

WALIDACJA W METROLOGII AGROFIZYCZNEJ

A. Bieganowski¹, A. Persona²

¹ Instytut Agrofizyki, Polska Akademia Nauk
ul. Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27, Skr. Pocz. 201, Polska
e-mail: Biegan@demeter.ipan.lublin.pl

² Zakład Chemii Analitycznej i Instrumentalnej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
ul. Pl. M.Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin, Polska

Streszczenie. W pracy przedstawiono zagadnienia związane procedurą walidacyjną metod pomiarowych stosowanych w naukach agrofizycznych. Na poszczególnych etapach procedura ta zawiera w sobie określenie specyficzności, selektywności, wyznaczenia zależności funkcyjnej, dokładności, powtarzalności, odtwarzalności, zakresu, granicy detekcji, granicy oznaczalności, stabilności i niewrażliwości.

Słowa kluczowe: metrologia, walidacja, agrofizyka

WSTĘP

Agrofizyka jako nauka o przepływie masy i energii w układzie gleba-roślina-atmosfera [11] korzysta z metod pomiarowych opracowanych i wykorzystywanych w fizyce i chemii. Należy jednak podkreślić, że metody te odnoszą się do innych niż w obu wymienionych naukach obiektów badań. W agrofizyce są to: gleba oraz materiały pochodzenia roślinnego i zwierzęcego.

Konieczność badania takich obiektów powoduje wiele problemów natury metrologicznej. Znakomita większość z tych obiektów ze względu na stopień swojej komplikacji i zmienność właściwości w czasie jest bardzo trudna do zdefiniowania zarówno z jakościowego jak i ilościowego punktu widzenia. Istnieją metody pomiarowe pozwalające na pełny opis obiektu badań to jest pomiar wszystkich wielkości charakteryzujących dany obiekt. Tym niemniej metody te są drogie i czasochłonne. Niektóre obiekty badań podlegają ciągłym dynamicznym

zmianom (np. gleba zmienia niektóre swoje właściwości ze względu na aktywność mikrobiologiczną). Dlatego tak ważne jest, aby metody pomiarowe adaptowane do agrofizycznych obiektów badań były odpowiednio walidowane.

O wymaganiu walidacji metody pomiarowej wspominają, choć nie wprost normy ISO serii 9000. W sposób bardziej szczegółowy problem potraktowany jest w systemie jakości dotyczącym akredytacji laboratorium badawczego/pomiarowego w obecnie obowiązujących normach EN serii 45000. Jeszcze dokładniej odnosi się do tej kwestii projekt normy ISO 17025. Jednakże niezależnie od posiadania lub nie certyfikacji lub akredytacji należy sobie uświadomić wagę procedury walidacyjnej. Określenie i przestrzeganie takiej procedury w laboratorium zapewnia (a przynajmniej powinno) zaufanie do uzyskiwanych wyników.

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest propozycja poszczególnych etapów procedury walidacyjnej w odniesieniu do agrofizycznych metod pomiarowych.

Ponieważ celem jest propozycja procedury, dlatego konstrukcja pracy odpowiada powszechnie przyjętej konstrukcji procedur.

TERMINOLOGIA

Pojęcie walidacji definiowane jest w różny sposób dla różnych potrzeb. Biorąc pod uwagę cel niniejszej pracy walidacja zdefiniowana jest jako proces zapewnienia, że metoda pomiarowa jest adekwatna do zamierzonego celu, a otrzymane wyniki są wiarygodne.

Przed opisaniem zakresu poszczególnych etapów walidacji należy zwrócić uwagę na problem związany z zawartą tam terminologią. Część z wykorzystanych terminów jest zdefiniowana w normie PN-71/N-02050 „Metrologia. Nazwy i określenia”. W takim przypadku definicja i zakres danego pojęcia wynikać będą wprost z normy. Niestety istnieje część terminów, która nie jest tam zdefiniowana. Kłopotów przysparzają znajdujące się w polskim piśmiennictwie tłumaczenia z języka angielskiego. Często różni autorzy zupełnie inaczej tłumaczą poszczególne terminy. Dlatego należy podkreślić, że niniejsza praca nie stawia próby ujednoczenia nomenklatury związanej z metrologią, a tylko wskazanie zakresu walidacji metody.

ZAKRES WYKORZYSTANIA PROCEDURY WALIDACYJNEJ

Walidację/rewalidację należy przeprowadzać wtedy gdy mamy do czynienia:

- z wprowadzaniem metody do rutynowych oznaczeń,
- ze zmianą warunków, w których metoda była poprzednio walidowana (np. zmiana charakterystyk parametrów sprzętu pomiarowego, zmiana temperatury otoczenia itp.),
- z nową lub zmodyfikowaną metodą.

Walidacja powinna być przeprowadzana w takich samych warunkach, w jakich później eksploatowana będzie metoda pomiarowa.

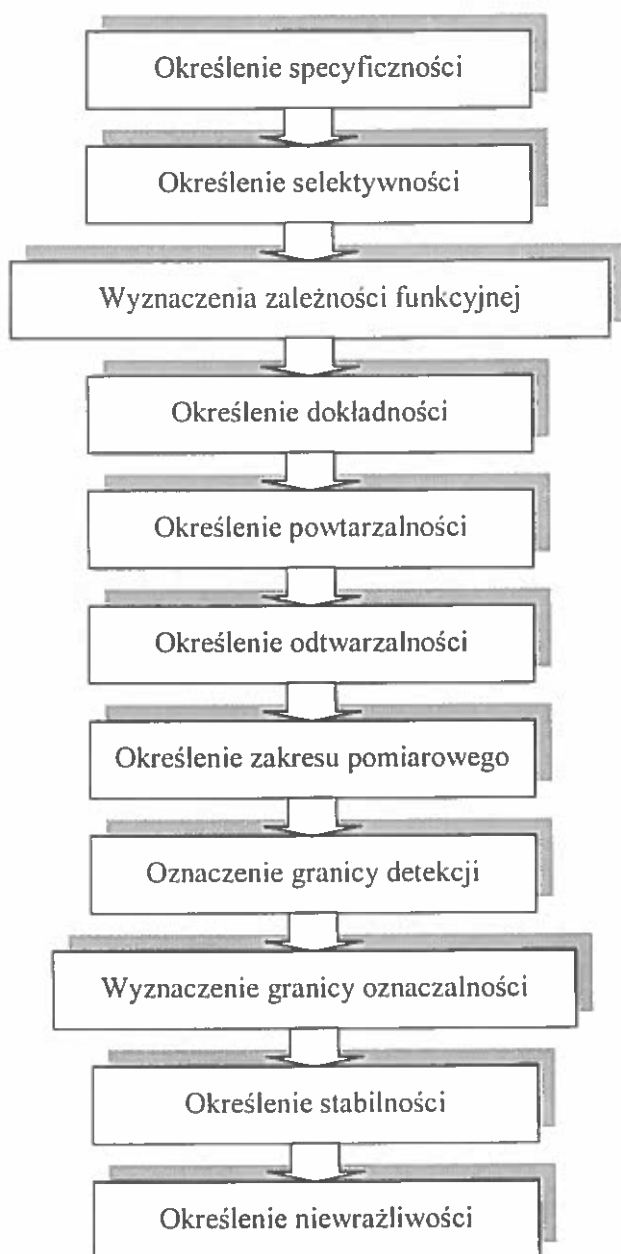
UPRAWNIENIA I ODPOWIEDZIALNOŚĆ

Walidację powinna przeprowadzać osoba posiadająca pewne doświadczenie analityczne/pomiarowe, ponieważ uzyskane podczas walidacji wyniki rzutować będą na rezultaty pomiarów rutynowych. Ta sama osoba odpowiedzialna jest też za opracowanie pełnej dokumentacji związanej z walidowaną metodą pomiarową.

OPIS POSTĘPOWANIA

Pierwszym krokiem podczas procedury walidacyjnej jest ustalenie zakresu walidacji. Będzie to zależało od metody pomiarowej, celu i sposobu jej zastosowania, dotychczasowych doświadczeń itp. W każdym konkretnym przypadku należy się zastanowić nad minimalnym zestawem elementów procesu walidacyjnego [4]. Na przykład jeśli metoda będzie używana dla jakościowej analizy śladowej pierwiastków w próbce, nie ma potrzeby testować i walidować liniowości metody w całym zakresie dynamicznym aparatury. Jeśli ma to zastosowanie, to wyspecyfikowaną w ten sposób listę należy przedyskutować z klientem (odbiorcą wyników pomiarów).

W literaturze można znaleźć wiele, czasami znacznie się różniących specyfikacji, co należy włączyć w zakres procedury walidacyjnej [6]. Poniżej zostaną przedstawione te elementy, które są powszechnie akceptowane, najczęściej realizowane oraz mają zastosowanie w metrologii agrofizycznej. Schematyczne przedstawienie proponowanych etapów procesu walidacji przedstawione jest na Rys. 1.



Rys. 1. Schemat blokowy procedury walidacyjnej.

Fig. 1. Block diagram of validation procedure.

Określenie specyficzności

Specyficzność jest to właściwość metody badawczej występująca w przypadku, gdy dana metoda jest „wrażliwa” tylko na jedną substancję lub na jedną cechę umożliwiającą specyficzny pomiar. Przykładem może być wykorzystanie spektrografii do jakościowego (nie ilościowego) oznaczenia składu próbki. Występowanie linii charakteryzujących widmo substancji wzbudzonej jednoznacznie określa obecność danego pierwiastka.

W metrologii agrofizycznej stosunkowo rzadko używane są metody specyficzne i dlatego w praktyce o wiele częściej niż ze specyficznością mamy do czynienia z selektywnością metody.

Określenie selektywności

Selektywność jest to zdolność metody do generowania poprawnych wyników przy obecności innych czynników, które mogą mieć wpływ na te wyniki.

W przypadku oznaczeń fizykochemicznych mogą to być zarówno substancje (np. związki organiczne redukujące się przy tym samym potencjale katody co oznaczany tlen w voltamperometrycznej metodzie wyznaczania gęstości strumienia tlenu w glebie) jak i zjawiska (np. ruch powietrza spowodowany przez przejeżdżający samochód przy pomiarze prędkości wiatru wiatromierzem).

Określenie selektywności realizowane jest przez porównanie wyników otrzymanych podczas pomiaru w układzie odizolowanym od wpływu czynników zakłócających z wynikami otrzymanymi w układzie z nadzorowanym wpływem tych czynników.

W przypadku oznaczeń chemicznych przykładem może być porównanie wyników analizy próbki zawierającej wyłącznie substancję oznaczaną z wynikami otrzymanymi dla próbek zawierających różne stężenia substancji, których obecność jest możliwa w próbkach badanych w rutynowych analizach.

Innym klasycznym przykładem określania selektywności metody jest obserwowanie wzajemnego położenia pików chromatograficznych. Jeśli analizowane są substancje, które przy danym wypełnieniu kolumny chromatograficznej generują na chromatogramie piki nie zachodzą na siebie można mówić o selektywnej metodzie. Ważne jest aby przy określaniu selektywności danej analizy odnieść się do wypełnienia kolumny chromatograficznej i parametrów procesu analizy, po-

nieważ inne wypełnienie i/lub inne parametry procesu wcale nie muszą zapewniać selektywności.

Ważne jest aby przy określaniu selektywności wybrać te czynniki, które mogą mieć wpływ na wyniki i aby podczas badania ich wpływu na końcowy rezultat ustalić ich intensywność na poziomie porównywalnym z intensywnością w próbkach analizowanych rutynowo.

W praktyce laboratoryjnej często przyjmuje się, że dana metoda jest selektywna i nie prowadzi w tym kierunku badań. Podstawą do takiego podejścia mogą być wyniki zaczerpnięte z literatury. Na przykład stosowana w mikrobiologii glebowej pożywka PDA uznawana jest powszechnie za selektywną w oznaczeniach grzybów [9]. Tym niemniej pojawiają się doniesienia w literaturze, że na pożywce tej rozwijają się także promieniowce, które nie są grzybami tylko bakteriami [2]. Przykładów takim można znaleźć więcej. Ich przyczyną może być fakt, że metodyki pomiarów opracowywane i opisywane były jakiś czas temu. Na przykład metoda oznaczania ogólnej liczby bakterii w glebie na pożywce asparginowo-mannitolowej opracowana została w 1928 roku [3]. Od tego czasu zarówno możliwości techniczne jak i doświadczenie i wiedza nabyte w laboratoriach poszerzyły się. Dlatego też należy wnikliwie przeanalizować i posiadać dowody selektywności „metod selektywnych”.

W literaturze można znaleźć różnice w definiowaniu pojęć *specyficzność* i *selektywność* [6]. Czasami pojęcia te uznawane są za synonimy i przypisuje im się znaczenie określone w niniejszej pracy jako *specyficzność*. Kiedy indziej autorzy w ogóle nie używają pojęcia *specyficzność*. Zastępują je *selektywnością*, a zakres znaczeniowy selektywności przypisują terminowi *rozdzielczość*.

Wyznaczenia zależności funkcyjnej

Ważnym etapem walidacji jest wzorcowanie (kalibracja). Jest to wyznaczenie zależności funkcyjnej pomiędzy wartością mierzonej wielkości a wskazanymi przez przyrząd lub układ pomiarowy odpowiednimi wartościami wielkości realizowanymi przez wzorce jednostki miary [7]. Typowym przykładem może być analiza liniowości w spektrofotometrycznych pomiarach azotanów w glebie. Przed przystąpieniem do analizy kalibruje się układ pomiarowy, to znaczy wyznacza się zależność funkcyjną pomiędzy stężeniem azotanów a ekstynkcją w ściśle określonych warunkach przewidzianych w metodzie.

Przy wyznaczaniu zależności funkcyjnej należy zwrócić uwagę, aby mierzona w późniejszych rutynowych pomiarach wartość znalazła się w przedziale wartości, dla których wyznaczono tę zależność. Na przykład błędne jest z punktu widzenia walidacji metody wyznaczenie zależności funkcyjnej w zakresie stężeń $0.1-1 \text{ g NO}_3^- \text{ dm}^{-3}$ w roztworze, jeśli spodziewamy się analizować próbki o stężeniu $10 \text{ g NO}_3^- \text{ dm}^{-3}$ i większym.

Dopasowana funkcja nie zawsze jest funkcją liniową. Może to być dowolna zależność. Warunkiem jest jednak, aby można było udowodnić, poprzez zapisy z przeprowadzonej serii doświadczeń, powtarzalną zależność funkcyjną wyników pomiarów od wartości mierzonej wielkości [8].

Określenie dokładności

Dokładność jest to cecha pomiaru określająca stopień zbliżenia wyniku do „prawdziwej” wartości mierzonej wielkości. Prawdziwa wartość jakiegokolwiek wielkości nie istnieje. Nie ma możliwości stworzenia układu pomiarowego całkowicie odseparowanego od otoczenia. Tak więc otoczenie zawsze będzie wpływało na warunki pomiaru i na otrzymywane wartości. Niedoskonałość metod pomiarowych nie zawsze pozwala zauważyć ten wpływ. W praktyce za wartość prawdziwą najczęściej przyjmuje się uśrednioną wartość z wielu powtórzeń. Dokładność można określić na kilka sposobów.

Warunkiem realizacji pierwszego sposobu jest znajomość „prawdziwej” wartości danej wielkości (np. stężenia oznaczanej substancji). Porównuje się wtedy otrzymane wartości z wartością rzeczywistą. W praktyce pomiarowej jest to dosyć rzadki przypadek.

Drugi sposób polega na porównaniu wyników z wynikami otrzymanymi alternatywną metodą, której dokładność jest znana. Problem w tym, że taka metoda nie zawsze jest dostępna. Oba powyższe sposoby pozwalają na skuteczną eliminację błędów systematycznych [5].

O dokładności można też wnioskować na podstawie znajomości precyzji, specyficzności i zależności funkcyjnej. Można też przyjąć jako praktyczną miarę dokładności błąd graniczny pomiaru. Im mniejszy będzie błąd graniczny pomiaru, tym większa dokładność.

Określenie powtarzalności

W niektórych pracach publikowanych w języku polskim poświęconych walidacji metod badawczych pojawia się termin precyzja metody. Jest to bezpośrednie tłumaczenie angielskiego słowa „precision”. Biorąc jednak za podstawę polskie słownictwo dotyczące metrologii [10] należy raczej mówić o określeniu powtarzalności i odtwarzalności pomiaru.

Powtarzalność pomiaru zdefiniowana jest jako stopień niezgodności (wyrażany zwykle jako wariancja lub odchylenie standardowe, albo też na podstawie niepewności pomiaru) wyników kolejnych pomiarów tej samej wielkości, wykonywanych przez tego samego obserwatora, w tym samym laboratorium, w tych samych warunkach, za pomocą tych samych metod i tych samych narzędzi pomiarowych.

Określenie odtwarzalności

Odtwarzalność wyników jest to stopień zgodności wyników pomiarów tej samej wielkości w przypadku gdy poszczególne pomiary wykonywane są: za pomocą różnych metod czy też różnych narzędzi pomiarowych, przez różnych obserwatorów, w różnych laboratoriach, w długich odstępach czasu lub w różnych warunkach użytkowych.

Jeśli istnieje możliwość to określanie zarówno powtarzalności jak i odtwarzalności powinno odbywać się w oparciu o analizowaną próbkę, aby uniknąć błędów powstających w procedurze przygotowania próbek przygotowanych na potrzeby oznaczenia. Jednakże w uzasadnionych przypadkach istnieje możliwość użycia do tego celu próbek sztucznie przygotowanych.

Określenie zakresu pomiarowego

Zakres pomiarowy to zakres wartości mierzonej wielkości, dla których wskazania narzędzia pomiarowego otrzymane w normalnych warunkach użytkowania i z jednego tylko pomiaru nie powinny być obciążone błędem większym od granicznego błędu dopuszczalnego [10].

Z praktycznego punktu widzenia można stwierdzić, że zakres pomiarowy jest to przedział wartości mierzonej wielkości (np. przedział stężeń analizowanej sub-

stancji), w którym otrzymywane podczas pomiaru wartości mają akceptowalną (przez użytkownika) dokładność, liniowość i powtarzalność i odtwarzalność.

Oznaczenie granicy detekcji

W literaturze poświęconej walidacji metod analitycznych granica detekcji definiowana jest jako minimalna, mierzona wartość, która jest większa niż szum (tło) pomiaru [1]. Może to być więc na przykład najniższe stężenie substancji w próbce, przy którym można dzięki danej metodzie wykazać obecność tej substancji, ale niekoniecznie oznaczyć ilościowo. Tak więc granica detekcji jest raczej parametrem jakościowym.

Wyznaczenie granicy oznaczalności

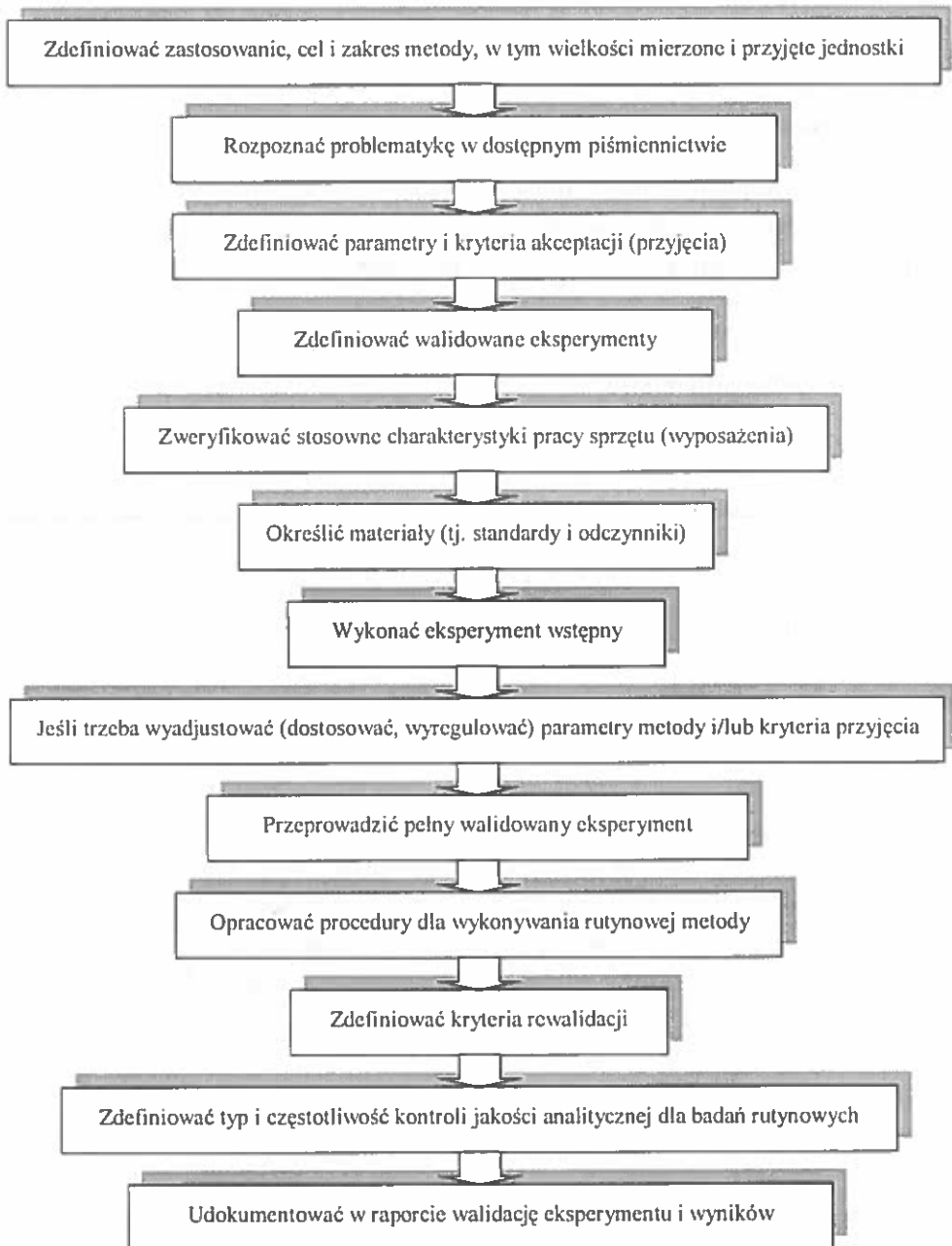
Granica oznaczalności jest to minimalna, mierzona wartość, która pozwala na dokładny, powtarzalny i odtwarzalny pomiar ilościowy. I tak na przykład w chromatografii przyjmuje się, że otrzymany podczas pomiaru pik powinien być 10–20 razy większy od tła, aby można było mówić o przekroczeniu granicy oznaczalności [6].

Określenie stabilności

Określenie stabilności jest niezwykle ważne w odniesieniu do obiektów agrofizycznych ponieważ wiele substancji chemicznych czy też wielkości fizykochemicznych ulega ciągłym zmianom spowodowanych aktywnością biologiczną w analizowanych materiałach. Stabilność jest to niezmiennosc wartości danej wielkości w określonym czasie. Na przykład dla oznaczeń chemicznych stabilność stężeń substancji oznaczanej, stężeń reagentów oraz standardów odniesienia jest czynnikiem decydującym o wiarygodności wyników otrzymanych w laboratorium.

Typowym przykładem oznaczenia, które powinno być wykonane natychmiast po pobraniu próbki jest oznaczenie stężenia tlenu w wodach powierzchniowych. Aktywność mikrobiologiczna nie pozwala na uznanie próbki za stabilną.

Istnieją metody stabilizowania próbek na określony czas. W takim przypadku należy jednak odpowiedzieć na pytanie czy dodatek stabilizatora nie pogarsza innych, zdefiniowanych poprzednio parametrów metody pomiarowej.



Rys. 2. Schemat blokowy etapów całościowej walidacji „prototypowej” metody pomiarowej
Fig. 2. Block diagram of stages of new method validation procedure.

Określenie niewrażliwości (ang. robustness)

Pojęcie to trudne do przetłumaczenia na język polski obejmuje niewrażliwość metody na niewielkie zmiany poszczególnych parametrów. Na przykład w przywołanej wcześniej chromatografii ustala się, ważne z punktu widzenia metody, parametry pomiaru takie jak: szybkość przepływu przez kolumnę, objętość dozwolonej próbki, temperaturę itp. Jednakże w praktyce wszystkie te parametry zmieniają się nieznacznie w jakimś zakresie. Walidacja powinna odpowiedzieć na pytanie, czy wyniki pomiarów zależą (i jeśli tak to w jaki sposób) od tych naturalnych wahań ustalonych parametrów.

WSKAZÓWKI I UWAGI

Walidacja metod standardowych nie naraża wielkich problemów. Wiele z wymagań dotyczących zakresu walidacji znajduje się w normach przedmiotowych opisujących poszczególne metody. Można także skorzystać z doświadczeń innych laboratoriów.

Jeśli już mowa o innych laboratoriach to należy wspomnieć o tzw. badaniach międzylaboratoryjnych. Jest sposób porównywania wyników otrzymanych (tą samą lub innymi metodami) dla tej samej próbki przez różne laboratoria. Forma takich porównań jest także zalecana ze względu na możliwość doskonalenia metod pomiarowych i badawczych.

O wiele trudniej jest zwalidować specyficzną metodę używaną „prototypowo” w danym laboratorium. Walidacja takiej metody powinna być zademonstrowana w eksperymencie laboratoryjnym przy użyciu próbek lub standardów podobnych do nieznanymi, analizowanych rutynowo próbek. Przygotowanie i wykonanie powinno następować według protokołu walidacyjnego najlepiej napisanego w postaci instrukcji „krok po kroku”. Możliwe etapy całościowej walidacji metody „prototypowej” przedstawione są na Rys. 2.

DOKUMENTOWANIE

Podczas walidacji wszystkie wyniki, wnioski uwagi powinny być zapisywane. Celem tworzenia tych zapisów jest możliwość ciągłego doskonalenia metody pomiarowej a także, w przypadku złych wyników, możliwość stwierdzenia przyczyn takiego stanu rzeczy i podjęcia działań korygujących.

- Typowe zapisy, które powinny się znaleźć w raporcie z walidacji obejmują:
- Cel i zakres metody, w tym wielkości mierzone i przyjęte jednostki
 - Szczegółowy opis odczynników, standardów odniesienia i próbek kontrolnych
 - Procedurę sprawdzania jakości standardów i używanych odczynników
 - Opis problematyki bezpieczeństwa
 - Jakże parametry metody uznano za ważne i jakie przyjęto dla nich wartości
 - Krytyczne parametry wykazane z testów decydujące o braku niewrażliwości (robustness) metody
 - Listę wyposażenia/sprzętu i jego wymagania funkcjonalne
 - Szczegółowy opis warunków przeprowadzenia eksperymentu, a w tym przygotowanie próbek
 - Procedurę statystyczną i odpowiednie obliczenia wykonane podczas realizacji całej procedury walidacyjnej
 - Procedurę kontroli jakości podczas badań rutynowych
 - Odpowiednie wykresy (np. chromatogramy, spektrogramy i krzywe kalibracyjne itp.)
 - Metodę akceptacji limitów
 - Oszacowane niepewności wyników pomiarów
 - Kryteria rewalidacji
 - Osobę, która rozwinęła i wstępnie walidowała metodę
 - Podsumowanie i wnioski

ARCHIWIZOWANIE

Zapisy wykonane podczas walidacji powinny być dostępne podczas całego okresu eksploatacji metody pomiarowej. Należy także określić czas przez jaki powinny być archiwizowane po zakończeniu tego okresu. Może to być przydatne w badaniach porównawczych przy zastosowaniu nowych metod pomiarowych.

WNIOSEK

Wyniki walidacji metody pomiarowej są niezbędnym dowodem zapewniającym o rzetelności wyników pomiarów i badań, w tym agrofizycznych.

LITERATURA

1. **Analytical Methods Committee.**: Analyst, February 1987, 12, 199–204. 1987.
2. **Dąbek-Szreniawska M., Wyczółkowski A.J.**: Modifications of bacterial populations in soil dependent on cultivated crops. XXIV Congress of the Polish Soc. Microbiol., September 2000. Białystok, Poland. Medical Science Monitor 6 (suppl. 3), 142, 2000.
3. **Fred E.B., Waksman S.A.**: Laboratory manual of general microbiology, McGraw – Hill Book Comp., New York, London, 1928.
4. **Green J.M.**: A practical guide to analytical method validation. Analytical Chemistry, 68, 305A–309A, 1996.
5. **Holme D.J.**: Analytical Biochemistry. Longman Scientific and Technical, J. Wiley and Sons, Inc. New York, 1993.
6. **Huber L.** 1998. Validation of analytical methods: review and strategy. LC-GC International – February 1998, 96–105.
7. **Międzynarodowy słownik podstawowych i ogólnych terminów metrologii.** GUM, 1996.
8. **Miller J.C.**: Statistic for Analytical Chemistry. Ellis Horwood PTR Presentice Hall, New York, 1993.
9. **Parkinson D.**: Filamentous fungi [in] Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbial and Biochemical Properties. R.W. Weaver i inni (eds). Publ. Soil Sci.Am. Inc. Madison, 329–350, 1994.
10. **PN-71/N-02050.** Metrologia. Nazwy i określenia.
11. **Walczak R.T.**: Modelling of processes in soil-plant-atmosphere-machine system. Roczniki Gleboznawcze (Soil Science Annual) Tom L Nr 3 W-wa, 51–66, 1999.

VALIDATION IN METROLOGY OF AGROPHYSICS

A. Bieganowski¹, A. Persona²

¹Institute of Agrophysics, Polish Academy of Sciences
Doświadczalna 4, 20-290 Lublin 27, P.O Box. 201, Poland
e-mail: Biegan@demeter.ipan.lublin.pl

Summary: The problems of validation of measurement methods in agrophysics are described in this paper. Demonstrate of specificity, selectivity, functional dependence, accuracy, repeatability, reproducibility, limit of detection, limit of quantitation, stability and robustness should be demonstrated during the validation procedure.

Key words: metrology, validation, agrophysics.

