materials are to be used at the purchaser's discretion. In no way does Trilogy accept responsibility for the use or work performed by the purchaser.

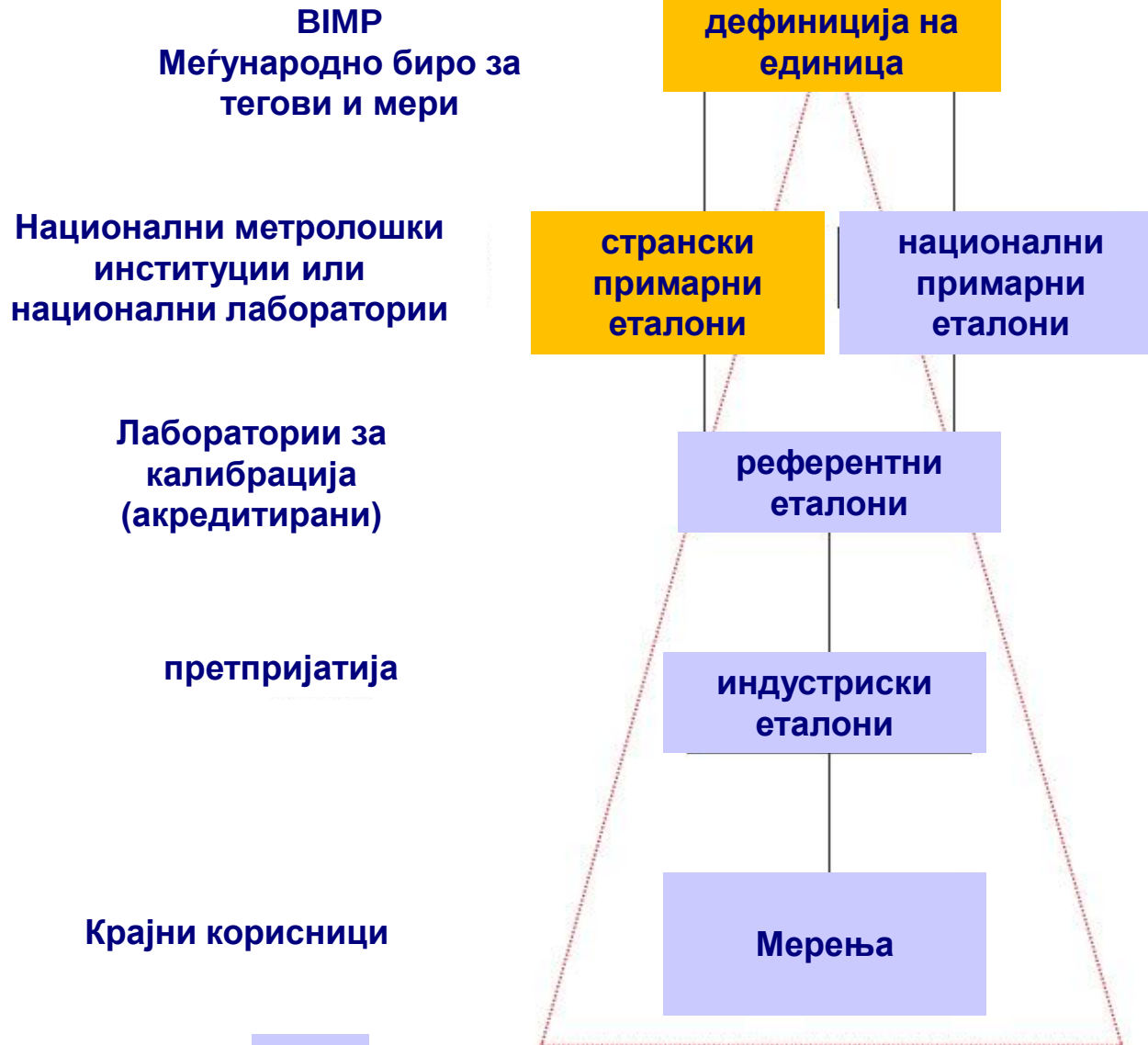
CRM – за што се користат?

- Сертифицираните референтни материјали (CRM) претставуваат „контрола“ т.е. стандарди кои се користат за:
 1. проверка на квалитетот и метролошката следливост на производите,
 2. за потврдување на аналитичките методи на мерење или
 3. за калибрација на инструментите.

Следливост и калибрација

- Ланец на следливост е непрекината низа на споредби кои мора да бидат извршени како би се осигурало дека резултатот од мерењето или вредност на еталонот е поврзан со референтен еталон на повисоко ниво (во ланецот), кои на крајот завршуваат со примарен еталон (стандард).
- Во хемија и биологија следливост често се воспоставува со користење на сертифицирани референтни материјали и референтни постапки.
- Крајниот корисник може да постигне следливост наназад до највисокото меѓународно ниво директно од национални институти за метрологија или од лаборатории за калибрација.
- Како резултат на различни договори за меѓусебно признавање, следливост може да се постигне и преку лабораторијата од друга држава.

Ланец на следливост



Несигурност расте кон пониски нивоа на следливост

Национална метролошка инфраструктура

КАЛИБРАЦИЈА НА АНАЛИТИЧКА ОПРЕМА И ЛАБОРАТОРИСКО СТАКЛО

- Вага
- Волуметриски прибор:
- Одмерни колби (класа А и В)
- Мензури
- Пипети (градуирани, одмерни, микропипети)

Правилната употреба и ракување со аналитички ваги

Аналитички ваги се инструменти со висока резолуција, чија што точноста не зависи единствено од самата вага, но исто така и од:

- условите на средина во која таа се наоѓа, како и
- од предмети (тегови на пример.) кои се користат за мерење на опрема, контрола и тестирање на вагата,
- видови на материјал т.е. примероци кои се вагаат,
- како и од самото ракување со вагата.



Нестабилни отчитувања или неповторливи мерења
може да бидат предизвикани од низа **фактори**:

- промените во температурата,
 - ефектот на испарување,
 - статички електрицитет,
 - магнетизам и др.
-
- многу е важно да се разберат и да се идентификуваат фактори кои влијаат на резултатите на мерењето, односно
 - **да се обезбедат такви услови, кои ќе дадат точни и прецизни резултати на мерење.**

Местото на инсталација

- треба да се избегнуваат или минимизираат структурни вибрации и вибрации предизвикани од други уреди, инструменти и сл.
- вага се поставува на маса во аголот на собата, бидејќи тоа е најстабилно место
- се избегнува место изложено на директна сончева светлина
- вага не се става на јужната страна од просторијата
- оптимални карактеристики на просторија - засенчени прозорци и само една врата
- климатизација се подесува на минимум проток на воздух (важно е дека нема директно струење на воздух кон вагата)
- се избегнува место во близина на радијатори и светилки
- собна температура мора да биде постојана (на пример, $21\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) , при што треба да се обрне внимание на пропишаниот температурен опсег од производителот

маса за вага

- потребно е да се избегне преносот на вибрации преку сидови и подови
- најдобро - антивибрациска маса за вага
- Работна површината која не го допира сидот
- Сиден носач
- Површината на која се наоѓа вага не треба да се користи за други операции

Како се инсталира вага ?

- Прво
- се поврзува потребен хардвер за пренос на излезни податоци излез, а потоа се вклучува во струја
- По најмалку еден ден, вага ќе се аклиматизира, и се постигнува стабилна работна температура
- Вага потоа не смее да се поместува
- За да се избегне повторно аклиматизирање, не се исклучува од електричната мрежа
- т.е. се остави во "стенд-бај"
- Се врши калибрирање доколку е потребно,
- Се подесува рамнотежата (се нивелира) пред секое мерење.

влага

- Релативната влажност на самото место треба да биде помеѓу 45% и 60%
- промени во влажноста можат да влијаат и на тегови и на примероци
- Ако влажноста е премногу ниска, може да се појави статички електрицитет
- и тогаш е препорачливо да се користат инструменти за отстранување на статички електрицитет
- Ако влажноста е доста висока, би требало да се превземат соодветни мерки да не дојде до кондензација.

Работа со вага

Нивелирање на вага

- Само правилно нивелирана вага ќе даде веродостојни резултати
- Вага се нивелитра со прилагодување на нозете на вагата при што воздушни меури мора да бидат во рамките на кружни индикатори (идеално, во средината)
- По усогласување на вагата се прави калибрација / прилагодување.

Калибрација

- Целта на калибрација е да се идентификуваат, проценат и намалат отстапувањата кои можат (и се јавуваат) во текот на работа со вага
- Отстапувања на осетливоста и опсегот треба да се утврдуваат во редовни интервали (на пр., еднаш дневно, неделно) со тегови за калибрација.

Работа со вага

- **Калибрација** = утврдување на разликата помеѓу номиналната и вистинската вредност на тегот
- Ако се надминат границите на толеранција, треба да се постави точен опсег.
- Прилагодување = да се намалат или елиминираат разлики утврдени со калибрација
- Секој пат кога ќе се смени состојбата на средина (температура, влажност на воздух и др.) или кога вагата се нивелира => неопходно е да се изврши калибрација
- Кога е активна функцијата "isoCAL", вага автоматски се калибрира со цел да биде поточна.
- **важно:**
е да се проучи/прочита граница на толеранција на теговите за калибрација.
На пример, за теговите од класа E2, дозволените граници на толеранција, т.е. отстапувањата, за тег од 200 g се $\pm 0,30$ mg.

Примероци и посуди за вагање

- Пред да се започне со вагање , и примерокот и посуда за вагање треба да се аклиматизираат, т.е. да се прилагодат на околна температура.
- Секогаш се користат најмали можни посуди за вагање.
- Пластични материјали можат да предизвикаат статички електрицитет (со мала влажност, истиот проблем постои и со стаклени посуди).
- Никогаш не се допираат примероците ниту посуди за примероци со голи прсти (треба да се избегнува оставање отпечатоци од прсти – тие се хигроскопни)
- Треба по правило да се носат ракавици или да се користат антимагнетни пинцети.
- Да се избегнуваат температурни промени; температурни промени може да предизвикаат нестабилни отчитувања:
- Ако предметот е топол, прикажани вредности ќе бидат пониски; ако е ладен, вредности ќе биде повисоки.
- Посуда за вагање секогаш се поставува на централниот дел од мерната површина, т.е. на средината на тасот

Процедура на вагање

- Внимателно ракување, односно правилно вагање, ја подобрува точноста
- Клизните врати на вагат секогаш треба да бидат затворени при читање на резултатот.
- Се става посуда
- Се стиска копчето “tare”
- Се става посуда со примерокот и
- Се отчитува резултат од вагањето
- Доколку се вагаат повеќе примероци - повторувања, би требало отчитувањата да се прават во правилни временски размаци
- Евентуално истурени течни супстанции се отстрануваат со вливлива крпа

Одржување на вагата

- Комората за мерење како и мерна површина мора секогаш да бидат чисти.
- За чистење се користи мека четка или рачна правосмукалка за да се отстранат делови од мостри
- Ако е потребно, се вади и мерна површина (тасот)
- Евентуално истурени течни супстанции се отстрануваат со впитлива крпа.

Како примерок влијае на резултатите ?

- Аналитички ваги, особено семимикро-, микро и ултра-микро ваги реагираат и на најмали промени на средината
- И несакани промени во физичките параметри, предизвикани од примерокот и/или посуда за вагање, исто така влијаат на резултатите
- Можни причини се, на пример:
 - посуда или примерок не се прилагодени на температурата на околината
 - примерокот е хигроскопен или лесно испарлив
 - посуда или примерок имаат статички електрицитет
 - посуда или примерок покажуваат магнетни својства
 - гравитационото забрзување
 - густина на примерокот
 - струење на воздух

Калибрацијата и верификацијата на ваги

- Калибрацијата и верификацијата на вагите може да ја врши само вработено лице и негов заменик кои се обучени за оваа процедура, поседуваат уверение за техничка обука и овластување од раководно лице.

Потребни материјали

- ИСО 17025 калибрирани референтни тегови
- ИСО 17025 сертификат за калибрација на референтни тегови.

Постапка

- **ИСО 17025 калибрирани референтни тегови**
- Калибрацијата и верификацијата на сите ваги се врши со помош на калибрирани референтни тегови набавени од лабораторија за калибрирање на тегови, акредитирана по ИСО 17025 стандардот.

Фреквенција на калибрирање

Надворешна калибрација на ИСО 17025 калибрирани референтни тегови

- При испраќање на теговите за калибрирање во референтна лабораторија и при одобрување на вратените калибрирани тегови, треба да се почитуваат упатствата од соодветна процедура.
- Референтните тегови се калибрираат на секои 2-5 години, освен ако не е наведено поинаку.
- Ако некој од калибрираните референтни тегови на било кој начин биде оштетен, или падне, тогаш тој повторно треба да биде калибриран.

Надворешна калибрација на ваги

- Добавувачот на вагата или квалификуван сервис, според Годишниот план за сервисирање, се должни да ја калибрираат истата со помош на свои ИСО 17025 калибрирани референтни тегови. Калибрирањето се врши **еднаш годишно**.

Внатрешна калибрација на ваги

- Сите ваги се калибрираат со ИСО 17025 калибрирани референтни тегови во зависност од нивната употреба, барањата на процедурите (СОП), кога при верификацијата има отстапување, после секоја поправка или после преместување на вагата на друга локација.

Верификација на ваги

- Сите ваги се верифицираат **еднаш неделно** со помош на ИСО 17025 калибрирани референтни тегови.

Подготовка на вагата за калибрација

- Пред да се започне со калибрирање на вагата, треба да се провери дали на неа има остатоци од некои супстанции, и ако има, тие треба да бидат отстранети.
- Вагата мора да биде поставена на рамна и стабилна подлога, на место каде нема струење на воздухот, вибрации и температурни варијации.
- Со теговите се ракува со помош на соодветна пинцета.

Калибрација на вагата која е во употреба

- Се вклучува вагата
- Се притиска копчето за тарирање на вагата и се чека на дисплејот да се појави нула.
- Ако е потребно, повторно се тарира.
- Се поставува тегот на средина на вагата.
- Се чека вредноста на дисплејот да се стабилизира и се запишува испишаната вредност.
- Постапката се повторува 6 пати со 3 тегови со различни тежини кои се со
 - (1) маса блиску до минималната,
 - (2) максималната тежина и
 - (3) најчесто користената / средна тежина во рамките на мерниот опсег.
- Секоја вага има свој единствен ИД број и мерен опсег.
- пр. $1,000 \pm 0,010 \text{ g}$
- $0,100 \pm 0,005 \text{ g}$
-
- Калибрираните тегови треба да бидат во рамките на **+/- 0,5%** од калибрираната тежина.
- Одлуката за тоа дали сите ваги одговараат или не одговараат на гореспоменатите препораки ја донесува раководителот на лабораторија и го пополнува соодветното поле во Формуларот за калибрација на вагите.

Подготовка на вага за верификација

- Пред да се започне со верификација на вагата, треба да се провери на неа да нема некои остатоци од течности или други материи, а ако има, тие треба да бидат отстранети.
- Вагата мора да биде поставена на рамна и стабилна подлога, на место каде нема струење на воздухот, вибрации и температурни варијации.
- Со теговите се ракува со помош на пинцета која е обезбедена од доставувачот.

Верификација на вага која е во употреба

- Се вклучува вагата
- Се притиска копчето за тарирање на вагата и се чека на дисплејот да се појави нула.
- Ако е потребно, повторно се тарира.
- Се поставува тегот на средина на вагата.
- Се чека вредноста на дисплејот да се стабилизира и се запишува испишаната вредност.
- Постапката се повторува 3 пати со 2 тега кои се со маса
 - (1) блиску до најчесто користената
 - (2) минимална и
 - (3) максимална тежина во рамките на мерниот опсег.
- Секоја вага има свој единствен ИД број и мерен опсег.
 - пр. $1,000 \pm 0,010 \text{ g}$
 - $0,100 \pm 0,005 \text{ g}$
 -
- Калибрираните тегови треба да бидат во рамките на **+/- 0,5%** од калибрираната тежина.
- Одлуката за тоа дали сите ваги одговараат или не одговараат на гореспоменатите препораки ја донесува верификувачот и го пополнува соодветното поле во Формуларот за верификација на вагите.

Внесување на податоците во формуларите за калибрација / верификација на ваги

- Секоја вага има свој формулар за калибрација, кој е составен дел од процедура за калибрација.
- Секоја вага има свој формулар за верификација кој е прикачен кон процедура за верификација.

Корективни мерки при отстапувања

- Одговорното лице за процедура ја пријавува **неисправната вага** со пополнување на соодветен формулар.
- Неисправните ваги се обележуваат со знак **НАДВОР ОД УПОТРЕБА**, и се постапува според соодветна процедура за одржување на опрема.

Калибрирање на пипетори

Клипните пипетори можат да бидат со:

- - **фиксен волумен**, одреден од производителот, со кој може да се дистрибуира само еден одреден номинален волумен на точност, на пр. 100 μl ;
- - **варијабилен волумен**, одреден од производителот, со кои во зависност од потребите на корисникот, можат да се дистрибуираат различни количини во рамките на волуменскиот опсег, на пр. од 10 μl до 100 μl .
- **Номинален волумен** е волумен одреден од страна на производителот кој се користи за идентификација и дефинирање на мерниот опсег или за одредување на максималниот волумен кој корисникот може да го одбере (само кај пипеторите).
- **Калибрација** е збир на постапки со кои се воспоставува врска помеѓу дистрибуираниот волумен и соодветниот номинален или одбран волумен на апаратот.
- **Точност** претставува блискост на усогласеност помеѓу резултатот од тестот и прифатената референтна вредност.
- **Прецизност** претставува блискост на усогласеност помеѓу независни тест резултати добиени во одредени / наведени услови.

Кој може да врши калибрација?

- Калибрацијата може да ја врши обучено вработено лице и негов заменик, кои добиле:
- екстерна или интерна обука и
- поседуваат Уверение за техничка обука и
- овластување од раководно лице во институцијата каде работат

Потребни материјали

- Калибриран термометар според соодветна процедура
- Стандардни референтни тегови со сертификат за калибрација според ИСО 17025 стандардот
- Калибрирана аналитичка вага со 5 децимали, со сертификат за калибрација според ИСО 17025 стандардот и според соодветна процедура
- Калибрирана аналитичка вага со 4 децимали, со сертификат за калибрација според ИСО 17025 стандардот и според соодветна процедура
- Точноста на аналитичките ваги треба да биде во согласност со барањата наведени во ИСО 8655-6:2000
- Дестилирана (ДС) или дејонизирана (ДЈ) вода (ИСО 3696)
- Сад за чување на водата
- Сад за мерење (што не апсорбира течност)
- Продолжетоци (врвови) за пипетор
- Соодветен формулар .

Динамиката на калибрација

- Динамиката на калибрација се изведува редовно и зависи од фреквенцијата и начинот на користење.
- нпр. пипеторите се калибрираат 3 пати годишно.
- Или - се калибрираат после секој период на интензивна употреба, во зависност од динамиката на работа, но најмалку 2 пати годишно.
- Раководно лице на институцијата го донесува **Годишниот калибрациски план.**

Работни услови

Пред започнување на калибрацијата треба да се обезбедат следниве услови во работната просторија:

- константна температура од 15- 30⁰ C,
- под претпоставка дека релативната влажност и промените на атмосферскиот притисок се такви да имаат само многу ограничено влијание кон мерната неодреденост (релативна влажност над 50% и атмосферски притисок од 1013 ± 25 hPa).
- Не смее да се калибрира вон овие граници.
- Треба да бидат забележани вредностите за густината на водата или температурата на водата.
- Целата опрема која се користи при калибрирањето треба да биде поставена во стабилна контролирана просторија каде се врши калибрација најмалку два часа пред почетокот на калибрацијата.

Одредување на мерниот волумен

- Кај пипеторите со **фиксен волумен** тестираниот волумен е истовремено и номинален волумен.
- Мерењето треба да се повтори 10 (десет) пати.
- Кај пипеторите со **варијабилен волумен** треба да се тестираат три различни волумени:
- најмалиот, најголемиот и средниот волумен (средината од горните два волумена). За секој тестиран волумен мерењето треба да се повтори 10 (десет) пати.
- Кај **мултиканалните пипетори** со варијабилен волумен се тестираат средниот канал:
 - канал број 4 кај 8 каналните пипетори и
 - канал број 6 кај 12 каналните пипетори).



Калибрирање на пипетори

- ПОДГОТОВКА

Подготовката за калибрација се состои во:

- вклучување на вагата и нејзино тарирање,
- навлекување на соодветни продолжетоци на пипеторите,
- подесување на тестираниот волумен на пипеторот и
- аспирација и исфрлување на дестилираната или дејонизираната вода со тестираниот волумен.
- Последната постапка се повторува 3-5 пати.

Калибрирање на пипетори - постапка

Калибрацијата на сите пипетори треба да ги следи следниве чекори:

1. Се ставаат околу 100 mL ДС или ДЈ вода во садот од кој ќе се аспирира водата.
2. Се тарира садот за мерење без разлика дали е полн или празен со ДС или ДЈ вода (види точка 9)
3. Се поставува продолжетокот на пипеторот и се притиска пружината за вовлекување.
4. Се потопува продолжетокот во садот полн со ДС или ДЈ вода така што неговиот отвор да биде 2 до 3 mm под површината на водата.
5. Униформно се аспирира тестираниот волумен од садот за чување со отпуштање на пружината за вовлекување.
6. Униформно се диспензира тестираниот волумен во садот за мерење внимавајќи да не се истури надвор од садот.
7. Се мери садот за мерење.
8. Се запишува вредноста од дисплејот по негово смирување.
9. Се повторува постапката од точка 2 до точка 8, уште 9 пати
10. Се запишуваат сите измерени вредности во Формуларот за калибрација на пипетори.

Евапорација

- За да се избегне испарување на течноста, **времето** потребно за мерење на диспензираниот волумен треба да биде што е **можно пократко**,
- но и да биде **правилно распределено** во рамките на еден циклус и колку што е можно од циклус до циклус.
- За да се минимизира грешката поради испарување, садот за мерење добро се **затвара со парафилм** при што во средината се отвара дупче кое ќе биде со доволен дијаметар за да овозможи непречен влез на продолжетокот на пипеторот.

Пресметување на калибрационите параметри

- Тежината на диспензираната течност за тестирање ја претставува нејзината маса која се чита од дисплејот на вагата.
- За конверзија на масата во волумен потребно е да се изврши корекција која ги зема во предвид густината на водата при одредена температурата и атмосферскиот притисок.
За конверзија се употребува корекцискиот фактор F_k ($\mu\text{L}/\text{mg}$) - види Табела.

$$V_i = m_i F_k$$

Пресметување на калибрационите параметри

Средниот волумен се добива како средна вредност од 10 мерења

$$V_{sr} = \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n}$$

Пресметување на точноста

$$T / \% = \frac{V_{sr} - V_{\text{nominalna vrednost}}}{V_{\text{nominalna vrednost}}} \cdot 100$$

Пресметување на стандардна девијација

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X_{sr})^2}{n-1}}$$

Пресметување на прецизноста

$$RSD / \% = \frac{SD \cdot 100}{V_{sr}}$$

Фактор за конверзија - F_k ($\mu\text{L}/\text{mg}$)

Температура / °C	Воздушен притисок / hPa	
	1013	1067
15.0	1.0020	1.0020
15.5	1.0020	1.0021
16.0	1.0021	1.0021
16.5	1.0022	1.0023
17.0	1.0023	1.0023
17.5	1.0024	1.0024
18.0	1.0025	1.0025
18.5	1.0026	1.0026
19.0	1.0027	1.0027
19.5	1.0028	1.0028
20.0	1.0029	1.0029
20.5	1.0030	1.0030
21.0	1.0031	1.0031
21.5	1.0032	1.0032
22.0	1.0033	1.0033
22.5	1.0034	1.0035
23.0	1.0035	1.0036
23.5	1.0036	1.0037
24.0	1.0038	1.0038
24.5	1.0039	1.0039
25.0	1.0040	1.0041
25.5	1.0041	1.0042
26.0	1.0043	1.0043
26.5	1.0044	1.0045
27.0	1.0045	1.0046
27.5	1.0047	1.0047
28.0	1.0048	1.0049
28.5	1.0050	1.0050
29.0	1.0051	1.0052
29.5	1.0052	1.0053
30.0	1.0054	1.0055

Пресметување на калибрационите параметри

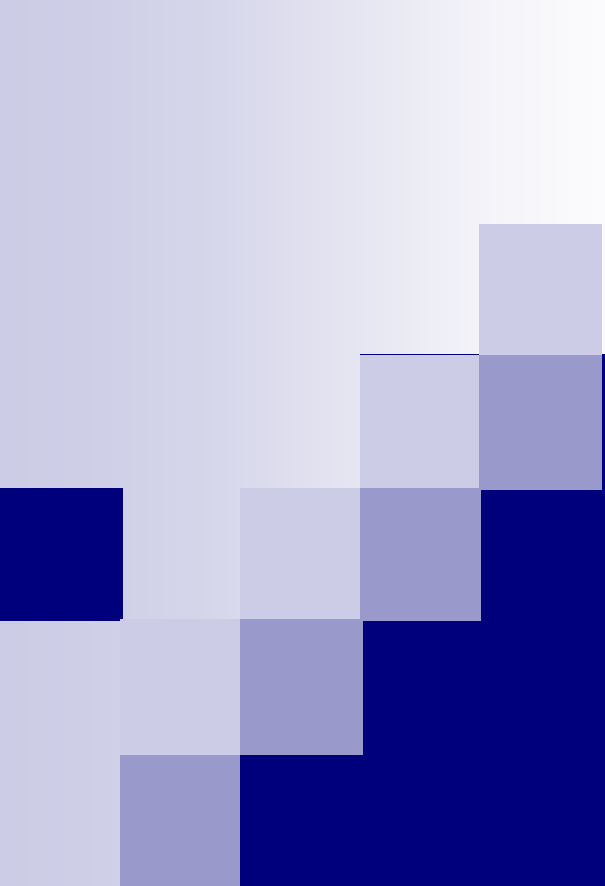
- Точноста и прецизноста се пресметуваат врз основа на спецификациите на производителот, барањата на СОП-овите или табелите од ИСО стандардот 8655-2:2000 (член 7.2.), ИСО 8655-3:2000 (член 6) и ИСО 8655-5:2000 (член 6) види Прилог 2..
- Одлуката за тоа дали пипеторот одговара на гореспоменатите препораки ја донесува Раководителот на лабораторија и го пополнува одветното поле во Формуларот за калибрација на пипетори.

Внесување на податоците во Формулар за калибрација на клипна волуметриска опрема

- За секој пипетор треба да се пополнува соодветен Формулар за пипетори кој е даден во прилог на оваа процедура.
- Податоците од калибрацијата се пресметуваат во посебен ексел формулар специјално дизајниран за оваа процедура. Формуларите се чуваат во лабораторија каде се употребува пипетата.
- **Корективни мерки при отстапувања**
- 1. Одговорното лице за оваа процедура го пријавува неисправниот пипетор со пополнување на формулар.
- 2. Неисправните пипетори се обележуваат со знак НАДВОР ОД УПОТРЕБА, и се постапува според процедура за одржување на опрема

Прашања за вежбање

- Што е метрологија?
- Во кои три категории со различни нивоа на сложеност и точност е поделена метрологија на ЕУ?
- Што претставува мерен стандард?
- Што претставува сертифициран референтен материјал?
- За што се користи сертифициран референтен материјал?
- Кои пет типа референтни материјали ги опишува ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation)?
- Што преставува ланец на следливост? Во која насока несигурноста расте во ланецот на следливост?
- Која е целта на калибрација на вага? Кој и кога може да ја врши калибрацијата и верификацијата на вагите?
- Доколку по извршена верификација на вагата се утврди дека таа е неисправна, кои активности се превземаат?
- Како се пресметува точноста на пипеторот по извршена калибрација?



2. Аналитички процес (метод)

Аналитички процес (метод)

- Физички и хемиски мерења и анализи имаат допир со практично секој аспект на модерниот живот, на пример:
 - во контрола на квалитетот на прехранбени производи и фармацевтски препарати,
 - анализа на примероци поврзани со евентуално загадување на животната средина, разни биолошки примероци и многу други.
- Аналитичките методи кои се користат при тоа се со различни цели, и соодветно на тоа , се карактеризираат со различни барања:цена, селективност, низок лимит на детекција, висока точност, прецизност итн. (Табела 1- дел од табела 0-1 од реф 1).

- Покрај тоа...
- Неколку подкатегории на аналитички науки се **уредуваат со закон**, кој ги утврдува **типот и зачестеноста на извршените анализи**.

Примери за такви области се:

- медицина: закони за контрола на епидемии
- фармација: закони за чистота на лековите
- производството на материјали: хемиски прописи
- здравствена заштита / здравјето и безбедноста: опасни материјали, прехранбени производи, закони за заштита на животната средина: закони кои ја регулираат чистота на вода за пиење, отпадни води, емисиите во воздухот, стандарди, итн.

Аналитички цели	Специјални барања на аналитичкиот процес	Пример
детекција на опасни агенси, скрининг	- висок степен на селективноста - низок LOD - брзо извршување - економичност	- Превентивни медицински прегледи (шеќерот во крвта, тест-стапчиња) - Токсикологија и судска медицина: идентификација на отрови и дрога - идентификација на токсини - инциденти во животната средина
Донесување на одлуки	- висок степен на прецизност - висок степен на точност	- Доказ во криминологијата - Медицинска дијагностика - процена на токсични гасови од објекти - Определување на надоместоци и казни (отпадни води - емисии, депонирање на цврст отпад, емисија на штетни материи во атмосферата) - Контрола на квалитет на сировини, материјал по приемот од добавувачи

Аналитички цели	Специјални барања на аналитичкиот процес	Пример
Заштита на животна средина	- висок степен на селективноста - висок степен на точност	- системи за предупредување (на пример, системи за откривање на отровни гасови) - инспекција на прехранбени производи - Контрола на квалитетот на лекови, хемикалии, горива, и други материјали
Следење, процесот на супервизија и регулациони процеси	- висок степен на селективноста - висок степен на точност - брзо извршување	- Супервизија на производство на прехранбени производи, лекови, хемикалии и други материјали -- мониторинг на животна средина кај релевантни објекти -- долготрајни клинички испитувања

Целта на аналитичка работа

- Целта на аналитичка работа е постигнување на сигурни аналитички резултати со дефиниран квалитет.

Затоа, квалитативни карактеристики на аналитички процеси/методи се:

- **Специфичност:** способност на аналитички процес/метод да се регистрира саканиот аналит во сите релевантни форми.
- **Селективност:** способност на аналитички процес/метод да регистрира **само посакуваниот аналит** во мострата за анализа, додека други компоненти во примерокот, или други карактеристики (познато како **матрикс**), не влијаат на резултатот.
- **Осетливост:** промената на измерената вредност(физичка величина) да одговара на промена на концентрација на аналитот во мострата за анализа.
- **Точност:** во смисла на двата параметра:
- **ВИСТИНИТОСТ** (недостаток на систематски грешки) и
- **прецизност** (мерење на разлики помеѓу резултатите, добиени преку повторување на потврден аналитички процес на истиот примерок (при што непрецизност е предизвикана од случајни грешки).

Задачата на аналитичарот

- Задачата на аналитичарот е да се утврди квалитетот на секој аналитички процес кои тој (или таа) го користи, и да се подобри, гарантира и тоа да се документира каде што е потребно, така што постигнатиот квалитет да се одржува во секој момент во текот на рутинска анализа.
- Само тогаш аналитички процес **се смета за сигурен**.
- На задачите што се бараат во физичка и хемиска анализа, генерално, може да се гледа како на утврдување на одговор на едно (или повеќе) од следниве **пет основни прашања**:
 1. Супстанција е присутна во даден примерок или не?
 2. Во кој опсег на концентрации супстанцата е присутна?
 3. Дали концентрацијата е под соодветни нивоа на одлучување – прагот на шумот на инструментот или методот?
 4. Дали прагот е надминат?
 5. Во кои концентрации (плус или минус статистичка грешка) супстанца за која станува збор е присутна во примерокот?
- Овие различни прашања имаат потреба од различни барања во однос на квалитетот на аналитичка постапка која се користи.

Диференцијација на аналитички процеси

- Аналитички процеси/методи можат да се категоризираат во пет групи **врз основа на целта, напор кој е потребно да се вложи, и потребниот степен на информации** за да се обезбедиме со резултати.
- **1. стандардни методи:** може да бидат национални стандардни постапки, или меѓународни (на пример, ASTM, ISO, ECCLES, CEN, IUPAC, итн) насоки и стандарди, или постапките опишани со законски прописи.
- Стандардните методи претставуваат **најновите прифатени** состојби на инженерингот, научни сознанија
- Нивната употреба може да биде **препорачана и/или задолжителна** во рамка на прописи и упатства.
- **2. споредливи лабораториски постапки:** квантитативни аналитички процеси кои **се разликуваат во постапка од стандардните методи**, но нивна еквивалентноста е потврдена со користење на стандардни методи.

продолжение

- **3.Други квантитативни аналитички** процедури кои имаат различни намени и цели во лабораторија надвор од законски регулирани области. Овие, исто така, вклучуваат најновите аналитички постапки за кои се уште не се утврдени стандарди.
- **4.Теренски методи:** аналитички процеси кои можат да се вршат надвор од лабораторија. Со помош на објективни методи за мерење, теренски методи може да доведат до квантитативни или полу-квантитативни резултати во зависност од претходно ракување со примерокот или управување со квалитетот на процедурата.
- **5.Ориентациони тестови / скрининг процедурите [88]** овозможуваат докажување на присуство на одредени супстанции и овозможуваат проценка на концентрација да се направи со точност од еден ред на големина.
- Процедури 4 и 5 потпаѓаат под поимот **"готови за употреба"** процедури [121]

Квалитетот на аналитичките процеси и Резултати

- Соодветните аналитички процеси за добивање на одговор на конкретно прашање треба секогаш **да бидат научно "најдобрите"** постапки
- Важно е и дека **резултатите од анализата**, добиени преку придржување кон законските прописи, треба ако е потребно да бидат **одбранливи во судот**, или со други зборови да бидат **правно издржани**.

Барања за прецизност на аналитички постапки во зависноста од аналитичкиот проблем

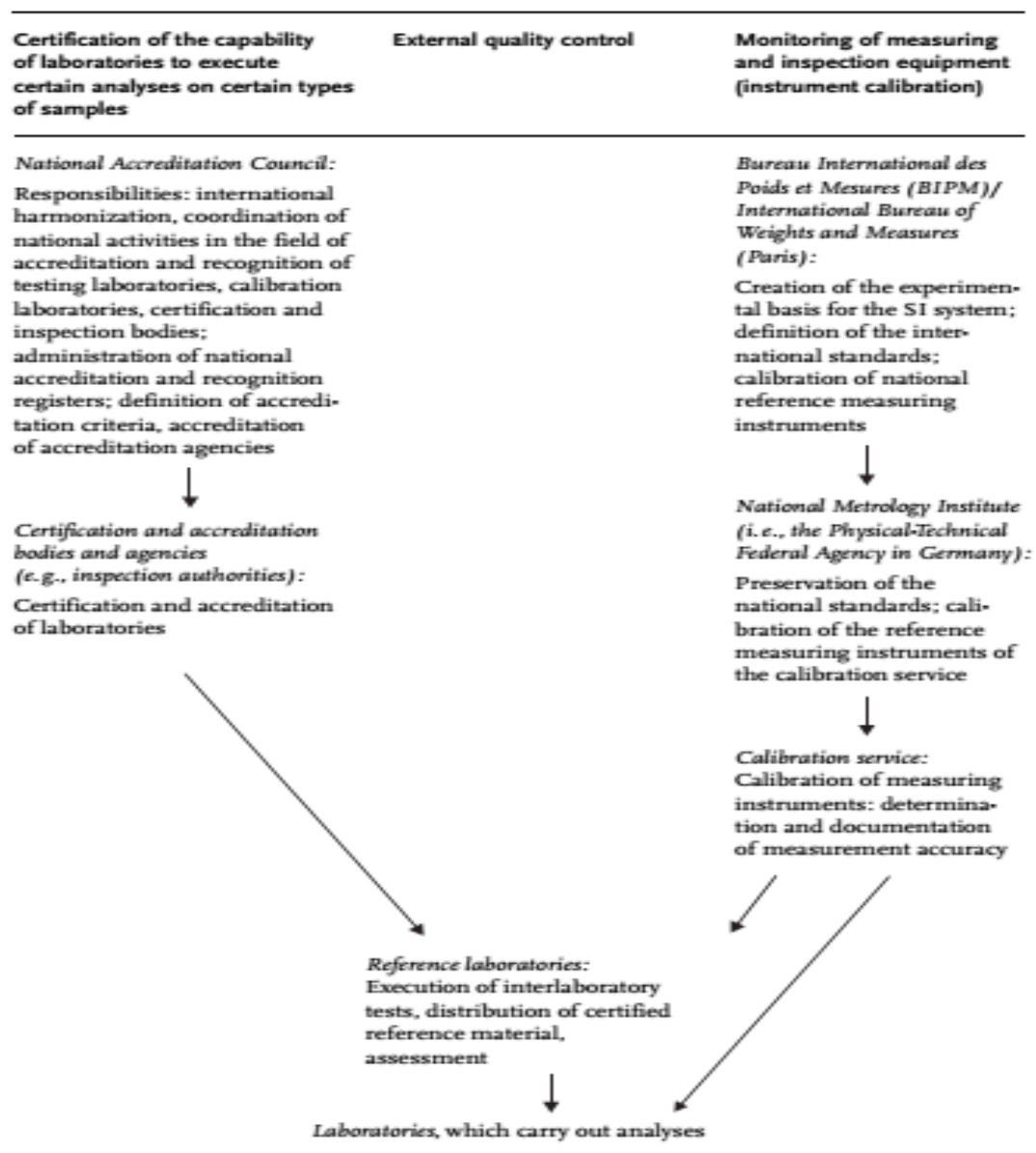
Прашање	Потребниот квалитет на аналитички процес
Супстанција е присутна или не?	Да / не одлука; доволен е осетлив ориентациони тест.
Во кои концентрациски опсег супстанцата се наоѓа?	се применува ориентациони тест кој укажува на соодветно концентрациски ниво
Дали концентрација е далеку под верификуваниот прагот на одлучување?	не е потребен високо прецизен аналитички резултат => се применуваат само ориентациони тестови или теренски методи
Дали прагот е надминат?	потребни се високо прецизни (во смисла на прецизност и истинитост) аналитички резултати, т.е. применливи се само референтни постапки и, доколку е потребно, споредливи лабораториски постапки
Во која концентрацијата $\pm$ интервал на веродостојност супстанцата е присутна во примерокот?	потребни се високо прецизни (во смисла на прецизност и истинитост) аналитички резултати. Ако аналитички резултатот е правно обврзувачки, прифатливи се само стандардни методи или споредливи лабораториски постапки. Инаку, се применуваат и други аналитички постапки со докажана сигурност.

Системот на обезбедување на квалитет

- Целта на обезбедување на квалитетот во аналитика е да се добијат сигурни аналитичките резултати, чија точност е утврдена, редовно потврдена, и документирана.
- Сите чекори во производството и евалуација на аналитичките резултати во комерцијално и на национално ниво регулирани области се поврзани во хиерархиски организиран систем на внатрешно и надворешно осигурување лабораториски квалитет (Табела 0-3).

Одговорност и релации во надворешно обезбедување на квалитет

Table 0-3 Responsibilities and relationships of external analytical quality assurance.



На **национално и европско ниво**, законодавецот:

- дефинира рокови, цели, и квалитетот на барања;
- пропишува проверка на квалитетот на производот и, доколку е потребно, исто така референтни постапки;
- предвидува организирање на системот на квалитет;
- и исто така поддржува, делумно, основање и работење на тела за сертификација и акредитација,
- и на инспекциски тела.

- **Меѓународни** (т.е. ISO, CEN) и **националните** (односно, DIN, BSI, AFNOR, NEN) стандарди дефинираат услови; специфицираат систем за квалитетот, курсеви за акција, аналитички процедури и мерни инструменти; и обезбедуваат основа за оценување на работењето и компетентност на лаборатории во процесот на акредитација и сертификација.
- **Сертификација** потврдува дека лабораторијата има воспоставено и одржува функционален систем за обезбедување на квалитет.
- За акредитација, лабораторија **мора да докаже** дека компетентно може да врши одредени анализи на одредени видови на примероци и дека ги исполнува сите соодветните прописи и стандарди.

- Секоја хемиска анализа се базира на некој начин на мерење на физички или хемиски величини со помош на мерни инструменти - обезбедување на точноста на овие мерни инструменти е целта на **закажани калибрации** на инструменти.
- Проверка на надлежноста на лабораторијата, исто така, вклучува и учество во **меѓулабораториски испитувања** како средство за споредба со други лаборатории.
- При организирање на лабораторија во меѓулабораториски испитувања се произведува голема количина на многу **хомогена мостра** и се испраќаат помали подмостри на тест лаборатории за анализа.
- Резултатите од анализите на учесниците потоа се собираат и оценуваат. Оценување на работата на лабораторијата се врши врз основа на точност и прецизност на нејзините резултати.
- Со меѓулабораториски испитувања не само што се врши **проценка на аналитички перформанси** на лабораторијата, но исто така служи:
 1. како тест за практичноста/применливоста на нови аналитички постапки,
 2. за да се утврдат карактеристики на постапката,
 3. да се идентификуваат карактеристиките на референтниот материјал.

Четири-фазен модел на обезбедување на квалитет

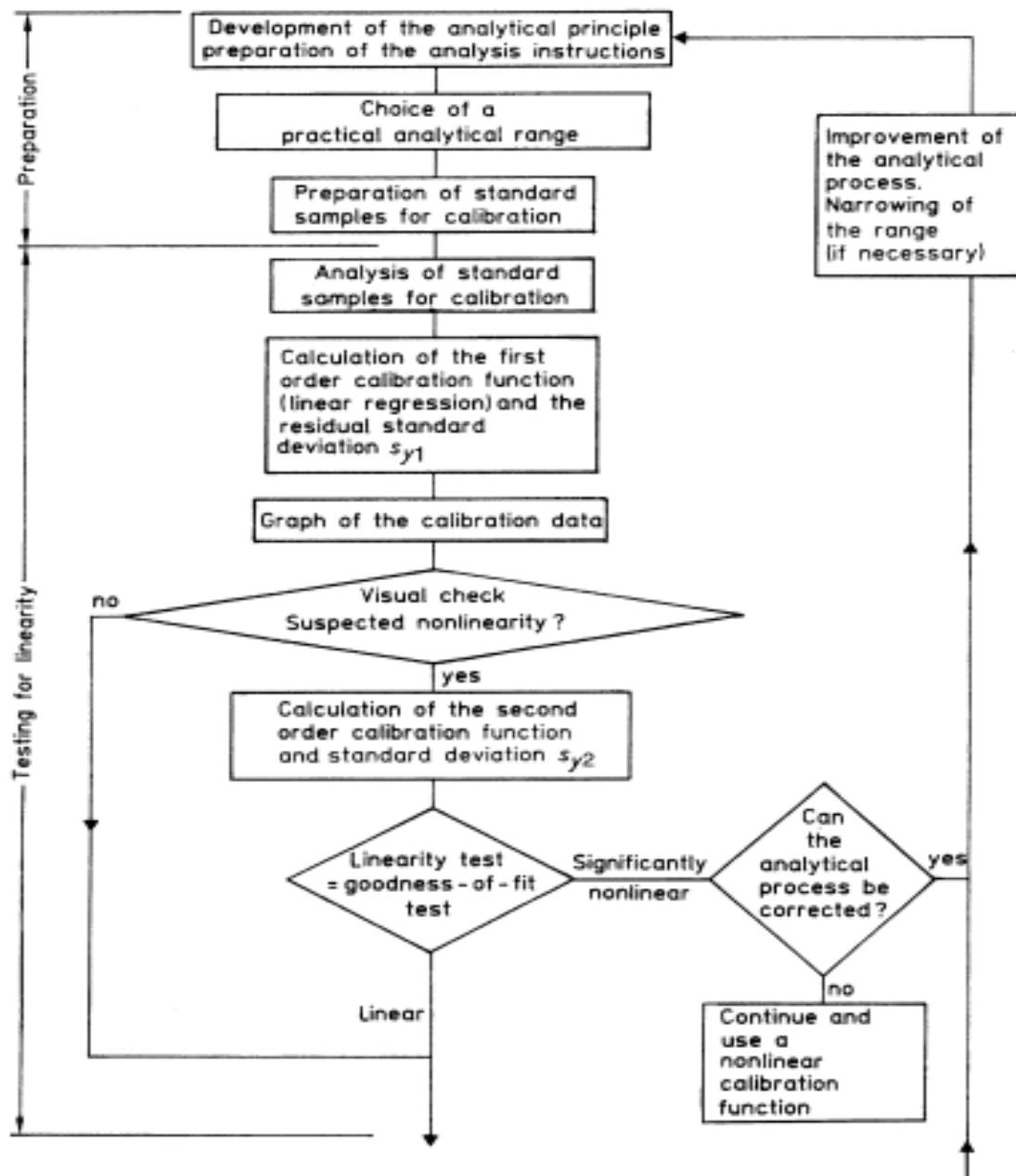
- Потсетување - Задачата на аналитичарот е да се утврди квалитетот на секој аналитички процес кои тој (или таа) го користи, и да се подобри, гарантира и тоа да се документира каде што е потребно, така што постигнатиот квалитет да се одржува во секој момент во текот на рутинска анализа.
- **Определување и, каде што е потребно, подобрување и одржување на квалитетот на аналитичките резултати се предуслови за акредитирање на лабораторија**
- Дури и кога акредитација не е планирана, тоа е во интерес на обезбедување на квалитетот.
- За аналитичарот, целокупниот систем на квалитет може да биде опишан, повеќе или помалку хронолошки, во четири фази:
- **Фаза I: Воведување на нова аналитичка постапка**, калибрација, подобрување и документирање.
- **Фаза II: Подготовки за контрола на квалитетот** - аналитички процес (чији карактеристики се веќе документирани) се операционализира за рутинска анализа. Ова вклучува постигнување и одржување на доволен аналитички квалитет пред започнување на рутинска анализа .

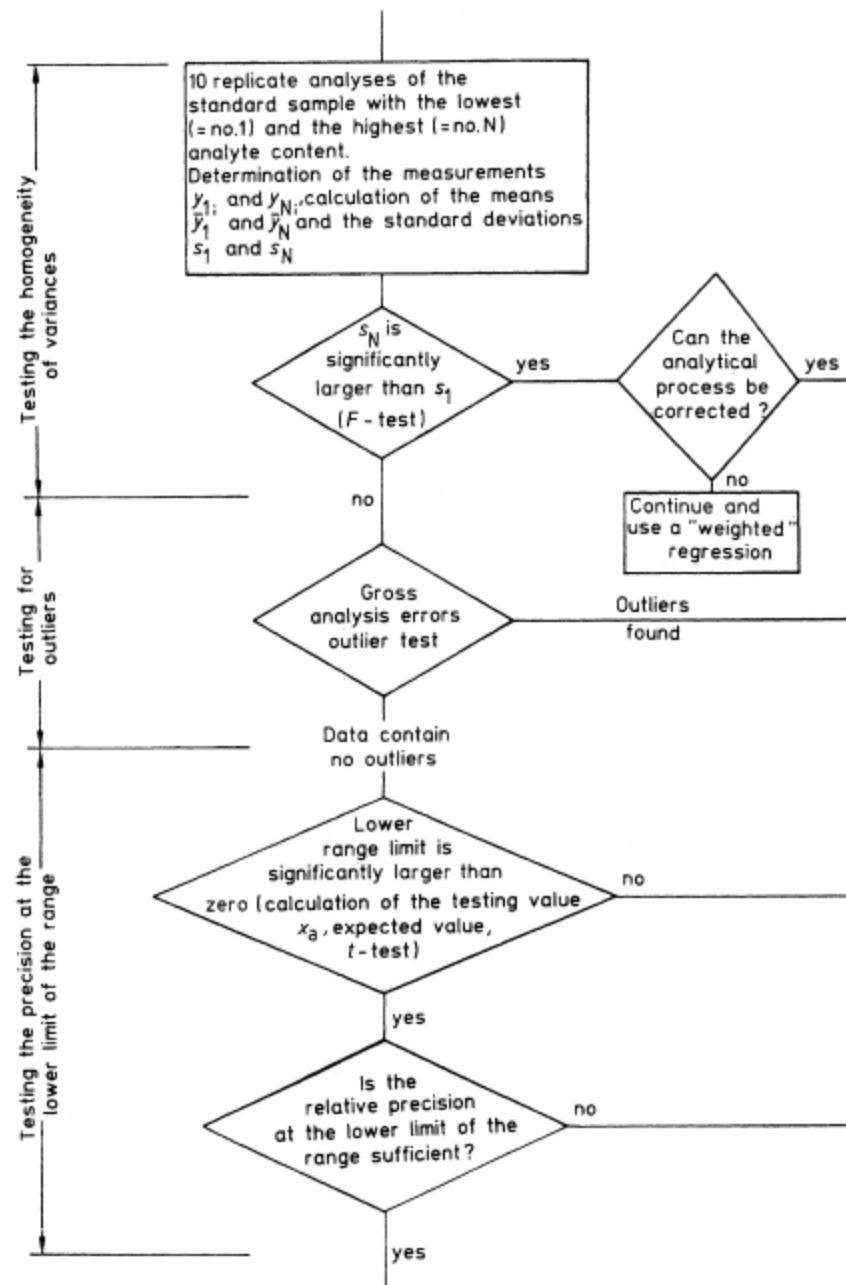
Четири-фазен модел на обезбедување на квалитет

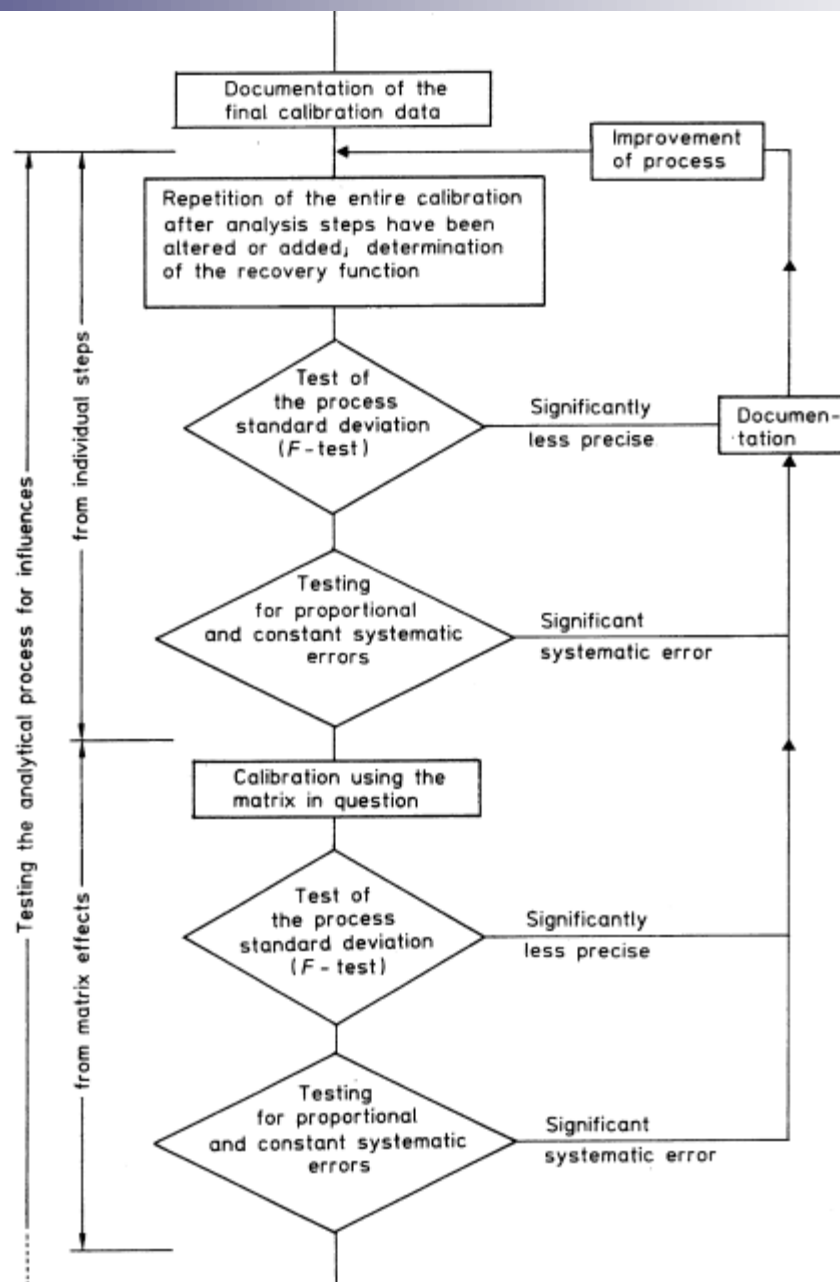
- **Фаза III: Внатрешни мерки** за осигурување на квалитет, придружуван од
- **Фаза IV: Надворешното осигурување** на квалитетот во форма на меѓулабораториски тестови и надворешна ревизија.
- Само со поврзување на сите аналитички активности во затворен систем на внатрешно и надворешно осигурување може да се гарантира квалитет, т.е. сигурноста на аналитичките резултати :
- овие се, од една страна, законска обврска, морална и, од друга страна, тие може да се користат за споредби на експерименти, да се воспостават регистри на аналитички вредности, итн.

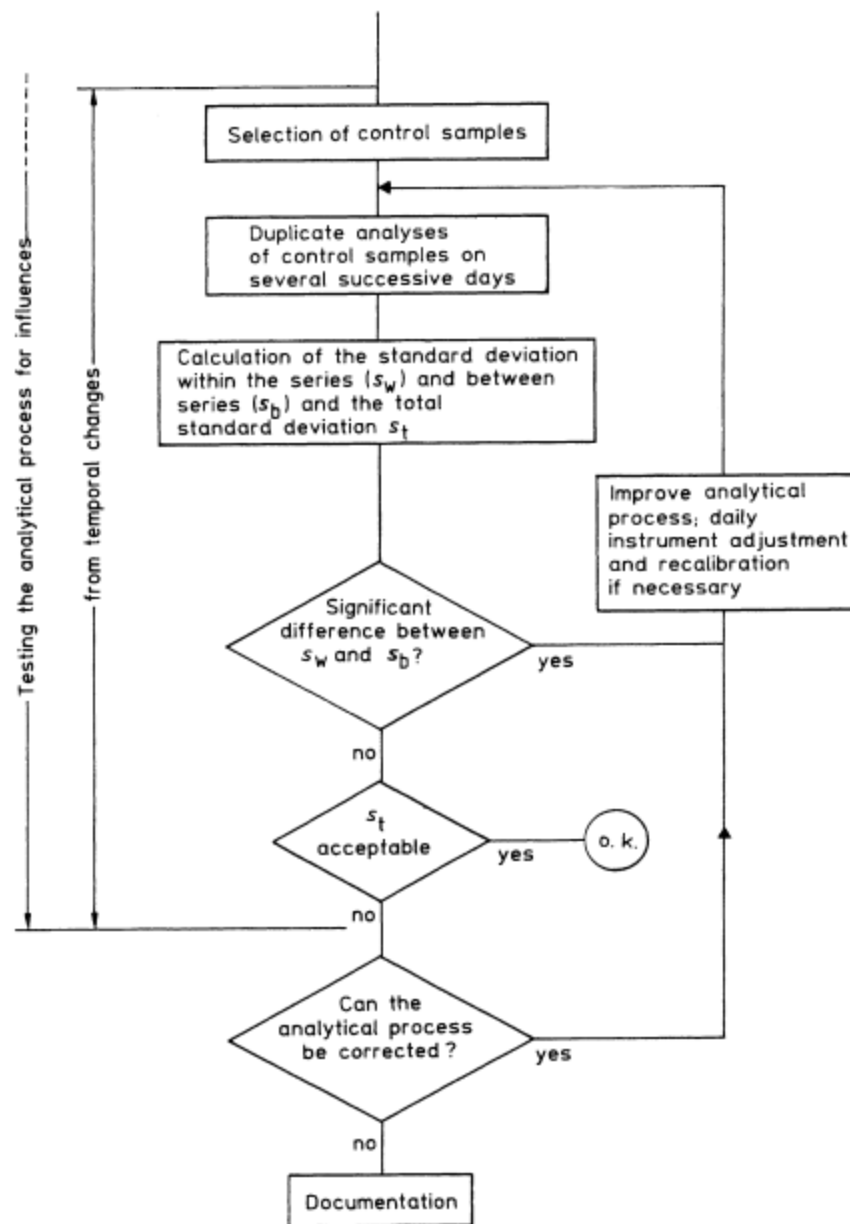
Scheme 1-1 Procedure of Phase I: flowchart.

I фаза:
Разработка на
нова аналитичка
постапка
(нов аналитички
метод)









I фаза

I фаза се состои претежно од следниве пет главни чекори (види Шема 1-1):

1. изработка на експериментот на калибрација
2. тестирање за
 - Линеарноста на функцијата за калибрација
 - Точност (варијанца, хомогеност, отсуство на вредности кои статистички значајно отстапуваат -outliers, обезбедување на пониски границите на опсегот)
3. конечното утврдување на податоци за калибрација,
4. тестирање за влијанието на одделни чекори во процесот или матрикс ефекти врз податоците за калибрација,
5. тестирање за влијанието на времето на аналитичкиот процес.

Резултати од I фаза: статистички податоци

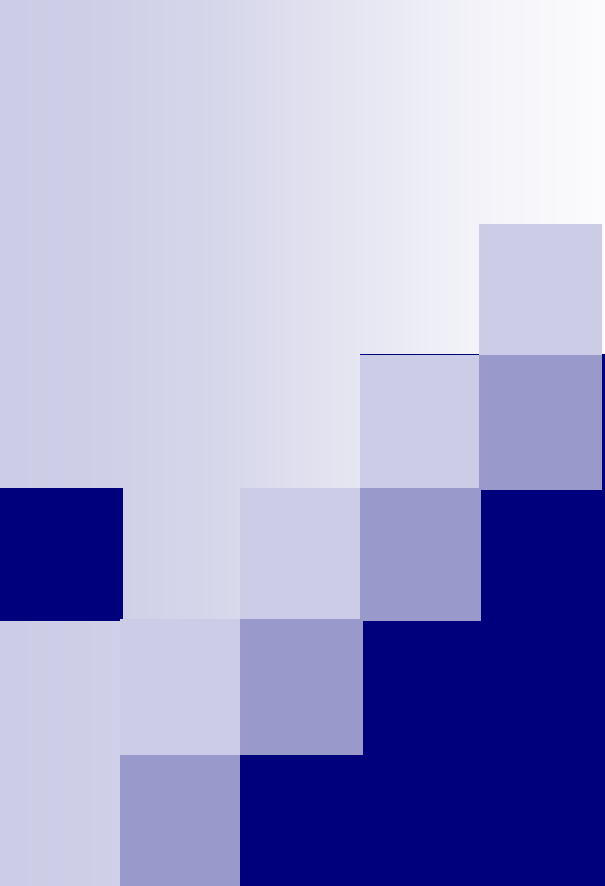
- I фаза во воспоставување квалитетот на анализа обезбедува квалитетни податоци врз основа на кои подоцна се овозможува рутинска анализа.
- Пред сè, ова ги вклучува:
 1. опсегот на тестирање,
 2. коефициентите на функцијата на калибрација:
 - Во случај на функција од прв ред за калибрација ($y = a + bx$):
пресекот на ордината – интерцепт a
наклон – slope b (карактеристика на осетливоста на аналитичката постапка)
 - Во случај на функција од втор ред калибрација ($y = a + bx + cx^2$):
intercept a , коефициент b – линеарен член, коефициент c – квадратен член, осетливоста E на аналитичкиот процес определена со функција.
 3. стандардната девијација на постапката, S_{x_0} , како апсолутна мерка на прецизности за калибрација и
 4. коефициентот на варијација V_{x_0} , како релативна мерка на прецизности.

Резултати од I фаза: статистички податоци

- Покрај тоа, се документираат и следниве параметри:
- Decision limit, x_{DL} , граница на одлучување,
- LOD (limit of detection) лимит на детекција
- LOQ (limit of quantification) лимит на квантификација
- Подетално – во Валидација на методи

Прашања за вежбање

- Кои се специјални барања на аналитичкиот метод доколку аналитичка цел е: а) детекција на опасни агенсии, б) донесување одлуки? Наведете примери.
- Која е целта на аналитичката работа?
- Кои се 5 основни прашања на кои треба да одговори аналитичар?
- Која е задачата на аналитичарот во однос на аналитички процес/метод?
- Во кои пет групи се категоризирани аналитички методи?
- За да се акредитира, што мора да докаже една лабораторија? Што претставува сертификација?
- Целокупниот систем за квалитет (што се однесува до аналитичарот) може да се подели во 4 фази. Кои се тие?



3. Валидација на аналитички методи

ПАРАМЕТРИ ЗА ВАЛИДАЦИЈА НА МЕТОДИ

- За да се обезбедат сигурноста и точноста на аналитичките податоци, аналитички методи треба да бидат **валидирани (потврдени)**
- Тоа го бара и соодветна законска регулатива последните дваесет години.
- Со тоа се согласуваат и аналитичари кои основните принципи на валидација методи ги применувале долго пред почетокот на прописите, бидејќи тоа е дел од професијата.
- Во меѓувреме објавени се многу документи, статии, осврти, спроведени бројни различни експерименти.
- Во некои лаборатории валидација на методи стана рутина, додека во други не се спроведени.
- Во ова предавање ќе биде претставени основните начела за валидација на аналитички методи потребни за аналитичари.

Основни принципи на валидација

- Што е валидација на аналитичките методи?
Наједноставната дефиниција>
- Валидација на аналитичките методи е процес со кој ние докажуваме дека нашиот метод служи на целта за која е наменет.
- Наједноставна логика вели дека прво е потребно да се знае/дефинира целта на методот.
После тоа, согласно професијата и логиката на работа, се утврдуваат:
 - **постапките**, односно план и
 - на крајот се спроведуваат **експерименти**
 - чии **резултати** треба да се собираат и прикажат како доказ за валидноста на методот.

Основни принципи на валидација

- Сигурно е дека исти постапки не важат за сите методи – **различни пристапи** за валидација на
- квалитативни и
- квантитативни методи

Различни пристапи при валидација на методи се користат при утврдување на **концентрација на аналитот** кој:

- **доминира** во примерокот (пр. контрола на лекови)
- во однос на оние со кои се утврдуваат **трагови** во комплексен матрикс (пр. резидуи во храна).

Видови на валидација

Почетна (во смисол – од почеток) валидација, целосна валидација или само

валидација

- Постапката за валидација која се применува за **ново развиен аналитички метод** во лабораторија, со која се докажува дека методот е погоден за употреба.

Скратена валидација – валидација на трансфер (превземен) метод верификација

- Скратена валидација претставува валидација која се применува во **приемна лабораторија** (нпр ваша) на методот претходно потврден во **лабораторијата на потекло** (друга лаб.).
- Скратена валидација треба да и овозможи на приемна лабораторија да покаже дека методот ќе работи доверливо и дека е погоден за употреба.

Стандардна оперативна процедура (СОП)

- Стандардна оперативна процедура (СОП) **треба да биде подготвена пред вршење** на било почетна или скратена валидација и треба да ги покрие точките наведени во соодветна секција од стандардот ISO 17025: 2005 (ISO MKC 17025: 2006)
- Во најновата верзија од стандардот ISO 17025: 2017 (ISO MKC 17025: 2018) СОП не е обавезен (може да се подготви, а може и само опис на постапката)!
- Во текот на развојот на аналитички метод мора да биде дефиниран **опсегот на методот** (нпр. кој аналит може да се определува, во кои матрици т.е. мостри за анализа тој може да се утврди итн).
- Во текот на развојот на методот, сите релевантни **параметри на методот** треба да биде **оптимално одредени**, а мора да бидат идентификувани и контролирани и **критичните точки** (на пример, температура, pH).

Стандардна оперативна процедура (СОП)

- Доколку метод е од друга лабораторија - ваша лабораторија мора да го подготви **сопствениот СОП** кој мора да се усклади со СОП-от на лабораторија од која е превземен методот.
- Зошто? Можно е да двете лаборатории имаат различна опрема, чии карактеристики може да биде значително различни.
- При оптимизација и валидација, операторот има слобода да се прилагоди на условите со само една цел - **да се постигнат исти перформанси на методот.**

1. Цел и примена на методот**2. Принцип на работа**

на што се базира методот?

да се дефинираат основни поими

да се даде хемиска реакција доколку методот се базира на неа

3. Безбедност

3.1. Заштита при работа (*што се користи за заштита – наочари, ракавици и др.*)

3.2. Процедура по одредени точки (*ако ги има – жарење, загревање, работа со концентрирани раствори, испарливи, токсични реагенси и сл.*)

4. Реагенси

4.1. Основни стандардни раствори

4.2. Работни (калибрациски) раствори

4.3. Други реагенси

5. Потребни материјали

5.1. Инструменти

5.2. Лабораториско стакло

5.3. Друга опрема

6. Постапка

(детаљна постапка за секој чекор (вагање, пипетирање, филтрирање, загревање, ладење и др.

6.1. Подготовка на стандардни раствори

6.2. Подготовка на работни раствори

6.3. Подготовка на слепа проба

6.4. Подготовка на проба (*земање на проба, загревање, филтрирање и др.*)

6.5. Мерење (*опис на постапката на мерење*)

7. Пресметување на резултати

детаљна постапка за секој чекор – нпр:

ако е готова формула – како се доаѓа до неа,

пресметување на содржина на аналитот од калибрациона права

или преку други функции (нпр. прв извод)

8. Пресметување на мерна неодреденост

8.1. Одделни мерни неодредености

8.2. Учество на секоја мерна неодреденост

8.3. Комбинирана мерна неодреденост (*резултатите да се дадат во табела*)

8.4. Проширена мерна неодреденост

9. Извештај

крајниот резултат од методот придружен со мерна неодреденост

10. Забелешки

нешто карактеристично за метод, постапка, ограничувања на методот и сл.

11. Референци

литература за методот (книга, скрипта, практикум, статија)

литература за податоци за мерни неодредености (статија, книга, веб страна...)

Основни параметри на валидација

– 8 основни параметри на валидација:

1. специфичност / селективност
2. линеарност
3. подрачје-концентрациски опсег
4. точност (trueness)
5. прецизност
 - повторливост (repeatability)
 - меѓупрецизност (intermediate precision)
 - репродуцибилност (reproducibility)
6. граница на детекција
7. граница на квантификација
8. стабилност/постојаност

1. Специфичност

- **Можноста недвосмислено да се детектира аналитот во присуство на други компоненти** (нечистотии, изомери, матрикс, метаболити, деградациони продукти) за кои се смета дека е можно да бидат присутни во примерокот.

Селективност

- Тоа е можноста на методот да го **квантифицира** аналитот **точно во присуство на интерференти**.

- Квантитативната мерка за селективноста **може да биде** индексот на селективноста

$$\frac{b_{an}}{b_{int}}$$

каде b_{an} е осетливоста на методот (наклонот на калибрационата функција)

а b_{int} е наклонот на одговорот на потенцијалниот интерферент определен со изведување на методот на бленк матрикс спајкуван со интерферентот.

- Наклонот на калибрационата крива се пресметува како $\tan \alpha$ каде α е аголот кој се формира помеѓу калибрационата крива и x-оската

2. Линеарност

- Линеарноста претставува **можност на аналитичката процедура** (во даден опсег) **да се добијат тест резултати кои се директно пропорционални на концентрацијата** (количината) **на аналитот во пробата.**

- Кога зависноста не е линеарна – се сведува на линеарна – пример: ELISA

$$A=f(\log c_{\text{неизреагираниот реагенс}})$$

- **Линеарноста** се изразува преку:
 - **калибрационата права** конструирана од **најмалку 5 точки** (вклучително и нулата) со различни концентрации во опсегот на определување на методот и
 - **коефициентот на регресија** (или r^2).
 - **бројот на повторувања** за секоја точка е 3-5.
 - општиот облик на калибрационата права е:

$$y = a + bx$$

Линеарност

Каде,

- **y** е измерениот одговор на инструментот (единици на површина, апсорбанца)
- **x** е концентрацијата изразена во соодветни единици (пр. mg/L)
- **b** е наклонот на калибрационата права и се пресметува како тангенс α ($\tan \alpha$), каде α е аголот кој се формира од калибрациоантата права и x оската
- **a** е интерцептот на y оската од правата и се пресметува како:

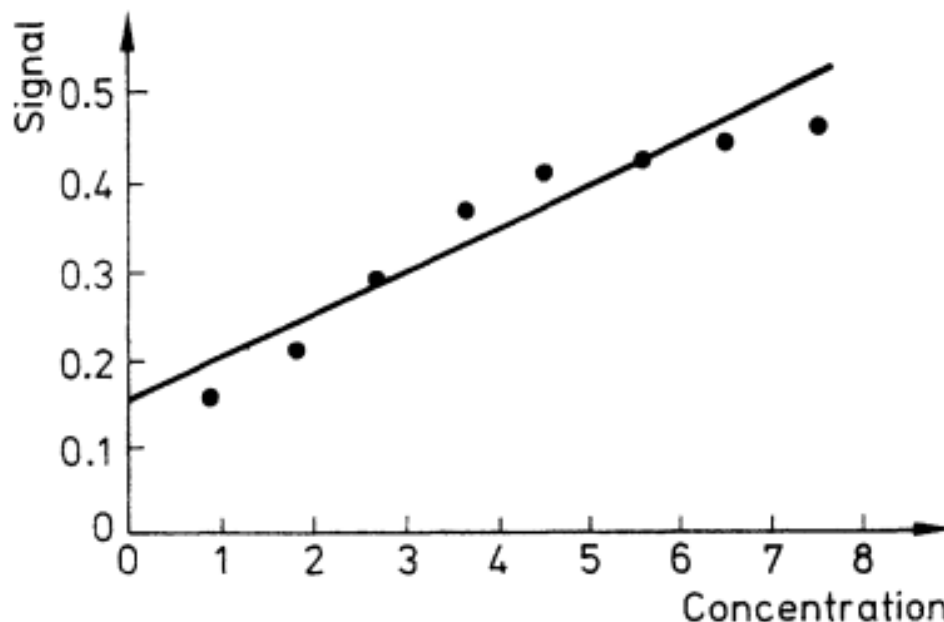
$$a = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

- x_i и y_i се индивидуалните вредности за секое x и y , а $\bar{x}$ и $\bar{y}$ се нивните средни вредности.
- коефициентот на регресија r се пресметува со следната равенка:

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$

Верификација на линеарноста

- верификација на линеарноста доколку е можно, треба да се обиде најпрво калибрациона функција од прв ред – линеарна равенка
- калибрациона функција од втор ред треба да се користи само во оправдани исклучоци.
- Проверка –
- визуелно :



Калибрациона права добиена со регресиона анализа

Наклон – мерка за осетливост

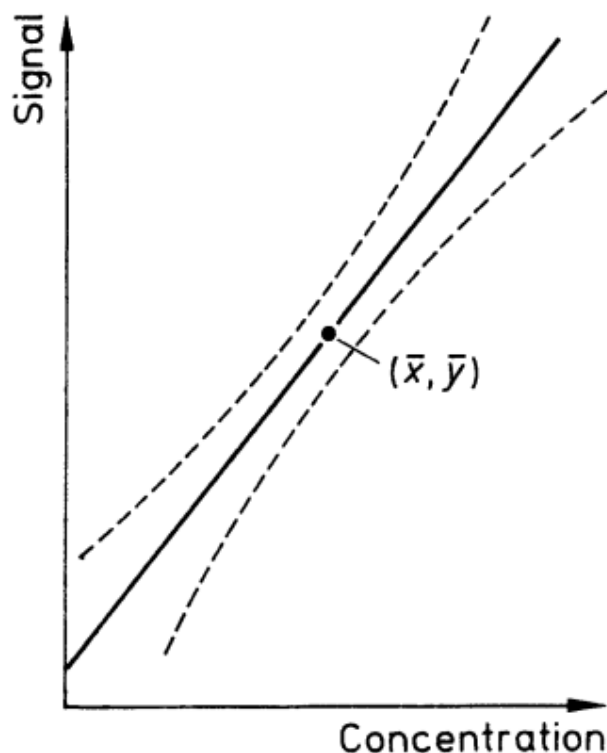
Slope (measure of sensitivity):

$$b = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})]}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$$

Axis intercept: отсечка

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{with} \quad \bar{x} = \frac{1}{N} \cdot \sum x_i$$

$$\bar{y} = \frac{1}{N} \cdot \sum y_i$$



Сензитивноста/осетливоста на методот е градиентот на калибрационата функција и се изразува преку наклонот на калибрационата крива. Ова може да е корисен параметар за да се тестира дали инструментот работи согласно задоволителни стандарди.

Калибрациона функција од втор ред

Process Data for the Second-Order Calibration Function

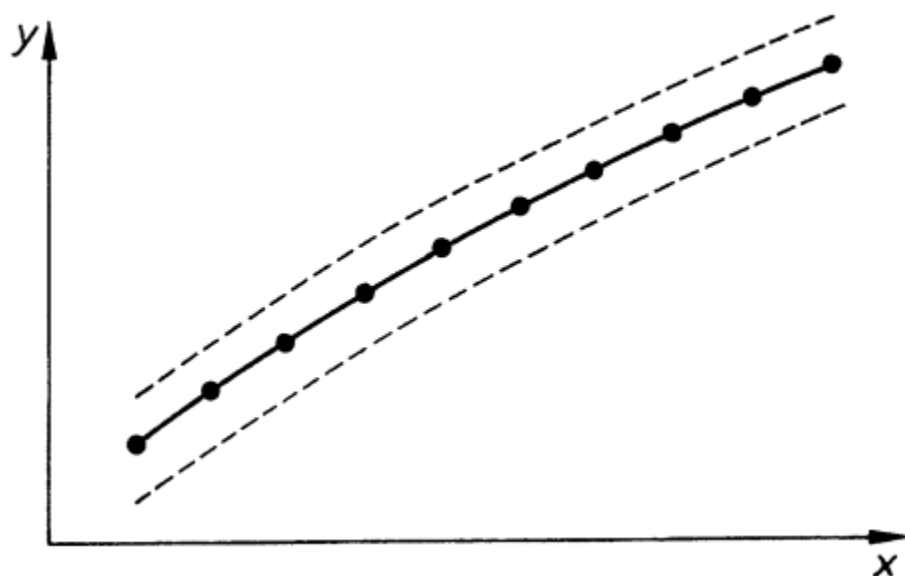


Fig. 1-3 Second-order calibration function
($y = a + bx + cx^2$).

Residual standard deviation:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 3}} \quad \text{where} \quad \hat{y}_i = a + bx_i + cx_i^2$$

Sensitivity E:

Додека кај линеарна калибрација осетливоста се карактеризира со наклонот b ,

кај функција од втор ред, осетливоста зависи од првиот извод на таа функција

$$E(x) = b + 2c \cdot x$$

Препорака:

Осетливоста да се изразува во средината на испитуваниот опсег

$$E(\bar{x}) = b + 2c \cdot \bar{x}$$

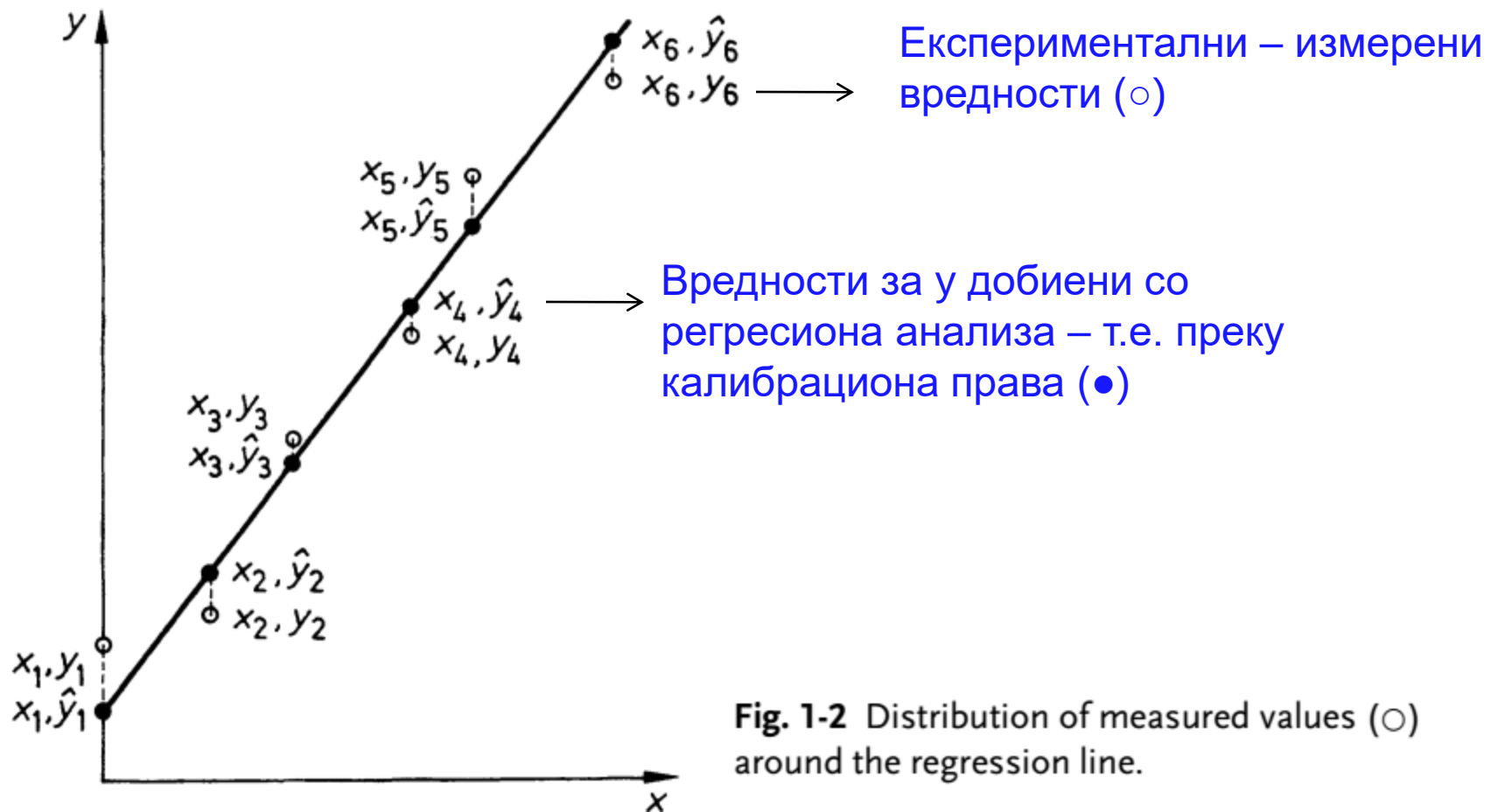
Process standard deviation:

$$s_{xo} = \frac{s_y}{E(\bar{x})}$$

Relative process standard deviation:

$$V_{xo} = \frac{s_{xo}}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$$

Дистрибуција на измерените вредности околу калибрациона права



Резидуална анализа

- Тестирање на калибрациониот модел
- Резидуи – остатоци – вертикални отстапувања од регресиона крива-права

$$d_i = \hat{y}_i - y_i \quad \text{for } i = 1, \dots, n$$

- Пример:

Резидуална анализа – пример:

c/(mol/L)	A (exp)
0.1370	0.0110
0.2870	0.0190
0.4380	0.0280
0.5900	0.0410
0.7450	0.0480

SUMMARY OUTPUT

Regression Statistics

Multiple R	0.995869
R Square	0.991755
Adjusted R Square	0.989006
Standard Error	0.001598
Observations	5

ANOVA

	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	0.000922	0.000922	360.8393	0.000319
Residual	3	7.66E-06	2.55E-06		
Total	4	0.000929			

	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	0.001632	0.001627	1.002738	0.389872	-0.00355	0.00681	-0.00355	0.00681
c/(mol/L)	0.063196	0.003327	18.99577	0.000319	0.052609	0.073784	0.052609	0.073784

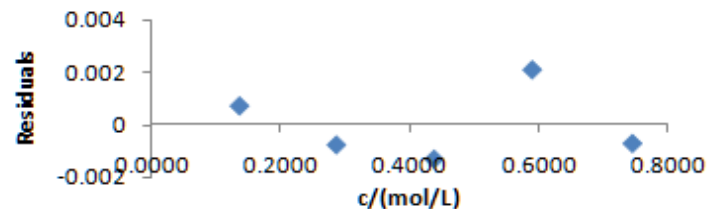
RESIDUAL OUTPUT

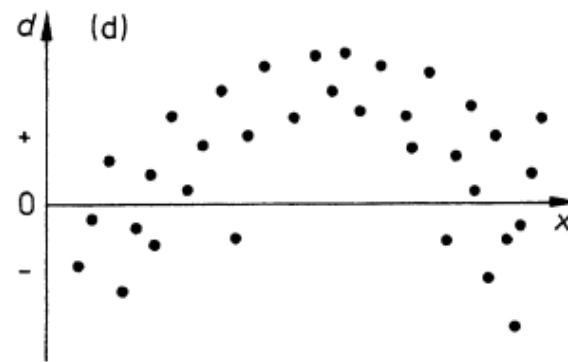
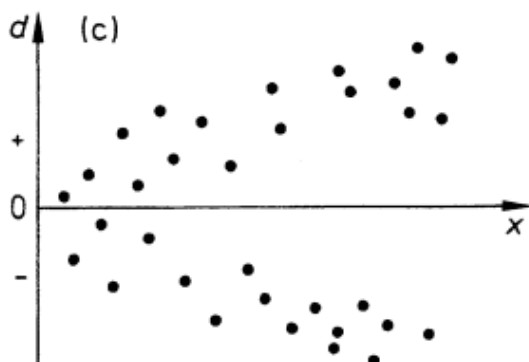
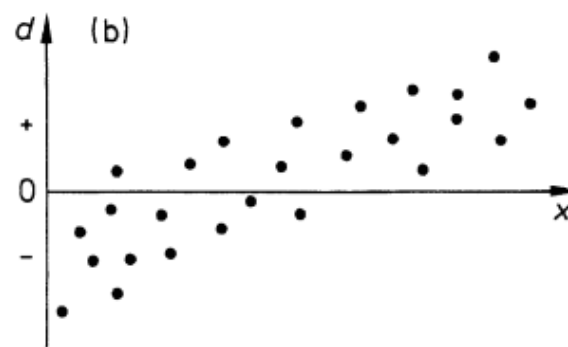
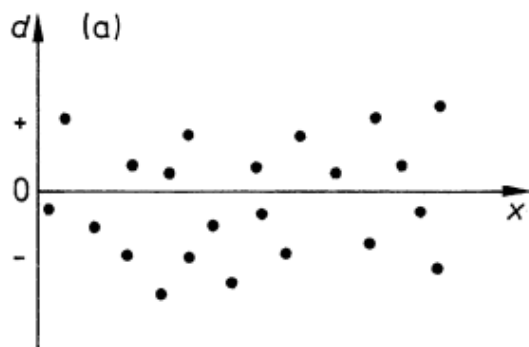
Observation	Observed A	Residuals	Standard Residuals
1	0.010289	0.000711	0.513377
2	0.019769	-0.00077	-0.55558
3	0.029312	-0.00131	-0.94765
4	0.038917	0.002083	1.504836
5	0.048713	-0.00071	-0.51499

PROBABILITY OUTPUT

Percentile	A (exp)
10	0.011
30	0.019
50	0.028
70	0.041
90	0.048

c/(mol/L) Residual Plot





- a) идеално – избраниот модел е коректен
- b) линеарен тренд – веројатни грешки од пресметковна природа
- c) варијанцата се зголемува – нехомогена варијанца
- d) нелинеарен тренд – резултат на несоодветна регресиона функција

3. Концентрациски опсег

- Интервалот помеѓу горната и долната концентрација (количина) на анализот во пробата (вклучувајќи ги и овие концентрации) за кои е покажано дека аналитичката процедура има соодветно ниво на прецизност, точност и линеарност.

4. Точност

- **Степенот на совпаѓање** помеѓу тест резултатот (најдена вредност) и вредноста која е конвенционално прифатена како вистинска вредност или пак е прифатена референтна вредност
- Степенот на совпаѓање помеѓу средната вредност добиена од голема серија од тест резултати и прифатената референтна вредност. Вистинската вредност е изразена како BIAS (вкупна систематска грешка)

$$t = \text{abs}(x_{av} - x_r) / SD < 2,02$$

x_{av} е средната вредност добиена од голема серија на тест резултати

- **За определување на точноста** се анализира соодветниот аналит во CRM (**сертифициран референтен материјал**) со најмалку 6 повторувања
- ISO 5725-1:1994, Accuracy (trueness and precision)2. J.C. Miller and J. N. Miller, Statistic in Analytical Chemistry, 3rd ed., Ellis Horwood Ltd., Chichester, West Sussex, 1994

во пракса – со користење на метод на стандарден додаток - **Аналитички принос (Recovery)**

- Се изразува преку процентот на приносот на аналитот после изведувањето на целокупна аналитичка постапка.

$\% \text{ Recovery} = 100 \times \text{измерена количина} / \text{додадена количина}$

- Ако се анализира бленк тогаш

$$\% \text{ Recovery} = 100 (x_2 - x_1) / x_{\text{ADD}},$$

Каде x_1 е измерената вредност на бленкот, и x_2 е измерената вредност на аналитот во спајкуваниот примерок, x_{ADD} е додадената вредност на аналитот во примерокот

Се анализираат 6 репликации/повторувања од спајкуваната слепа проба со познато количество (концентрација) на аналитот за секое ниво (ниско, средно и високо) во концентрацискиот опсег на аналитот.

- Commission decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

5. Прецизност

Степен на совпаѓање помеѓу серија на мерења добиена со анализа на повеќекратно земени примероци од ист хомоген материјал под услови за репродуцибилност

Прецизноста се изразува преку стандардната девијација или релативната стандардна девијација - **RSD** (коефициент на варијација - **CV**)

$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

аритметичка средина

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

стандардна девијација

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100$$

релативна стандардна девијација (%)

RSD (CV) не треба да го надмине нивото пресметано со равенката на **Horwitz** :

$$CV = 2^{(1-0,5 \log C)}$$

каде **C** е масениот удел кој е определен во примерокот

SULFADIMIDIN tablet,
Veterina d.o.o, Hrvatska – 2.5 g
sulfadimidine in 1 tablet (3.7 g);

NEOSULFOX powder, FM Pharm, Srbija –
100 mg sulfadimidine, 60 mg neomycin
sulphate and 40 mg oxytetracycline
hydrochloride in 1 g powder;

2.34 %

Табела 6. Прецизност на методот за определување на SDM во Sulfadimidin таблета преку на A_{263}

4.00 %

очекувана концентрација $\gamma(\text{SDM})/\mu\text{g mL}^{-1}$	A_{263}	$\gamma(\text{SDM})/\mu\text{g mL}^{-1}$ (во проба)	Фактор на разредување	$m(\text{SDM})/\text{mg}$ (во таблета)
15	1,0551	15,57	166,66	2594,5
15	1,0282	15,18	166,66	2529,6
15	1,0364	15,30	166,66	2549,3
15	1,0637	15,69	166,66	2615,4
15	1,0766	15,88	166,66	2646,6
15	1,0462	15,44	166,66	2573,1
Број на мерења (n)		6		
Средна вредност		2,58 g		
Стандардна девијација (SD)		0,04 g		
Релативна стандардна девијација (RSD)		1,66 %		
Horwitz критериум $\text{RSD} \leq 2,34 \%$				
Декларирана содржина = 2,5 g SDM во таблета (3,7 g)				

Табела 10. Прецизност на методот за определување на SDM во Neosulfox P преку

A_{263}

Очекувана Концентрација $\gamma(\text{SDM})/\mu\text{g mL}^{-1}$	A_{263}	$\gamma(\text{SDM})/\mu\text{g mL}^{-1}$ (во проба)	Фактор на разредување	$m(\text{SDM})/\text{mg}$ (во прашок)
15	0.9199	13.61	6.66	90.73
15	0.9355	13.83	6.66	92.20
15	0.9393	13.89	6.66	92.60
15	0.9753	14.41	6.66	94,67
15	1.0032	14.81	6.66	96,07
15	0.9610	14.20	6.66	98,73
Број на мерења (n)			6	
Средна вредност			94,17 mg	
Стандардна девијација (SD)			2,93 mg	
Релативна стандардна девијација (RSD)			3,11 %	
Horwitz критериум $\text{RSD} \leq 4,00 \%$				
Декларирана содржина = 100 mg SDM во 1 g прашок				

Виолета Трајковска, ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СУЛФАДИМИДИН И СУЛФАФУРАЗОЛ ВО ВЕТЕРИНАРНИ ЛЕКОВИ СО ПРИМЕНА НА ДЕРИВАТИВНА UV-VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈА, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2014

Табела 12. Прецизност на методот за определување на SDM во Neosulfox P преку

$^1D_{276}$

Очекувана Концентрација $\gamma(\text{SDM})/\mu\text{g mL}^{-1}$	$^1\text{D}_{276}$	$\gamma(\text{SDM})/\mu\text{g mL}^{-1}$ (во проба)	Фактор на разредување	$m(\text{SDM})/\text{mg}$ (во прашок)
15	0,0201	11,36	6.66	75,75
15	0,0205	11,6	6.66	77,30
15	0,0206	11,64	6.66	77,62
15	0,0212	11,85	6.66	79,88
15	0,0221	11,98	6.66	82,94
15	0,0210	12,44	6.66	78,99
Број на мерења (n)			6	
Средна вредност			78,75 mg	
Стандардна девијација (SD)			2,26 mg	
Релативна стандардна девијација (RSD)			2,87 %	
Horwitz критериум $\text{RSD} \leq 4,00 \%$				
Декларирана содржина = 100 mg SDM во 1 g прашок				

Виолета Трајковска, ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА СУЛФАДИМИДИН И СУЛФАФУРАЗОЛ ВО ВЕТЕРИНАРНИ ЛЕКОВИ СО ПРИМЕНА НА ДЕРИВАТИВНА UV-VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИЈА, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2014

5. Прецизност

5.1. Повторливост - ја изразува прецизността при истите услови за работа во краток временски интервал

- најмалку 6 определувања на соодветниот аналит во CRM / или 3 повторувања на 3 конц. нивоа
- иста лабораторија, ист аналитичар, иста опрема,
- intra-day repeatability

5.2. Меѓупрецизност - изразува варијации во рамките на една лабораторија: различни денови (inter-day), различни аналитичари, различна опрема, итн.

$$SD_R^2 = \sum_i SDr_i^2$$

5.3. Репродуцибилност - ја изразува прецизността помеѓу лабораториите - интерлабораториски студии: **ист метод на идентичен тест материјал во различни лаборатории со различни аналитичари и различна опрема**

1. ICH Harmonized Tripartite Guideline (Validation of analytical procedures: Text and Methodology)
2. J.C. Miller and J. N. Miller, Statistic in Analytical Chemistry, 3rd ed., Ellis Horwood Ltd., Chichester, West Sussex, 1994

6. Лимит на детекција

- Најмалата количина на аналитот која може да се детектира но не и неопходно да се квантифицира како егзактна вредност.
- Лимитот на детекција може да се пресмета преку следната равенка:

$$LOD = 3.3 \times SD / \text{наклон}$$

- Каде наклонот се пресметува од калибрационата крива а SD е стандардната девијација базирана на мерење на аналитичкиот одговор на 10 бленка.
- Се користи и $Se_{y,x}$ – ст. грешка на калибрациона права (STEYX – команда во Excel)

7. Лимит на квантификација

- Најмалата количина на аналит во примерокот која може квантитативно да се определи со соодветна прецизност и точност.
- Лимитот на квантификација може да се пресмета од равенката:

$$LOQ = 10 \times SD / \text{наклон}$$

Каде наклонот се пресметува од калибрационата крива а SD е стандардната девијација базирана на мерење на аналитичкиот одговор на 10 бленка.

Се користи и $Se_{y,x}$ – ст. грешка на калибрациона права (STEYX – команда во Excel)

8. Робустност (Robustness/Ruggedness)

- Мерка за капацитетот на аналитичката процедура да остане неизменета во перформансите по мала но намерна варијација во параметрите на методот (стабилност на реагенсите, време на екстракција, состав на мобилната фаза, различни колони, различен проток, рН, температура) и обезбедува индикации за сигурноста на методот во текот на нормалното користење.
- Квантитативно може да се определи преку тестот на значајност - споредба на квадратите на стандардните девијации на соодветниот метод на мерените аналити пред (SDr) и после промената на параметрите (SDy), преку χ^2 тестот, за ниво на веројатност од 95 % и n-1 степени на слобода (табличната вредност е 2,22)

$$SDy^2 / SDr^2 < \chi^2_{1-\alpha, (n-1)} / n-1$$

- Факторите кои значително влијаат на резултатите треба јасно да се идентификуваат во СОП (или во описот, упатството...)

- Примери за **типични варијации** се:
- - стабилност на аналитички раствори
- - време на екстракција.
- Во случај на **течна хроматографија**, примери на типични варијации се:
- - влијание на варијациите на pH во мобилна фаза;
- - влијание на варијациите во составот на мобилната фаза;
- - различни колони (различни лот-ови и/или добавувачи);
- - температура;
- - проток.
- Во случај на **гасна хроматографија**, примери на типични варијации се:
- - различни колони (различни лот-ови и/или добавувачи);
- - температура;
- - проток

Оптимизација

Табела 1. Равенки на калибрациони прави за TMP во соодветни растворувачи

Растворувач	$y=ax + b$ $A_{618}=a \cdot \gamma(\text{TMP}) + b$	$SE_{y,x}$	R	$\gamma(\text{TMP})/\mu\text{g mL}^{-1}$
Етанол	$y=0,0121x-0,0961$	0,0844	0,8828	1 - 35
Метанол	$y=0,0472x-0,0782$	0,0594	0,9953	1 - 35
10% <i>N,N</i> -диметиацетамид во метанол	$y=0,0326x+0,0687$	0,0296	0,9976	1 - 35

* $SE_{y,x}$ - стандардна грешка на калибрационата права на секое y за секое x

Табела 1. Влијание на растворувачот и pH на средината врз аналитичкиот принос на TMP

Растворувач	pH	Recovery %
етанол	неутрална	117,61
метанол	неутрална	111,29
метанол	базна	106,49
<i>N,N</i> -диметилацетамид во метанол	базна	96,98

Марија Соклевска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ТРИМЕТОПРИМ ВО ПОТЕНЦИРАНИ СУЛФОНАМИДНИ ФАРМАЦЕВТСКИ ФОРМУЛАЦИИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2014

Табела 1. Проценка на прецизноста на методот А за определување на TMP во Bactrim®

Очекувана концентрација во пробата $\gamma(\text{TMP})/\mu\text{g mL}^{-1}$	A_{618}	Најдена концентрација во пробата $\gamma(\text{TMP})/\mu\text{g mL}^{-1}$	Фактор на разредување	$m(\text{TMP})/\text{mg}$ (во таблета)
20	0,6694	18,40	4000	73,59
20	0,6800	18,72	4000	74,89
20	0,6455	17,67	4000	70,66
20	0,6497	17,80	4000	71,18
20	0,6695	18,40	4000	73,61
20	0,6371	17,41	4000	69,64
Број на мерења (n)			6	
Средна вредност $\gamma(\text{TMP})/\mu\text{g mL}^{-1}$			18,07 $\mu\text{g mL}^{-1}$	
Стандардна девијација(SD)			0,51 mg	
Релативна стандардна девијација (RSD)			2,84 %	
Horwitz критериум RSD < 4,19 %				
Декларирана содржина = 80 mg TMP во 600 mg таблета				

Марија Соклевска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ТРИМЕТОПРИМ ВО ПОТЕНЦИРАНИ СУЛФОНАМИДНИ ФАРМАЦЕВТСКИ ФОРМУЛАЦИИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2014

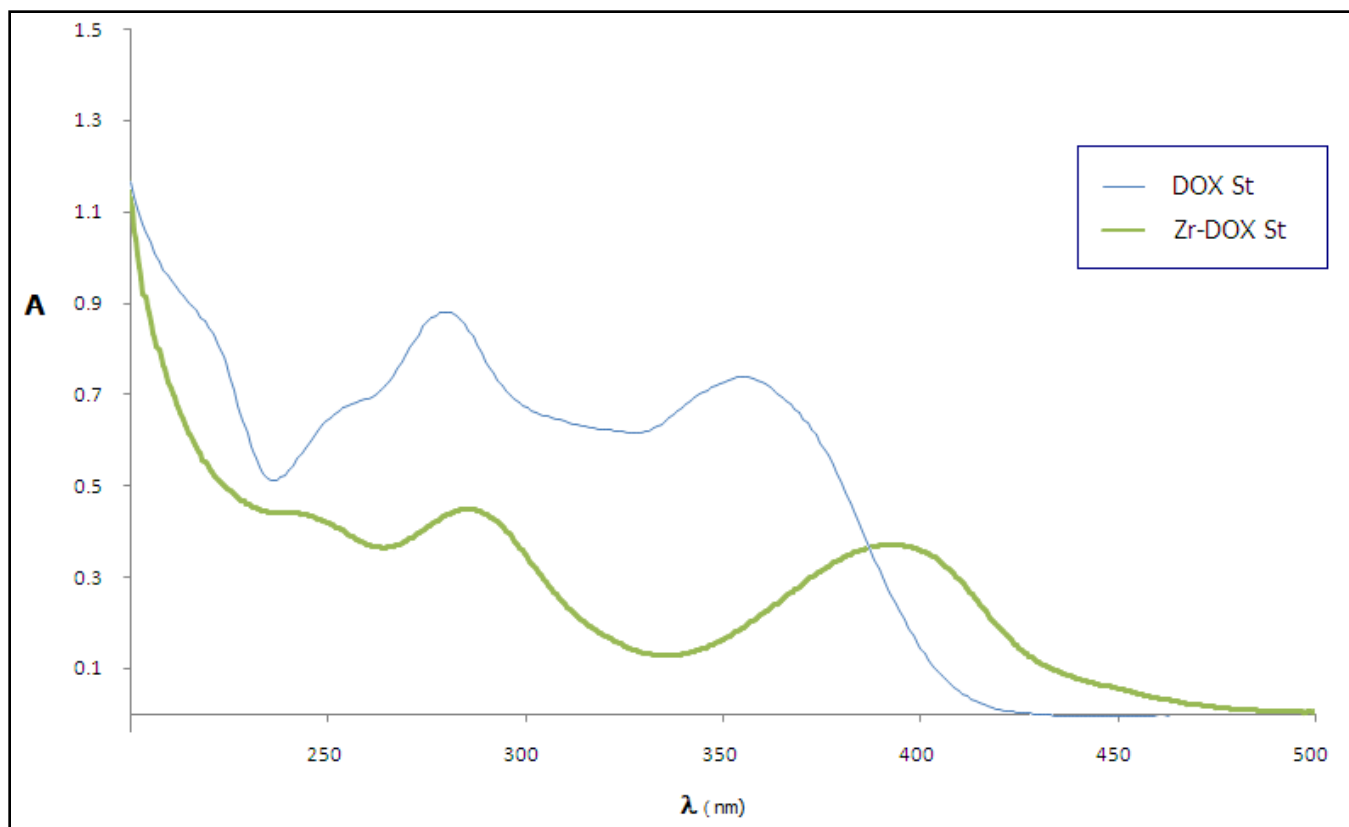
- **Пример за валидација – определување на доксициклин**
- На табелата (Табела 8) што следи сумарно се прикажани резултатите добиени од валидацијата на двата методи (со и без додаток на Zr(IV)).
- **Табела 8.** Сумиран компаративен приказ на резултатите од валидација на двата методи за доксициклин.

Аналитичка техника		UV-Vis-Спектрофотометрија	
Тип на апаратура за валидација		UV – Vis Спектрофотометар VARIAN, Carry Win 50	
Валидациони параметри	Критериуми на прифатливост ^{16,17}	Резултати	
		Без Zr(IV)	Со Zr(IV)
ОПСЕГ:	мин. прифатлива конц. 80 – 120 %	0,7 до 15,0 µg/mL Доксициклин (во облик на хилкат) RS / mL	1,0 до 40,0 µg/mL Доксициклин (во облик на хилкат) RS / mL
ЛИНЕАРНОСТ: Коефициент на корелација R ² :	≥ 0,9900	R ² = 0,9995	R ² = 0,9990
LOD	LOD = 3,3 σ / S	0,42 µg/mL	1,39 µg/mL
LOQ	LOQ = 10 σ / S	1,3 µg/mL	4,23 µg/mL
ТОЧНОСТ:	98,0 – 102,0% ¹⁶	Recovery = 101,57 %*	Recovery = 101,09 %*
Аналитички принос:	95,0 – 105,0 % ¹⁷	Recovery = 99,075 %**	Recovery = 97,432%**
ПРЕЦИЗНОСТ:	RSD ≤ 2,0 % ¹⁶	s = 1,53	s = 1,61
(рипитабилност на методот)	RSD ≤ 2,98 % ¹⁷	RSD = 1,54 %	RSD = 1,64 %

*Работено со спајкување на плацебо; ** Работено со спајкување на прашочната содржина на самата капсула

Марина Наумоска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV-VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА КВАНТИТАТИВНО ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ТЕТРАЦИКЛИНСКИ АНТИБИОТИЦИ ВО ФОРМУЛАЦИИ, БЕЗ И СО ПРИМЕНА НА ЦИРКОНИУМ (IV) ЈОН КАКО КОМПЛЕКСООБРАЗУВАЧ, *Магистерска работа*, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Институт за хемија, Скопје, 2014.

Слика 8. Споредба на UV-спектарот на стандардни раствори на DOX без- ($\lambda_{\max} = 275,5$ и 350 nm) и со- Zr(IV) јон ($\lambda_{\max} = 285$ and 395 nm)



Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

Линеарност и опсег

Табела 9. Концентрациски опсег на DOX и детекторски одговор:

а) метод без додаток на Zr(IV);

Теоретска концентрација (µg/mL)	Работна концентрација (µg/mL)	Апсорбанца ($\lambda = 275,5$ nm)
0,7	0,71	0,0216
0,9	0,88	0,0314
2	1,77	0,0560
4,5	4,42	0,1466
7	7,07	0,2389
9	8,84	0,2999
10	10,60	0,3481
12	12,37	0,4105
15	15,02	0,4924

б) метод со додаток на Zr(IV)

Теоретска концентрација (µg/mL)	Работна концентрација (µg/mL)	Апсорбанца ($\lambda = 395$ nm)
1	0,92	0,0233
2	1,85	0,0460
3	2,77	0,0716
5	4,62	0,1227
10	9,24	0,2300
15	13,86	0,3694
20	18,48	0,5006
30	27,72	0,7858
40	36,96	1,0198

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

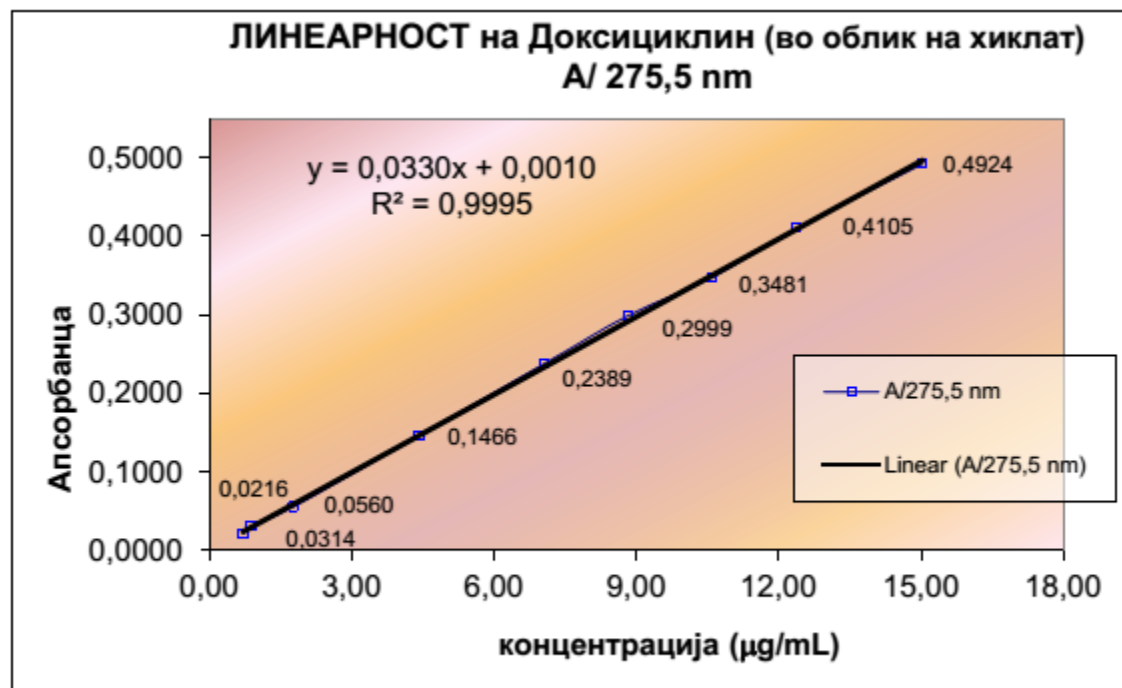


График 1. Линеарност на DOX без додаток на Zr(IV), на бранова должина $\lambda = 275,5$ nm.

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

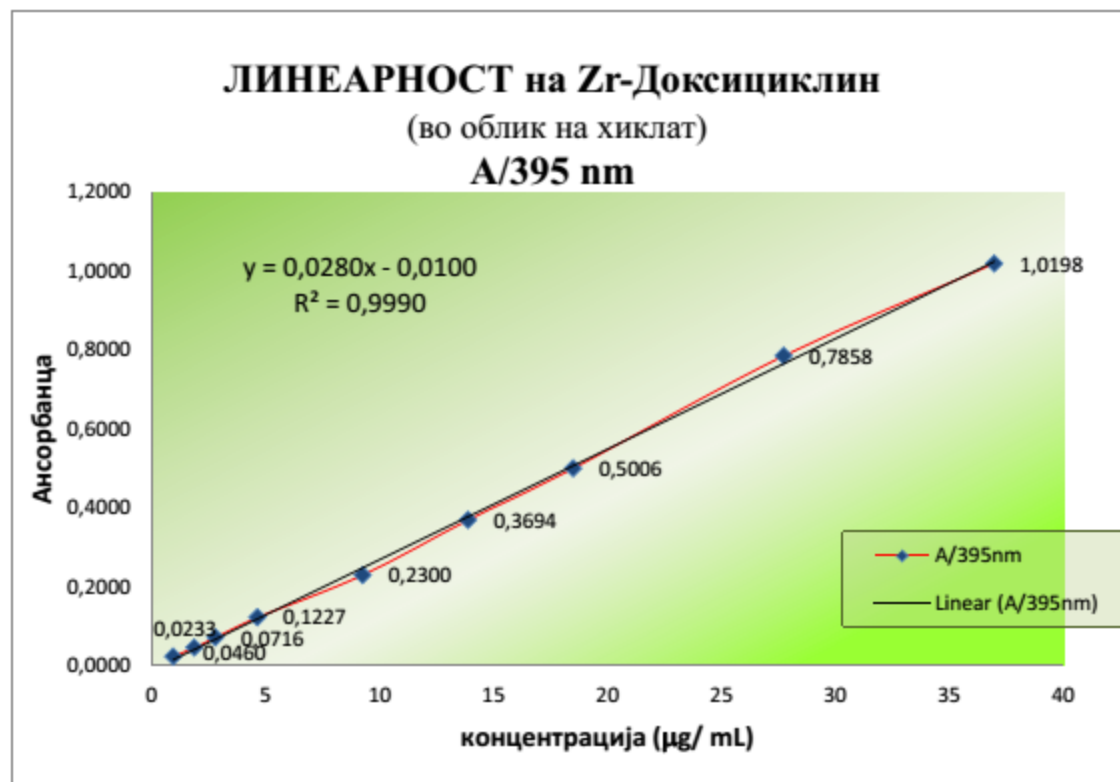


График 2. Линеарност на DOX со додаток на Zr(IV), на бранова должина $\lambda = 395 \text{ nm}$.

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

4.1.2 Лимит на детекција и квантификација

Лимитот на детекција (LOD), како и лимитот на квантификација (LOQ) во двата случаја се одредени врз база на резидуалната стандардна девијација на одговорот и наклонот на правата. Се пресметува според следнава формула:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad (8)$$

$$LOQ = \frac{10 \sigma}{S} \quad (9)$$

Каде σ = е резидуалната стандардната девијација на одговорот, а S = е наклонот на калибрационата права.

Пресметковно од Табела 9 (а и б) добиени се следниве вредности прикажани во следнава табела:

Табела 10. Сумарни резултати за LOD и LOQ за Доксициклин

	DOX	Zr-DOX
σ	0,0042	0,0118
S	0,0330	0,0280
LOD	0.42 $\mu\text{g/mL}$	1.27 $\mu\text{g/mL}$
LOQ	1.3 $\mu\text{g/mL}$	4.23 $\mu\text{g/mL}$

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

Точност (Аналитички принос)

Табела 11. Точност на методот за определување на DOX без Zr(IV).

Одвага стандард доксициклин хиклат (mg)	на	Просечна спајкувана концентрација на доксициклин (µg/mL)	Добиена концентрација (µg/mL)	Аналитички принос (%), n = 3
86,55	7,34	7,44	101,34	
		7,45	101,55	
		7,46	101,63	
123,11	10,44	10,63	101,79	
		10,64	101,88	
		10,64	101,94	
163,49	13,87	14,07	101,45	
		14,06	101,43	
		14,03	101,17	
			Просечен аналитички принос (%) =	101,57
			S.D. =	0,26
			RSD (%)	0,25

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

Табела 12. Точност на методот за определување на DOX со додавање на Zr(IV).

Одвага стандард доксициклин хиклат (mg)	на	Просечна спајкувана концентрација на доксициклин (µg/mL)	Добиена концентрација (µg/mL)	Аналитички принос (%), n = 3
70,00	9,50		9,57	100,74
			9,65	101,58
			9,60	101,05
106,40	14,44		14,59	101,04
			14,69	101,73
			14,61	101,18
139,4	18,92		19,00	100,42
			19,04	100,63
			19,19	101,43
			Просечен аналитички принос (%) =	101,09
			S.D. =	0,442
			RSD (%)	0,437

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

Метод на стандарден додаток

Табела 13. Начин на спајкување и аналитички принос - **recovery** - на DOX

Бранова должина (nm) = 275,5		Спајкувана конц. µg/mL	Апсорбанца	Добиена конц. µg/mL	Recovery (%)	Просечен Рес. (%)
Стандард 7µg/mL	7,07		0,2389	7,20		
Проба.1.0	7	0	0,2390	7,21		98,18
Проба.1.1	7+4,5	4,42	0,3828	11,56	98,58	
Проба.1.2	7+10	7,07	0,4692	14,18	98,63	
Проба.1.3	7+15	8,84	0,5229	15,81	97,31	
Проба.2.0	10	0	0,3428	10,35		99,53
Проба.2.1	10+4,5	4,42	0,4890	14,78	100,23	
Проба.2.3	10+10	10,60	0,6892	20,84	98,95	
Проба.2.4	10+12	12,37	0,7489	22,65	99,43	
Проба.3.0	12	0	0,4115	12,43		99,51
Проба.3.1	12+7	7,07	0,6459	19,53	100,43	
Проба.3.2	12+10	10,60	0,7598	22,98	99,49	
Проба.3.3	12+12	12,37	0,8143	24,63	98,62	
					Просечен аналитички принос - Recovery(%):	99,075

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

Табела 14. Начин на спајкување и аналитички принос - **recovery** - на Zr-DOX
а) наспроти дејонизирана вода како слепа проба

Бранова должина (nm), 395		Спајкувана конц. µg/mL	Апсорбанца	Добиена конц. µg/mL	Recovery (%)	Просечен Rec. (%)
Стандард 10µg/mL	9,24		0,2448	9,10		
Проба.1.0	5	0	0,1598	6,07		
Проба.1.1	5+5	4,62	0,2721	10,08	86,84	
Проба.1.2	5+10	9,24	0,3977	14,57	91,96	
Проба.1.3	5+15	13,86	0,5277	19,21	94,83	91,21
Проба.2.0	10	0	0,3147	11,60		
Проба.2.1	10+5	4,62	0,4339	15,86	92,17	
Проба.2.3	10+10	9,24	0,5660	20,58	97,17	
Проба.2.4	10+15	13,86	0,7117	25,79	102,34	97,23
Проба.3.0	15	0	0,4533	16,55		
Проба.3.1	15+10	9,24	0,7059	25,58	97,66	
Проба.3.2	15+15	13,86	0,8540	30,87	103,29	
Проба.3.3	15+20	18,48	0,9694	34,99	99,77	100,24
					Просечен аналитички принос - Recovery(%):	96,22

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

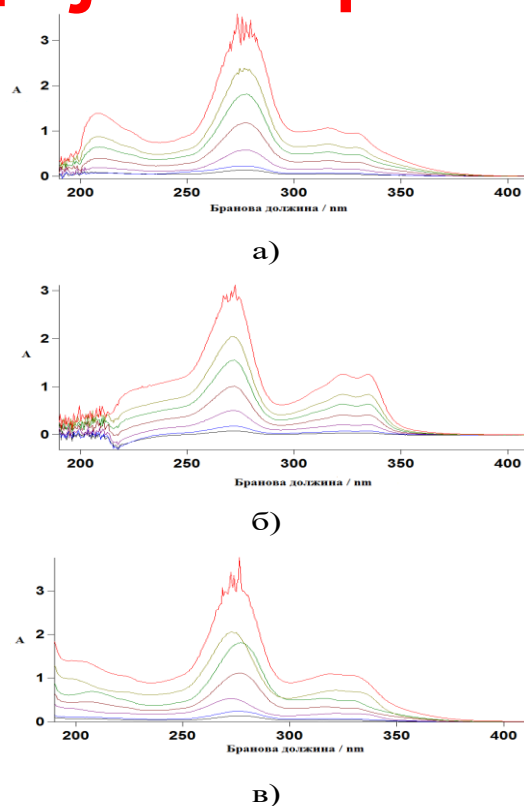
Прецизност

Табела 15. Сумарен приказ на прецизността на методот, без и со додавање на Zr(IV).

Метод без Z(IV)		Метод со Zr (IV)	
Изразена како финално добиена концентрација на тест растворот (10 µg/mL)	Изразена во % од декларираната содржина / капсула	Изразена како финално добиена концентрација на тест растворот (15 µg/mL)	Изразена во % од декларираната содржина / капсула
10,04	100,43	14,53	96,86
10,22	102,23	14,43	96,17
10,08	100,81	14,29	95,29
9,98	99,83	14,59	97,30
9,83	98,33	14,95	99,65
10,19	101,88	14,79	98,58
10,24	102,36	14,91	99,38
9,85	98,49	14,98	99,85
10,21	102,08	14,87	99,16
9,94	99,37	14,86	99,07
Просечна содржина = 100,58 % S.D. = 1,53 RSD (%) = 1,54		Просечна содржина = 98,13 % S.D. = 1,61 RSD (%) = 1,64	

Марина Наумоска, *Магистерска работа*, 2014.

Валидација - пример



Слика 1. UV спектри на на серија стандардни раствори на енрофлоксацин со масена концентрација од 1–30 $\mu\text{g/mL}$, приготвени во 0,1 mol/L HCl (а), 0,1 mol/L NaOH (б) и двојно дејонизирана вода (в)

- Елена Цветковска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕНРОФЛОКСАЦИН ВО ВЕТЕРИНАРНИ МЕДИЦИНСКИ ПРЕПАРАТИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2016

Линеарност и опсег

Табела 6. Статистички параметри на калибрационата крива на зависност на концентрацијата на ENR од апсорбанцата, за серијата стандардни раствори подготвени со 0,1 mol/L HCl (а), 0,1 mol/L NaOH (б) и двојно дејонизирана вода (в)

Сигнал	$y = ax + b$	$STE_{y,x}$	R^2	LOD	LOQ
A ₂₇₇	$y = 0,1199x - 0,0028$	0,0207	0,9997	0,52	1,73
A ₃₁₆	$y = 0,0353x + 0,0019$	0,0089	0,9993	0,76	2,54
A ₃₃₀	$y = 0,0313x + 0,0014$	0,0084	0,9992	0,80	2,68

а)

Сигнал	$y = ax + b$	$STE_{y,x}$	R^2	LOD	LOQ
A ₂₇₂	$y = 0,1050x - 0,0273$	0,0093	0,9999	0,26	0,88
A ₃₂₂	$y = 0,0428x - 0,0082$	0,0050	0,9998	0,35	1,17
A ₃₃₅	$y = 0,0418x - 0,0045$	0,0044	0,9999	0,32	1,06

б)

Сигнал	$y = ax + b$	$STE_{y,x}$	R^2	LOD	LOQ
A ₂₇₆	$y = 0,1182x - 0,0224$	0,5232	0,9970	13,28	44,27
A ₃₁₈	$y = 0,0348x + 0,0046$	0,2494	0,9993	21,45	71,48
A ₃₃₀	$y = 0,0313x - 0,0089$	0,0108	0,9989	1,04	3,46

в)

Табела 7. Статистички параметри на калибрационата крива на зависност на концентрацијата на ENR од апсорбанцата, за серијата стандардни раствори подготвени со 0,01 mol/L NaOH

Сигнал	$y = ax + b$	R^2	$STE_{y,x}$	LOD	LOQ
A ₂₇₁	$y = 0,0957x + 0,0105$	0,9998	0,0094	0,29	0,98
¹ D ₂₇₉	$y = 0,0063x + 0,0002$	0,9999	0,0005	0,26	0,86

- Елена Цветковска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕНРОФЛОКСАЦИН ВО ВЕТЕРИНАРНИ МЕДИЦИНСКИ ПРЕПАРАТИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2016

Табела 8. Вредности за концентрациите на ENR во пробите од таблета екстрахирана со 0,01 mol/L NaOH, двојно дејонизирана вода, 20 % етанол и 20 % метанол, при три различни сигнали

*dd – двојно дејонизирана

Растворувач	Аналитички принос %		
	A ₂₇₁	A ₃₂₂	A ₃₃₅
0,01M NaOH	100,42	99,37	98,49
dd H₂O	81,73	85,73	85,86
20% CH₃CH₂OH	101,61	104,12	104,92
20% CH₃OH	83,66	84,57	84,51

- Елена Цветковска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕНРОФЛОКСАЦИН ВО ВЕТЕРИНАРНИ МЕДИЦИНСКИ ПРЕПАРАТИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2016

Табела 11. Вредности за концентрацијата на ENR во пробите и приносот на реакцијата во однос на растворувачот и волуменот на растворувачот, квантифицирани на 271 nm

Растворувач	V(растворувач) / mL	A ₂₇₁					
		γ (ENR)/μg/mL			Аналитички принос %		
		Обид 1	Обид 2	Обид 3	Обид 1	Обид 2	Обид 3
NaOH	25	5,26	5,42	5,37	101,45	100,85	100,42
NaOH	50	5,62	5,37	5,62	89,21	122,31	95,51
H ₂ O	25	3,70	2,93	4,42	87,80	94,44	100,34
H ₂ O	50	4,48	4,48	4,03	117,06	91,19	99,86

- Елена Цветковска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕНРОФЛОКСАЦИН ВО ВЕТЕРИНАРНИ МЕДИЦИНСКИ ПРЕПАРАТИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2016

Табела 17. Средни вредности за аналитичкиот принос на пробите од инјекција филтрирани со различни типови на филтри

Тип на филтер	Аналитички принос % (средна вредност)	
	A ₂₇₁	¹ D ₂₇₉
0,22 µm (хидрофилен)	80,69	71,62
0,22 µm (липофилен)	94,99	83,52
0,45 µm	103,58	90,23
Без филтрирање	100,97	86,86

- Елена Цветковска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕНРОФЛОКСАЦИН ВО ВЕТЕРИНАРНИ МЕДИЦИНСКИ ПРЕПАРАТИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2016

Точност (Аналитички принос)

Табела 18. Средни вредности за аналитичкиот принос на пробите од таблета, квантифицирани на A_{271}

γ (ENR од додаден стандарден раствор)/ $\mu\text{g/mL}$	Аналитички принос (%) $\pm$ RSD (%)			
	A_{271}			
	Ден 1	Ден 2	Ден 3	Средна вредност
2,5	102,64 $\pm$ 2,77	98,00 $\pm$ 2,61	94,48 $\pm$ 2,81	98,37 $\pm$ 2,73
5,0	102,51 $\pm$ 2,45	98,05 $\pm$ 1,52	98,75 $\pm$ 0,38	99,77 $\pm$ 1,38
7,5	97,51 $\pm$ 0,90	97,59 $\pm$ 1,33	101,60 $\pm$ 2,75	98,90 $\pm$ 1,66

- Елена Цветковска, ОПТИМИЗАЦИЈА И ВАЛИДАЦИЈА НА UV/VIS СПЕКТРОФОТОМЕТРИСКИ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ЕНРОФЛОКСАЦИН ВО ВЕТЕРИНАРНИ МЕДИЦИНСКИ ПРЕПАРАТИ, Магистерска работа, ПМФ, УКИМ, Скопје, 2016

Прецизност

Табела 20. Средни вредности за резултатите добиени при испитувањето на прецизноста за пробите од таблета, квантифицирани на A_{271}

Сигнал очекувана $\gamma(\text{ENR}) /$ $\mu\text{g/mL}$	A_{271}						Критериум на Horwitz % 2,95
	детектирана $\gamma(\text{ENR}) /$ $\mu\text{g/mL}$	$m(\text{ENR}) /$ mg	% од ДВ*	SD/mg	$RSD / \%$ (n=6)	HorRat	
5,0	5,40	49,34	96,68	1,09	2,07	0,70	
7,5	8,04	48,98	98,02	1,11	1,93	1,75	
10,0	11,02	50,33	100,65	1,86	1,06	0,46	

* % од декларирана вредност



Ориентациони или скрининг методи (screening-”скрининг”)

Ориентациони методи (screening-"скрининг")

- Скрининг методи се дефинирани како методи кои се користат за да се утврди **присуство** на аналит или класа на аналити во мострата за анализа на **ниво од интерес**.
- Овие методи овозможуваат **голем број** на проби во единица време и се користи за филтрирање на потенцијално голем број на примероци, за потоа позитивните да бидат потврдени со конфирмациони методи.
- Скрининг методи се **специјално дизајнирани** за да се избегнат "**лажно негативни резултати**".
- **Ниво од интерес** обично е правен или законски лимит - (*Regulatory Limit*, *MRL- Maximum Residue Limits*, *MRPL- Minimum required performance limits*) или ниво / граница на превземање на мерки (*Action Level/Limit*)

Класификација на “скрининг” методи

Скрининг методи можат да се класифицираат во согласност со принципот на утврдување или според тоа дали се квалитативни или (полу)квантитативни.

- Класификацијата според принципот на утврдување / докажување
- Класификација според степенот на квантификација

Класификацијата според принципот на утврдување и докажување

- **Биолошки методи** се базираат на клеточен одговор на мострата за анализа (на пример, на естроген ефект, инхибиција на бактериски раст, клеточни ефекти, хормонални ефекти).
- Овие методи не се селективни и можат да покријат неколку хемиски класи на активни аналити (на пример, хормони, антимикроби).
- Тие не дозволуваат идентификација на индивидуалните аналити.

Класификацијата според принципот на утврдување и докажување

Биохемиски методи – се базираат на молекуларни интеракции (на пример, антигени, протеини) помеѓу аналит и антитело или рецептор на протеини

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* (ензимски поврзан имуносорбентен тест)

Hornbeck, P. 2015. *Enzyme-linked immunosorbent assays*. *Curr. Protoc. Immunol.* 110:2.1.1-2.1.23. doi: 10.1002/0471142735.im0201s110

RIA – *radioimmunoassay* (радиоимуно анализа)

- Хемиско означување на аналит или антитело / рецептор овозможува интеракција да биде следена и мерлива.
- Овие методи се селективни за група на аналити кои имаат слична молекулската структура
-или се понекогаш аналит-специфични.

Класификацијата според принципот на утврдување и докажување

- **Физичко-хемиски методи** – ја разликуваат хемиска структура и молекуларни карактеристики со сепарација на молекули (на пр. TLC, GC, HPLC) или го детектираат сигнал во врска со молекуларна карактеристика (npr. UV- DAD, Visible, Fluo, FID- flame ionization detector, ECD-electron capture detector, MS, тандем MS (MS/MS, MS_n), ion trap MS, ToF MS - *Time-of-flight* mass spectrometry, и други хибридни MS техники).
- Тие се во состојба да одделат соединенија слични по молекуларна структура и овозможат симултана анализа на различни аналити.

Класификација според степенот на квантификација

Квалитативни методи

- Квалитативни методи даваат да/не одговор, без индикација за концентрацијата на претпоставениот аналит во мострата за анализа.

Примери:

- тестови на инхибиција на бактериски раст, кои даваат резултат> “без зона” или “зона на инхибиција”
- инхибициски тестови кои даваат резултати во промена на бојата
- имунохемиски / лиганд врзани тестови, каде што одговорот е “над” или “под” на ниво на резолуција; или каде што аналити со различни вкрстена реактивност (crossreactivities) се вклучени во опсегот на методот
- хроматографски испитувања (HPLC, LC-MS / MS, ...), каде што врвот (пик=peak) се смета за “присутен” или “отсутен” – тие можат лесно да бидат валидирани како квалитативни скрининг методи кога не се бара квантификација на аналитот.

Класификација според степенот на квантификација

Полуквантитативни методи

- Полуквантитативни методи даваат индикација за приближна концентрација на анализот.
Поради приближна бројна вредност - не може да се смета за извештај, но може да корисно за аналитичар во одлучувањето на калибрациски опсег за некои наредни квантитативни испитувања.

Примери:

- инхибициски тестови на микробен раст, каде што се обидува да се направи врска помеѓу зона на инхибиција со претпоставена концентрација на анализот
- биохемиски тестови кои вклучуваат калибрациона крива (нпр., ELISA, но само ако тестот е специфичен за одделни анализи
- хроматографски тестови, калибрирани во краток опсег, при што е можно да не се добие одговор на анализот
- сите физичко-хемиските испитувања (HPLC, LC-MS / MS, ...), каде што карактеристиките на прецизноста на методот не ги исполнуваат условите за квантитативни испитувања.

Класификација според степенот на квантификација

Квантитативни методи

- Квантитативни методи ги исполнуваат истите барања за точност, опсег и прецизност како конфирмациони тестови.
- Кога е потребна квантификација, овие методи треба да бидат валидирани како конфирмациони методи.

Принципи за валидација на скрининг методи

■ Клучни услови

- Клучен услов за скрининг метод (било квалитативен или (полуквантитативен), е способноста да **сигурно одреди бараниот аналит** од мострата за анализа - во ориентациска концентрација и при тоа да се избегнат погрешни резултати.
- Ориентациска концентрација треба да биде **доволно ниска** за да се обезбеди дека ако аналит е присутен на правно ниво во примерокот, примерокот да биде класифициран како "**ориентациски позитиван**".
- Валидација треба да обезбеди објективен доказ дека овие услови се исполнети.
- Валидација мора да ја покрие цела комбинација на матрица / врста / аналит како што е утврдено во СОП на методот.
- Минималните карактеристики на скрининг методи - општ принцип - мора да има доволна разлика помеѓу целната концентрација на аналитот и правно ниво.
- Затоа, ССВ мора да биде помала или еднаква на правно – регулаторно ниво.
- Треба да се забележи дека еден скрининг метод не е доволен за да со сигурност се утврдат сите релевантните целни аналити во правното ниво во сите матрици и видови.
- дополнителни тестови со користење на алтернативни методи

Избор на аналити за валидација

- Изборот на аналити кои ќе бидат користени за студија за целосна или скратена валидација зависи од опсегот на скрининг метод кој е опишан во СОП-от на методот.
- Ако скрининг метод не може да изврши одделување-одредување на различни аналити во рамките на една хемиски класа (нпр. тетрациклини или бета-лактами) валидација треба да се изведе за секој аналит кој се смета за релевантен за лабораторија.
- На пример, релевантни аналити се сите аналити за кои се бара (од лабораторија) да бидат вклучени во нпр. годишна програма за одредување на резидуи (остатоци).

Лимит на одлучување $CC\alpha$

- $CC\alpha$ - лимит **Над** кој може да се одлучи дека некој примерок не одговара, со ниво на веројатност на грешката α (5 %)
- Во случај на супстанции за кои **не е воспоставено** дозволено ниво, $CC\alpha$ може да се определи со анализирање на најмалку 20 бленка за секој матрикс и пресметување на односот сигнал/шум во временскиот интервал во кој се очекува примерокот.
- Со множење на односот сигнал шум со 3 се пресметува лимитот на одлучување. Применливо е за квалитативни и квантитативни анализи.

$$CC\alpha = 3 \times \text{signal/noise}$$

- Во случај на супстанции **со воспоставено** дозволено ниво, $CC\alpha$ може да се определи со анализирање на најмалку 20 бленк материјали спајкувани со аналитот со концентрација која одговара на дозволеното ниво. Соодветната концентрација на дозволеното ниво плус 1,64 пати по соодветната стандардна девијација одговара на лимитот на одлучување ($\alpha = 5\%$).

$$CC\alpha = MRL + 1.64 \times SD_{RW}$$

Способност за детекција ССβ

- ССβ - најмалата содржина на анализот која може да се детектира, идентификува и или квантификува во примерокот со веројатност на грешка $\beta = 5\%$.
 - И во двата случаи:
 - на супстанции за кои **нема воспоставено дозволено ниво**,
 - на супстанции **со востановен дозволен лимит**
- способноста за детекција се определува на следниот начин:
- се анализираат 20 бленк примероци за секој матрикс спајкувани со анализот на нивото лимитот на одлучување.
 - Се анализираат примероците и се идентификува анализот.
 - Вредноста на лимитот на одлучување плус 1,64 пати по вредноста на стандардната девијација на интерлабораториската репродукцибилност на мерениот анализ е еднаква на способноста на детектирање ($\beta = 5\%$).

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64 \times SD_{RW}$$

Што значат $CC\alpha$ и $CC\beta$

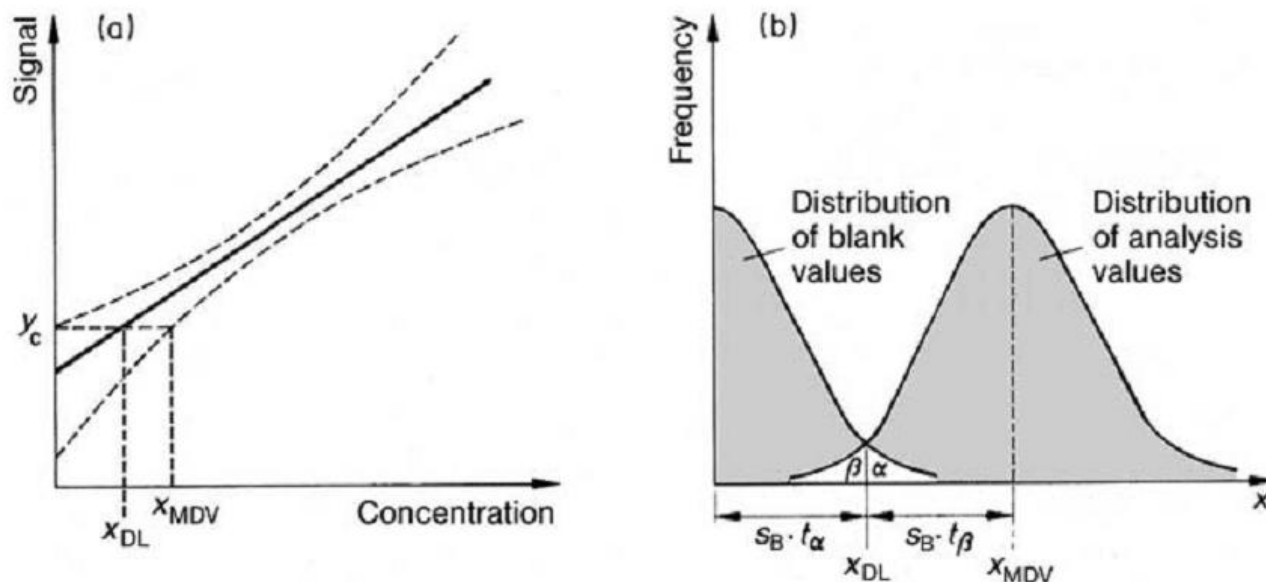


Fig. 1-12 Minimum detectable value.

a) obtained using the calibration function with its associated confidence interval;

b) obtained using the distribution of blank values; important assumption: s is identical.

Скрининг методи: $CC\beta$ – 5% од резултатите е можно да бидат
ЛАЖНО НЕГАТИВНИ

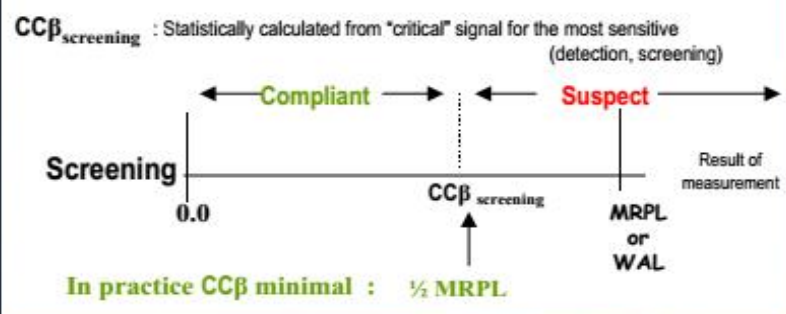
Конфирмациони методи: $CC\alpha$ – 5% од резултатите е можно да бидат
ЛАЖНО ПОЗИТИВНИ

ССα и ССβ – одлучување

Screening Methods

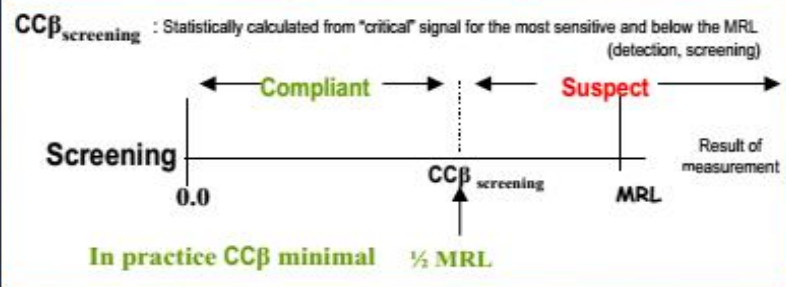
Non authorized substances

(S/N < 6-10)



Authorized MRL Substances

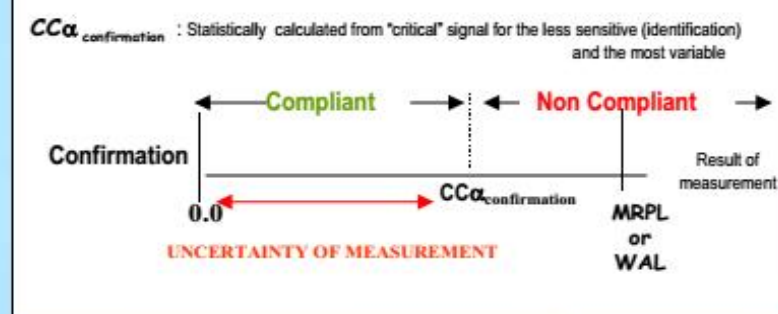
(S/N >> 6-10)



Confirmatory Methods

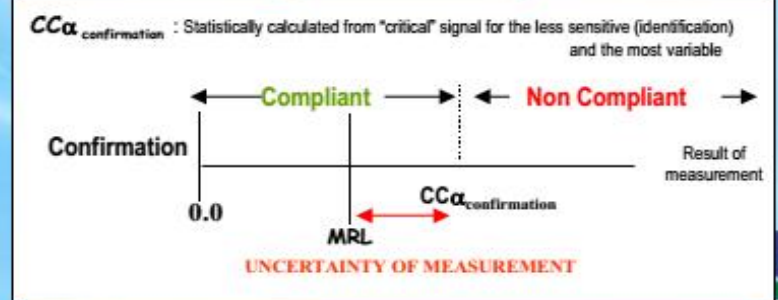
Non authorized substances

(S/N < 6-10)



Authorized MRL Substances

(S/N >> 6-10)



compliant =сообразен

suspect=сомнителен

Прашања за вежбање

- Што претставува валидација на аналитичките методи?
- Која је разликата помеѓу валидација и верификација?
- Која је целта при оптимизација и валидација на еден метод?
- Што претставува специфичност, а што селективност?
- Што претставува концентрациски опсег, а што опсег на методот?
- Што претставува прецизноста на методот и како се изразува?
- Што е меѓупрецизност?
- Што претставува робустност?
- Што се интерлабораториски тестови? Која е нивната цел?
- Што се скрининг методи и за што се специјално дизајнирани?
- Како се класифицираат скрининг методи по принципот на утврдување?
- Наведете го клучниот услов за скрининг метод. Колку треба да биде ниска оринтациска концентрација? Кои се минималните карактеристики на скрининг метод?
- Што претставува лимитот на одлучување CC_{α} и како се пресметува за супстанции кај кои не е, а како кај супстанции кај кои е воспоставено дозволено ниво?
- Што претставува способност за детекција CC_{β} ? Како се пресметува за супстанции со востановен дозволен лимит? Колкава вредност треба да има CC_{β} кај скрининг методи?

УПРАВУВАЊЕ СО КВАЛИТЕТ ВО ХЕМИСКА ЛАБОРАТОРИЈА

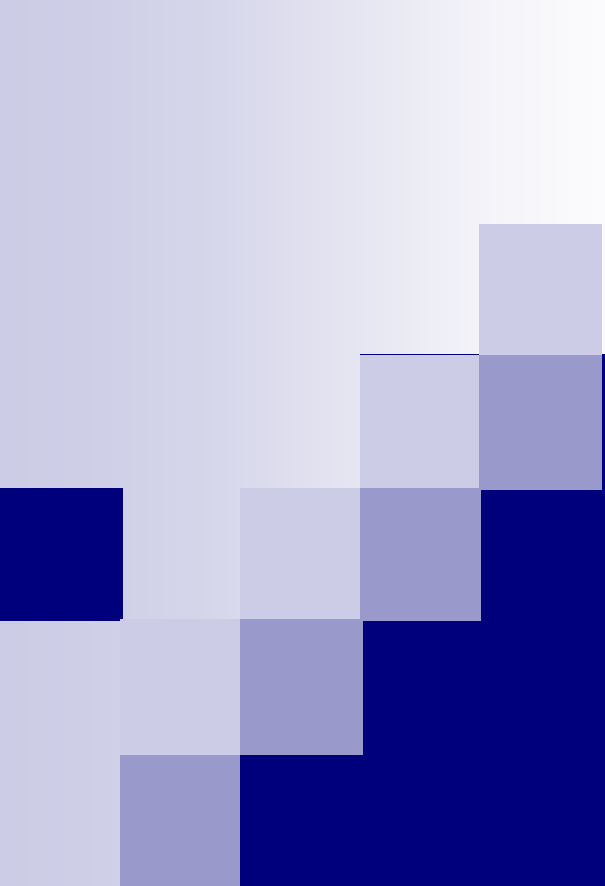
Материјал за втор колоквиум

Проф. Д-р Горан Стојковиќ,

Институт за хемија, Природно-математички факултет

Научен советник Д-р Елизабета Димитриеска-Стојковиќ,

Институт за храна, Факултет за ветеринарна медицина - Скопје



4. Мерна неодреденост

МЕРЕЊЕ И МЕРНА НЕОДРЕДЕНОСТ

- Неодреденост= uncertainty
- Уште Берцелиус (Berzelius, 1779–1848) забележал дека ни едно мерење во хемијата не е апсолутно егзактно – точно.
- Модерен пристап, според International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM, Joint Committee for Guides in Metrology, 2007), под **мерењето подразбира множество од дејствија (акции) кои допринесуваат кон зголемување сознанија за непозната вредност која е предмет на мерењето.**
- **Покрај проценката на вистинската вредност на мерената величина, тука е вклучена и проценка на мерната неодреденост на мерените резултати.**
- Оцена на мерната неодреденост е овозможена од природата на секоја компонента во вкупната неодреденост.

...ВИДОВИ грешки

- Постојат различни видови грешки кои допринесуваат кон појава на варијации во аналитичките резултати:
- **Случајни** грешки (спомнати и третирано од страна на статистиката во врска со нормална дистрибуција).
- **Систематски** грешки (bias and recovery) – треба да бидат определени и врз основа на нив резултатите треба да бидат соодветно коригирани.
- **Големи** – gross errors (би можеле да се наречат и глупи) грешки – или грешки од невнимание – нпр. прелевање на аналитот, поместување на децимална запирка (точка), користење на погрешен реагенс и сл. Важно е да бидат забележани, документирани и отстранети.

МЕРНА НЕОДРЕДЕНОСТ

- Со мерење се добива вредноста на мерна величина во однос на мерна единица.
- Примена на резултатите од мерењето е можна само со познавање на нивниот квалитет.
- **Квалитет на резултатите од мерењето се искажува со мерна неодреденост.**
- Доколку мерна неодреденост е помала, квалитетот на резултатите од мерењето е поголем.
- Мерна неодреденост се изразува со **стандардна девијација или проширена стандардната девијација** и тоа е параметар кој се придружува кон мерните резултати.
- **Целокупен резултат на мерење се состои од процена на мерна величина, мерна неодреденост и мерна единица**
- Резултат може да се добије од едно или повеќе мерења (во тој случај резултат е аритметичка средина од сите повторувања).

Главни причини за мерна неодреденост

- Главни причини за мерна неодреденост:
 - нецелосна и несовршена реализација на дефиницијата на мерна величина
 - нерепрезентативен примерок на основно множество
 - недоволно познавање на условите (лабораториски, атмосферски, и др.) кои влијаат на мерењето
 - субјективност во мерењето
 - недоволна точност на стандардот - еталонот
 - разни апроксимации и претпоставки вклучени во процесот на мерење
 - големи разлики во повторени мерења при навидум исти услови

МЕРНА НЕОДРЕДЕНОСТ

- Познавајќи ја функцијата на распределба на податоците, може да се определи веројатноста која одговара на дадените податоци.
- Од тука следува дека сите видови на мерна неодреденост имаат случаен карактер, и затоа им се придружува соодветна функција на распределба.
- Важно е да се нагласи дека при изразувањето на мерна неодреденост се користат повеќето од термините, како и математички апарат, кои се користат и во класична статистичка теорија, но воведени се и нови поими за областа на изразување на мерна неодреденост.
- **Усвоено е дека мерна неодреденост се означува со буква “*u*” (од зборот *uncertainty*).**
- Основниот принцип е дека на секој податок за неодреденост се придружува соодветна функција на распределба, како и веројатноста, односно статистичка сигурност.

Стандардна мерна неодреденост

- Стандардна мерна неодреденост, u , по дефиниција е еднаква на стандардната девијација $u = s = \sigma$.
- Статистичка сигурност која одговара на стандардна мерна неодреденост зависи од распределбата која се припишува на дадено мерење.

На пример, во случај на Гаусова распределба:

- на интервалот во широчина на една стандардна девијација ($x_s \pm \sigma$) одговара сигурност (веројатност) од 68%,
- на интервалот ($x_s \pm 2\sigma$) одговара сигурност од 95% и
- на интервалот ($x_s \pm 3\sigma$) одговара сигурност од 99%.

Типови на мерна неодреденост

- Мерна неодреденост од **тип А** се определува исклучиво со користење на статистичка анализа на резултатите, а тоа значи дека мерна неодреденост од тип А постои само ако се работи за мерење кое е повторено повеќе пати.
- Мерна неодреденост од **тип В** се определува преку сите други методи, освен со статистичка анализа.
- **Комбинираната** мерна неодреденост може да се дефинира како вкупна мерна неодреденост, која се состои од мерна неодреденост од тип А и мерна неодреденост од тип В.
- Под комбинирана мерна неодреденост u_c подразбира се и сложена мерна неодреденост, обично во врска со пресметката на стандардна девијација кај функции на повеќе независно променливи.

Проширена мерна неодреденост

- Проширената мерна неодреденост, U , претставува производ на стандардната мерна неодреденост u , и коефициентот на проширување K :

$$U = K u$$

- Коефициент на проширување K може да има вредност **во интервал од $3^{1/2}$ до 3**, во зависност од распределба.
- Во некои литератури, може да се најде и погруба проценка, т.е.
 K се движи од 2 – 3
- **Важно: на проширената мерна неодреденост одговара висока вредност на статистичка сигурност-веројатност, од редот на величина од 99%.**
- Ова значи дека мерената величина со висока веројатност од ~99% се наоѓа во интервалот: **$x_s \pm u$**

- Кога постојат оправдани причини за тоа, несигурност на резултатите може да се прикаже преку проширена мерна неодреденост U .
- Тогаш е потребно да се наведе коефициент на проширување K и статистичка сигурност (веројатност).
- Ако е Гаусова распределба, преку статистичка веројатност е лесно да се утврди коефициентот на проширување K .
- Меѓутоа, ако статистичка дистрибуција не е Гаусова, потребно е да се наведе за каква распределба на податоците станува збор, како и соодветни релевантни информации од кои може да се одреди коефициент на проширување.
- На пример, ако резултатот е аритметичка средина од мал број на повторени мерења ($n < 30$), тогаш треба да се наведе бројот на степени на слобода, или бројот на повторени мерења врз основа на кои коефициентот на проширување може да се прочита од таблица на студентова распределба.

Типови на мерна неодреденост

- Постојат два основни типови видови на мерна неодреденост.
- Тие се тип А и тип В
- Оваа поделба се базира само врз основа на методите со кои тие мерни неодредености се одредуваат.

■ Мерна неодреденост од тип А

- Мерна неодреденост од тип А (ознака u_A) се определува со статистичка анализа на резултатите кои се утврдени со повторување на мерења.
- Од n повторени мерења $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$, може да се пресмета:
- нивната средна вредност $\bar{x}$,
- стандардната девијација на поединечните резултати $u_A = s$
- стандардна девијација на средната вредност на мерења $u_{A\bar{x}} = s_{\bar{x}}$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

$$u_A = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

$$u_{A\bar{x}} = \frac{u_A}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

- Кај доволно голем број на мерењата, на средната вредност на мерења обично се придружува Гаусова распределба, без оглед на распределбата на самите мерења.
- Со повторување на мерења и пресметка на средната вредност, мерната неодреденост на резултатите, настаната со случајно отстапување односно девијација, може да се намали за фактор

$$1/\sqrt{n}$$

- **Мерна неодреденост од тип А - Гаусова распределба**

Мерна неодреденост од тип В

- Мерна неодреденост од тип В може да се утврди од едно (поединечно) мерење.
- Мерна неодреденост од тип В (ознака u_B)
 - се одредува со индивидуална анализа на мерење
 - не зависи од бројот на повторувања
- Стандардна мерна неодреденост од тип В, претставува стандардна девијација добиени со анализа на различни влијанија врз резултатот од мерења.

Проценка на мерна неодреденост од тип В се заснова на:

- Спецификација на инструментите кои се користат при мерењето.

Во спецификацијата на инструментите обично се внесени **граничните грешки на инструментот**. Под гранична грешка се подразбира максимално дозволената грешка која инструмент смее да има, а при тоа да се смета за точен.

- Податоци за **калибрирање** на инструментот со кој се мери
- Податоци за неодреденоста на **константите** кои се користат
- Податоци за **репродуцибилност** на процесот на мерење
- Податоци за **претходно спроведени** слични мерења
- **Искуство и познавање на својствата** на релевантните инструменти за мерење, објекти на мерењето

Како се изразува квалитетот на мерните резултати

- Порано квалитетот на резултатите од мерењето беше изразуван на неколку начини. Некои од нив беа:
 - Гранични грешки на директно мерени величини
 - Сигурни гранични грешки на посредно мерени величини
 - Статистички гранични грешки на посредно мерени величини
 - и други начини.
-
- Сите од горенаведените искази не се меѓусебно ускладени и ја отежнуваат или онемозбужуваат споредба на квалитетот на добиените мерни резултати, добиени со различни начини.
-
- Затоа, **препорака** да се квалитетот на мерни резултати изразува со мерна неодреденост, а квалитетот на мерни уреди со гранични грешки, **е обврзувачка**.

- Бидејќи извори на податоци се различни, податоците можат да бидат изразени различно, па тие **треба да се конвертираат** во мерна неодреденост изразена преку стандардна девијација.
- При тоа, неопходно е на овака изразена мерна неодреденост да се придружи соодветна функција на распределба.
- За мерна неодреденост од **тип А** секогаш станува збор за **Гаусова распределба**,
- додека кај мерна неодреденост од **тип В** најчесто е **униформа (равномерна) распределба**, иако во посебни случаи, може да биде и **тригонална распределба**.

Комбинирана (сложена) мерна неодреденост

- мерна неодреденост на индиректно мерена величина y :

$$u_y = \sqrt{\sum_1^n \left[\left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u_{x_i}^2 \right]}$$

- Каде, $u(x_i) = s_{x_i}$, е мерна неодреденост за секое поединечно мерење x_i

- Релативната мерна неодреденост:

$$u_{r_y} = \frac{u_y}{y} = \frac{1}{y} \sqrt{\sum_1^n \left[\left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 u_{x_i}^2 \right]}$$

Процена на мерна неодреденост

Процена на мерна неодреденост преку гранични грешки

- Во спецификација на мерните инструменти наведени се граници или гранични грешки во чии рамки сигурно се наоѓа вистинската вредност на мерената величина.
- Изразување на гранични грешки е различно за аналогни и дигитални инструменти.
- Податок за гранични грешки ($\pm \alpha$) не содржи информација за реалната вредност на грешка на инструментот со кој се мери.
- Затоа, во случај кога немаме информација за распределба на грешки на сите инструменти од одредено производство, ние **претпоставуваме дека сите измерените вредности M** (измерени со кој било инструмент од тоа производство) **во рамките на опсегот кој е ограничен со границите на грешки од $(M-\alpha, M+\alpha)$ се подеднакво веројатни**, а надвор од овие граници се невозможни.

- Ова е карактеристично за т.н **униформна распределба** и стандардна девијација на индивидуалните мерења, кои се подеднакво веројатни во интервалот, се изразува како:

$$s_{x_i} = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

- Бидејќи мерната неодреденост се изразува со стандардна девијација, важи:

$$u_B = \frac{a}{\sqrt{3}}$$

- На овој начин, се **проценува мерна неодреденост од типот В**, во случаи кога располагаме со податоци за гранични грешки на инструментот, статистички гранични грешки и тн.

Проценка на мерна неодреденост од типот А,

се сведува на одредување на:

$$u_{Ax_s} = s_{x_s}$$

- стандардната девијација на поединечните мерења

$$u_A = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_s)^2}{n-1}}$$

- и стандардната девијација на средната вредност на мерењата.

$$u_{Ax_s} = \frac{u_A}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_s)^2}{n(n-1)}}$$

Мерна неодреденост – прикажување – значајни цифри

- При обработка на резултати од мерењето, еден од важните делови е и правилно прикажување на резултатите од мерењето.
- Во упатство за изразување на мерната неодреденост од 1993 година, наведени се правилата во врска со заокружување на мерната неодреденост, као и на самиот резултат на кој таа одговара.

Определување на бројот на значајни цифри

- **Мерна несигурност во согласност со меѓународниот договор се прикажува со две значајни цифри.**
- Ако мерната неодреденост или мерениот резултат се добиени преку математички операции (индиректно), се заокружуваат само на крајот, додека меѓуреизултатите се изразуваат со уште една или две цифри.
- **Значајни цифри на заокружениот број** се сите цифри од лево различни од 0 (нула) до цифра на местото на заокружување.

Правила за одредување на бројот на значајни цифри

- Правилата за определување на бројот на значајни цифри
 1. Сите цифри, освен нула, се значајни.
 2. Нули помеѓу значајни цифри се значајни.
 3. Нулите на крајот на број, кои се наоѓаат после децималната запирка, се значајни.
 4. Нули пред првата значајна цифра на бројот не се значајни.
 5. Статусот на нула на крајот на целиот број не е дефиниран, односно, тие можат да бидат значајни, но и не мораат, па во тој случај најдобро е бројот да се пишува во експоненцијална форма (на пр. $5 \cdot 10^2$ има една значајна цифра, $5,0 \cdot 10^2$ има две значајни цифри).

Примери за утврђување на значајни цифри

568 има три значајни цифри

4,3 има две значајни цифри

20,5 има три значајни цифри

0,123 има три значајни цифри

3,00 има три значајни цифри

0,0025 има две значајни цифри

$7 \cdot 10^{-3}$ има една значајна цифра

$7,000 \cdot 10^{-3}$ има четири значајни цифри

900 може да имаат три, две или една значајна цифра,

$9 \cdot 10^2$ има една значајна цифра, а

$9,00 \cdot 10^2$ има три значајни цифри.

- При утврдување на значајни цифри на резултатот од мерење, мора да располагаме со информација за мерна неодреденост.
- Резултатот од мерење се заокружува така што прво мерната несигурност (апсолутна) се заокружува на две значајни цифри.
- Потоа измерената вредност се заокружува на ист начин како и мерна неодреденост.

На пример:

- Ако е мерна неодреденост = 0,xx
- Резултатот од мерењето ќе биде претставен како xxx,xx
- каде x е било која значајна цифра.

Примери

- за правилно претставување на резултатот од мерење и соодветната мерна неодреденост

Пример 1. Отчитаниот напон на дигитален волтметар изнесува 3,023 V, а проценетата мерна неодреденост е 0,0144 V.

решение: $(3,023 \pm 0,014) \text{ V}$

Пример 2. Измерената маса е 123,456 g, а проценетата мерна неодреденост е 0,135 g.

решение: $(123,46 \pm 0,14) \text{ g}$

Пример 3. Густина на растворот е 1,08045 g/mL и проценетата мерна неодреденост е 0,005105 g/mL.

решение: $(1.0804 \pm 0,0051) \text{ g/mL}$

Проценка на мерната неодреденост на методите за тестирање

- **Неодреденост од тип А** - неодреденост која се определува преку пресметување на повторливоста и репродуцибилноста на мерењето (обично на сертифициран референтен материјал)
- **Неодреденост од тип В** - неодреденост определена преку калибрационите сертификати на опремата, претходни податоци за извршени мерења, спецификации на производители
- **Мерна неодреденост (u)** - параметар кој го придружува резултатот од мерењето и ја карактеризира дисперзијата на вредностите на мерената величина во тест материјалот

Проценка на мерната неодреденост на методите за тестирање

1. Започнување на постапката

Постапката за процена на мерната неодреденост секогаш се спроведува при:

- - воведување на нов метод
- - употреба на нова опрема за методот
- - промена на техничките карактеристики на употребената опрема
- - промена на условите на работа

2. Специфицирање

- Се специфицира детално што се мери, вклучително и корелациите помеѓу мерената величина и параметрите од кои таа зависи (пр. количините кои се мерат, константи, калибрациони стандарди).
- Доколку е можно и постојат податоци за тоа во СОП , се вклучуваат и корекциите за познати системски грешки.

3. Идентификување на изворите на неодреденост

- Се прави листа на можните извори на неодреденоста. Оваа листа ги вклучува изворите кои придонесуваат во неодреденоста на мерените параметри. Доколку одредени мерења се повторуваат, се зема во предвид и бројот на повторувањата.

4. Квантификација на компонентите на неодреденоста

- Се прави процена за големината на компонентите на неодреденоста (u_i) за секој потенцијален поединечен идентификуван извор на неодреденост како и бројот на контрибуции (учества) за секоја поединечна компонента.

Упатство за пресметување на одделни мерни неодредености

- Заради различните единици на изворите на неодреденоста аналитичарот ги конвертира типичните неодредености во %.
- Ако дистрибуцијата околу средната вредност е нормална со ниво на веродостојност 95 % (вагање, декларирана неодреденост на калибрационен сертификат) тогаш **делителот е 2.**
- Ако интервалот на веродостојност не е деклариран претпоставуваме ректангуларна дистрибуција и **делителот е**

$$\sqrt{3}$$

■ 5. Пресметување на вкупната неодреденост

- Неодреденостите од типот А и В се преведуваат на единица релативна стандардна девијација за да може да се комбинираат и да ја дадат т.н. комбинирана мерна неодреденост.
- Преку информациите добиени за поединечните квантифицирани неодредености се пресметува комбинираната неодреденост како:

$$U_c = \sqrt{\sum u_i^2}$$

- т.е. комбинирана мерна неодреденост е еднаква на квадратен корен од сума од квадрати на одделни мерни неодредености.
- **Проширената неодреденост U се пресметува како $2 \times U_c$** за ниво на веродостојност од 95 %.
- Резултатот од тестот се изразува како **вредност за одреден параметар** (определена преку спроведувањето на тестот) **$\pm U$**
- Кај хемиските тестирања каде неодреденоста од видот В е значително помала ($<1/5$) во однос на неодреденоста од типот А, истата се занемарува.

Пример

Извор	квантифицирана вредност	Делител	Фактор на единици	број на контрибуции	типична неодреденост ± во единици како %
Репродуцибилност (Тип А)	0,45 %	1		1	0,45 %
калибрација на ваги (Тип В)	0,3 %	2		3 (3 пати се мери на вага)	3 X 0,15 % = 0,45 %
неодреденост на пипета (Тип В)	0,4 %	$\sqrt{3}$		2 (2 разредувања)	2 X 0,23 % = 0,46 %
чистота на реагенс (Тип В)	0,2 %	$\sqrt{3}$		1	0,115 %
комбинирана неодреденост	$U_c = \sqrt{(\sum u_i^2)}$				0.79 %
проширена мерна неодреденост 2 x U_c					1.59 %

Table 1. Measurement uncertainty estimation of *Method 1* performed for concentration level of 10 µg/mL and for *Method 2* for concentration level of 20 µg/mL for the injection solution samples

Source of measurement uncertainty	Quantified value %		Divisor	Contributions		Standard uncertainty (U _i %)	
	Method 1	Method 2		Method 1	Method 2	Method 1	Method 2
Sample preparation							
RSD % (Type A)	1.06	1.58	1	1	1	1.06	1.58
Spectrophotometer (Type B)	0.39	2.54	1.73	1	1	0.22	1.47
10 mL volumetric flask (Type B)	0.50	0.50	1.73	2	2	0.58	0.58
25 mL volumetric flask (Type B)	0.16	0.16	1.73	1	1	0.09	0.09
100-1000 µL micropipette (Type B)	0.20	0.20	1.73	1	2	0.12	0.23
Preparation of the standard + calibration curve							
Analytical balance (Type B)	9,1·10 ⁻⁵	9,1·10 ⁻⁵	2	1	1	0.00	0.00
10 mL volumetric flask (Type B)	0.50	0.50	1.73	3	2	0.87	0.58
100-1000 µL micropipette (Type B)	0.20	/	1.73	2	/	0.23	/
50-200 µL micropipette (Type B)	0.16	0.16	1.73	/	1	/	0.09
Spectrophotometer (Type B)	0.41	2.65	1.73	1	1	0.24	1.54
Σ(U _i ²)						2.39	7.75
Combined measurement uncertainty (U _c)	$U_c = \sqrt{\sum(U_i^2)}$					1.55	2.78
Expanded measurement uncertainty	2*U _c					3.09	5.57

Table 2. Comparison of the reproducibility data and the data obtained from the measurement uncertainty (MU) estimation in *Method 1*

Product	Enroxil Flavour 50 mg Tablets			Enroxil 5 % injection solution		
γ (Enr) / $\mu\text{g/mL}$	MU Type A (RSD %)	Uc %	2*Uc %	MU Type A (RSD %)	Uc %	2*Uc %
5	1.94	2.22	4.45	1.15	1.66	3.33
7.5	1.42	1.75	3.50	1.23	1.68	3.36
10	1.12	1.51	3.01	1.06	1.55	3.09*

*This is the result presented in Table 1

Table 3. Comparison of the reproducibility data and the data obtained from the measurement uncertainty (MU) estimation in *Method 2*

Product	Enroxil Flavour 50 mg Tablets			Enroxil 5 % injection solution		
γ (Enr) / $\mu\text{g/mL}$	MU Type A (RSD %)	Uc %	2*Uc %	MU Type A (RSD %)	Uc %	2*Uc %
20	2.14	3.16	6.32	1.58	2.78	5.57*
40	0.91	1.57	3.14	0.54	1.42	2.85
60	2.51	2.77	5.54	0.68	1.42	2.85

*This is the result presented in Table 1

Workshop "From Molecules to Functionalized Materials" 1-5 September 2016, Ohrid, Republic of Macedonia

ESTIMATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY OF ENROFLOXACIN DETERMINATION IN VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS BY TWO SPECTROPHOTOMETRIC METHODS

*Elena Cvetkovska¹, Elizabeta Dimitrieska-Stojkovic², Emil Popovski¹, Kristina Madenovska³, Goran Stojkovic¹

Прашања за вежбање

- Кои се главни причини за мерна неодреденост?
- Кога се спроведува постапка за процена на мерната неодреденост?
- Како се изразува целокупниот резултат на мерење?
- Како се определува мерна неодреденост од тип А?
- Од што зависи процена на мерна неодреденост од тип В?
- Како се проценува мерна неодреденост од тип В кога располагаме со податокот за гранична грешка?
- Кога се користи израз $u_B = a/2$, а кога $u_B = a/3^{1/2}$ за процена на мерна неодреденост од тип В?
- Како се дефинира комбинираната, а како проширената мерна неодреденост? Со колку значајни цифри се изразуваат?



5. Добра лабораториска пракса

(*GOOD LABORATORY PRACTICE*,
GLP)

Добра лабораториска пракса

- Принципи на добра лабораториска пракса востановени се 1976 год. во САД, а стапиле на сила 1979 год.
- **Успешност и квалитет** на давање на услуги на некоја лабораторија зависи во голема мера и од нејзина организација.
- Лабораторија (независно дали е државна-јавна или приватна) – за да опстане на пазар, каде се присутни и други лаборатории, мора да има статус на поуздана и проверена лабораторија (по можност и **акредитирана**).
- Тоа го обезбедува преку своја работа и професионалност.

Што е ДЛП (GLP)?



- Добра лабораториска пракса претставува **систем на принципи за обезбедување на квалитет**, кој осигурува организациони процеси и услови преку кои соодветни лабораториски испитувања се:
 - планираат,
 - изведуваат,
 - надгледуваат,
 - запишуваат и
 - за кои се известува.

- Воведување на добра лабораториска пракса
 - особено важно за за подрачја како што се
 - анализа на лекови
 - анализа на храна
 - анализа на животна средина
-
- Денес – принципи на GLP прераснаа во систем на осигурување на квалитет
 - Се применува и во други дејности
 - Добра земјоделска пракса
 - Добра прозводствена пракса



- 
- Главна цел на лабораториска работа – издавање на веродостојни и поуздани резултати на анализи, кои мораат да бидат базирани на научни факти и соодветни закони и законски решенија
 - Воведување на систем на осигурување на квалитет во лабораторија претставува стручно и организациски сложена и захтевна работа, која подразбира одговорност за спроведување на зададени барања.
 - Лабораторија – одредува своја политика и цели

Принципи на GLP

1. Организација и персонал на објектот во кој се врши тестирање
2. Програма за обезбедување на квалитет (Quality Assurance -QA)
3. Објекти (институција, лабораторија, терен, ...)
4. Материјали за апарати и реагенси
5. Референтни и предмети за тестирање
6. Стандардни оперативни процедури (СОП)
7. Изведба на студијата
8. Известување за резултатите од студијата
9. Складирање и задржување на евиденција и материјали

Стандардизована постапка на спроведување на лабораториски испитувања подразбира

- Прием и разгледување на барањето
- Прифаќање на барање и/или потпишување договор за испитување
- Узоркување (инспекциски служби или клиент)
- Прием и евиденција на примерок
- Подготовка на примерок за испитување
- Испитување на примерокот
- Анализа на резултатите и логичка контрола на испитување
- Изработка на извештај за испитување
- Верификација на испитување
- Издавање на извештај за одредено испитување

Прием и разгледување на барањето Прифаќање на барање и/или потпишување договор за испитување

- Врз основа на барањето на корисникот, **раководител на лабораторија** во разговор со непосредни извршители на испитување (или врз основа на сознанија за нивните компетенции) утврдува можности за реализација на барањето.
- Ако е одлука позитивна => се пристапува кон изработка на понуда и/или договор

Узоркување

Узоркување може да врши

- овластен претставник на лабораторијата (во тој случај се користат постапки дефинирани со стандарди) или
- самиот нарачател на испитување (клиент)

Узоркување се врши на повеќе начини и зависи од:

- предметот и местото на узоркување,
- природата на материјалот,
- методите и стандардите по кои се врши испитување,
- правилниците,
- општите технички услови.

Прием и евиденција на примерок

Ракување со примерок подразбира постапување со примерок од:

1. **узоркување**, преку
2. **испитување**, па се до
3. **одлагање** на испитаниот примерок или остатокот (за суперанализа)

Исправно ракување опфаќа:

- Кондиционирање и пакување на примерок пре транспорт
- Транспорт и доставување
- Прием на примерок во лабораторија
- Шифрирање на примерок
- Испитување
- Чување на остатокот или дел од примерок
- Одлагање на остатоци – отпад (според позитивните закони за одлагање на отпад)

Подготовка на примерок за испитување

- Подготовка на примерок – во однос на **барани испитувања** и врз основа на **методот на испитување на одделни параметри**
- Пример: подготовката на примерок не е иста ако се анализираат:
 - тешки метали,
 - шеќери,
 - протеини,
 - масти,
 - пестициди
 - микотоксини или др.

Текот на испитување и точност на мерење

Во лабораторија се користат **стандардизирани методи**, кои се

- соодветни за лабораторија
- ги задоволуваат потребните барања

Непосредно на местото на испитување треба да се наоѓаат

- методи за работа (во вид на **СОП**- стандардна оперативна постапка)
- **упатства** за ракување со опрема

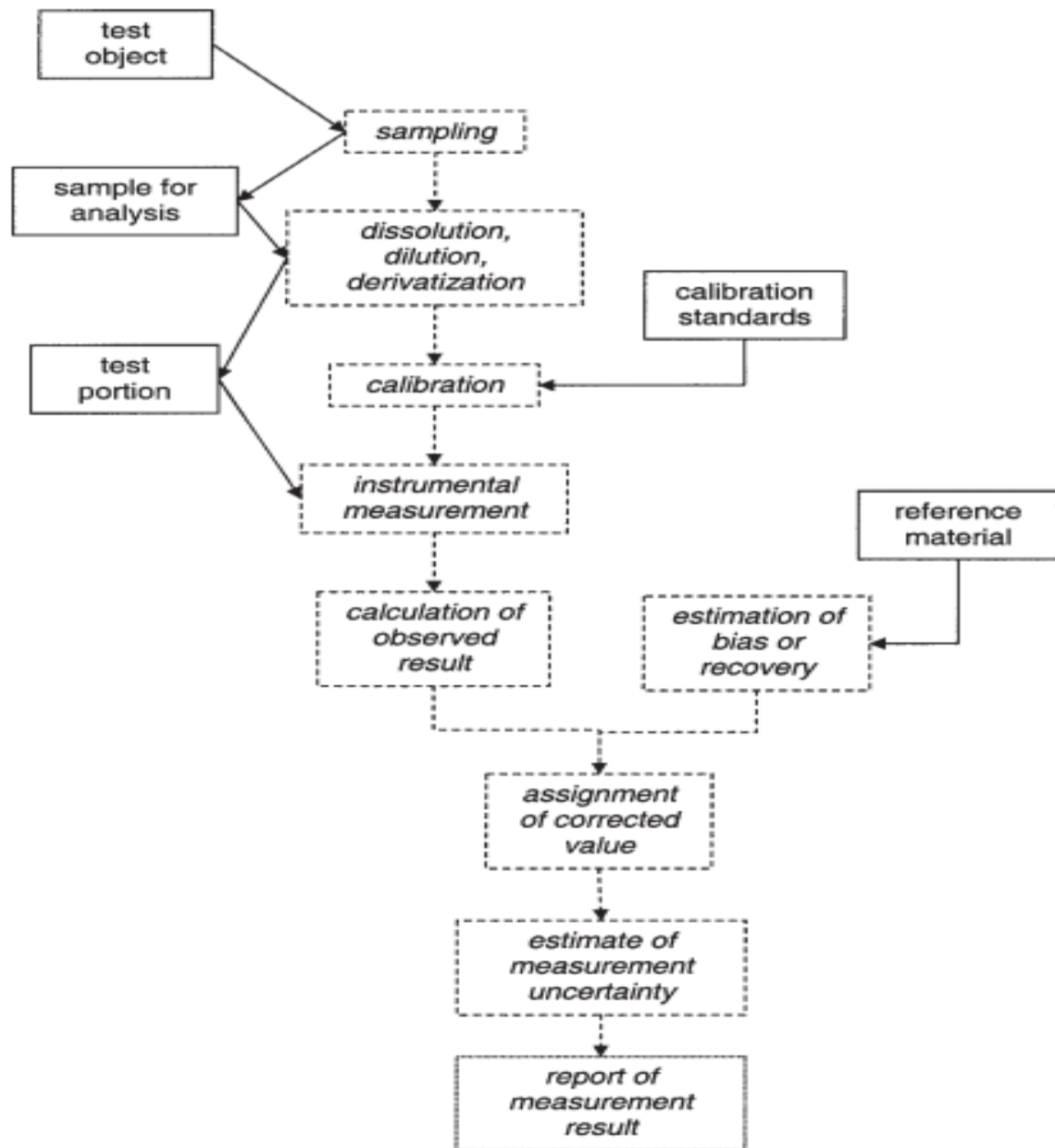


Figure 1.1. Steps and materials in an analysis. Procedures are shown in dashed boxes. Quality control materials that are presented to the analytical system are shown in solid boxes.

Ракување и одржување на опрема

- За ракување и одржување на опрема во исправна состојба задолжени се точно определени лица
- Се водат евиденциони картони за опрема
- Пр. Вага и микропипети – дата на калибрирање
- Лабораторија и Фрижидер – секојдневно следење на температура во точно определено време

Анализа на резултати и логичка контрола на испитувањето:

- По извршени испитувања, резултатите се запишуваат во соодветни извештаи
- При тоа – се врши логичка контрола, која подразбира споредување на добиените вредности со важечки утврдени вредности
- Пр.: афлатоксин М1 во млеко
- Најдено: 0,03 $\mu\text{g/kg}$ (дозволено 0.05 $\mu\text{g/kg}$)
- Издавање резултат

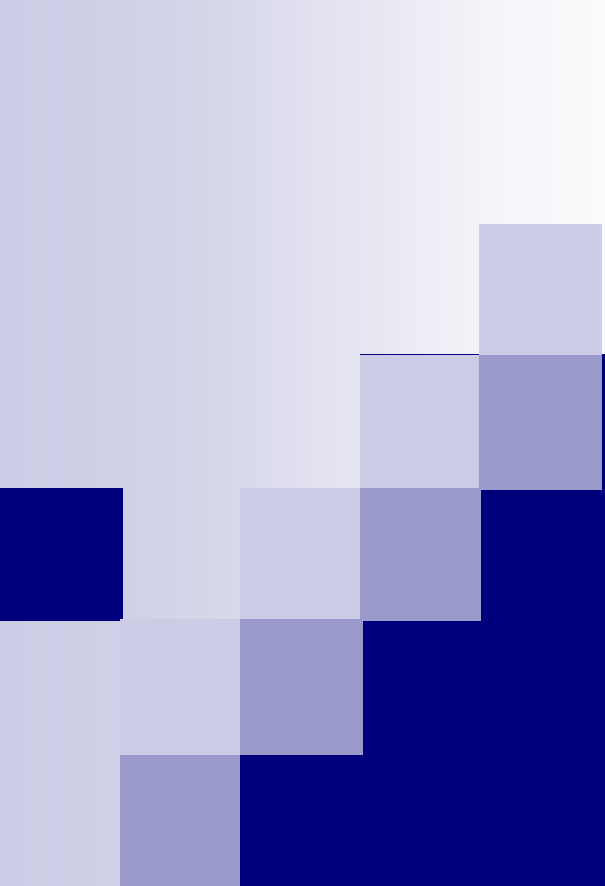
Изработка на извештај од истражување

- По завршување на лабораториско истражување се **изработува извештај** во кој сите резултати се даваат во табеларна или графичка форма.
- Останатите податоци неопходни за изработка на извештајот (корисник на услугата, место и постапка на узоркување, методи на испитување итн.), се внесуваат на барање или према договор.
- Во извештајот се наведуваат информации за **специфични услови на испитување**:
 - дека резултатите од тестовите се однесуваат само на испитаните примероци
 - ако примерокот е оштетен
 - доколку земањето примероци не е направено правилно
 - ако испитувањето е повторено итн.

- Во случај кога лабораторија вршела **узоркување** – во извештајот се додаваат податоци за узоркување и ракување (количина и вид на мостри, место на земање мостри, врз основа на кој метод е направено узоркување, по кој стандард, правилник и техничките барања е направено и договорен програм-постапка за земање примероци).
- Доколку земањето примероци не извршил претставник на лабораторија, мора јасно да се назначи кој го извршил земање на мостри.
- Претставник на лабораторија е должен да врши надзор над земање примероци

Ракување со примероци за тестирање

- По завршувањето на тестирање се врши класификација и отстранување на тестирани материјали
- Класифицирани отпад привремено се отстранува во просторот предвиден за тоа во лабораторија, а потоа се изнесува во контејнери и привремена депонија
- Кога постои потреба тестираниот примерок или негов дел да се чува, се постапува како што е наведено во договорот
- Секогаш се остава примерок за суперанализа и соодветно – според прописи се чува заклучен



6. Систем на квалитет во лабораторија

Систем на квалитет во лабораторија

- Обезбедување на квалитет е клучен фактор за добивање на сигурни и веродостојни резултати.

Обезбедување на квалитет е **континуиран процес на унапредување на работата на лабораторијата** преку

- наоѓање на грешки,
- решавање на проблеми,
- преземање на корективни акции,
- внатрешна и надворешна контрола на работата,
- учество во испитување на оспособеноста на лабораторијата,
- како и во развојот на интерна контрола на квалитет.

Систем на квалитет во лабораторија

- Квалитет денес се сфаќа како процес кој треба **постојано да се подобрува** и искуства кои се стекнуваат служат за подобрување на идните услуги и/или производи.
- Барања за веродостојни резултати континуирано се зголемуваат, така да примена на хемиска анализа во науката, технологијата и општеството станува сè позначајна.
- Пр. Лаборатори во царина, фитопатолошки, клинички, форензички, санитарна исправност на водата (во ЈП водовод), ГЗЗЗ, РЗЗЗ, ФВМ, ФЗНХ итн.

Систем на квалитет во лабораторија

- Осигурување на квалитет во лабораторија ги опишува оние мерки кои се применуваат во лаборатории со цел да се обезбеди квалитетот на работата кој обезбедува сигурни и веродостојни резултати од анализи
- Овие мерки обично вклучуваат:
 - обезбедување на квалитетот
 - контрола на квалитет

Обезбедување на квалитет

- Обезбедување на квалитет - претставува **прво ниво на сигурност на квалитет** на аналитички постапки, и предвидува примена на техники и процедури за да се исполнат барањата за квалитет.
- **Примарната цел на обезбедување на квалитетот е да се спречи појавата на грешки**
- Активностите поврзани со обезбедување на квалитетот опфаќаат мерки за постигнување на статистичко следење на точноста на постапката за испитување, односно ги опишува мерките кои се применуваат **за да се постигнат повторливи и сигурни резултати.**

Обезбедување на квалитет



- **Одговорност и едукација на вработените во лабораторија** – сите вработени во лабораторија, без оглед на нивната работа, мора да бидат запознаени со важноста на нивната работа и потребата за професионална одговорност за нејзино обавување, без оглед на хиерархиска позиција во лабораторија.
- **Сите вработени во лабораторијата** мора да бидат способни да демонстрираат знаење за вршење на определени задачи во лабораторија, т.е. **да ја демонстрираат својата обученост.**
- **Лабораторија** (или институции чиј составен дел е лабораторија) е должна да пропише **минималните барања** кои вработени треба да ги исполнат за да може да ги обавуваат одредени работни обврски.
- Многу е важно лабораториите сите свои вработени постојано да едуцира како би биле оспособени за извршување на задачите што се бараат од нив.
- Едукација – обука на вработените мора да биде планирана и во согласност со работните задачи на вработените.
- Секое усовршување на вработени мора да биде документирано.

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Соодветна лабораториска опрема** – важен елемент на управување со квалитетот е адекватна опременост на лабораторијата.
- ❖ Цела опремата и инструментите кои се користат во работата мора да се одржуваат во **исправна состојба и калибрирани**.
- ❖ Лабораторијата мора да има **пишани процедури** за одржување на опрема и инструменти, како и постапките за калибрација и зачестеноста на извршување на одредени процедури.
- ❖ Сите процедури за одржување и калибрација мора да бидат **документирани**.
- ❖ **Стандарди** – назив, формула, чистота, рок на траење, раствори, концентрација, стабилност.....

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Стандардни оперативни процедури**
- ❖ **Мора да бидат развиени во лабораторија, нивната цел е да се постигне**
- ❖ **уедначеност во анализите т.е. единствен начин на вршење на некои анализи во лабораториски услови,**
- ❖ **и добивање на поуздани резултати.**

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Валидација** - документиран процес за утврдување на соодветноста на мерниот систем да се добиат корисни аналитички податоци.
- ❖ Во лабораторијата е особено важна валидација на **методи** и на аналитички **инструменти**.
- ❖ **Валидација на аналитички инструменти** е процес на проверка на техничките карактеристики на инструменти за добивање на сигурни-поуздани аналитички податоци.
- ❖ **Валидација на методи** е процес на воспоставување параметри на изведување на методот и неговите ограничувања, како и идентификување на факторите кои можат да влијаат на неговото изведување.
- ❖ **Целта на валидација** е да се преку испитување и собирање на објективни докази потврди дека избраниот метод е погоден за употреба и дека ги исполнува предвидените задачи.

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Референтен материјал** - се дефинира како материјал на кој една или повеќе карактеристики се истородни и добро дефинирани за да можат да се употребат за калибрирање на апаратурата, оцена на методот, или за доделување на вредноста на материјалот.
- ❖ Референтни материјали се користат во лабораторијата за калибрација на инструменти, валидација на методи, процена на отстапувања во мерењето, едукација, и интерна контрола на квалитет.
- ❖ Постојат неколку видови на референтен материјал:
 - чисти супстанции,
 - стандардни раствори или смеси и
 - референтни материјали во матриксот.

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Надзор над лабораторија** - сите сегменти на работата на лабораторија:
 - од земање на мостри или примерок,
 - или приемот на примерокот во лабораторија,
 - до пишување на извештаи,
 - вклучувајќи и следење на условите на средина,можат да бидат предмет на надзорот на лабораторија.

- ❖ **Лабораторијата мора да дефинира**
 - во кои области,
 - на кои места и
 - колку често ќе се врши надзор,
 - мора да утврди кои барања мора да бидат исполнети, и
 - да утврди лица кои ќе го вршат надзорот.

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Документација** - важен елемент во осигурување на квалитетот на лабораторија.
- ❖ Најголемиот дел од документацијата се однесува на документација на системот на квалитетот, која ги вклучува сите аспекти на осигурување на квалитетот:
 - модел на системот на осигурување на квалитет,
 - методологија,
 - стандардни процедури на извршување, итн.

Обезбедување на квалитет

- ❖ **Безбедност на работа во лабораторија** – раководството на лабораторија е должно да осигура дека пред започнувањето на работата во лабораторијата секој вработен е запознаен со:
 - правилата за безбедност на работа во лабораторија,
 - потенцијалните опасности на работа со хемикалии,
 - ракување на лабораториски материјали и опрема, итн ..
- ❖ Должност на секоја лабораторија е на видливо место да истакне правила за работа со потенцијалните опасности (хемикалии, компримирани гасови, различна опрема, итн.), како и упатства за прва помош во случај на несреќи.

Контрола на квалитет

- Контрола на квалитетот е **механизам** со кој се потврдува прифатливост на резултатите од анализата, а се применува за да се оцени ефикасноста на управувањето со квалитетот.
- Контрола на квалитетот е поделена на:
 - **Внатрешна (интерна)** и
 - **надворешна** контрола на квалитетот.

Контрола на квалитет

- **Интерна контрола** на квалитет се состои од постапки кои се спроведуваат во лабораторијата од страна на вработените заради континуирана процена на квалитетот на резултатите добиени во одредена аналитичка постапка.
- Внатрешна контрола на квалитетот вклучува:
 - слепа проба (реагенси, раствори, итн)
 - стандарди
 - сурогат примероци
 - слепи примероци
 - повторување на мерења
 - независни мерења
 - анализа на контролни примероци
 - интерни примероци за испитување -тестирање
 - изработка на контролни карти-дијаграми (Shewart -ов дијаграм)

Контрола на квалитет

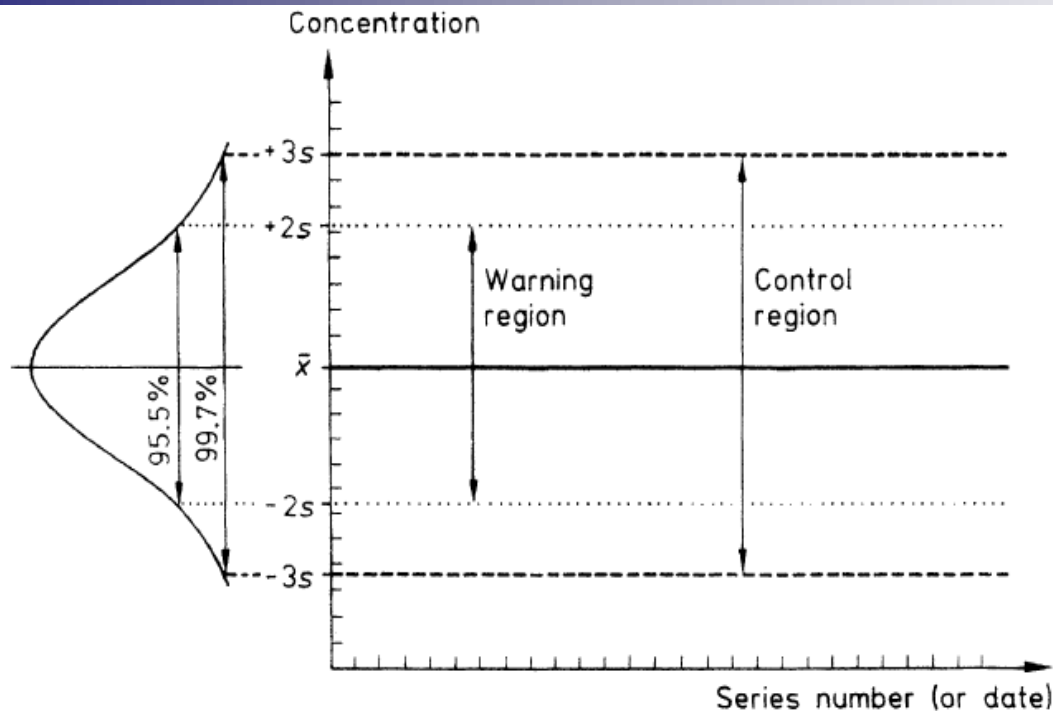
- Внатрешна контрола на квалитетот во лабораторијата мора да биде на такво ниво да може да се докаже валидноста на резултатите.
- За рутинска анализа е прифатливо да уделот на внатрешна контрола на квалитетот во вкупна работа на лабораторија изнесува 5%,
- што значи дека :
- од 20 анализирани примероци,
- 1 мора да биде контролен.

Контрола на квалитет

- **Надворешна контрола на квалитетот** – се базира на испитување на оспособеноста на лабораторија преку користење на **меѓулабораториски споредбени тестови**,
- **Испитување на оспособеноста на лабораторија за тестирање организира референтна лабораторија или надлежна институција**
- **Интерлабораториски тестови** – тестирања во кои група на лаборатории анализираат еден или повеќе идентични параметри на хомоген и стабилен тест примерок.

Shewart -ов дијаграм

- Примената на контрола на дијаграмите во обезбедувањето на квалитет е базирана на претпоставката дека добиените резултати се нормално дистрибуирани.
- Прво се поставува координатен систем во кој резултатите (нпр. единици на концентрација) се пишуваат на ординатата (y-оска). Апсцисата (x-оска) е временска оска на која серијата броеви или денови на пример се прикажуваат во хронолошка форма.
- По n денови или серии, се пресметуваат средната вредност и стандардната девијација кои служат за конструирање на Shewart-овиот дијаграм. (Слика 1).



Слика 1. Конструкција на контролен дијаграм

Опсегот на $2s$ ($s=SD=\text{стандардна девијација}$) од двете страни од централната линија покрива 95,5% од површината под кривата, т.е. веројатноста на “лажна тревога” во оваа област е 4,5% и едно отстапување над оваа граница се толерира.

Веројатноста да се добие вредност надвор од $3s$ границата е 0,3% и ако се случи тоа, тогаш тоа е одредено како ситуација која е надвор од контрола и мора да се преземат корективни мерки.

- Со помош на стандардната девијација, се цртаат предупредувачките и контролни лимити како $\bar{x} \pm 2s$ и $\bar{x} \pm 3s$, соодветно (у-оската треба секогаш приближно да го покрива рангот $\pm 4s$). На овој начин, сигурно ќе има слободен простор за дел од вредностите за кои велиме дека се “надвор од контрола”.
- Резултатите од прелиминарниот период потоа се вметнуваат во подготвен дијаграм и дијаграмот се проверува според контролните критериуми.
- Контролните и предупредувачки граници се $\bar{x} \pm 3s$ и $\bar{x} \pm 2s$ ранговите, односно:

Горна граница на контрола, $UCL = \bar{x} + 3s$

Долна граница на контрола, $LCL = \bar{x} - 3s$

Горна граница на предупредување, $UWL = \bar{x} + 2s$

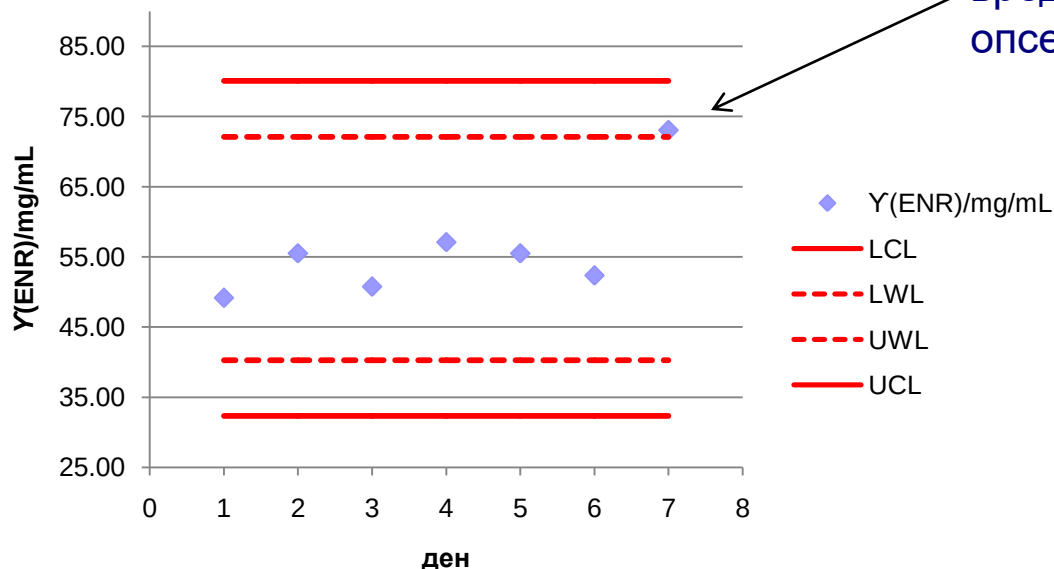
Долна граница на предупредување, $LWL = \bar{x} - 2s$

Пример:

ден	Y(ENR)/mg/mL	LCL	LWL	UWL	UCL
1	49.14	32.32	40.28	72.12	80.08
2	55.51	32.32	40.28	72.12	80.08
3	50.73	32.32	40.28	72.12	80.08
4	57.11	32.32	40.28	72.12	80.08
5	55.51	32.32	40.28	72.12	80.08
6	52.33	32.32	40.28	72.12	80.08
7	73.04	32.32	40.28	72.12	80.08

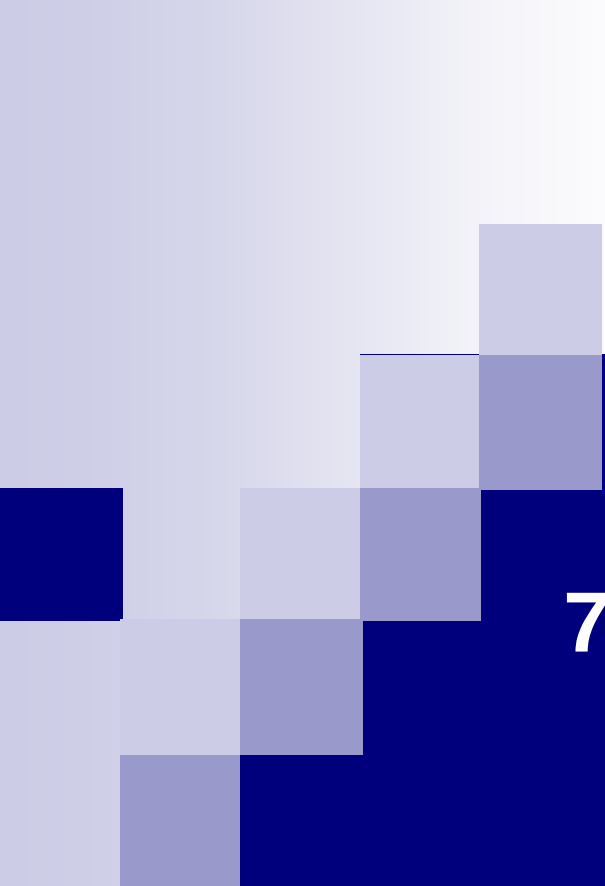
При оцената на податоците од прелиминарниот период, откривањето на ситуација која е надвор од контрола и која е веќе присутна во овој период покажува дека корективните мерки се итно потребни пред да започне рутинската анализа.

Од добиениот график се гледа дека вредноста од 7-иот ден е надвор од 2s опсегот.



Прашања за вежбање

- Што претставува добра лабораториска пракса?
- Која е главната цел на лабораториска работа?
- Кои елементи се опфатени во стандардизирана постапка за спроведување на лабораториски анализи?
- Од што зависи подготовката на примерокот за анализа?
- Кои елементи ги опфаќа исправно ракување со примерокот од узоркување?
- Како се постапува со примерокот за тестирање после извршено тестирање?
- Што претставува обезбедување на квалитет во лабораторија и која е негова примарна цел?
- Во која смисла е важна одговорност и едукација на вработените во лабораторија за обезбедување на квалитетот?
- Како се обезбедува квалитет во смисла на лабораториска опрема?
- Што претставува контрола на квалитетот и како е поделена?
- Набројте барем 5 параметри кои ги вклучува внатрешна контрола на квалитетот?
- Како се спроведува надворешна контрола на квалитетот?



7. MKC EN ISO/IEC 17025:2018

МКС EN ISO/IEC 17025

- Лабораториите може да добијат акредитација за тестирање или калибрација, доколку ги задоволуваат барањата на **Стандардот МКС EN ISO/IEC 17025 - Општи барања за компетентност на лаборатории за тестирање и лаборатории за калибрација**.
- Стандардот МКС EN ISO/IEC 17025 ги определува и барањата за давање мислење и интерпретација во извештаите од лабораторијата , иако ИАРМ за таа активност не нуди акредитација.
- ISO (Меѓународната организација за стандардизација) е светска федерација на национални тела за стандардизација .
- Во областа на оцена на сообразност, ISO и Меѓународната комисија за електротехника (IEC) развиваат заеднички ISO/IEC документи за оцена на сообразност (ISO/CASCO).

МКС EN ISO/IEC 17025

- **Проценка на сообразност** е процес што се користи за да се покаже дека производот, услугата или системот исполнуваат специфични барања.
- ISO комитет за проценка на сообразност (ISO / CASCO) подготвува меѓународни водичи и стандарди во врска со практиката на тестирање, инспекција и сертификација на производи, процеси и услуги и за проценка на системи за управување, лаборатории за тестирање, тела за инспекција, тела за сертификација, акредитациони тела и нивно работење и прифаќање.
- Промовира меѓусебно препознавање и прифаќање на национални и регионални системи за проценка на сообразност и соодветна употреба на меѓународни стандарди за тестирање, инспекција, сертификација, проценка и сродни цели.
- Овој стандард е подготвен од комитетот на ISO за оцена на сообразност (CASCO) и одобрен е кај двете организации (ISO и IEC).
- Ова трето издание ISO/IEC 17025:2017 го отповика и го замени второто издание (ISO/IEC 17025:2005)

МКС EN ISO/IEC 17025

- Овој стандард е развиен со цел да се промовира довербата во работата на лабораториите.
- Стандардот содржи барања за лабораториите за да им овозможат да демонстрираат дека работат компетентно и се во можност да дадат валидни резултати.
- Овој документ бара од лабораториите да планираат и имплементираат мерки кои се повикуваат на **ризик и можности**. Повикувањето на ризик и можностите воспоставуваат основа за зголемување на ефективност на системот за управување, достигнување на докажани резултати и заштита од негативни ефекти. Лабораторијата е одговорна за одлучување на кои ризици и можности треба да се повикаат.
- Имплементација на овој стандард:
 - ќе ја олесни соработката помеѓу лабораториите и другите тела.
 - ќе помогне во размена на информации и искуства
 - во хармонизација на стандардите и процедурите
 - ќе овозможи меѓународно признавањето на резултатите.

МКС EN ISO/IEC 17025

Општи барања за компетентност на лаборатории за тестирање и калибрација

1. Опсег
2. Упатување на нормативните документи
3. Термини и дефиниции
4. Општи барања
5. Структурни барања
6. Ресурсни барања
7. Процесни барања
8. Барања за системот за управување

МКС EN ISO/IEC 17025

1. Опсег

Овој документ ги одредува општите барања за компетентност, непристрасност и доследна работа на лабораториите.

2. Упатување на нормативните документи

- *ISO/IEC Упатство 99, Меѓународен речник во метрологијата – Основни и општи концепти и придружни термини*
- *ISO/IEC 17000, Оцена на сообразност – Речник и општи принципи*

МКС EN ISO/IEC 17025

3. Термини и дефиниции

- Термини и дефиниции дадени се во ISO/IEC Упатство 99 и ISO/IEC 17000.
- За потребите на стандардизација ISO и IEC одржуваат терминолошка база на податоци на следниве интернет страници:
- <https://www.iso.org/obp>
- <http://www.electropedia.org/>
- Непристрасност
- Жалба
- Меѓулабораториска споредба
- Внатрелабораториска споредба (интралабораториска споредба)
- Тестирање на оспособеноста
- Лабораторија
- Правило на одлучување
- Верификација
- Валидација

4. Општи барања

4.1 Непристрасност

Активностите во лабораторија мора да се изведуваат непристрасно, при што лабораторијата мора да биде одговорна за непристрасноста на своите лабораториски активности, да ги идентификува ризици на нејзината непристрасност, и доколку ризикот е идентификуван, лабораторијата мора да демонстрира како да ги елиминира или минимизира овие ризици.

4.2 Доверливост

Лабораторијата мора да биде одговорна за управување на сите информации добиени или создадени во текот на изведувањата на лабораториските активности.

5. Структурни барања

- Лабораторијата мора да биде **правен субјект** кој е законски одговорен (раководството) за нејзините лабораториски активности.
- Лабораторијата мора да го дефинира и документира **опсегот** на лабораториските активности
- Лабораториските активности мора да бидат изведени на таков начин **за да ги исполнат барањата** на: овој документ, корисниците на услуги на лабораторијата, регулаторните органи и организациите кои обезбедуваат препознавање.
- Лабораторијата мора:
 - да дефинира **организација и структурата** на управување на лабораторијата
 - да **документира** своите процедури до степен кој е неопходен за да се обезбеди доследна примена на нејзините лабораториски активности и валидноста на резултатите.
 - да има **персонал кој има овластувања и компетенции** потребни за извршување на нивните должности.
 - и др.

6. Ресурсни барања

6.1 Општо

Лабораторијата мора да има на располагање персонал, простории, опрема, системи и услуги за поддршка неопходни за управување и изведување на лабораториски активности.

6.2 Персонал

- **Персонал** - да дејствува непристрасно, да биде компетентен и да работи во согласност со системот на управување на лабораторијата.
- **Лабораторија** - пропишува барања за компетентност на персоналот, процедури и чува записи за:
 - утврдување на барањата за компетентност;
 - селекција на персонал;
 - обука на персоналот;
 - надзор на персоналот;
 - овластување на персоналот;
 - мониторинг на компетентноста на персоналот.
- **Лабораторија** - дава овластувања на персонал за изведба на специфични лабораториски активности (развој, модификација, верификација и валидација на методи; анализа на резултатите, изјави за сообразност, давање и потпишување на резултатите/извештаи.

6. Ресурсни барања

6.3 Простор и услови на сместување

- Просторот и условите на сместување мора да се соодветни за лабораториските активности
- Лабораторијата мора да ги следи, контролира и евидентира условите на околината во согласност со спецификации, методи или процедури или таму каде тие имаат влијание врз валидноста на резултатите.
- Мерките за контрола на просторот мора да се спроведуваат, следат и периодично да се преиспитуваат.

6. Ресурсни барања

6.4 Опрема

- Лабораторијата мора да има пристап до опремата (мерни инструменти, мерни стандарди, референтни материјали, реагенси, потрошен материјал, сифтвр и др.) потребна за изведба на лабораториските активности
- процедури за ракување, транспорт, складирање, употреба и планирано одржување на опремата
- опремата - во согласност со специфицираните барања пред да биде пуштена во употреба.
- Опремата што се користи за мерење мора да биде способна да ја постигне точноста на мерењето и мерната неодреденост потребна за да обезбеди валиден резултат.
- Мерната опрема - калибрација - кога? (кога точноста на мерењето и мерната неодреденост влијаат на валидноста на резултатот, и/или калибрацијата е услов за обезбедување на метролошката следливост на издадениот резултат.
- план за калибрација , период на важност, обележување/кодирање
- опрема дава сомнителни резултати/неисправна => обележана/изолирана
- записи за опремата која може да влијае на лабораториските активности (идентитетот на опремата, верзијата на софтверот, производителот, идентификацијата и сервискиот број, доказ за верификација, сегашната локација, датуми на калибрација, резултати од сите калибрации, датум на следната калибрација или интервалот на калибрација, датуми, документација на референтни материјали и рок на важење, планот за одржување, податоци за евентуална штета, дефект, модификација или поправка на опремата.

6. Ресурсни барања

6.5 Метролошка следливост

- Лабораторијата мора да воспостави и одржува метролошка следливост на нејзините резултати од мерењето преку документиран непрекинат ланец на калибрации
- резултатите од мерењето - следливост во однос на Меѓународниот систем на единици (SI) преку калибрација направена од компетентна лабораторија или сертифицирани вредности на сертифицирани референтни материјали или директна реализација на единиците на SI обезбедени со споредба, директно или индиректно, со национални или меѓународни стандарди.

6.6 Надворешно обезбедени производи и услуги

- Лабораторијата мора да обезбеди дека се користат само соодветни надворешно обезбедени производи и услуги кои влијаат врз лабораториските активности

7. Процесни барања

7.1 Преиспитувања на барања, понуди и договори

7.2 Избор, верификација и валидација на методи

7.3 Земање на примероци

7.4 Ракување со примероците за тестирање и калибрирање

7.5 Технички записи

7.6 Проценка на мерната неодреденост

7.7 Обезбедување на валидноста на резултатите

7.8 Известување за резултатите

7.9 Жалби

7.10 Несообразност при работењето

7.11 Контрола на податоци со податоци и управување со информации

7. Процесни барања

7.1 Преиспитувања на барања, понуди и договори

- Лабораторијата мора да има процедура за преиспитување на барањата, понудите и договорите. Процедурата мора да обезбеди дека барањата се соодветно дефинирани, документирани и разбрани,
- Лабораторијата е способна и има ресурси (внатрешни и надворешни) да ги исполни барањата;
- Лабораторијата мора да го информира корисникот на услуга за сите елементи од договорот, измени, кој метод се користи и тн.

7. Процесни барања

7.2 Избор, верификација и валидација на методи

- **Избор и верификација на методи**
- Лабораторијата мора да користи соодветни методи и процедури за сите лабораториски активности, за проценка на мерната неодреденост, како и за статистичките обработка на податоците.
- Сите методи, процедури, упатства, стандарди, прирачници и др. мора да се ажурирани и да бидат достапни за персоналот.
- Се користи најновата валидна верзија на методот, освен ако не е соодветно или можно да се направи тоа.
- Се препорачуваат методи објавени во меѓународни, регионални или национални стандарди, од реномирани технички организации, во релевантни научни текстови или списанија или како што е наведено од производителот на опремата. Може да се користат и лабораториски развиени или модифицирани методи.
- Лабораторијата мора да потврди дека правилно може да ги изведува методите.
- Кога се бара развивање на метод, тоа мора да е планирана активност и мора да се додели на компетентен персонал.
- **Валидација на методи**
- Лабораторијата мора да ги валидира нестандартните методи, лабораториски развиените методи и стандардните методи кои се користат надвор од нивниот планиран опсег.
- Ако има промени на валидиран метод, мора да се утврди влијанието на таквите промени и доколку го има => мора да се изврши нова валидација на методот.
- Лабораторијата мора да ги има документирано сите чекори на валидација (процедурата за валидација, спецификација на барањата, карактеристики на изведбата на методот, добиени резултати, изјава за валидноста на методот).

7. Процесни барања

7.3 Земање на примероци

- Лабораторијата мора да има план за земање на примероци и метод кога врши земање примероци од супстанции, материјали или производи за понатамошно тестирање или калибрација.
- Лабораторијата мора да чува записи за податоците за земање примероци (употребената метода за земање примероци; датум и време на земање примероци; опис на примерокот; идентификација на персоналот кој зема примерок ; идентификација на употребената опрема; условите на средината и транспортот; местото на земање примероци; отстапувања, дополнувања или исклучувања од методот на земање мостри и планот за земање примероци.

7. Процесни барања

7.4 Ракување со примероците за тестирање и калибрирање

- Лабораторијата мора да има процедура за транспорт, прием, ракување, заштита, складирање, задржување и отстранување или враќање на примероците за тестирање или калибрација

7.5 Технички записи

- Лабораторијата мора да обезбеди дека техничките записи за секоја активност на лабораторијата ги содржи резултатите, извештајот и доволни информации да овозможат идентификација на факторите што влијаат на измерениот резултат придружен со мерната неодреденост и да овозможат повторување на лабораториската активност под услови блиски на оригиналните. Техничките записи мора да вклучат податоци и идентитет на персоналот одговорен за секоја лабораториска активност .

7. Процесни барања

7.6 Проценка на мерната неодреденост

- Лабораториите мора да ги идентификуваат изворите на мерната неодреденост, вклучувајќи ги и оние што произлегуваат од земање примероци.
- Лабораторија која врши калибрации, вклучувајќи ја и таа од сопствена опрема, мора да врши проценка на мерната неодреденост од сите калибрации.

7. Процесни барања

7.7 Обезбедување на валидноста на резултатите

- Лабораторијата мора да има процедура за следење на валидноста на резултатите.
- Мора да се води запис за добиените податоци на таков начин за да можат да се детектираат трендовите.
- Следењето се планира и вклучува:
 - употреба на референтни материјали или материјали за контрола на квалитет
 - употреба на алтернативни калибрирани инструменти
 - употреба на работни стандарди или стандарди за проверка со контролни карти
 - повторно тестирање или рекалибрација на зачуваните предмети
 - преиспитување на резултатите
 - меѓулабораториски споредби
 - тестирање на слепи примероци
 - и др.
- Лабораторијата мора да ги следи нејзините перформанси со споредба со резултатите на другите лаборатории.

7. Процесни барања

7.8 Известување за резултатите

- Резултатите мора да бидат преиспитани и потпишани пред да бидат издадени.
- Резултатите мора да бидат прикажани точно, јасно, недвосмислено и објективно, вообичаено во извештај и мора да ги вклучува сите информации договорени со корисникот на услуга и се неопходни за интерпретација на резултатите.
- Лабораторијата мора да биде одговорна за сите податоци дадени во извештајот, освен кога податоците ги обезбедува корисникот на услуга.
- Кога се дава Изјава за сообразност со спецификација или стандард, лабораторијата мора да го документира правилото за донесување одлука, земајќи го во предвид нивото на ризик.
- Кога се дава мислење и толкување, единствено персоналот овластен за изразување на мислења и толкувања ги издава соодветните изјави.
- Кога издадениот извештај треба да се замени, измени или реиздаде, мора јасно да се идентификува секоја измена.

7. Процесни барања

7.9 Жалби

Лабораторијата мора да има документиран процес на примање, евалуација и одлучување по жалби.

7.10 Несообразност при работењето

- Лабораторијата мора да има процедура која се применува кога било кој аспект од нејзината лабораториска активност или резултатите се несообразни со нејзините процедури или со договорените барања со клиентот.
- Процедурата:
 - одговорност за управување со несообразност
 - мерки (запирање или повторување на работата, неиспорачување на извештаите)
 - значењето на несообразноста (анализа на влијанието на претходните резултати)
 - одлука за прифатливоста на несообразната работа или продолжувањето на работата.
 - ако несообразност се повторува - корективни мерки.

7. Процесни барања

7.11 Контрола на податоци со податоци и управување со информации

- Лабораторијата мора да има пристап до податоците и информациите потребни за вршењето на лабораториските активности.
- Системот за управување со информации на лабораторијата кои се користат за собирање, обработка, водење на записи, известување, складирање или пребарување на податоци мора да биде валидиран за функционалност.
- Системот за управување со информации:
 - мора да биде заштитен од неовластен пристап
 - да работи во средина која е во согласност со спецификацијата на добавувачот или спецификацијата на лабораторијата или
 - во случај на не-компјутеризирани системи, да обезбедува услови кои ја чуваат точноста на рачното запишување и препишување
 - да се одржува на начин кој го обезбедува интегритетот на податоците.

8. Барања за системот за управување

■ 8.1 Опции

■ 8.1.1 Општо

- Лабораторијата мора да воспостави, документира, имплементира и да го одржува систем за управување, кој е способен да подржи и демонстрира доследно постигнување на барањата на стандардот, и да го осигура квалитетот на лабораториските резултати.
- **Покрај исполнување на барањата од т. 4 до т. 7 од стандардот** (со што се демонстрира компетентност на лабораторијата да произведува валидни податоци и резултати), **лабораторијата мора да имплементира систем во согласност со опцијата А или опцијата Б.**

8.1.2 Опција А

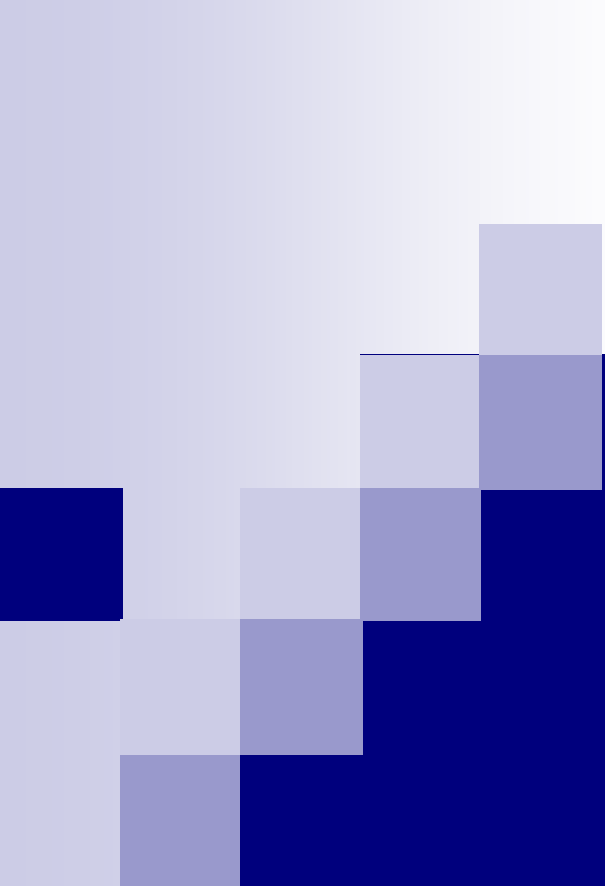
- Лабораторија нема воспоставено стандард ISO 9001 => минимални барања се да се исполнат барања опишани во точките 8.2 до 8.9
- 8.2 Документација на систем за управување
- 8.3 Контрола на документите на систем за управување
- 8.4 Контрола на записи
- 8.5 Мерки кои се однесуваат на ризиците и можностите
- 8.6 Подобрувања
- 8.7 Корективни мерки
- 8.8 Интерни проверки
- 8.9 Преиспитувања од страна на раководството

8.1.3 Опција Б

- Лабораторијата која има воспоставено и одржува менаџмент систем во согласност со ISO 9001 => лабораторија ги исполнува барањата на системот за управување специфицирани во точките 8.2 до 8.9.

Прашања за вежбање

- Наведете точна ознака и назив на стандардот познат скратено како ISO 17025. Од кои две организации е развиван и одобрен стандардот ISO 17025? Што овозможува имплементација на стандардот ISO 17025?
- Од кои осум точки е составен стандардот ISO 17025?
- Кои се барањата во однос на подточка Непристрасност?
- Наведете некои од структурните барања на стандардот ISO 17025.
- Кои се барањата во однос на подточка Персонал?
- На кој начин се воспоставува и одржува метролошка следливост во лабораторија? Во која точка од стандардот е опишано тоа?
- Во која точка од стандардот се опишани Избор, верификација и валидација на методи? Кои методи се користат и препорачуваат?
- Лабораторијата мора да има процедура која се применува кога било кој аспект од нејзината лабораториска активност или резултатите се несообразни со нејзините процедури или со договорените барања со клиентот. Што таа процедурата мора да обезбеди?
- Со исполнување на барањата од т. 4 до т. 7 од стандардот, што демонстрира лабораторијата? Објаснете во кој случај и како лабораторија мора да постапи за да имплементира систем во согласност со опцијата А, а како во согласност со опцијата Б?



крај