



**VYSOKÁ ŠKOLA  
CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE**

# **Zajištění jakosti ve forenzní analýze, rozhodovací analýza, legislativní aspekty**



**Prof. Jana Hajšlová**  
s využitím některých  
podkladů Prof. V. Kocourka

# Dvě základní oblasti chemické analýzy

## ► Kvalitativní analýza

Poskytuje informaci vedoucí k identifikaci složek obsažených ve vzorku

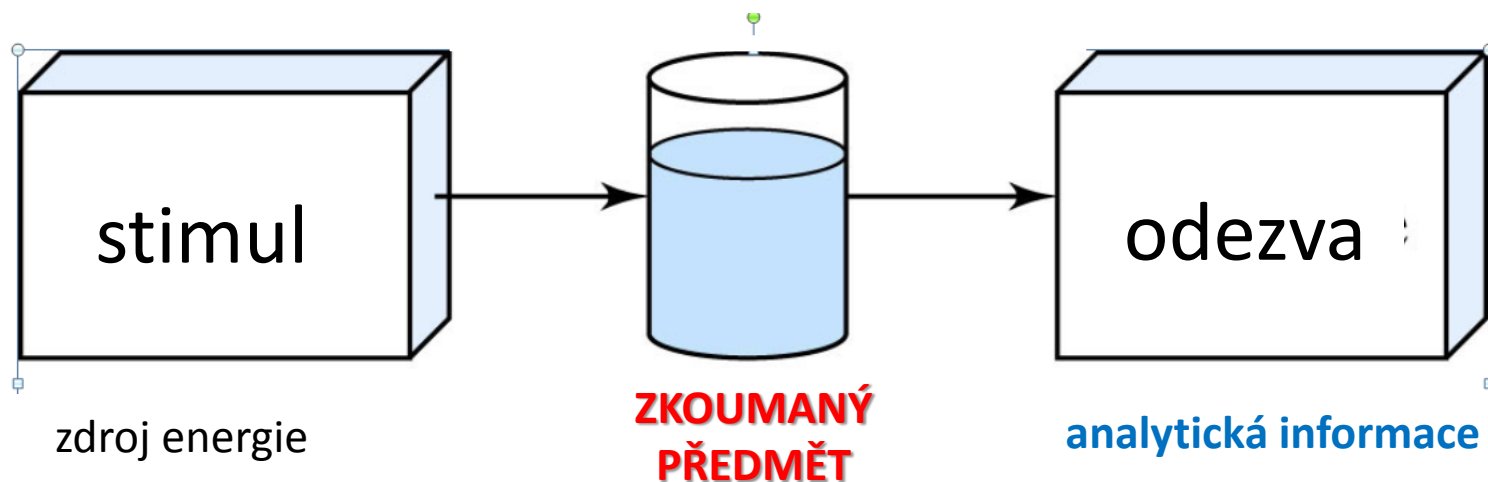


## ► Kvantitativní analýza

Výstupem je numerická informace - obsah daných složek ve vzorku



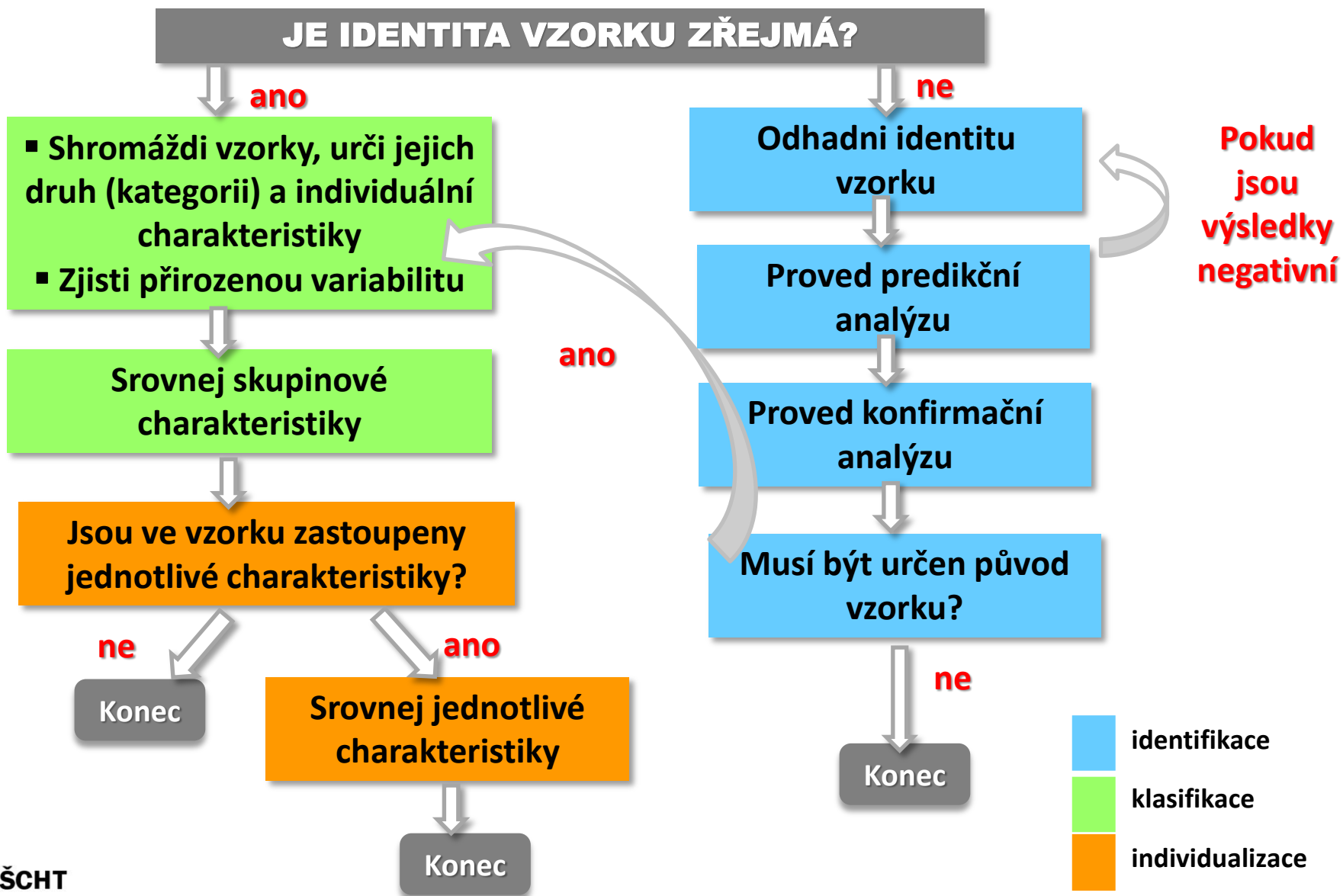
# Instrumentální metody – obecný koncept



## *Oblasti aplikace:*

- ➔ **BIOANALYTICKÁ:** biomolekuly / biologické matrice (např. proteiny, aminokyseliny,... sliny, krev, moč...)
- ➔ **ENVIRONMENTÁLNÍ:** pesticidy, polutanty...vzduch, voda, půda...
- ➔ **VĚDA O MATERIÁLECH:** polyméry, charakterizace nových materiálů..
- ➔ **FORENZNÍ VĚDY:** tělní tekutiny, DNA, zbytky střeliva / výbušnin, vlasy, vlákna, prvková analýza, drogy / léčiva, alkoholy, otravy, otisky prstů, etc.

# Postup vyšetřování forenzního vzorku



# Příklad klasifikace a individualizace

**TABLE 1** Examples of Class and Individual Characteristics for Common Evidence

EVIDENCE	CLASS CHARACTERISTICS	INDIVIDUAL CHARACTERISTICS
Fingerprints	General pattern type (arch, loop, whorl)	Relative location of fine detail (bifurcations and ridge endings)
Bullets	Diameter, # of land and groove impressions, mass, and direction of twist	Individual striations (scratches) imparted from the barrel
Hair	Color, length, and diameter	DNA only found in the root or attached skin cells
Glass	Color, thickness, density, refractive index, and curvature	Physical match
Soil	Color, pH, particle size distribution, and density distribution	Uncommon
Fibers	Color, cross section, chemical composition, microscopic features, refractive index, and solubility	Uncommon



FIGURE 9 Natural variation seen in hairs under a microscope.

# Presumpční a konfirmační forenzní testy

... v reálné situaci, v terénu, se často musí vyšetřovatelé rozhodnout ohledně charakteru možných důkazních předmětů...



Např červená skvrna je:

- lidská krev ?
- krev ze zvířete?
- kečup?
- barva ?

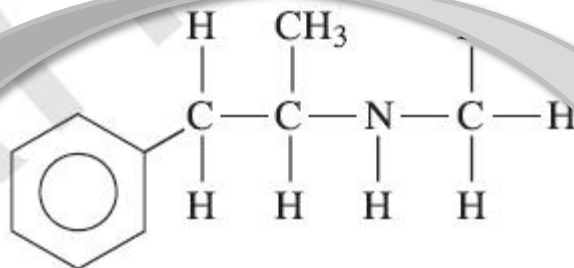
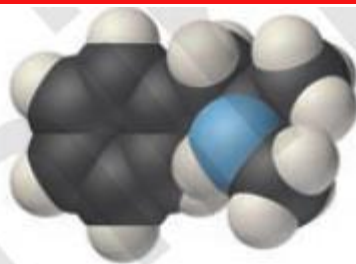
Vliv na odběr dalších důkazních předmětů

■ **PREDIKČNÍ TEST** – screening, umožní předběžnou kategorizaci, ale nerozliší např mezi krví člověka a zvířete

■ **KONFIRMAČNÍ TEST** – potvrzení, identifikace  
*standardní pro biologické tekutiny*

- krev
- pro sliny
- perma
- Moč
- vaginální sekrety

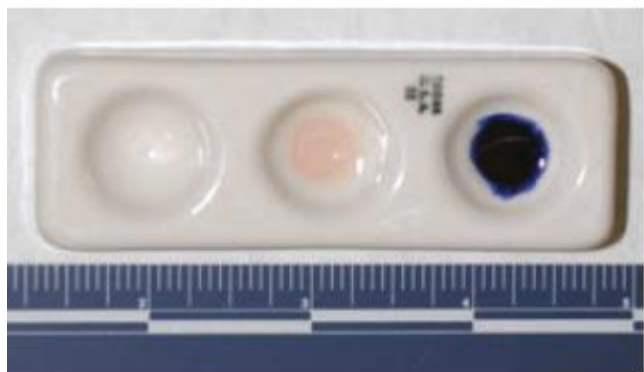




Methamphetamine

**PREDIKČNÍ  
TEST**

**KONFIRMAČNÍ  
TEST**



**FIGURE 6** The presumptive color test for methamphetamine shows a deep blue-colored product.



**FIGURE 7** The infrared spectrophotometer shown here produces a chemical fingerprint of a substance.



search

website

search

members login

Home

About ENFSI

News

Agenda

Projects

Documents

Hall of Fame

IFSA

Contact

EUROPEAN NETWORK OF FORENSIC SCIENCE INSTITUTES

# European Network of Forensic Science Institutes

www.enfsi.eu

## members from

- Armenia
- Austria
- Azerbaijan
- Belgium
- Bosnia and Herzegovina
- Bulgaria
- Croatia
- Cyprus
- Czech Republic
- Denmark
- Estonia
- Finland
- France
- Georgia

More members



Google

Obrázky ©2013 NASA, TerraMetrics

## news

- 2013-7-19 Tripartite Meeting of ENFSI, Eurojust and Europol in the Hague
- 2013-5-27 Changes within the ENFSI Board
- 2013-5-14 ENFSI Annual Report 2012
- 2013-5-10 New ENFSI Member from the UK

More news

## agenda

- Forensic Governance Executive Course
- 2013-9-22 | NFI, The Hague, The Netherlands
- 19th Annual Meeting of the EWG Paint & Glass
- 2013-9-23 | Larnaca, Cyprus
- 11th International Forensic Symposium
- 2013-9-24 | Bratislava, Slovakia

More agenda

Nahlasit ohybu v mapě

Board



Working Groups



Standing Committees



Animal, Plant and Soil Traces  
 Digital Imaging  
 DNA

Drugs  
 Explosives  
 Fingerprint  
 Firearms/GSR

Fire and Explosions Investigation  
 Forensic Information Technology

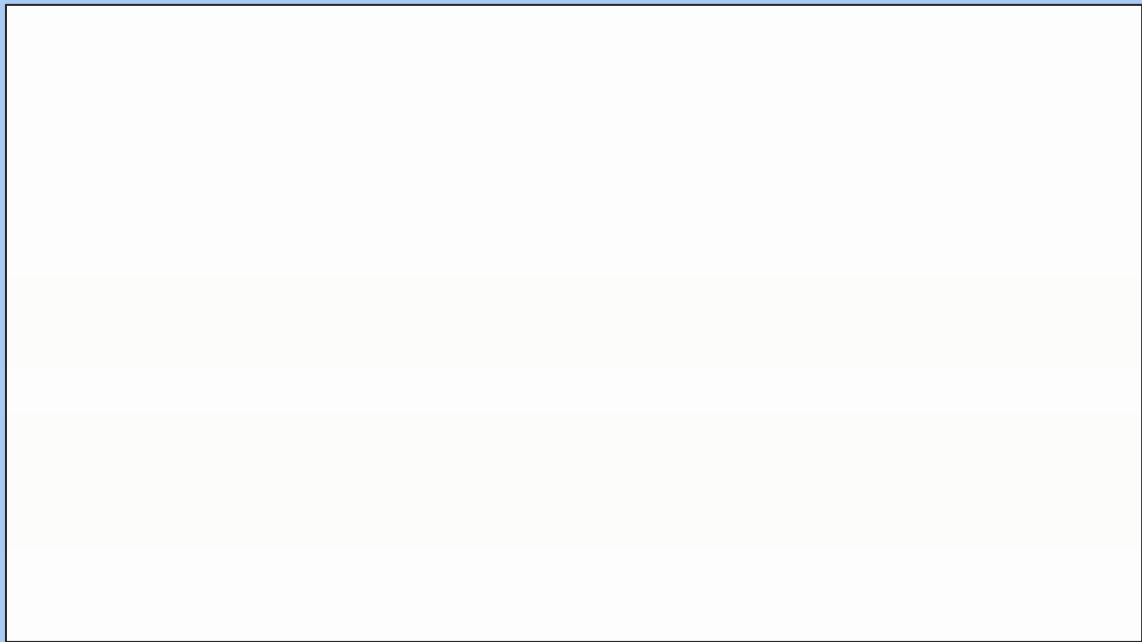
Forensic Speech and Audio Analysis  
 Handwriting  
 Marks

Paint and Glass  
 Road Accident Analysis  
 Scene of Crime  
 Textile and Hair





Netherlands Forensic Institute  
*Evidently the best*



# KONTROLA KVALITY (QC)

Externí vědecké organizace

Průběžné vzdělávání  
Referenční materiály  
Standardy  
Přezkoumání...

Profesní organizace

Akreditace laboratoře  
Průběžné vzdělávání  
Certifikace analytiků  
Mezilaboratorní zkoušky  
Přezkoumání  
Audity...

Forenzní laboratoř

Trénink a vzdělávání  
Kalibrace zařízení  
Standardní postupy  
Validace metod  
Interní QA/QC  
Kontrolní diagramy  
Přezkoumání

'Rodokmen' dat

Prokazování kvality (QA)

Předkladatel

černá skříňka

Data  
Výsledky  
REPORTY

# Web of Science: Forensic analysis & quality assurance



## Making drug-analysis laboratories fit-for-purpose The UNODC scientific and forensic work programme

Author(s): [Tetty, JNA](#) (Tetty, Justice N. A.)<sup>[1]</sup>; [Remberg, B](#) (Remberg, Barbara)<sup>[1]</sup>; [Naidis, I](#) (Naidis, Iphigenia)<sup>[1]</sup>

Abstract: The United Nations Office on Drugs and Crime forensic work programme seeks to ensure that the international community has access to quality forensic science services and data in support of their efforts to counter drugs, crime and terrorism. **Good quality and reliable data from forensic/drug analysis laboratories translate into the design of effective policies and decisions in drug control and crime prevention.** This article outlines the tools and services provided by the UNODC to drug analysis laboratories worldwide to make them fit for purpose. These include quality assurance support: analytical reference standards, manuals and guidelines on recommended analytical methods and forensic best practices, drug and precursor field testing kits, and fostering of international cooperation in the forensic sciences sector



CHIMICA OGGI-  
CHEMISTRY TODAY  
Volume: 28 Issue: 3  
Pages: 23-25  
Published: 2010

<S:\DOČASNÉ\United nations drugs.pdf>

Search

forensic analysis

Example: water consum\*

in Title

AND quality assurance

Example: oil spill\* mediterranean

in Topic

AND

Example: Cancer\* OR Journal of Cancer Research and Clinical Oncology

in Publication Name

[Add Another Field >>](#)

Search

Clear

Title: **Making drug-analysis laboratories fit-for-purpose The UNODC scientific and forensic work programme**

Author(s): Tettey, Justice N. A.; Remberg, Barbara; Naidis, Iphigenia

Source: CHIMICA OGGI-CHEMISTRY TODAY Volume: 28 Issue: 3 Pages: 23-25 Published: MAY-JUN 2010

Times Cited: 0 (from Web of Science)

[Links](#) [ [View abstract](#) ]

Title: **Forensic Analysis of Explosives Using Isotope Ratio Mass Spectrometry (IRMS)-Part 2: Forensic Inter-Laboratory Trial: Bulk Carbon and Nitrogen Stable Compounds (Australia and New Zealand)**

Author(s): Benson, Sarah J.; Lennard, Christopher J.; Maynard, Phillip; et al.

Source: JOURNAL OF FORENSIC SCIENCES Volume: 55 Issue: 1 Pages: 205-212 DOI: 10.1111/j.1556-4029.2009.01242.x Published: JAN 2010

Times Cited: 3 (from Web of Science)

[Links](#) [Full Text](#) [ [View abstract](#) ]

Title: **New perspectives in the use of ink evidence in forensic science: Part I. Development of a quality assurance process for forensic ink analysis by HPTLC**

Author(s): Neumann, Cedric; Margot, Pierre

Source: FORENSIC SCIENCE INTERNATIONAL Volume: 185 Issue: 1-3 Pages: 29-37 DOI: 10.1016/j.forsciint.2008.11.016 Published: MAR 10 2009

Times Cited: 9 (from Web of Science)

[Links](#) [Full Text](#) [ [View abstract](#) ]

Title: **Forensic analysis of excessive leakage from lagoons lined with a composite GCL**

Author(s): Benson, CH; Jo, HY; Abichou, T

Source: GEOSYNTHETICS INTERNATIONAL Volume: 11 Issue: 3 Pages: 242-252 DOI: 10.1680/gein.11.3.218.44487 Published: 2004

Times Cited: 5 (from Web of Science)

[Links](#) [Full Text](#) [ [View abstract](#) ]

Title: **Recent improvements in forensic hair analysis for illicit drugs**

Author(s): Miki, A; Katagi, M; Tsuchihashi, H

Source: JOURNAL OF HEALTH SCIENCE Volume: 49 Issue: 5 Pages: 325-332 DOI: 10.1248/jhs.49.325 Published: OCT 2003

Times Cited: 12 (from Web of Science)

[Links](#) [Full Text](#) [ [View abstract](#) ]

Title: **Quality assurance and reference material requirements and considerations for environmental sample analysis in nuclear forensics**

Author(s): Swindle, DW; Perron, RE; Goldberg, SA; et al.

Book Group Author(s): IAEA



## New perspectives in the use of ink evidence in forensic science: Part I. Development of a quality assurance process for forensic ink analysis by HPTLC

Cedric Neumann<sup>a,b,\*</sup>, Pierre Margot<sup>a</sup>

<sup>a</sup>School of Forensic Science, University of Lausanne, CH-1015 Dorigny, Switzerland

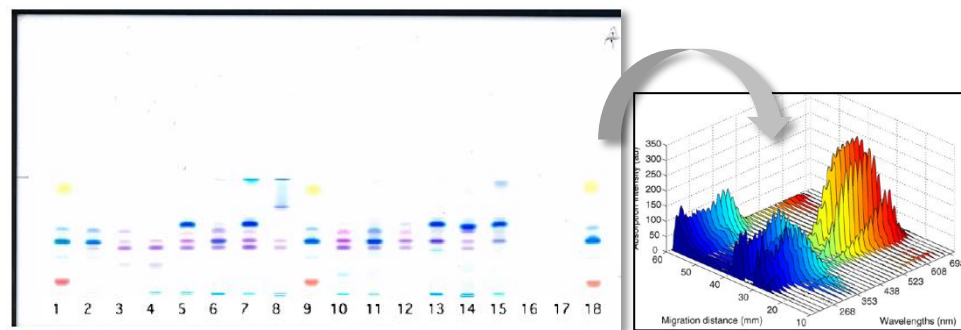
<sup>b</sup>The Forensic Science Service Ltd., 2920 Trident Court, Birmingham B37 7YN, United Kingdom

### ABSTRACT

The level of information provided by ink evidence to the criminal and civil justice system is limited. The limitations arise from the weakness of the interpretative framework currently used, as proposed in the ASTM 1422-05 and 1789-04 on ink analysis. It is proposed to use the likelihood ratio from the Bayes theorem to interpret ink evidence.

Unfortunately, when considering the analytical practices, as defined in the ASTM standards on ink analysis, it appears that current ink analytical practices do not allow for the level of reproducibility and accuracy required by a probabilistic framework.

Such framework relies on the evaluation of the statistics of the ink characteristics using an ink reference database and the objective measurement of similarities between ink samples. A complete research programme was designed to (a) develop a standard methodology for analysing ink samples in a more reproducible way, (b) comparing automatically and objectively ink samples and (c) evaluate the proposed methodology in a forensic context.



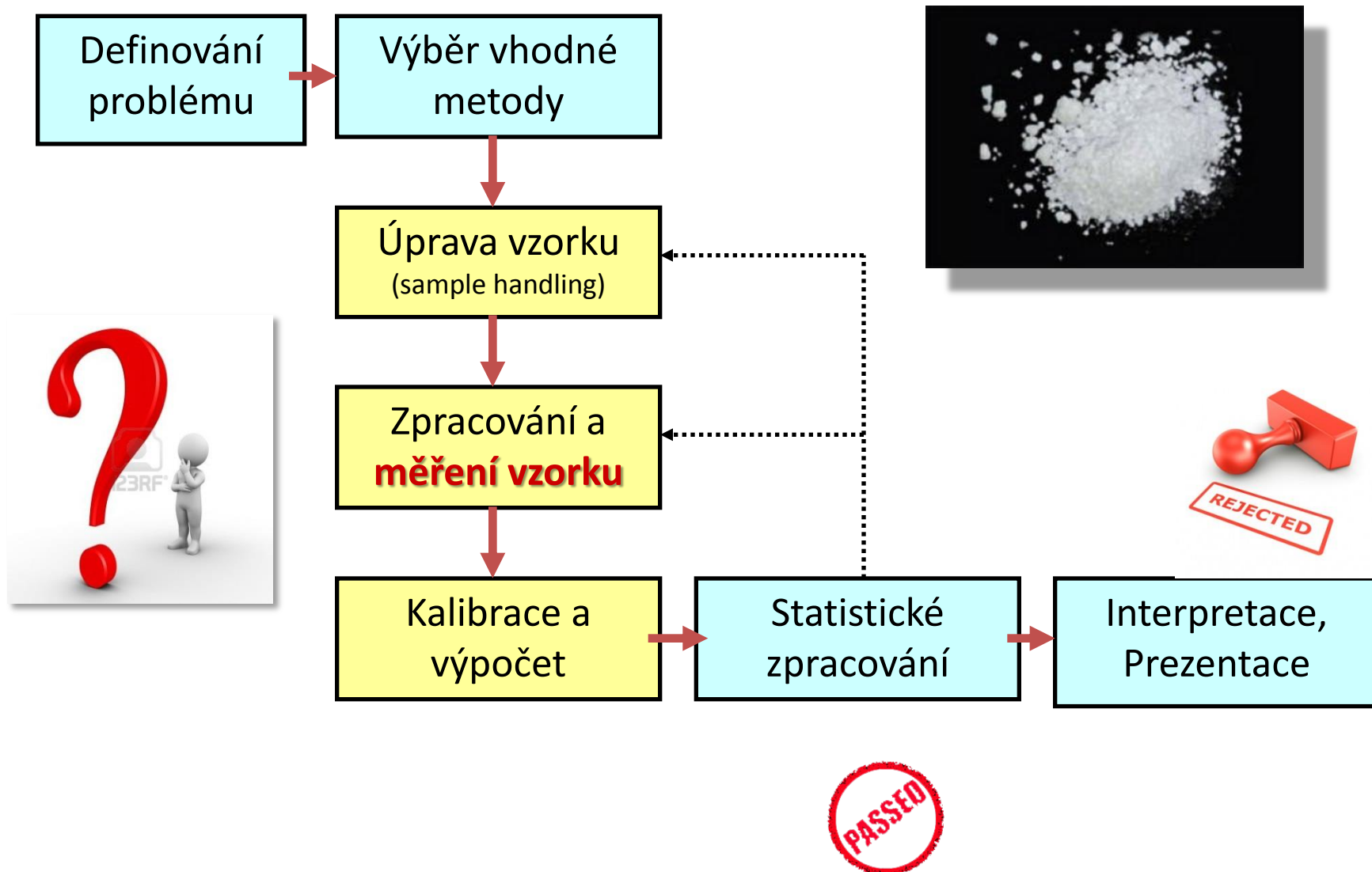
# VALIDACE, výběr zkušebních metod pro daný účel

**Kvalimetrie 9. Vhodnost analytických metod pro daný účel** (laboratorní příručka pro validaci metod a související činnosti), Miloslav Suchánek, EURACHEM ČR, Praha 1999

Procesem **VALIDACE** se zjišťují **PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY** analytické metody:

**„je metoda vhodná pro zamýšlený účel ?“**

# Analytická metoda jako součást řešení problému



# ■ Co je tedy „VALIDACE“ ?

...poskytnutí důkazu, že metoda je vhodná pro daný účel = zjišťování její „platnosti (validity)“.

Analytická metoda je definována:

- principem a rovnicí měření
- algoritmem pracovního postupu,
- požadavky na materiály, přístroje, zařízení,..
- pracovními (provozními) charakteristikami
- způsobem kvantifikace (kalibrace a výpočet)

***Popis dané metody - Standardní operační postup -  
SOP: „Standard Operation Procedure“***





# Struktura SOP – ČSN / EN / ISO

## Normalizovaná analytická (zkušební) metoda:

- **podstata zkoušky** (princip, definice analytu)
- **chemikálie** (činidla, rozpouštědla, standardy,..)
- **přístroje, zařízení**
- **pracovní postup** (algoritmus vč. kalibrace a výpočtu)
- **konfirmační zkoušky** (identita, kvantita)
- **preciznost** (opakovatelnost, reprodukovatelnost)
- **pravdivost** (výtěžnost – odchylka)
- **protokol o zkoušce** (uvádění výsledků, interpretace)



# PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY ZÍSKANÉ VALIDACÍ - přehled

## 1. PŘESNOST:

- ▶ opakovatelnost, reprodukovatelnost – *náhodné vlivy*
- ▶ pravdivost (zpravidla výtěžnost) - *vychýlení*

## 2. SPECIFIČNOST, SELEKTIVITA:

**specifická metoda** - zcela oproštěna od vlivu matrice

**selektivní metoda** – výsledky ovlivňuje složení matrice (interference, cross-reactivity,...)

## 3. CITLIVOST: směrnice kalibrační přímky



# PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY ZÍSKANÉ VALIDACÍ - přehled

## 4. MEZ DETEKCE a MEZ STANOVITELNOSTI:

**LOD** – jaké množství analytu lze ještě spolehlivě prokázat

**LOQ** – jaké množství analytu lze s definovanou přesností ještě stanovit nebo nejnižší bod kalibrační křivky (**LCL**)

## 5. PRACOVNÍ ROZSAH a LINEARITA:

v jakém koncentračním rozsahu lze měřit/kalibrovat a v jakém rozsahu je kalibrační závislost lineární

*Měření má probíhat za stejných podmínek jako kalibrace !*

## 6. ROBUSTNOST (ruggedness, robustness):

jak je výsledek ovlivněn malými změnami v dodržení SOP (test robustnosti parametrů).

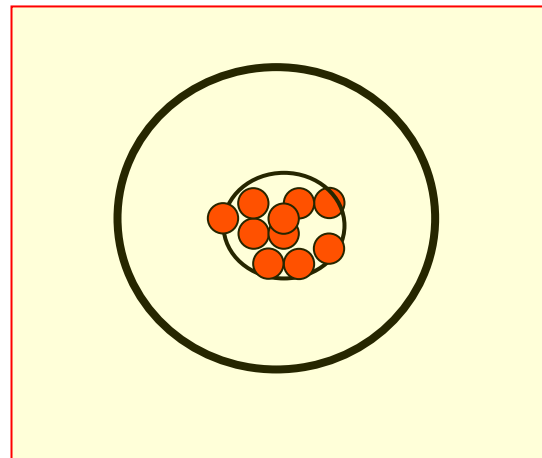
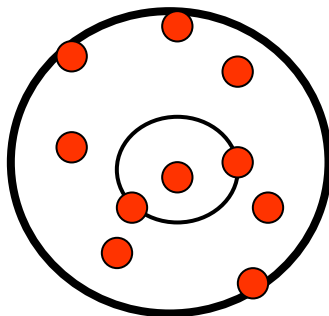
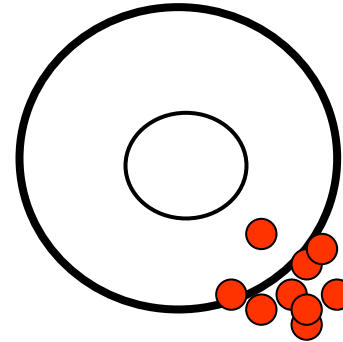
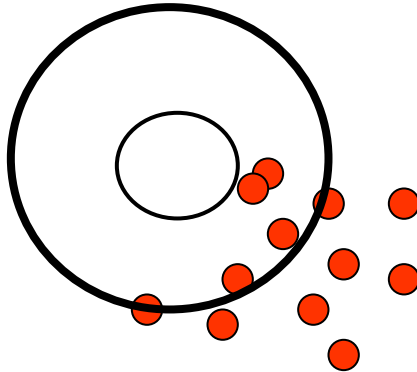


1.

# PŘESNOST

*opakovatelnost* →

↓  
*správnost*  
↓



← **optimální  
přesnost**

# 2.

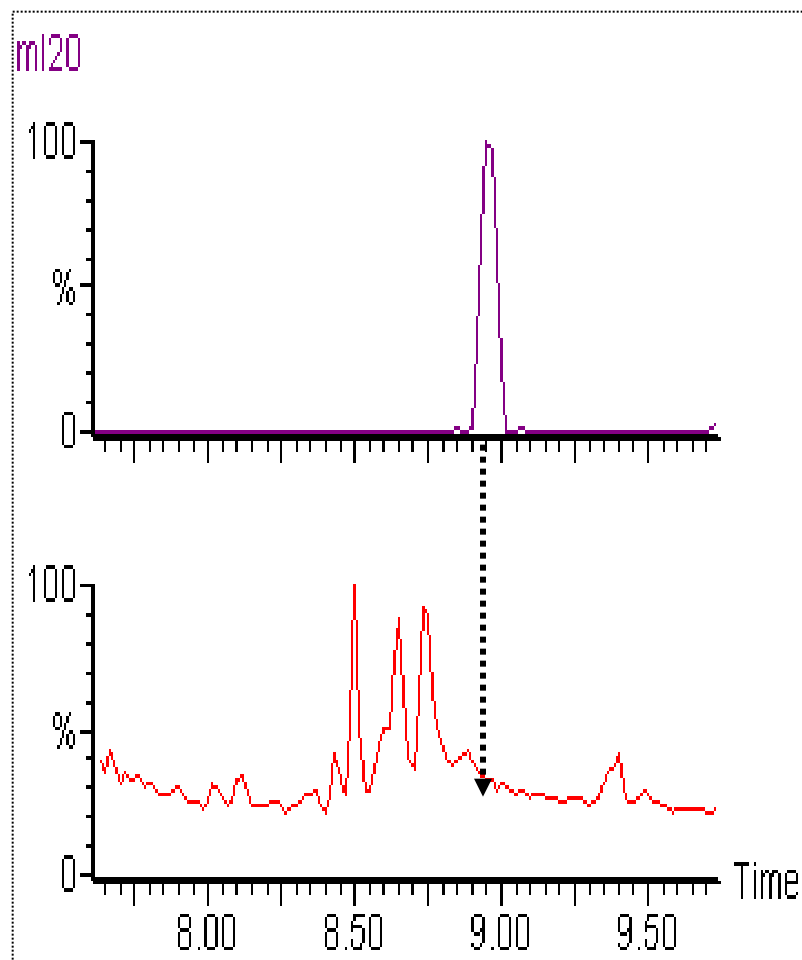
## SELEKTIVITA

### GC stanovení reziduí organofosfátů

**Selektivní NPD**

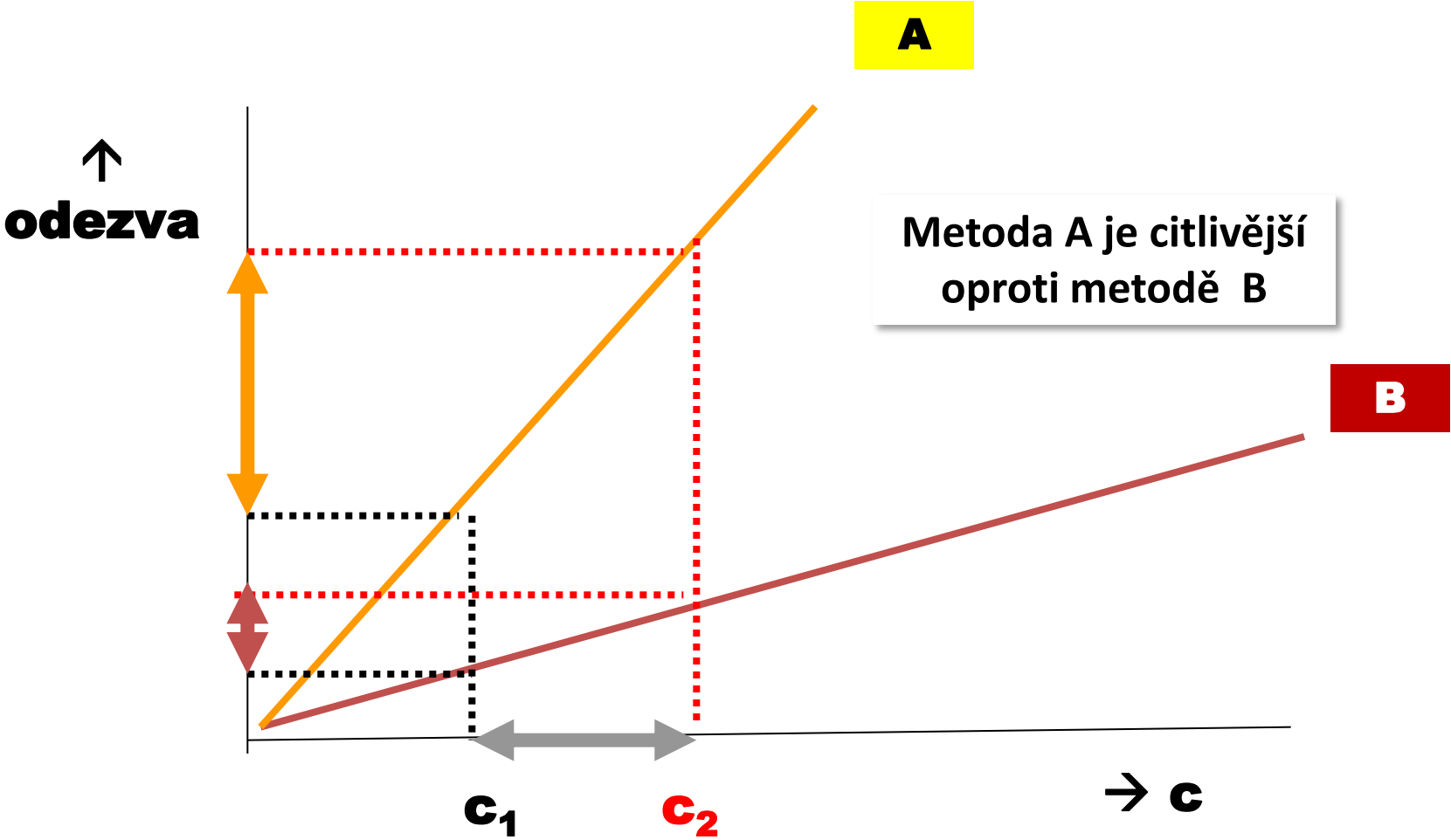


**Neselektivní  
(univerzální) FID**



# 3.

## CITLIVOST

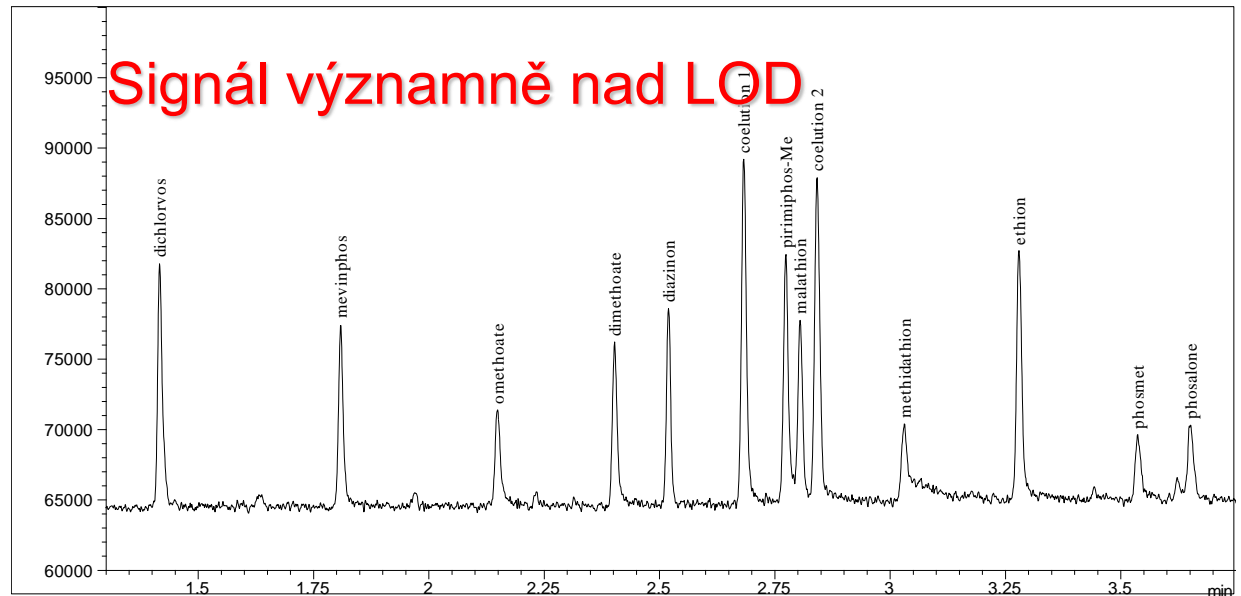
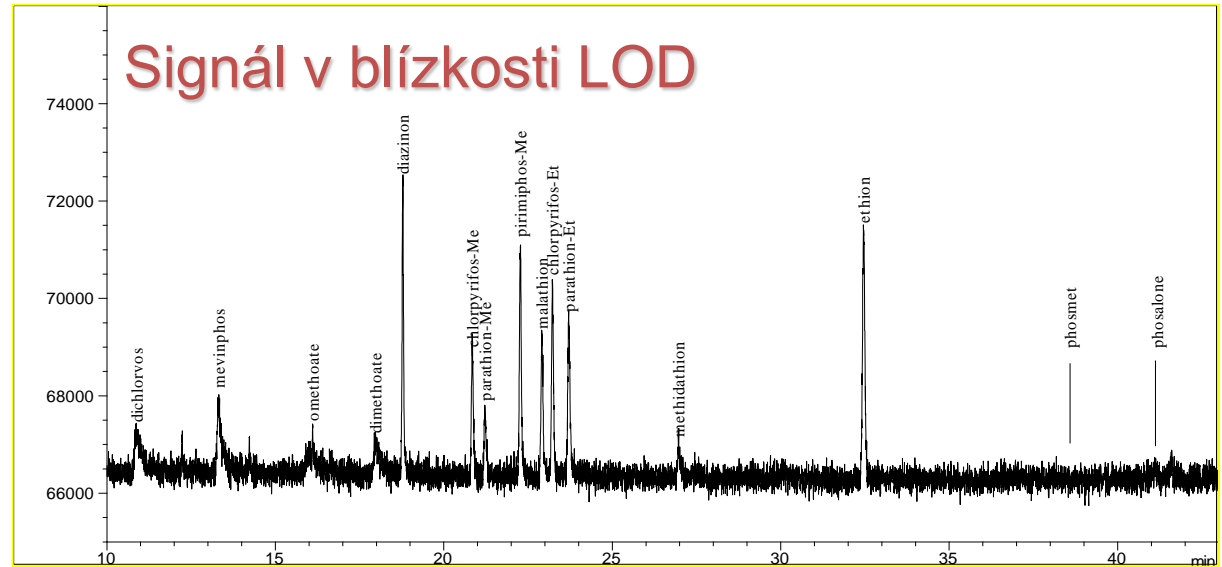


# 4.

## MEZ DETEKCE / STANOVITELNOSTI

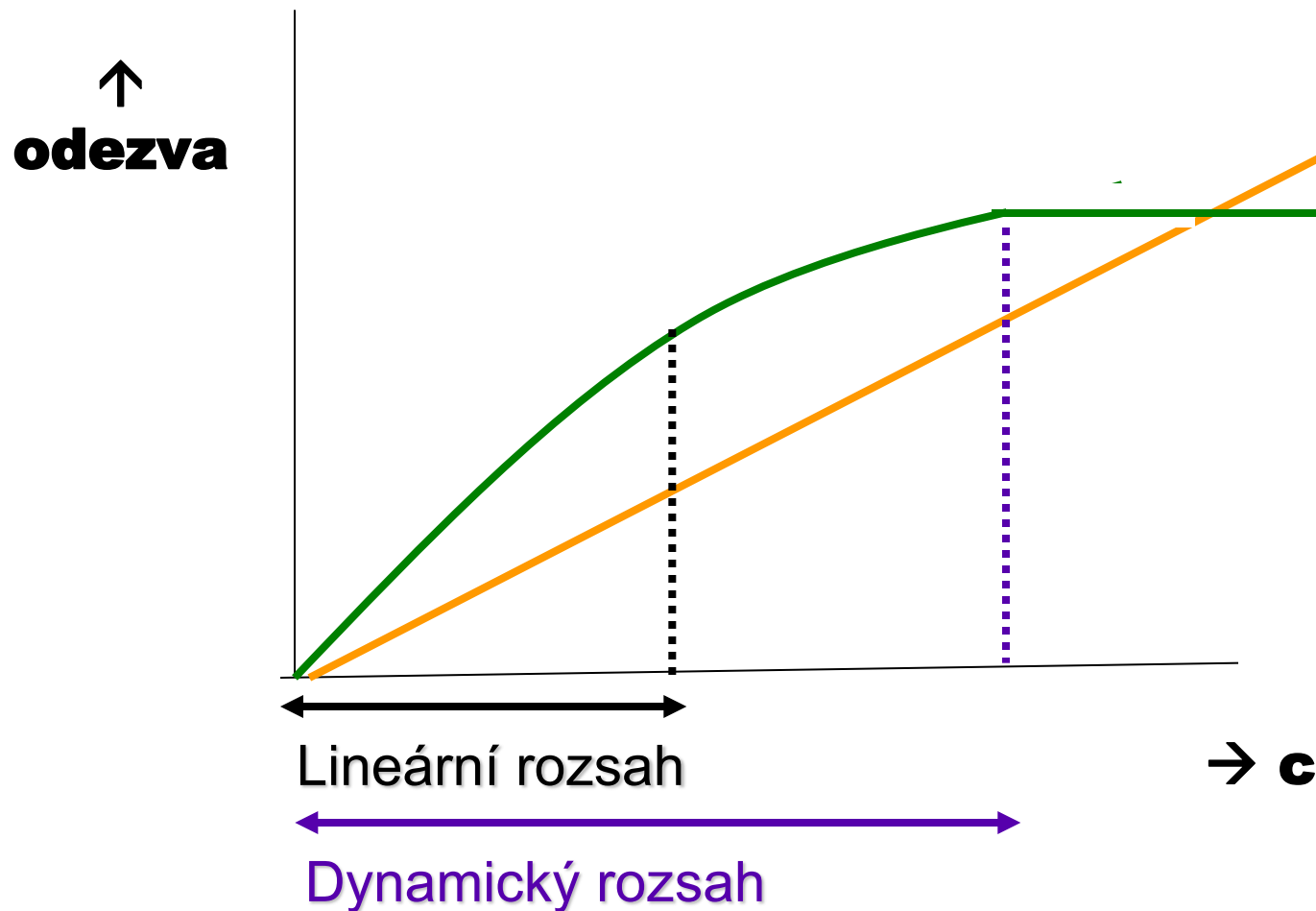
*Příklad:*

GC stanovení reziduí  
pesticidů v povrchové  
vodě



# 5.

## LINEARITA

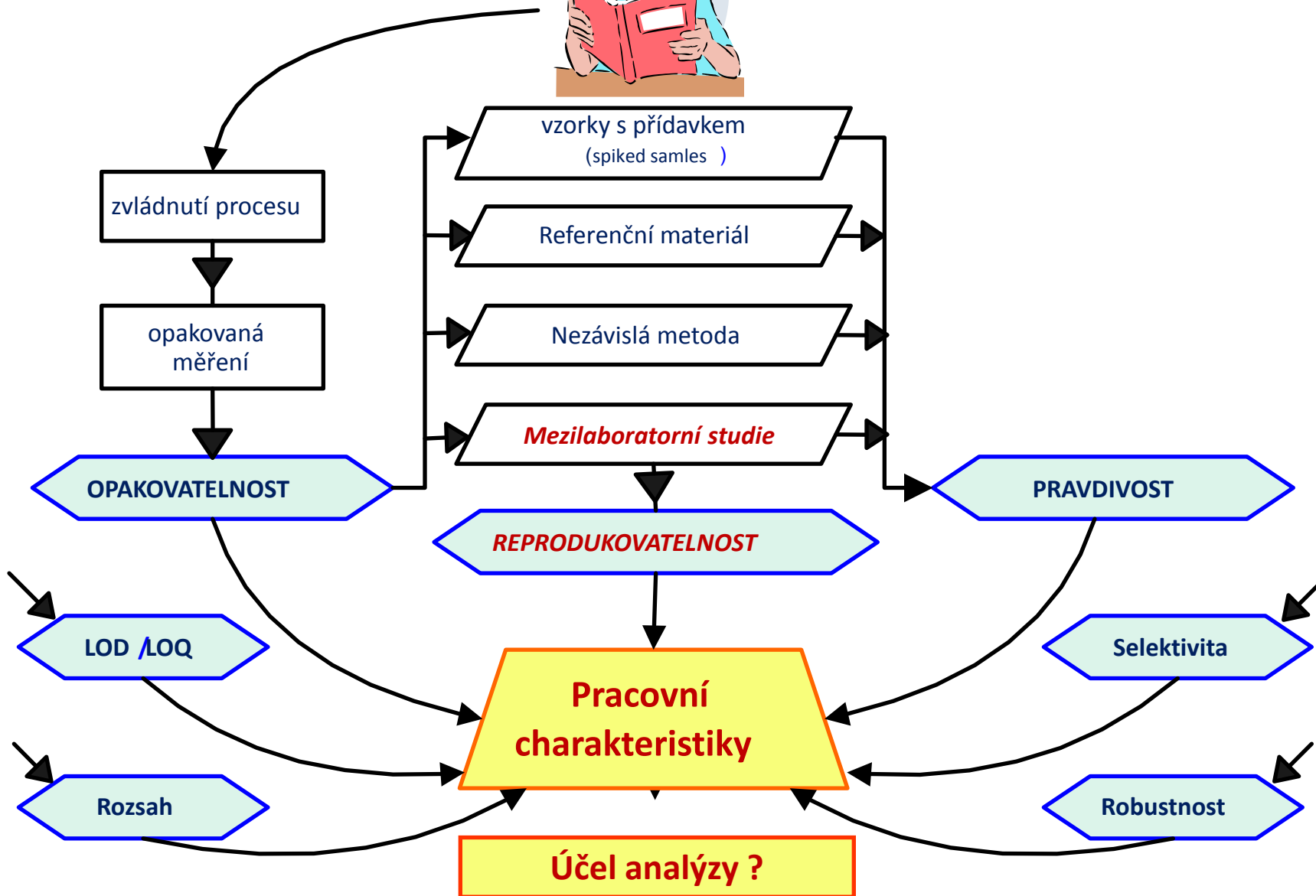




# POSTUP VALIDACE



Vývoj a optimalizace metody



## ~~? Citlivost ?~~

### **Mez detekce (Limit Of Detection):**

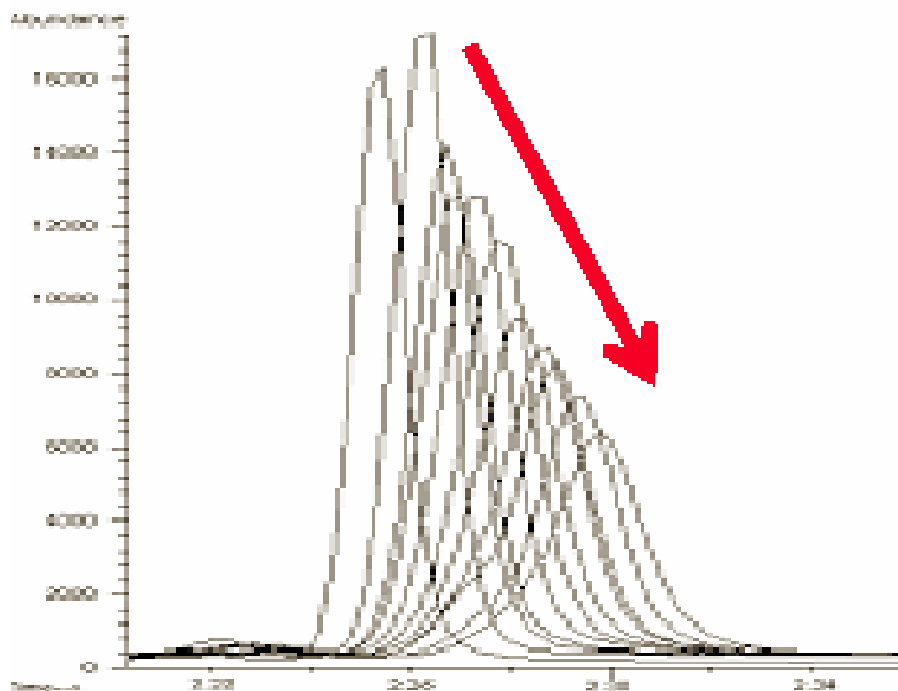
nejmenší koncentrace analytu, která ještě vyvolá odezvu měřicího systému rozpoznatelnou (s přijatelnou statistickou jistotou) od ostatních vlivů.

### **Mez stanovitelnosti (Limit Of Quantitation):**

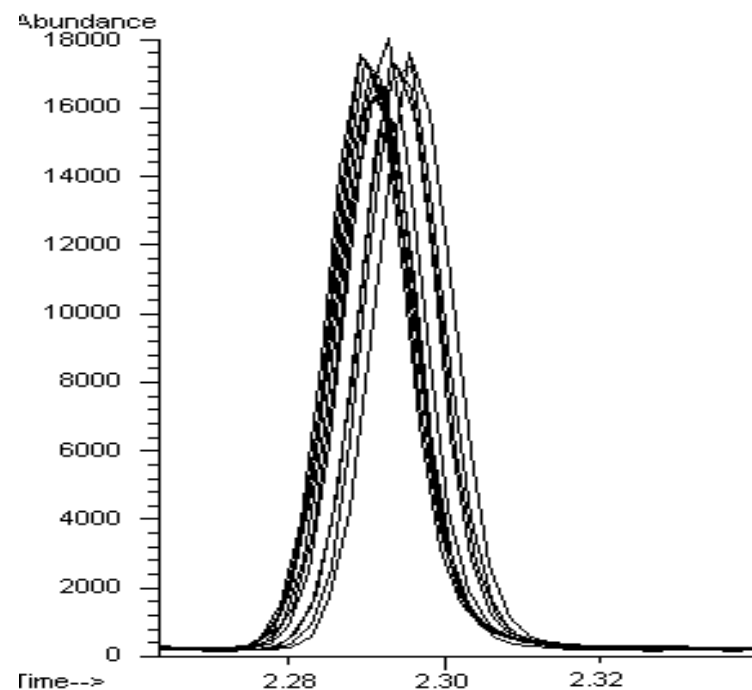
nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit a pro kterou byla metoda validována (*odpovídá zpravidla nejnižšímu bodu kalibrační křivky*).

LOD a LOQ se doporučuje vyjadřovat jako koncentraci analytu [v původním vzorku](#), zejména pokud na daných koncentračních hladinách existují [rušivé vlivy matrice](#).

# Matriční vlivy: např. pokles a deformace signálu

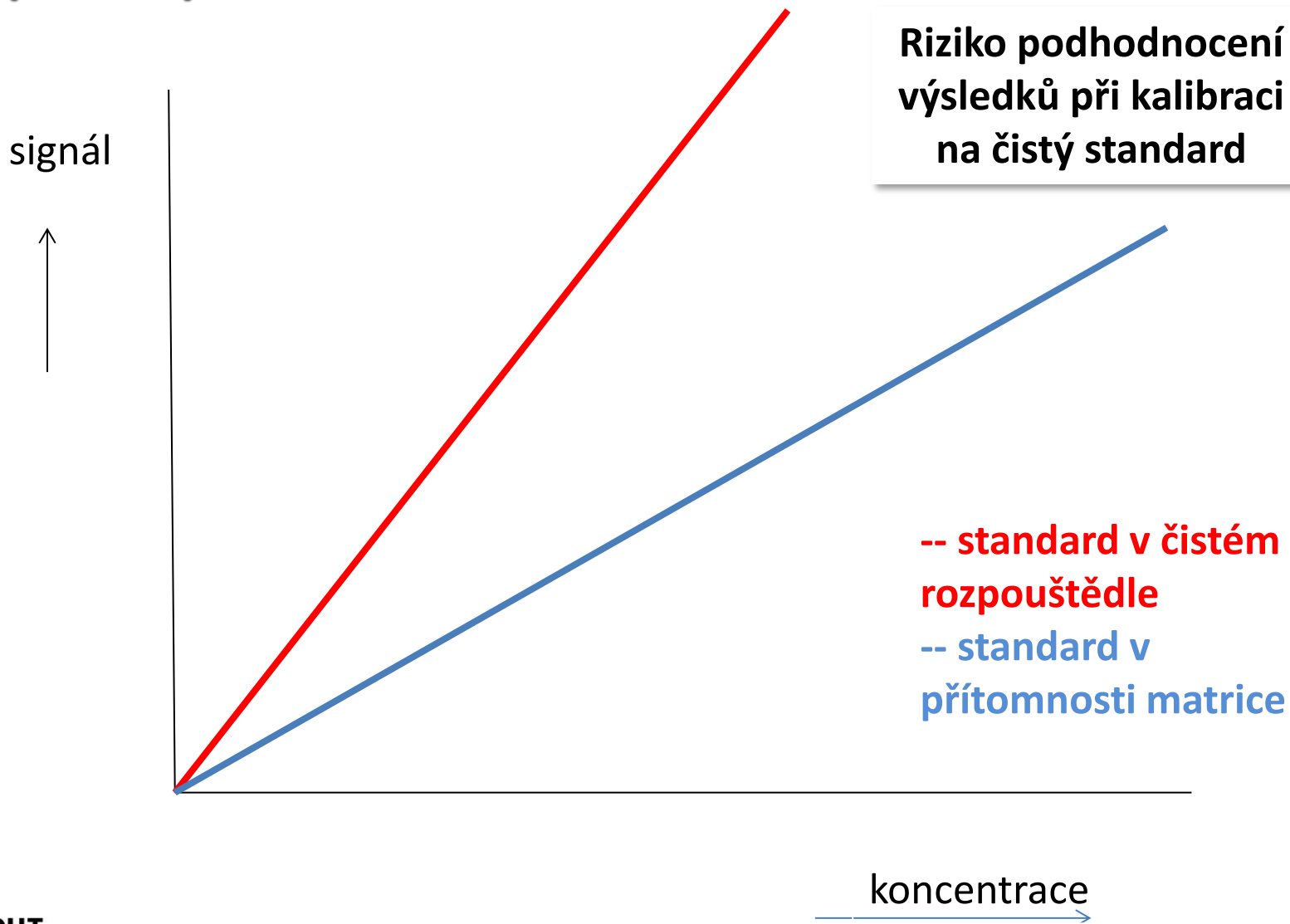


Vysoký obsah matrice  
(kontaminace GC systému)

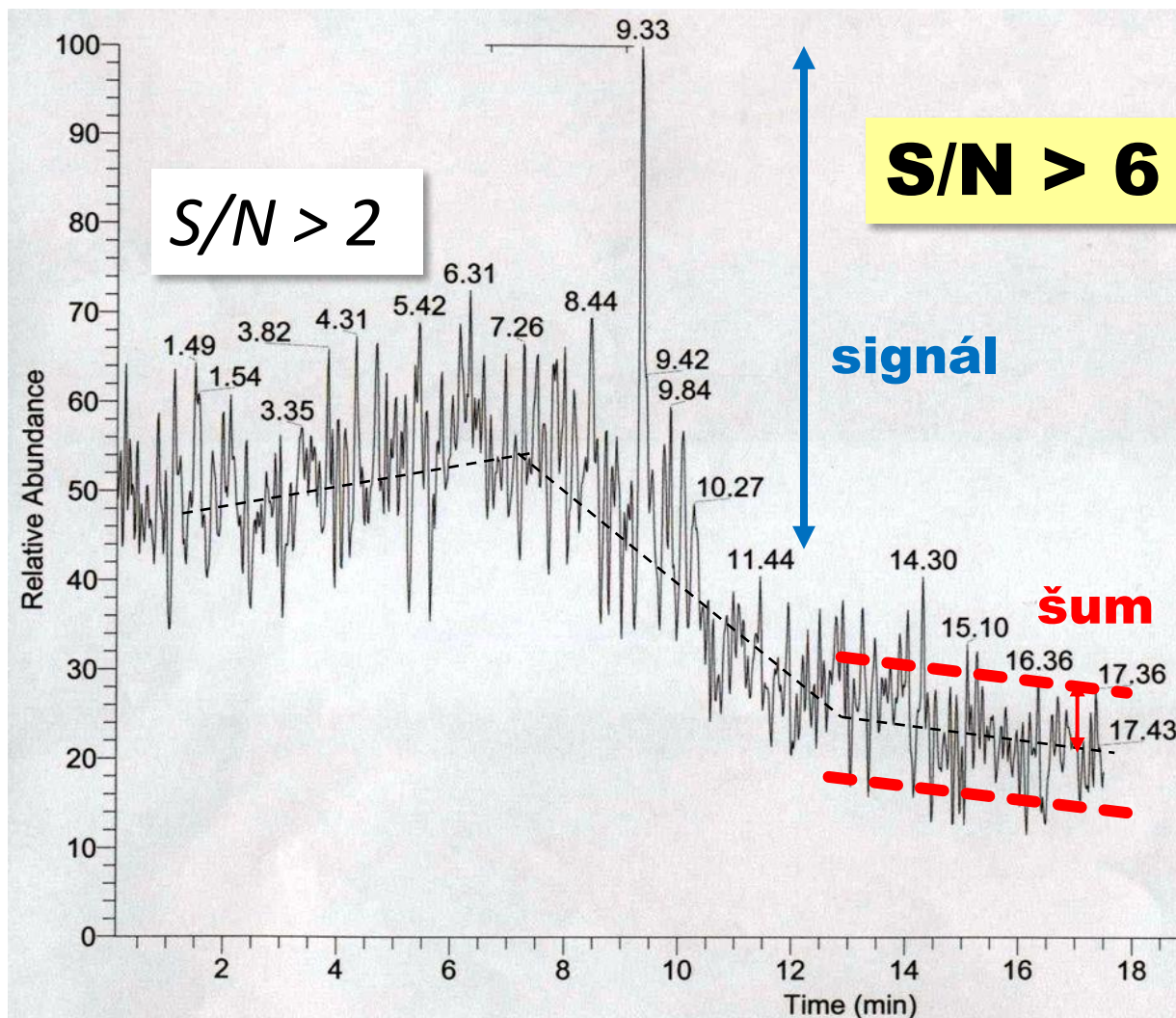


Nízký obsah matrice

# Matriční efekty – příklad vlivu na kalibrační graf (LC-MS)



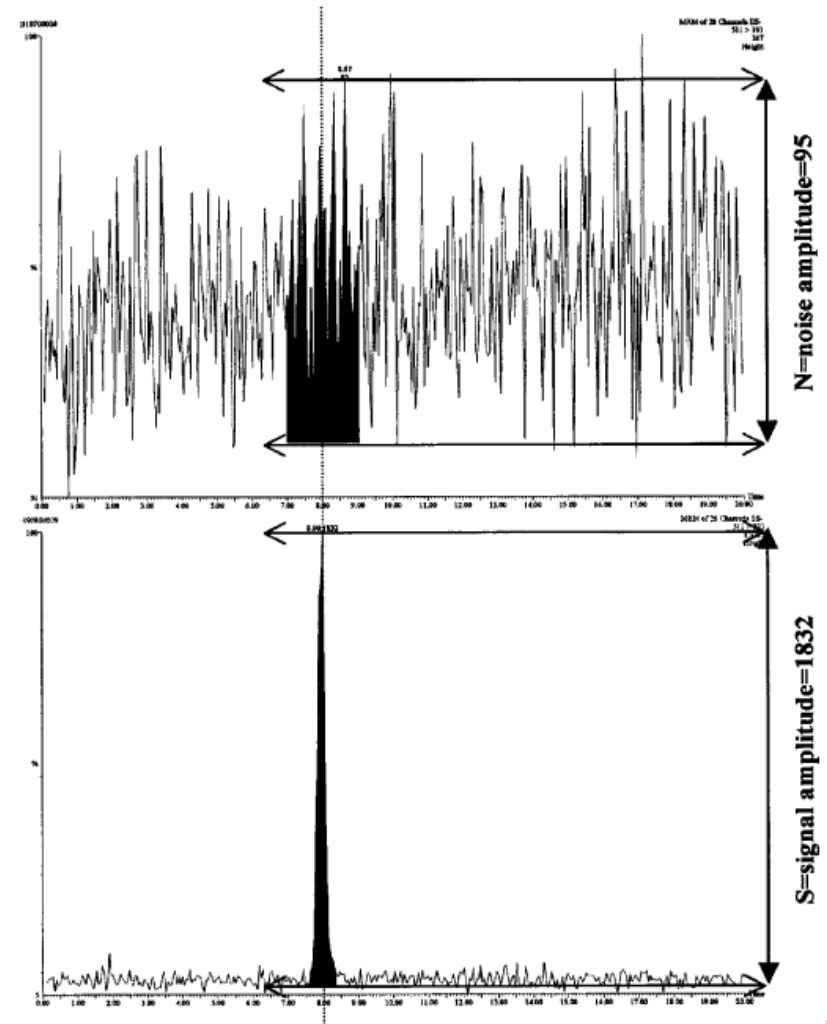
# Mez detekce: odlišení signálu od šumu?



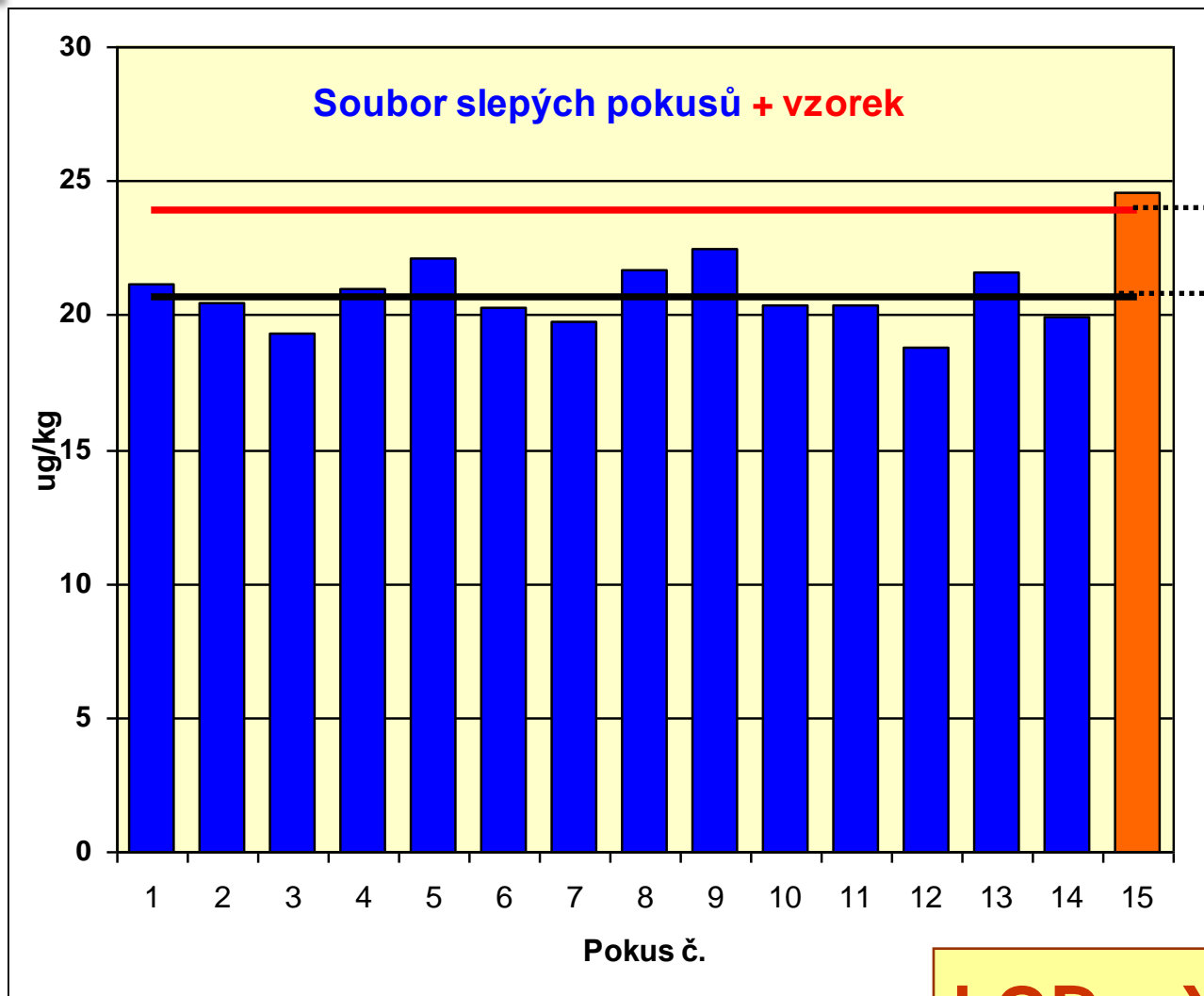
**Limit detekce (LOD)** – kdy lze prohlásit, že látka je přítomna  
**Limit kvantifikace (LOQ)** – kdy lze obsah látky dobře změřit

**LOD** je koncentrace, kdy látka vyvolá odezvu (S) měřicího přístroje větší než je trojnásobek úrovně šumu (N) pozadí  
 $S/N = 3$

**LOQ** je koncentrace, kdy látka vyvolá odezvu měřicího přístroje větší než je desetinásobek úrovně šumu pozadí  
 $S/N = 10$



# Mez detekce: odlišení signálu od slepých pokusů



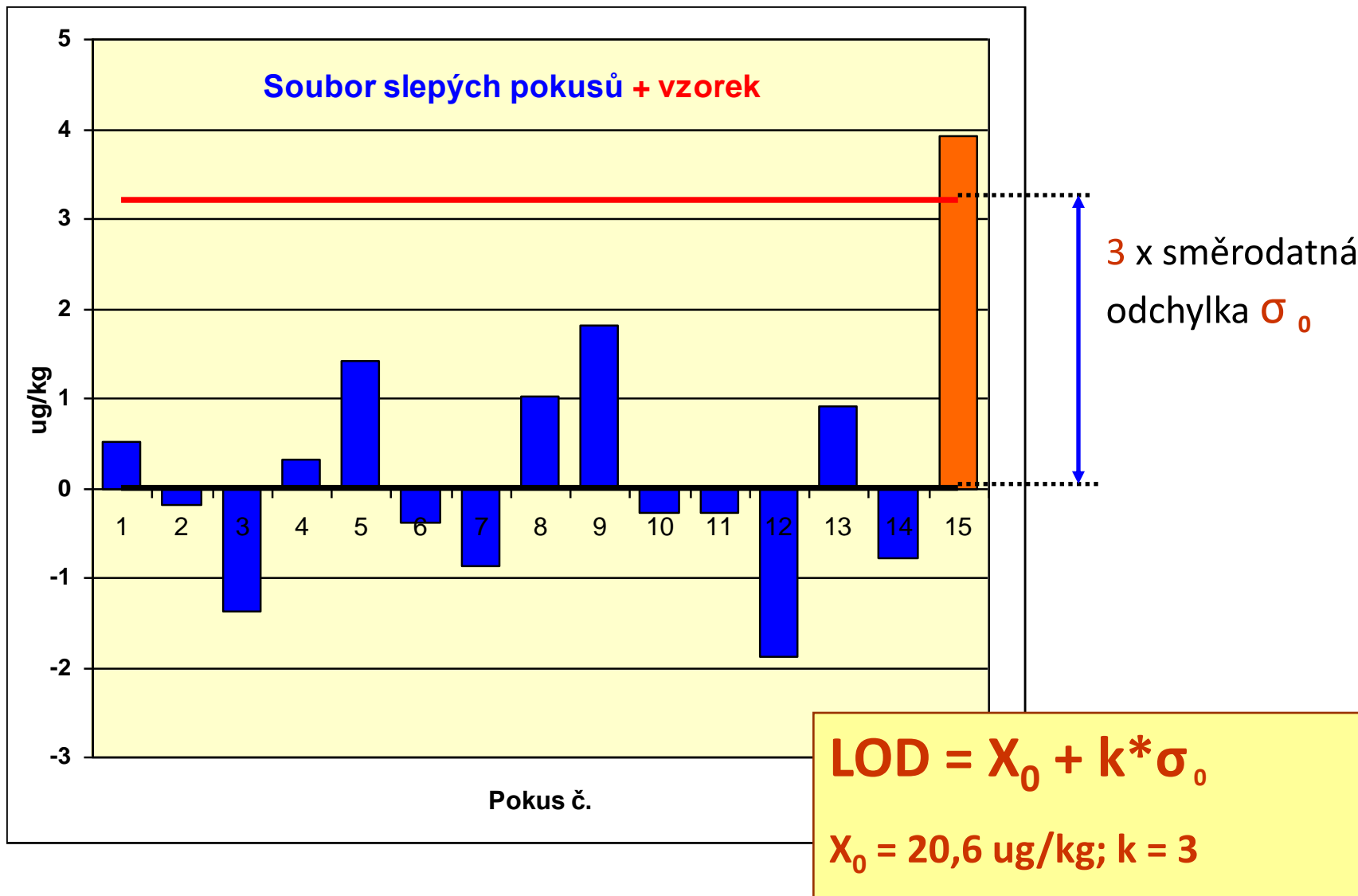
**LOD**

3 x směrodatná  
odchylka  $\sigma_0$

průměr  
slepých  
pokusů  $X_0$

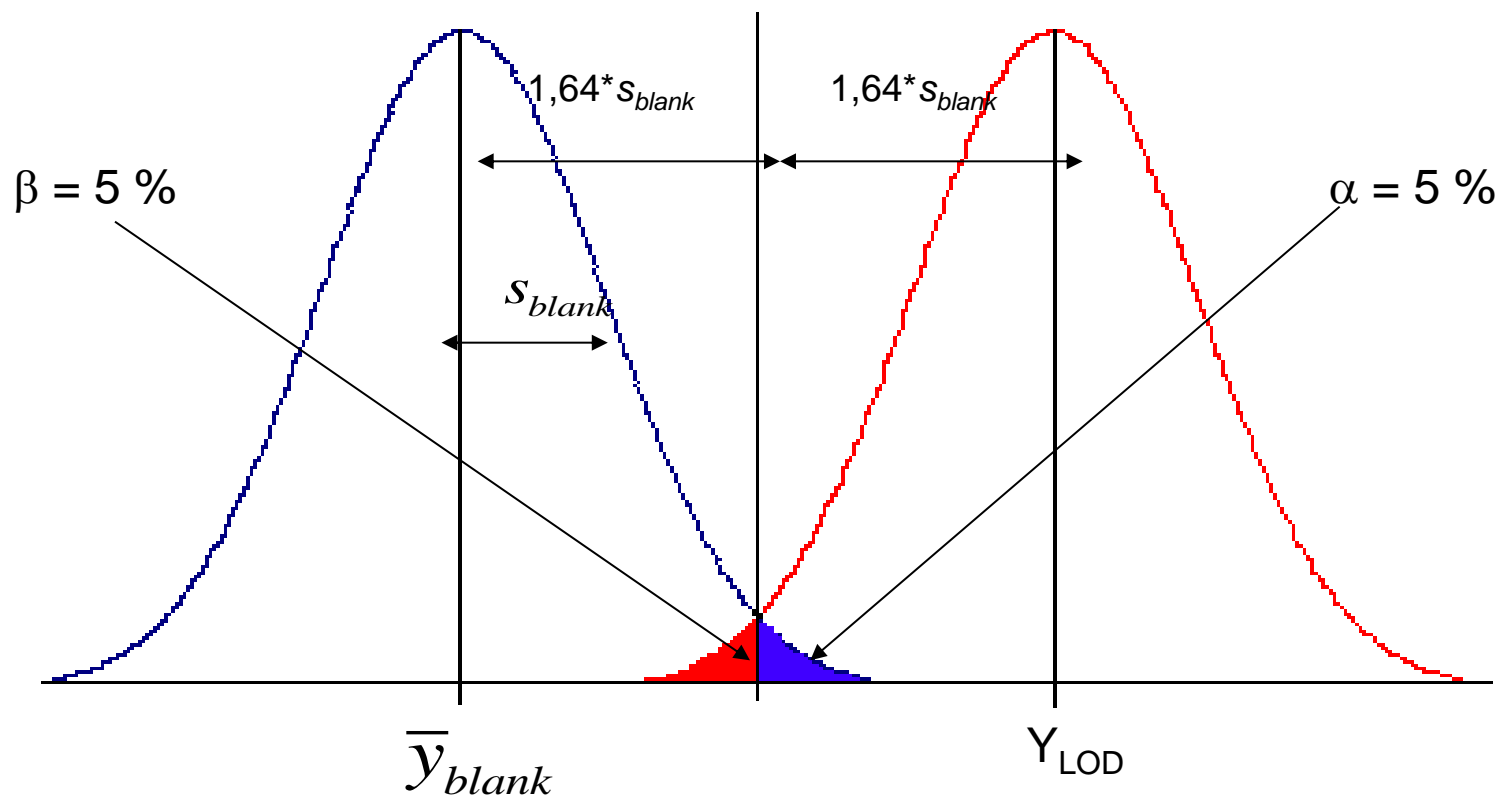
$$\text{LOD} = X_0 + k^* \sigma_0$$

# Mez detekce: odlišení signálu po korekci pozadí





# Vztah mezi LOD a slepými pokusy (blank)



Odezva blanku

Signál analytu



# ROZHODNUTÍ KOMISE 2002/657/EC o provádění analytických metod a interpretaci výsledků.

## CC $\beta$

**Detekční schopností CC $\beta$**  se rozumí nejmenší množství látky, které může být s chybou  $\beta$  ve vzorku detekováno a/nebo identifikováno.

*V případě látek, pro něž není stanovena nejvyšší přípustná hodnota, je to nejnižší koncentrace, kdy lze identifikovat skutečně kontaminované vzorky se spolehlivostí  $1 - \beta$ .*

*V případě látek, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota, se detekční schopností rozumí koncentrace, při jejímž dosažení lze metodou detekovat nejvyšší přípustné koncentrace s pravděpodobností  $1 - \beta$ .*

## CC $\alpha$

**Rozhodovací mezí CC $\alpha$**  se rozumí mez, při jejímž dosažení a překročení lze konstatovat, že vzorek s pravděpodobností  $\alpha$  nesplňuje požadavky.

# Zásady pro validační studii

*Pure Appl. Chem.*, Vol. 74, No. 5, pp. 835–855, 2002.

© 2002 IUPAC

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY

ANALYTICAL, APPLIED, CLINICAL, INORGANIC, AND  
PHYSICAL CHEMISTRY DIVISIONS

INTERDIVISIONAL WORKING PARTY FOR HARMONIZATION OF  
QUALITY ASSURANCE SCHEMES FOR ANALYTICAL LABORATORIES\*

## HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLE- LABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS

**(IUPAC Technical Report)**

*Prepared for publication by*

MICHAEL THOMPSON<sup>1</sup>, STEPHEN L. R. ELLISON<sup>2</sup>, AND ROGER WOOD<sup>3,‡</sup>

# Parametry pro stopovou analýzu - biotické matrice

## COMMISSION DECISION

of 14 August 2002

implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results

*(notified under document number C(2002) 3044)*

*(Text with EEA relevance)*

**2002/657/EC**

Kompletní návod pro validaci metod a kriteria jejich vhodnosti pro úřední kontrolu

# KLASIFIKACE ANALYTICKÝCH METOD

## (charakteristiky, které musí být verifikovány)

COMMISSION DECISION 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.

Typ metody		CC $\beta$ [k.LOD]	CC $\alpha$ [DL]	Pravdivost	Opakovatelnost	Selektiv./ specific.	Použit./ robust.
KVALITATIVNÍ	S	+	-	-	-	+	+
	K	+	+	-	-	+	+
KVANTITATIVNÍ	S	+	-	-	+	+	+
	K	+	+	+	+	+	+

pro všechny oblasti stopové analýzy se spíše uvažuje LOD a DL

S – screeningová; K - konfirmační

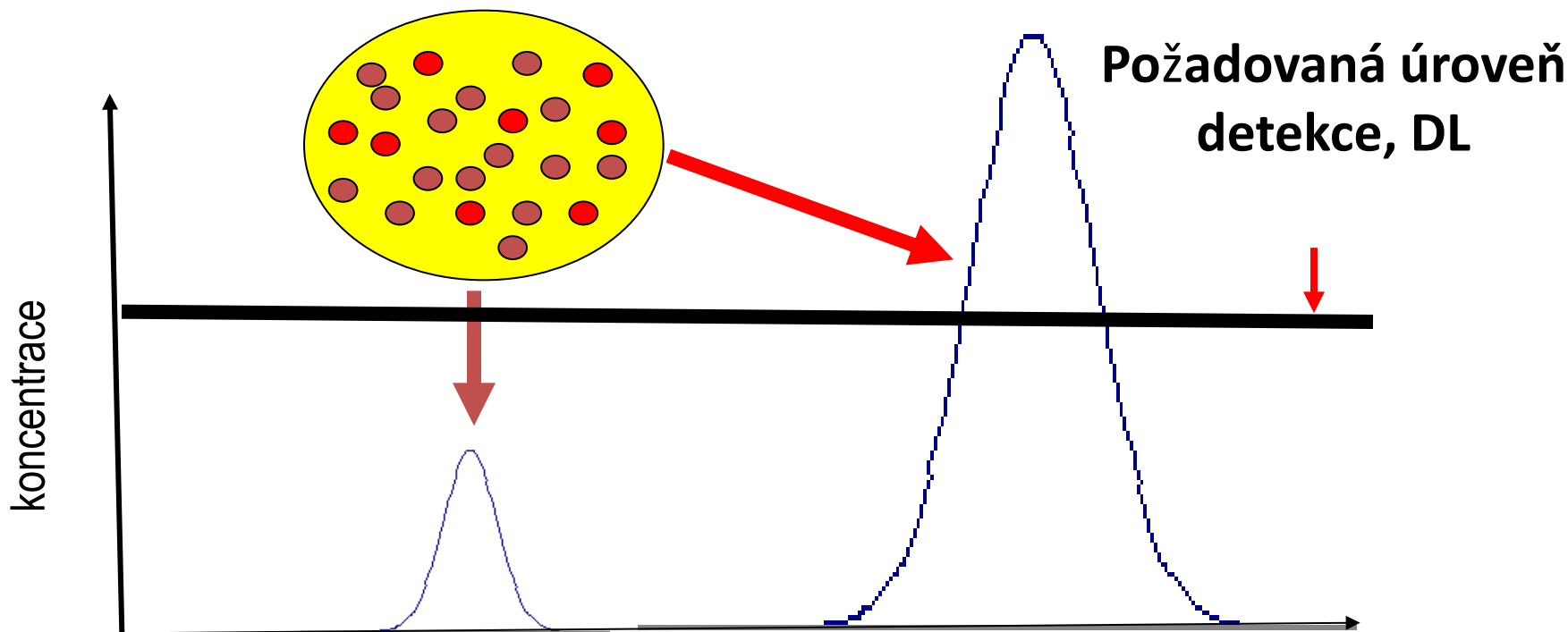
+ - stanovení je závazné



# SCREENINGOVÉ METODY - nutno validovat

požadavek: *falešně negativní výsledky < 5%*

(chyba 2. řádu -  $\beta$ ) na rozhodovací koncentrační hladině

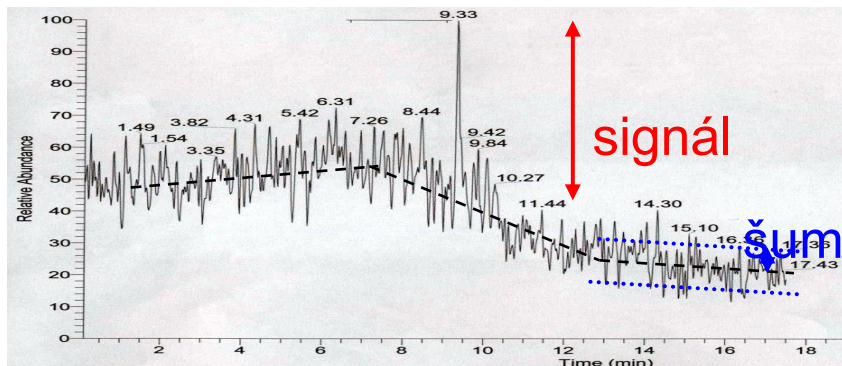


**NEGATIVNÍ vzorky**  
→ STOP

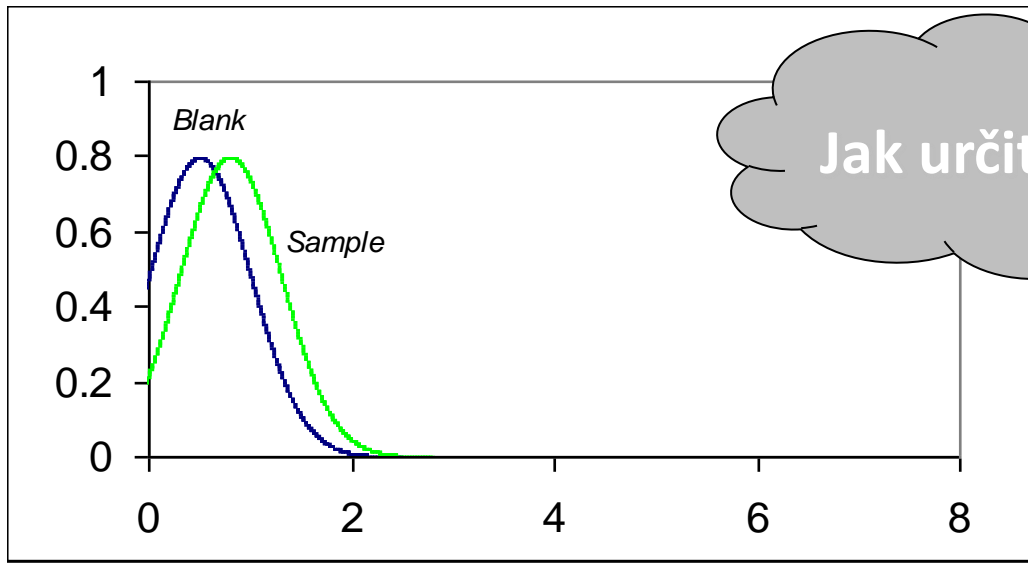


**POSITIVNÍ vzorky**  
→ KONFIRMACE

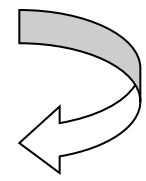
# Mez detekce: kvalita rozhodnutí ?



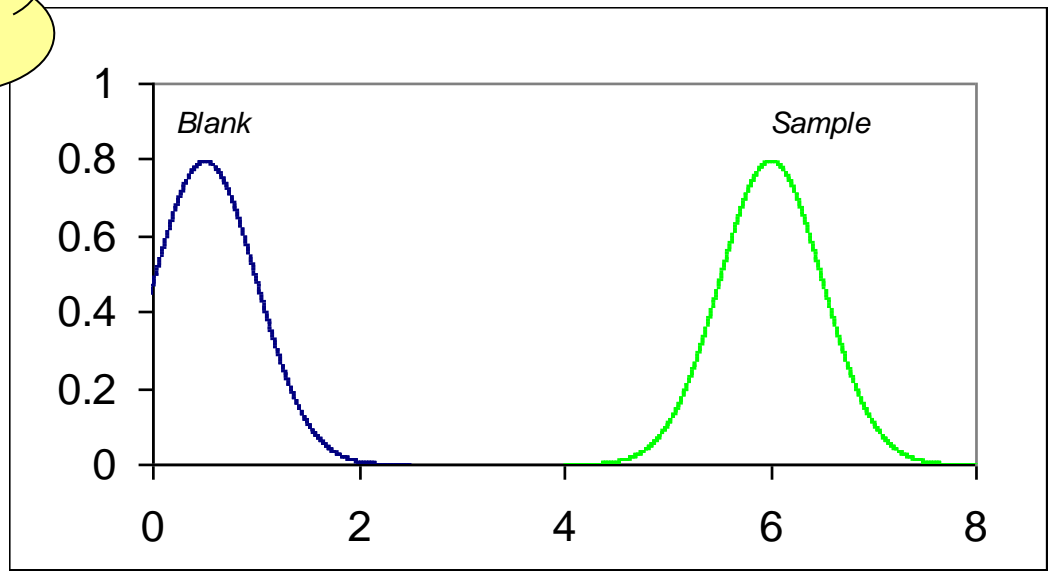
		Skutečnost	
		nepřítomen	přítomen
Rozhodnutí (hypotéza)	nedetekován	Správné rozhodnutí	<b>Falešně Negativní (chyba II. druhu)</b>
	detekován	<b>Falešně Pozitivní (chyba I. druhu)</b>	Správné rozhodnutí



Jak určit LOD?

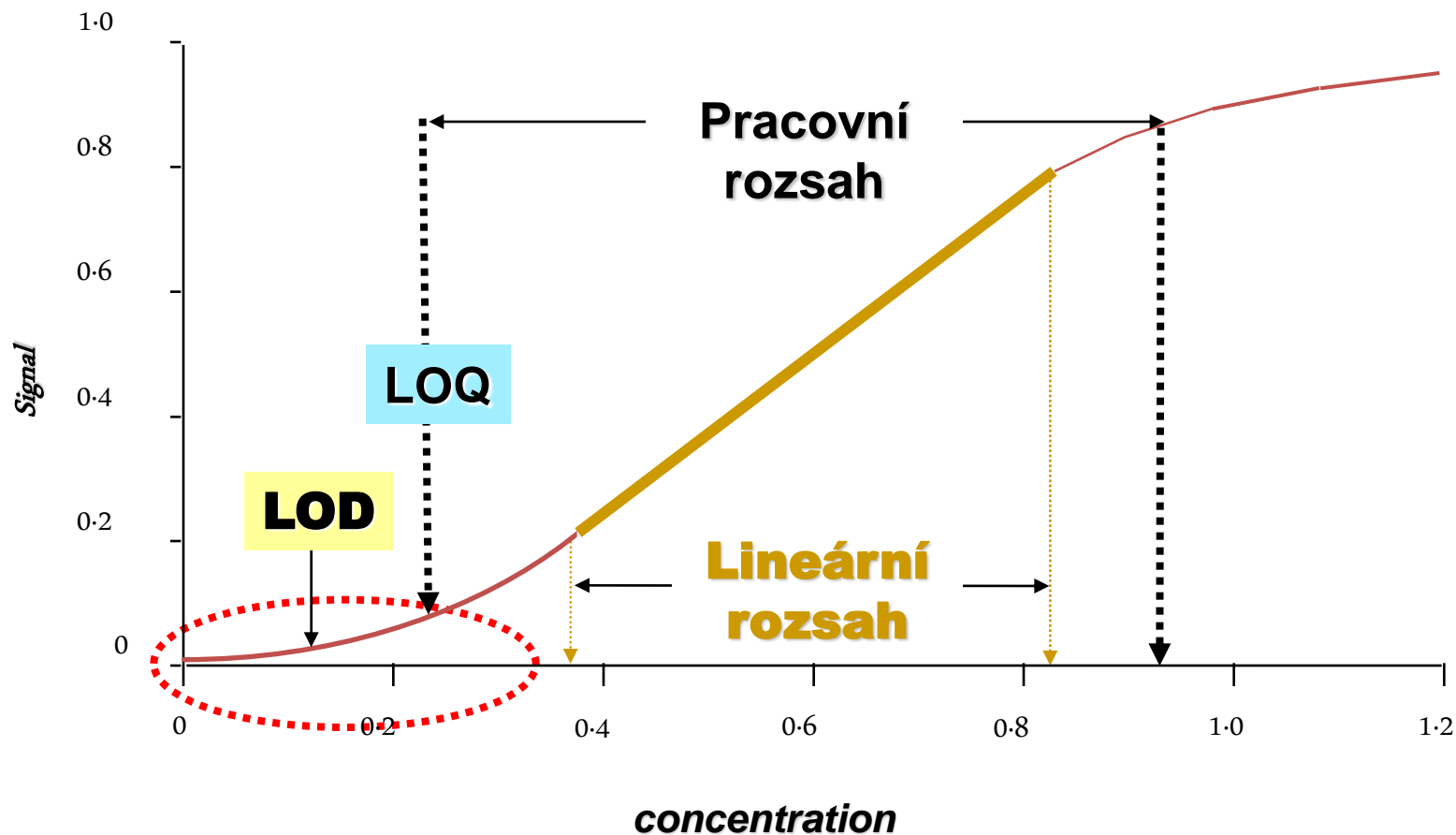


Toto není problém!

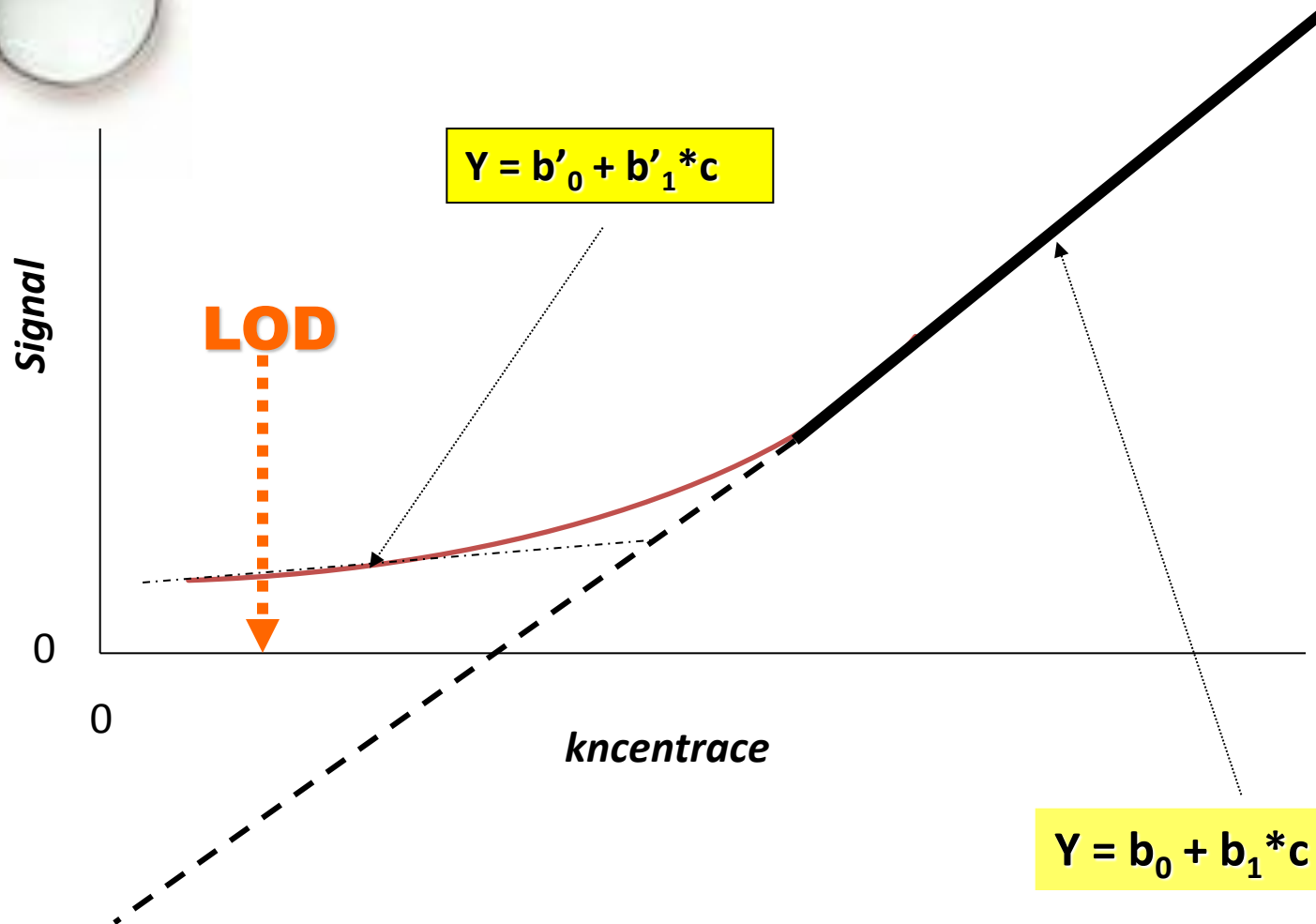




# Stopová analýza: signál vs koncentrace



# Stopová analýza: signál vs koncentrace



# „Dobrý analytický výsledek“

## Vhodný pro daný účel:

- ◆ Umožňuje provést rozhodnutí
- ◆ Presentovaný ve srozumitelné formě
- ◆ Konsistentní a úplný
- ◆ *Dodaný včas*
- ◆ *...a za přiměřenou cenu*

- ◆ Přesný (pravdivý a precizní)
- ◆ Postihující i malé množství sledované látky
- ◆ S prokazatelnou vazbou k referencím



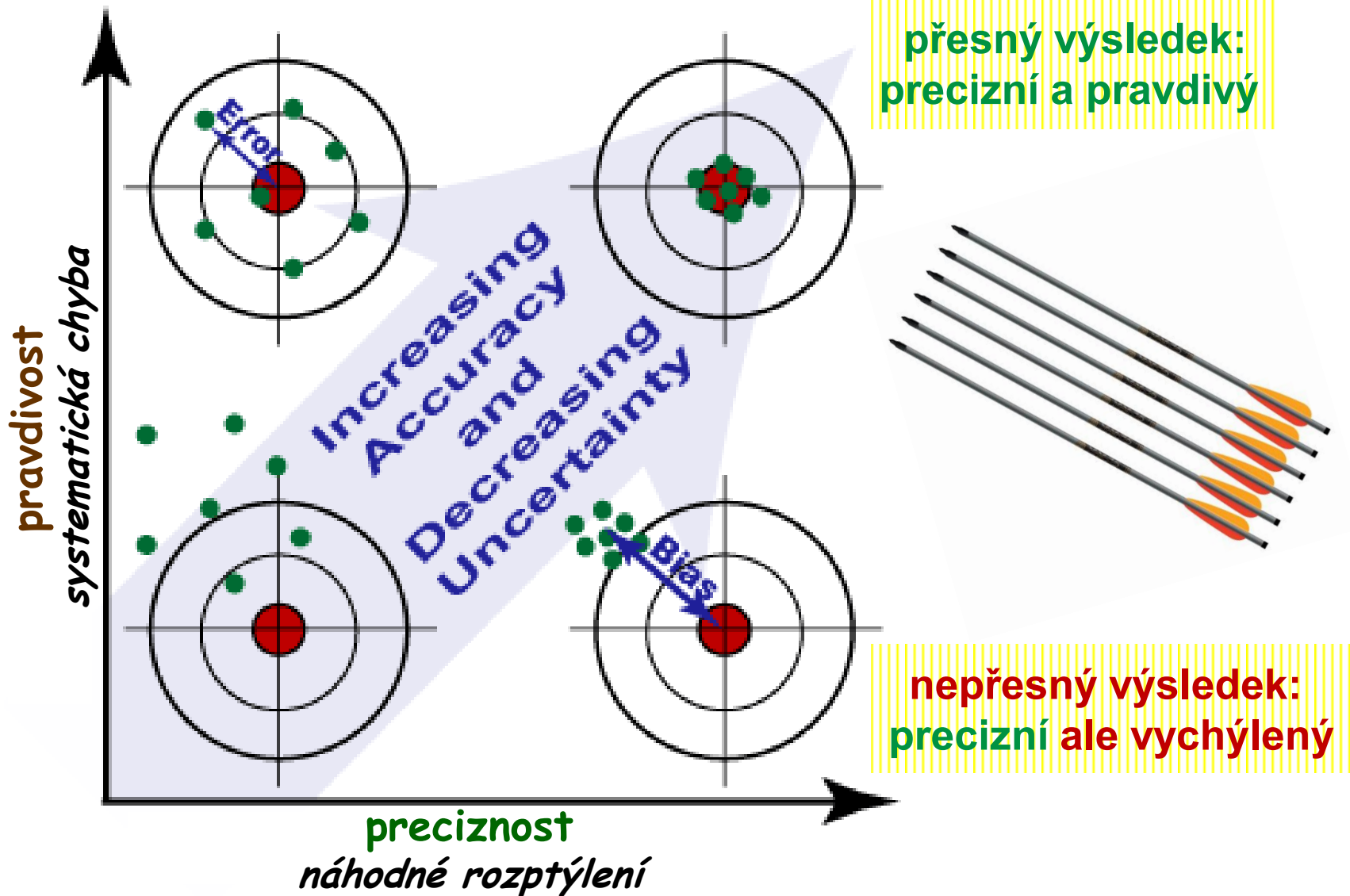
# Analytický interval spolehlivosti

- ◆ každé měření je spojeno s chybami
- ◆ každá střední hodnota by proto měla být doplněna údajem o nejistotě jejího odhadu [např.  $X \pm x \text{ g/l}$ ]
- ◆ Při prokazování, že vzorek je ve shodě se specifikacemi je nutné vzít do úvahy interval spolehlivosti (nejistotu) hodnoty výsledku

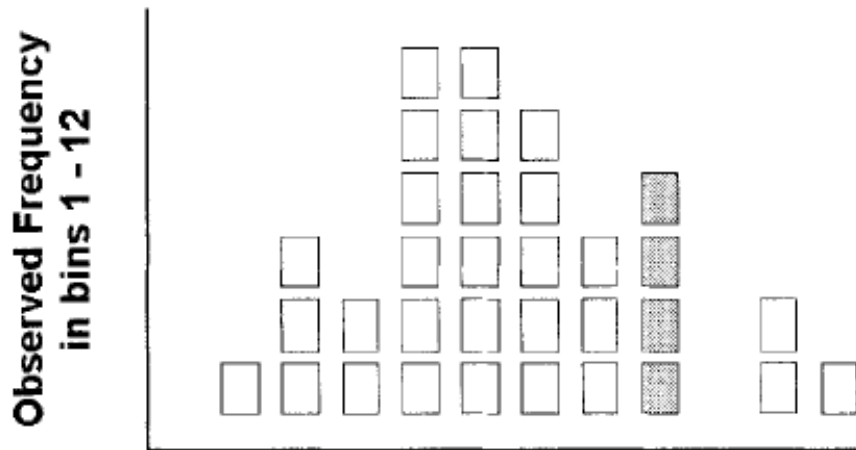
## ***Příklad:***

- *analýza (metoda) poskytla hodnotu výsledku  $\pm 1,5\%$*
- *je požadován obsah analytu ve vzorku min. 97%*
- *aby byla jistota, že obsah analytu je  $>97\%$ , musí být výsledek analýzy nejméně 98,5 %*

# Přesnost výsledků měření / zkoušek



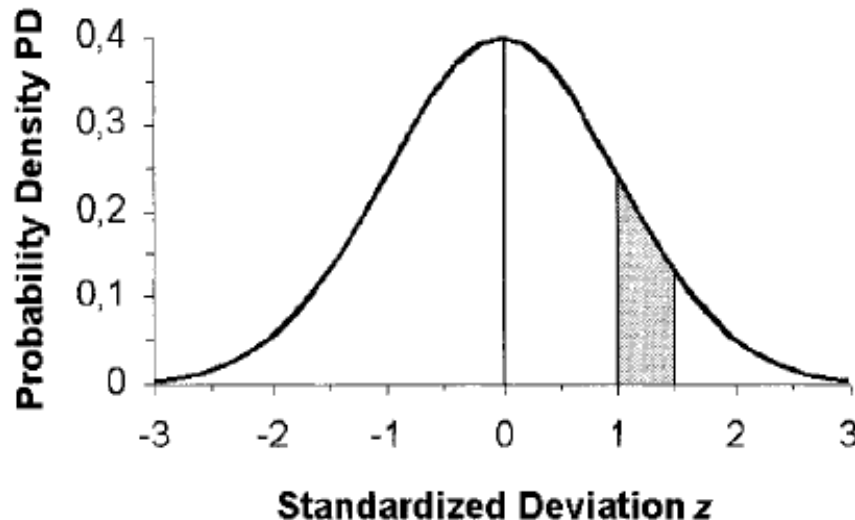
# Distribuce naměřených hodnot veličiny



Histogram



Probability Distribution Function (Gauss)



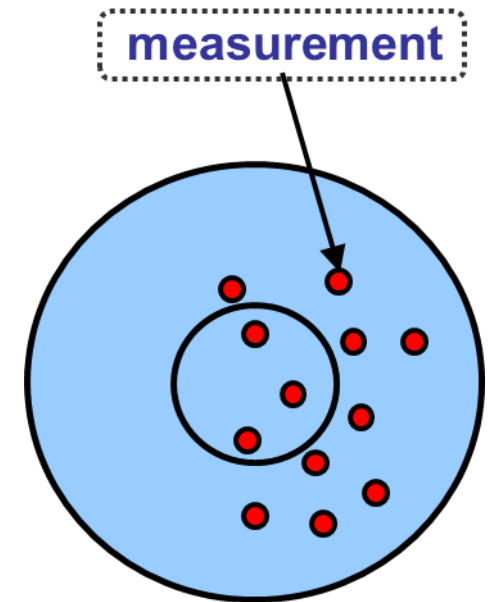
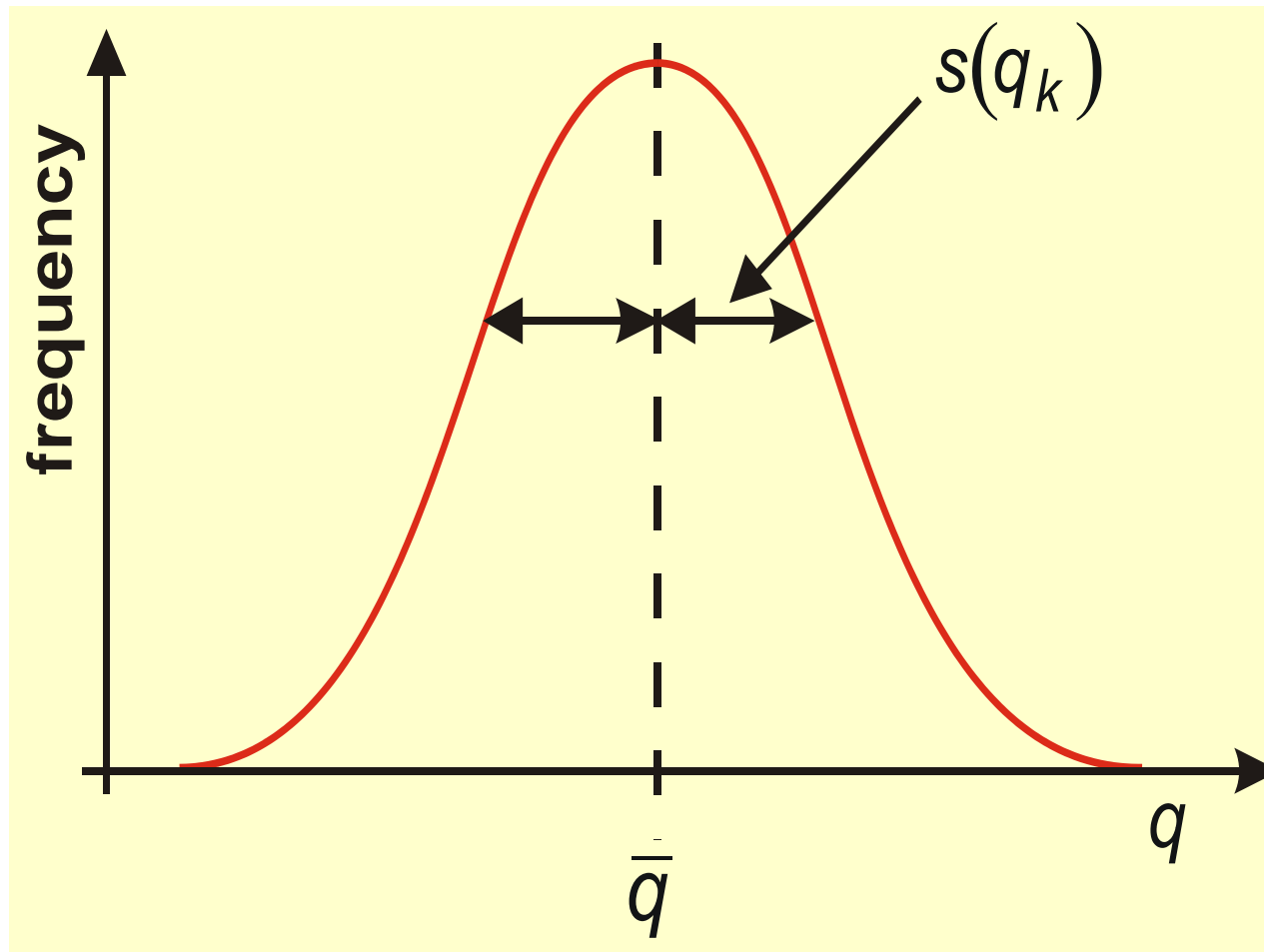
$$PD = \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp\left(\frac{-1}{2} \cdot \left(\frac{x - \mu}{\sigma}\right)^2\right)$$

1. There is a strong tendency for the variable to take a central value;
2. Positive and negative deviations from this central value are equally likely;
3. The frequency of deviations falls off rapidly as the deviations become larger.

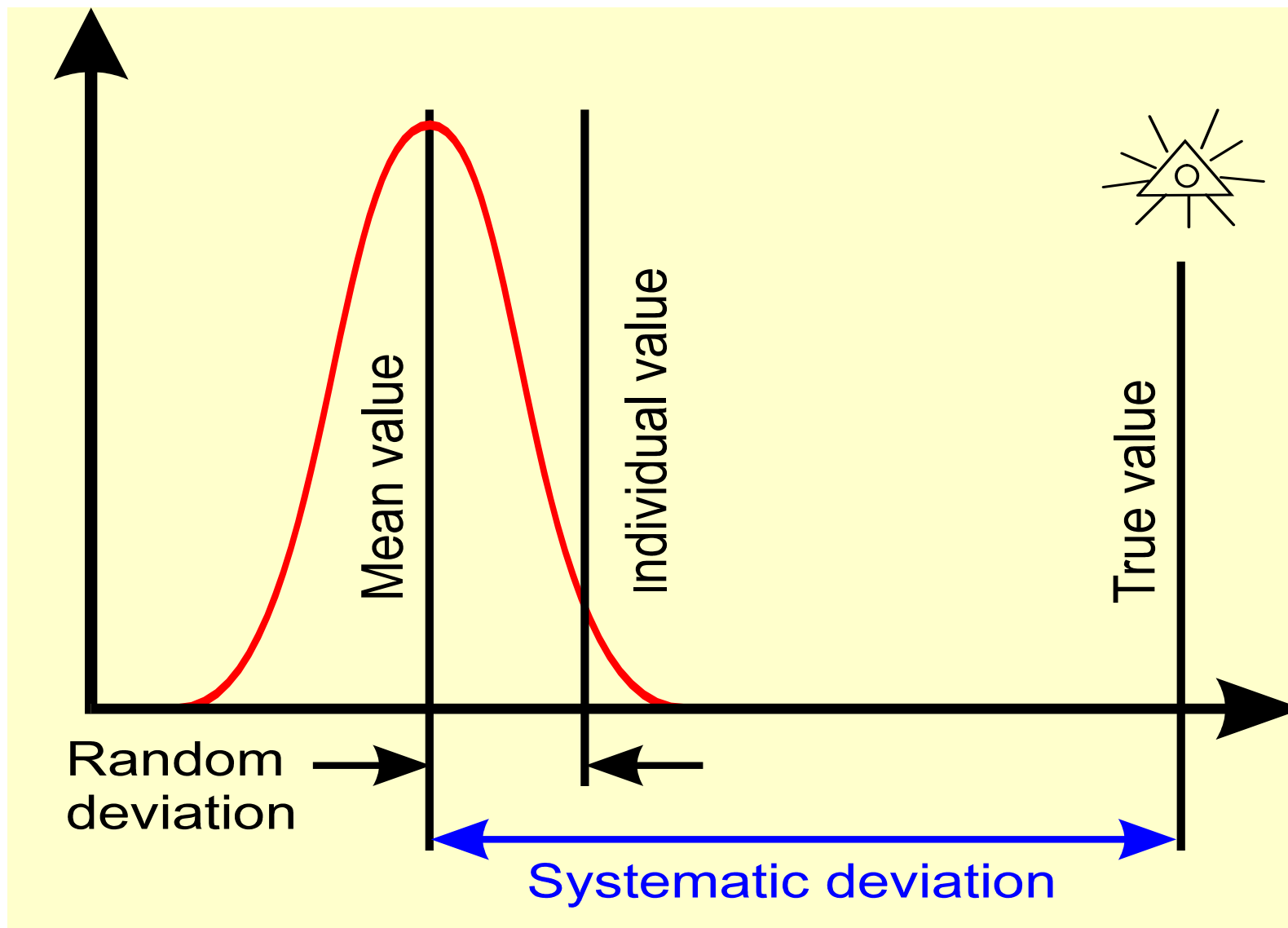


# Pravděpodobnostní rozdělení náhodných chyb – tzv. „normální“ – „Gaussovo“

Charakterizováno střední hodnotou a směrodatnou odchylkou náhodného výběru

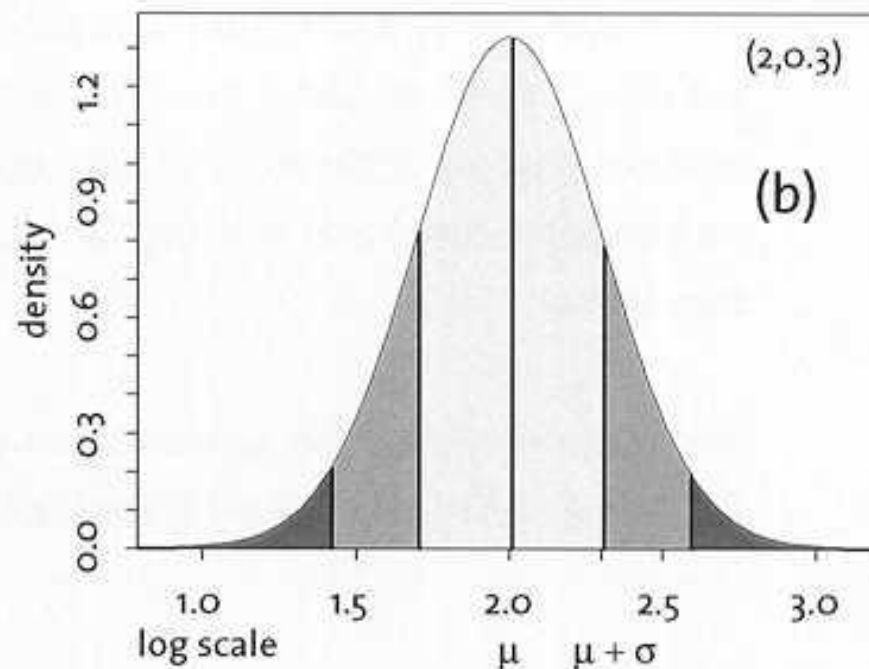
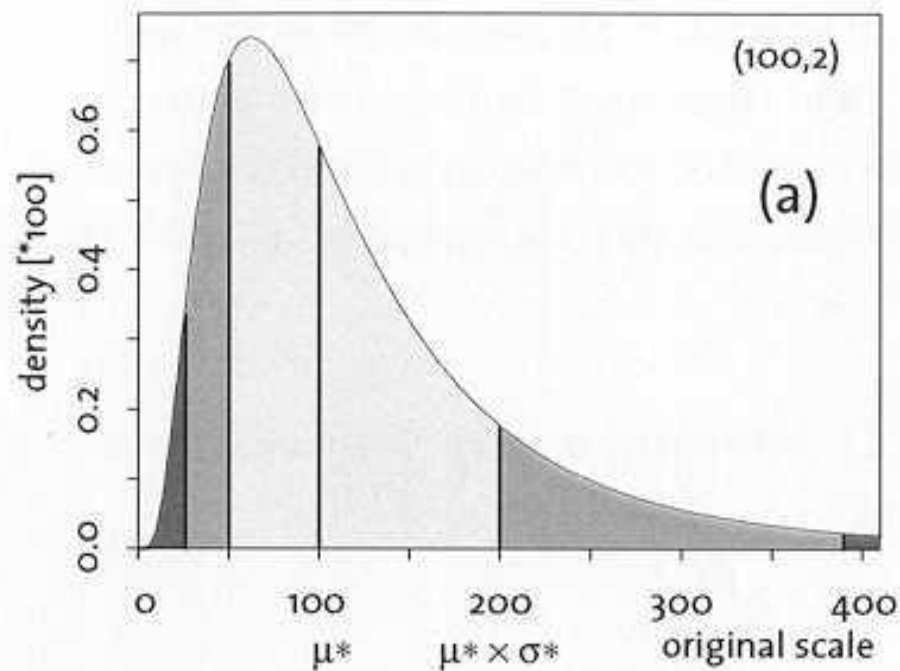


# Systematic errors of measurement





# Zešikmená data: život bývá **log-normální**



Toxiny distribuované v prostředí,  
Citlivost jedinců v populaci vůči působení chemické látky,  
Výsledky opakované analýzy těsně nad LOQ,  
*Počty zaměstnanců podle výše platu*

# Výběrové charakteristiky

---

Výběrový průměr:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Odhad směrodatné odchylky:

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

**Medián:**

hodnota, která dělí řadu podle velikosti seřazených výsledků na dvě stejně početné poloviny.

Výhodou mediánu jako statistického ukazatele je fakt, že není tolik ovlivněn extrémními (nebo odlehlými) hodnotami.

**Modus:**

hodnota, která se v daném statistickém souboru vyskytuje nejčastěji.

Modus lze použít i na kvalitativní výsledky: např. modus ze souboru „žlutá, zelená, červená, modrá, žlutá, zelená, červená, fialová, zelená, hnědá“ je:.....



# Intervalové odhady s definovanou pravděpodobností

**Interval spolehlivosti:**

$$L_{2,l} = \bar{x} \pm s \frac{t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$$

**Pološířka intervalu spolehlivosti:**

$$L_{/2} = s \frac{t_{\alpha}}{\sqrt{n}}$$

**Intervalový odhad průměru:**  
(n opakování, hladina spolehlivosti  $\alpha$ )

Obsah vody: 11,02 ± 0,22 %  
Interval hodnot: 10,80 až 11,24 %

$$\bar{x} - t_{1-\alpha/2}(v) \frac{s}{\sqrt{n}} \leq \mu < \bar{x} + t_{1-\alpha/2}(v) \frac{s}{\sqrt{n}}$$



# Přesnost měření / zkoušek

Co všechno obsahuje výsledek analýzy  $\underline{X}$  ?

$$X = \mu + \varepsilon + \sum \delta$$

$\mu$ ...skutečná (pravdivá) hodnota

$\varepsilon$ ...systematická chyba - *stejná velikost a znaménko*

$\delta$ ...náhodné chyby – *v součtu mění velikost a znaménko*

**Přesnost = Pravdivost ( $\varepsilon$ ) + Preciznost ( $\delta$ )**

**Accuracy = Trueness ( $\varepsilon$ ) + Precision ( $\delta$ )**

# Co je to „chyba výsledku analýzy (měření)“

## Chyba měření (measurement error):

$$(\varepsilon + \Sigma \delta) = X - \mu$$

Chyba měření je rozdíl mezi hodnotou naměřenou a hodnotou pravou ( $\mu$ ).

...zahrnuje vždy chybu systematickou ( $\varepsilon$ ) a náhodné vlivy ( $\delta$ ).

Problém: často neznáme dost dobře  $\mu$  a tedy ani chybu systematickou a tudíž ani celkovou...*zase nejistota. Nejistota ?*



# Pravdivost výsledku měření

$$\text{Systematická chyba } (\varepsilon + \Sigma \delta) = X - \bar{\mu}$$

- ◆ systematická chyba výsledku je rozdílem mezi průměrným výsledkem z velkého počtu opakování a skutečnou hodnotou (*true value*)
- ◆ někdy je nazývána vychýlení (bias)
- ◆ v analytické chemii se zjišťuje např. jako průměrná výtěžnost ( $c_x/c_0$ )

# Pravá hodnota - true value

...je hodnota charakterizující dokonale definovanou veličinu za podmínek existujících v okamžiku, kdy je uvažována...

*Je to ideální pojem - obecně nemůže být dokonale poznána !*

*pro praxi se proto nahrazuje*

**REFERENČNÍ HODNOTOU**



# Referenční hodnota

Realizuje se zpravidla prostřednictvím  
referenčního materiálu

1. střední hodnota dle definitní metody
2. teoretická hodnota (ze složení čisté látky)
3. expertní mezilaboratorní porovnání zkoušek
4. známé množství analytu přidané do matrice
5. střední hodnota základního souboru měření



# Náhodná chyba výsledku

☞ složka chyby, která se v průběhu řady zkoušek téhož znaku mění nepředvídatelným způsobem – kolísá okolo střední hodnoty

☞ *nelze ji odstranit jakoukoli korekcí !*

## Některé zdroje náhodných chyb:

- ✓ metoda
- ✓ laboratoř (prostředí)
- ✓ zařízení a materiály (nádobí, přístroje, činidla...)
- ✓ analytik
- ✓ časové rozmezí

# ■ Náhodná chyba výsledku

- vyjadřuje náhodné rozptýlení hodnot okolo střední hodnoty
- vyjadřuje se jako **PRECIZNOST (precision)** výsledků opakovaného měření za určitých podmínek
- vypočte se jako směrodatná odchylka  $\sigma_x$  z řady opakování

👉 nemá nic společného s pravou (referenční) hodnotou !

# Náhodná chyba výsledku

☺ *za různých podmínek působí různé náhodné vlivy → preciznost výsledků (precision) je různá*

**1. extrém: co nejméně odlišností při opakování:**

**OPAKOVATELNOST** (*jak se to daří opakovat mně*)

**2. extrém: co nejvíce odlišností při opakování:**

**REPRODUKOVATELNOST** (*jak se to daří zreprodukovat jinde*)

# Náhodná chyba výsledku

podmínky **OPAKOVATELNOSTI:**

⇒ stejná metoda, laboratoř, analytik, zařízení, přístroje, standardy, chemikálie, kalibrační křivka, v krátkém časovém rozmezí („paralelky“)

podmínky **REPRODUKOVATELNOSTI :**

⇒ zpravidla stejná metoda ale jiná laboratoř a tedy všechny ostatní faktory jiné.

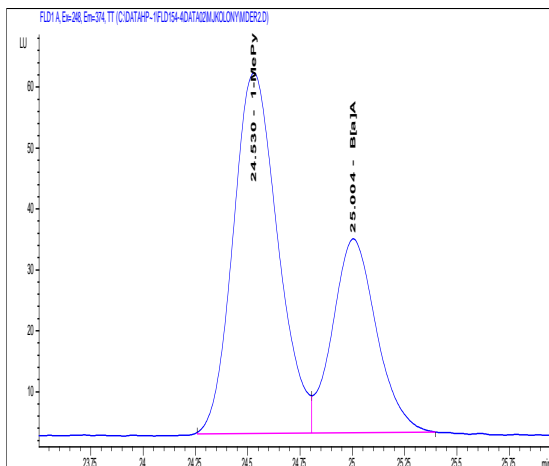
*a což takhle něco mezi ?*

podmínky **MEZILEHLÉ PRECIZNOSTI :**

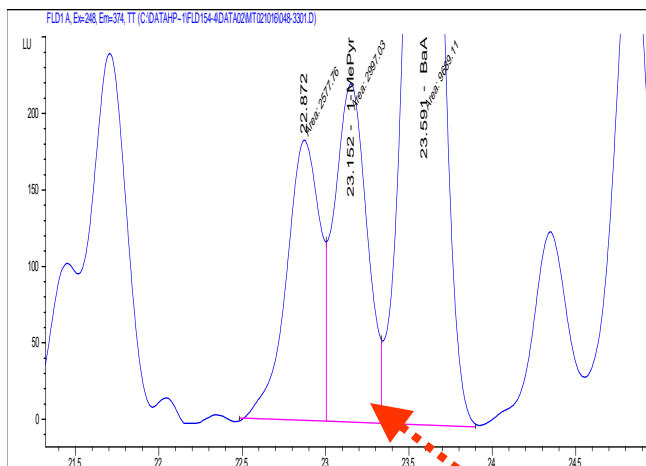
⇒ zpravidla stejná metoda i laboratoř ale v dlouhém časovém období (dlouhodobá opakovatelnost)

# Ilustrace mezidenní variability výsledků: *dva různí pracovníci*

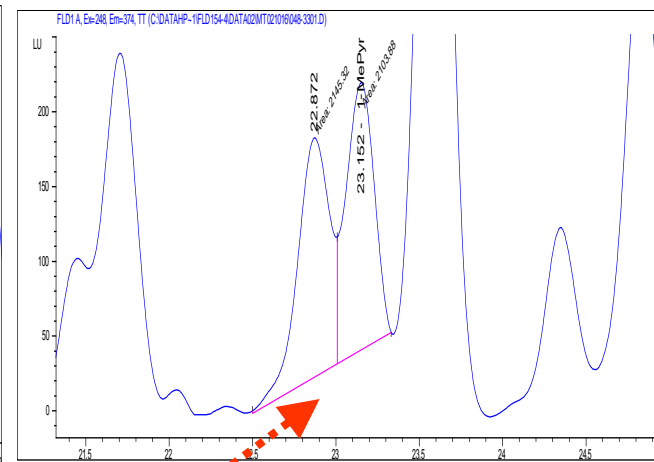
Standard



Integrace 1



Integrace 2



Rozdíl mezi výsledky  
– 42 % (koncentrační hladina ppb)

# Mez opakovatelnosti (r)

Vypočte se ze směrodatné odchylky opakování analýzy stejnou metodou na stejném vzorku (homogenním) za podmínek opakovatelnosti:

$$r = f \cdot \sqrt{2} \cdot \sigma_r$$

$$r = 2,8 \cdot s_r$$

## Použití:

Jsou-li výsledky zatíženy pouze přijatelnou náhodnou chybou ( $H_0$ ),

pak rozdíl mezi výsledky dvou opakování nesmí být větší nežli  $\underline{r}$  :

$$|x_1 - x_2| < r$$

# Opakovatelnost ( $s_r$ )

## *Postup 1:*

- ✓ provede se řada opakování ( $n = 8$  až  $15$ ) na tomtéž homogenním vzorku za podmínek opakovatelnosti,
- ✓ vypočte se směrodatná odchylka

## *Postup 2:*

- ✓ různé ale podobné vzorky se za podmínek opakovatelnosti analyzují dvojmo a vypočtou rozpětí,
- ✓ vypočte se směrodatná odchylka:

$$s_r^2 = \sum D_i^2 / (2n)$$

# Reprodukovatelnost (R)

**Význam - odpověď na otázku:**

"Ize rozdíl mezi výsledky získanými na tomtéž vzorku jinou laboratoří vysvětlit náhodným rozptýlením anebo nejsou výsledky laboratoří srovnatelné?"

$$R = 2,8 \cdot S_R$$

Použití:

Jsou-li výsledky zatíženy pouze přijatelnou chybou, pak rozdíl mezi výsledky dvou laboratoří nesmí být větší nežli R :

$$|X_1 - X_2| < R$$

*Nelze ovšem říci, který ze dvou výsledků je „pravdivější“ ...*



# Reprodukovatelnost (R)

Skládá se ze dvou složek:

$\sigma_r^2$  - rozptyl výsledků uvnitř laboratoře

$\sigma_L^2$  - rozptyl výsledků mezi laboratořemi

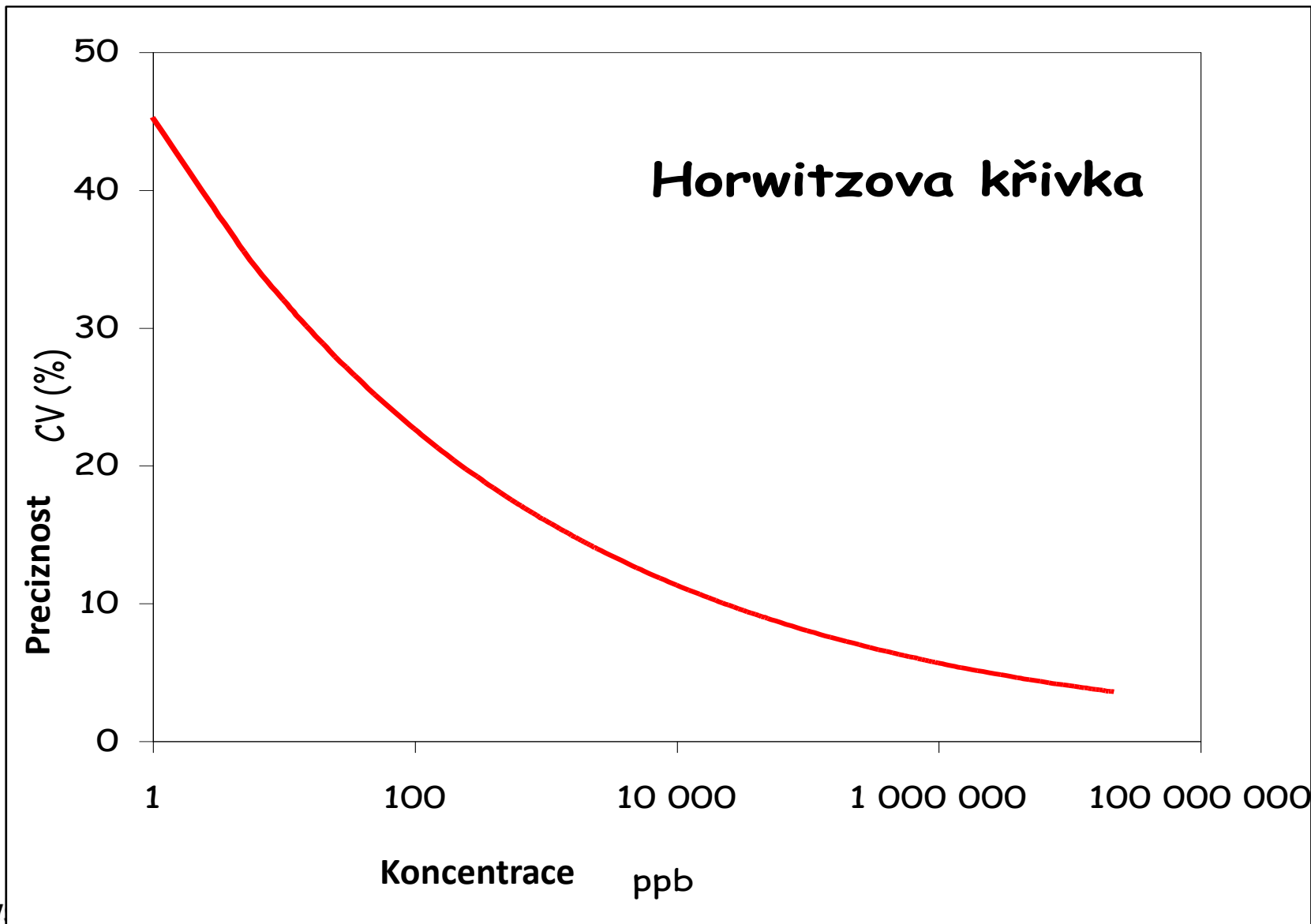
$$\sigma_R^2 = \sigma_r^2 + \sigma_L^2$$

Způsob zjištění R:

1. experimentálně na základě mezilaboratorního porovnání zkoušek (MPZ)
2. odhadem z Horwitzova/Thompsonova empirického vztahu

*„Horwitz“ ...*

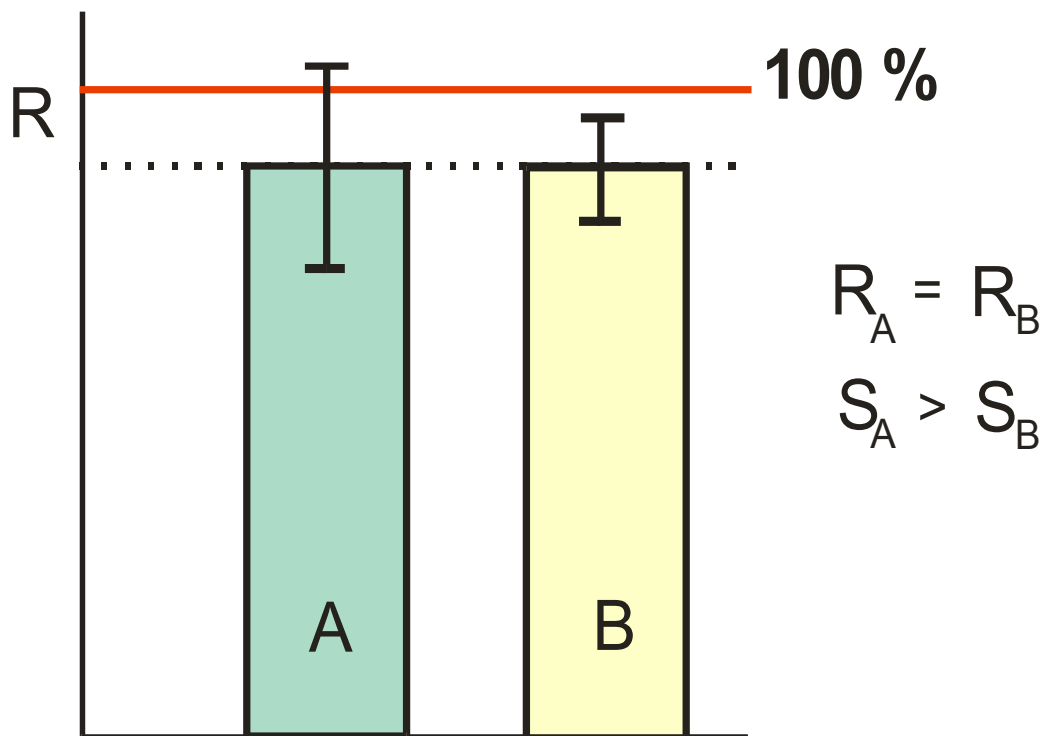
# Reprodukovatelnost (R) - Horwitz



# PRAVDIVOST (Trueness)

celková **systematická** chyba - měřítkem je odchylka výsledků od skutečné hodnoty, zjišťuje se jako **výtěžnost**

$$\text{Výtěžnost: } Rec = X_s / \bar{C}_{ref}$$



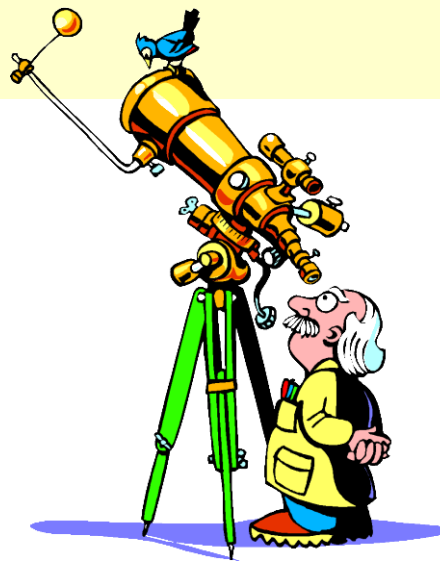
# Co je „NEJISTOTA“ ?

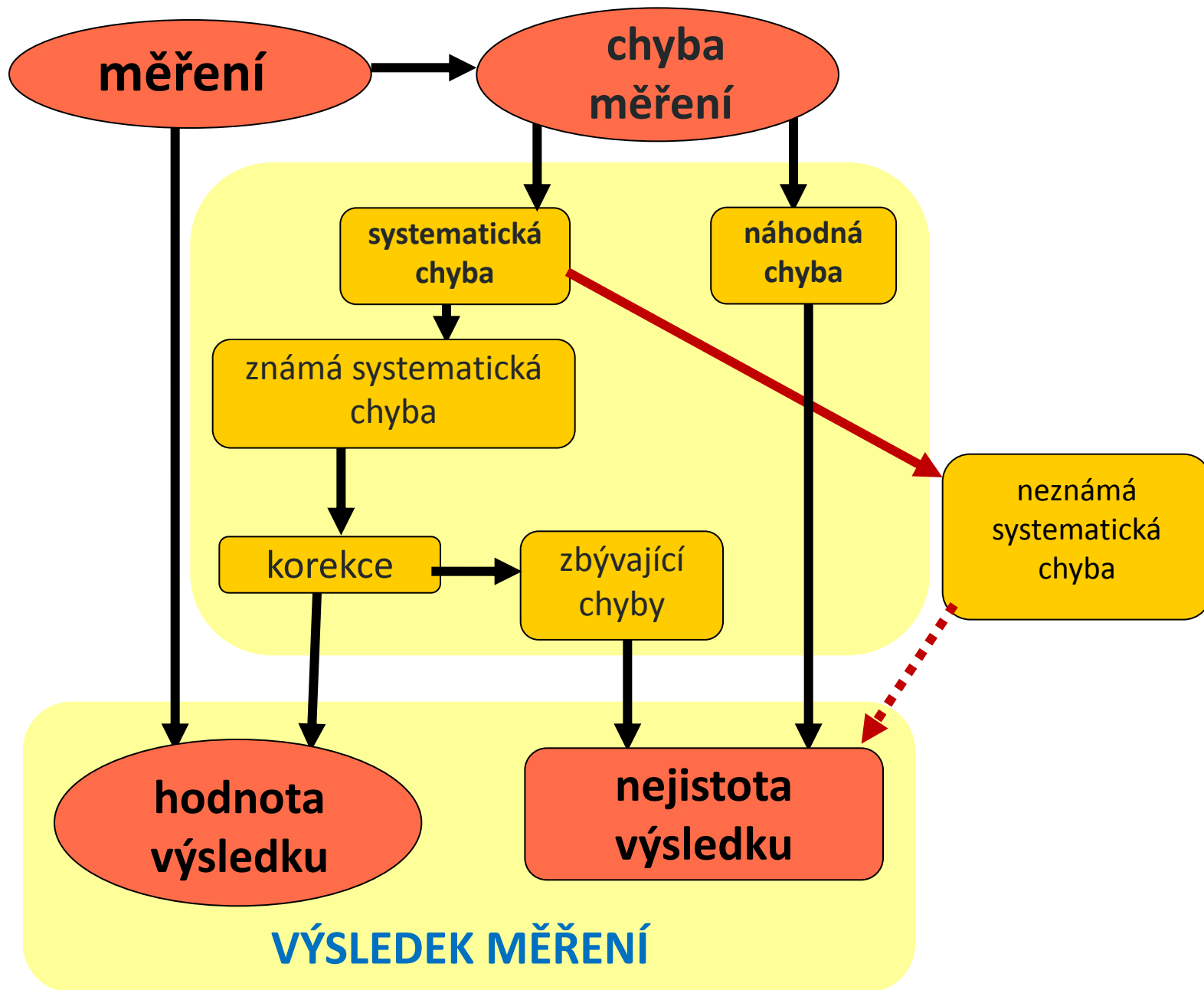
## ...POCHYBNOST O VÝSLEDKU MĚŘENÍ – PROČ ?

„What we observe is not nature itself, but nature exposed to our method of questioning.“

*Werner Heisenberg*

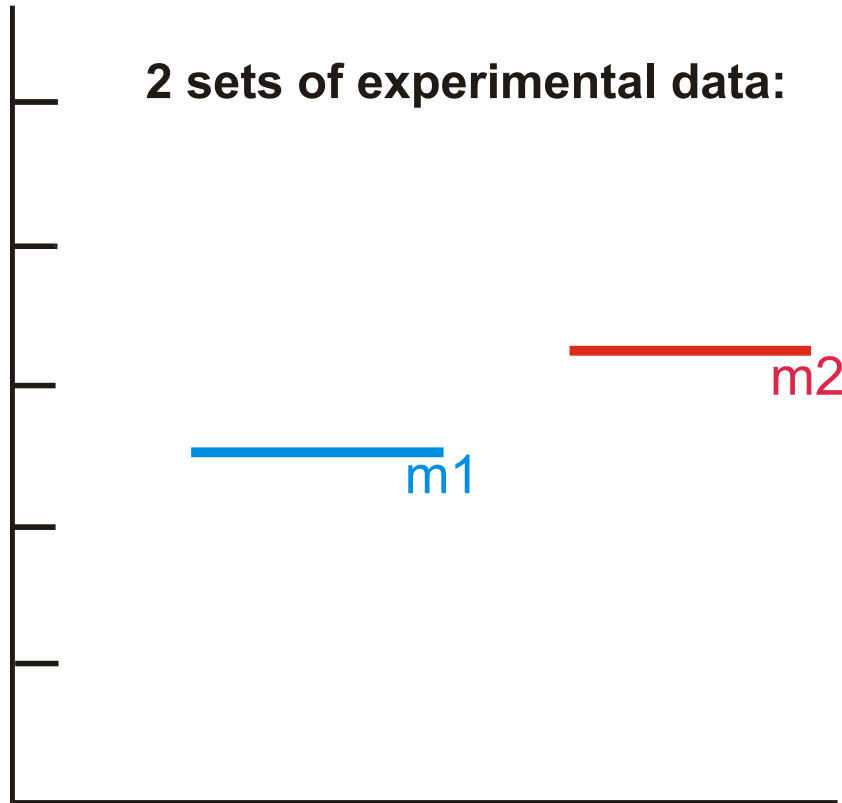
*„To, co pozorujeme, není příroda samotná ale příroda vystavená naší metodě zkoumání.“*





# Interpretace výsledků měření ?

2 sets of experimental data:

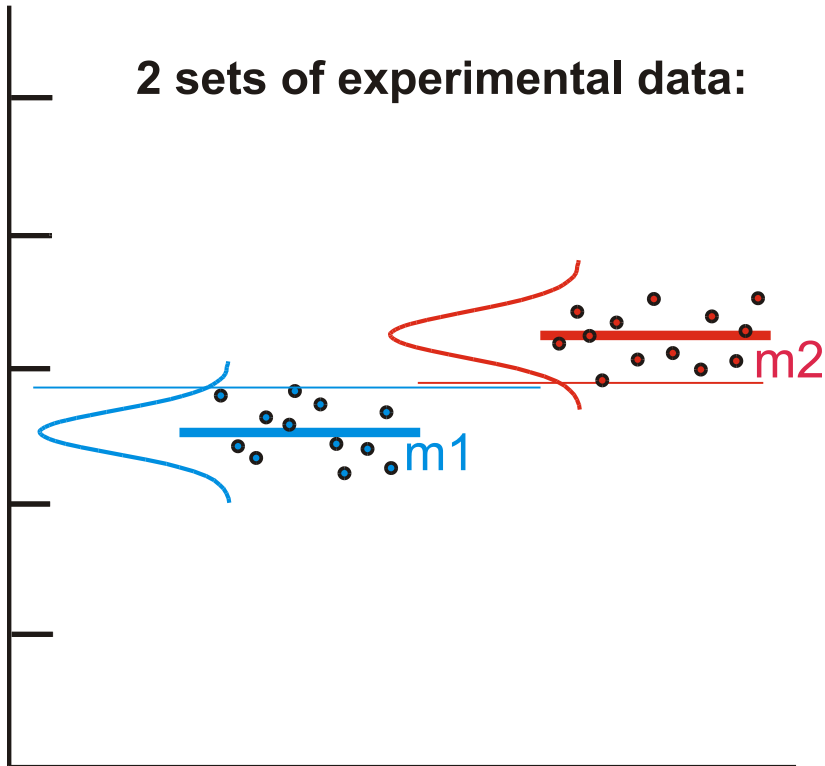


$m_1$ ...výsledek měření (resp. střední hodnota výsledků opakovaných měření) vzorku 1

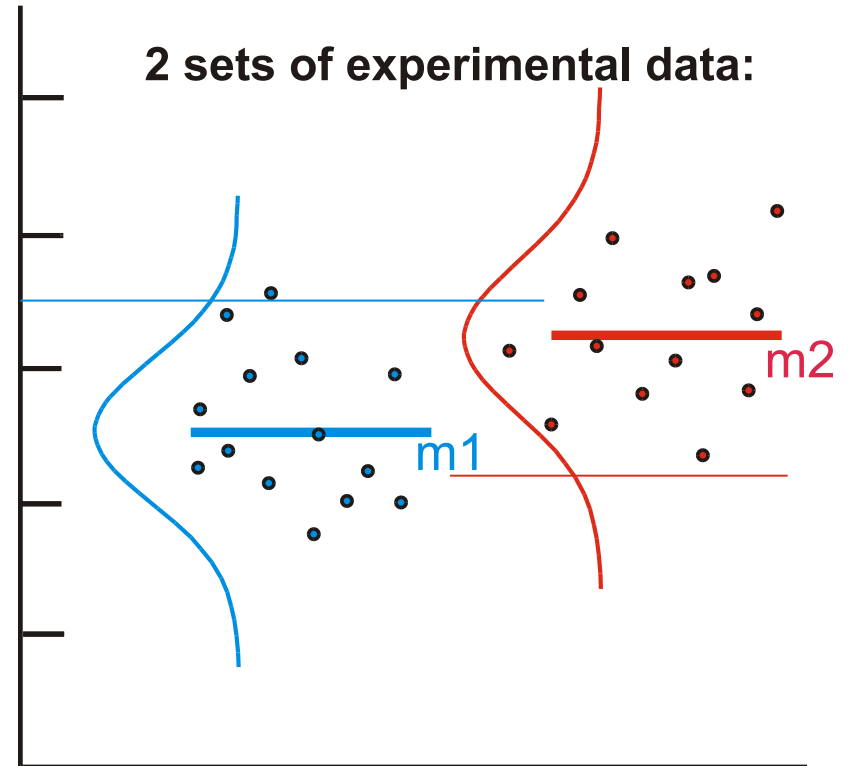
$m_2$ ...výsledek měření (resp. střední hodnota výsledků opakovaných měření) vzorku 2

$m_1 < m_2$  ? significantly ?

# Interpretace výsledků měření ?



$m1 < m2$  ! "statistically significant" !

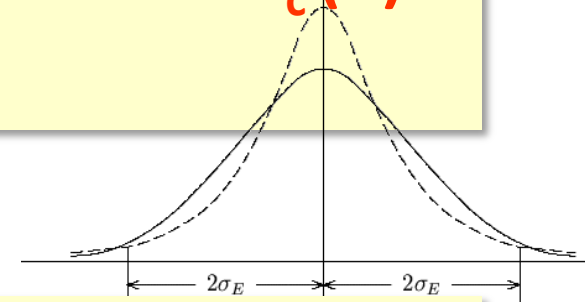


$m1 < m2$  ? "not statistically proved" !

# Co je nejistota měření (Uncertainty) ?

- ▶ Parametr spojený s výsledkem měření charakterizující rozptýlení hodnot, které mohou být důvodně připsány měřené veličině →  $u_c(\sigma)$

*nebo*



- ▶ Odhad přiřazený k výsledku zkoušky a charakterizující interval hodnot, o němž se tvrdí, že uvnitř něho leží pravdivá hodnota  
→  $U = k u_c$



## Jaké typy nejistot uvažujeme ?

**TYP A - náhodné vlivy** - výpočtem směrodatné odchylky z opakovaných experimentů:

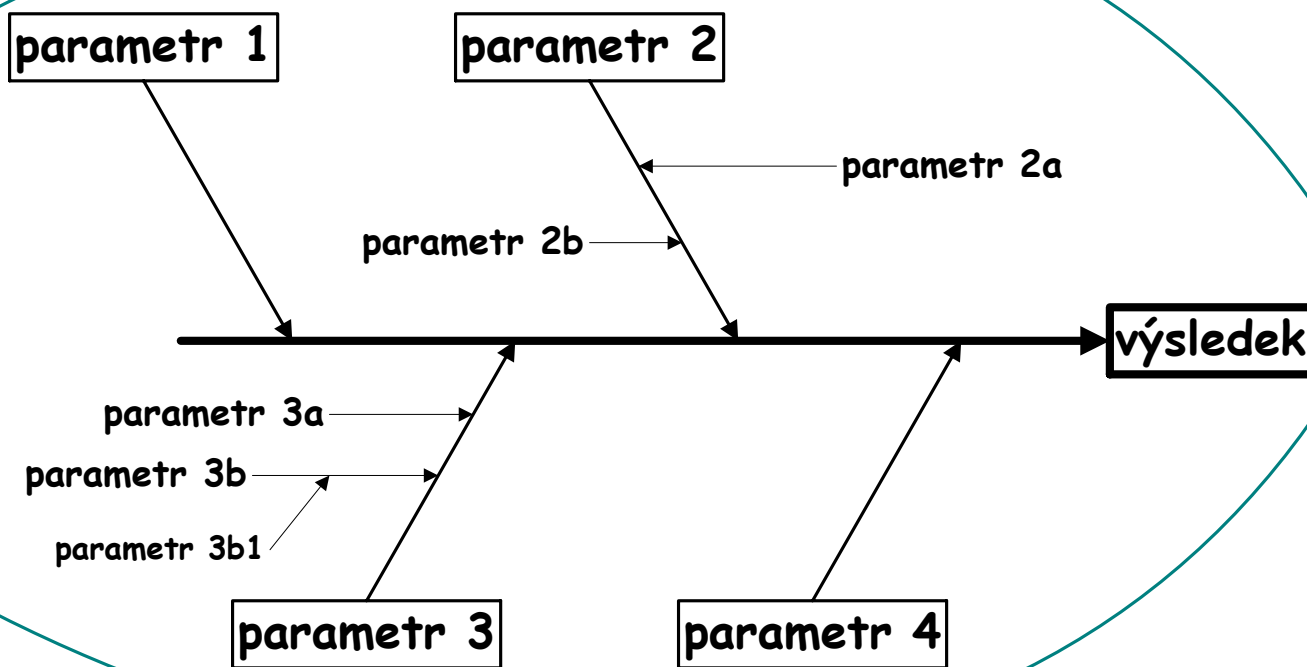
$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 - \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i\right)^2}{N}}{N}}$$

**TYP B - systematické chyby** - odhadem založeným na spolehlivých informacích např.:

- ❖ *z předchozích měření*
- ❖ *ze specifikací výrobců (např. čistota standardů)*
- ❖ *z kalibračních listů a certifikátů*

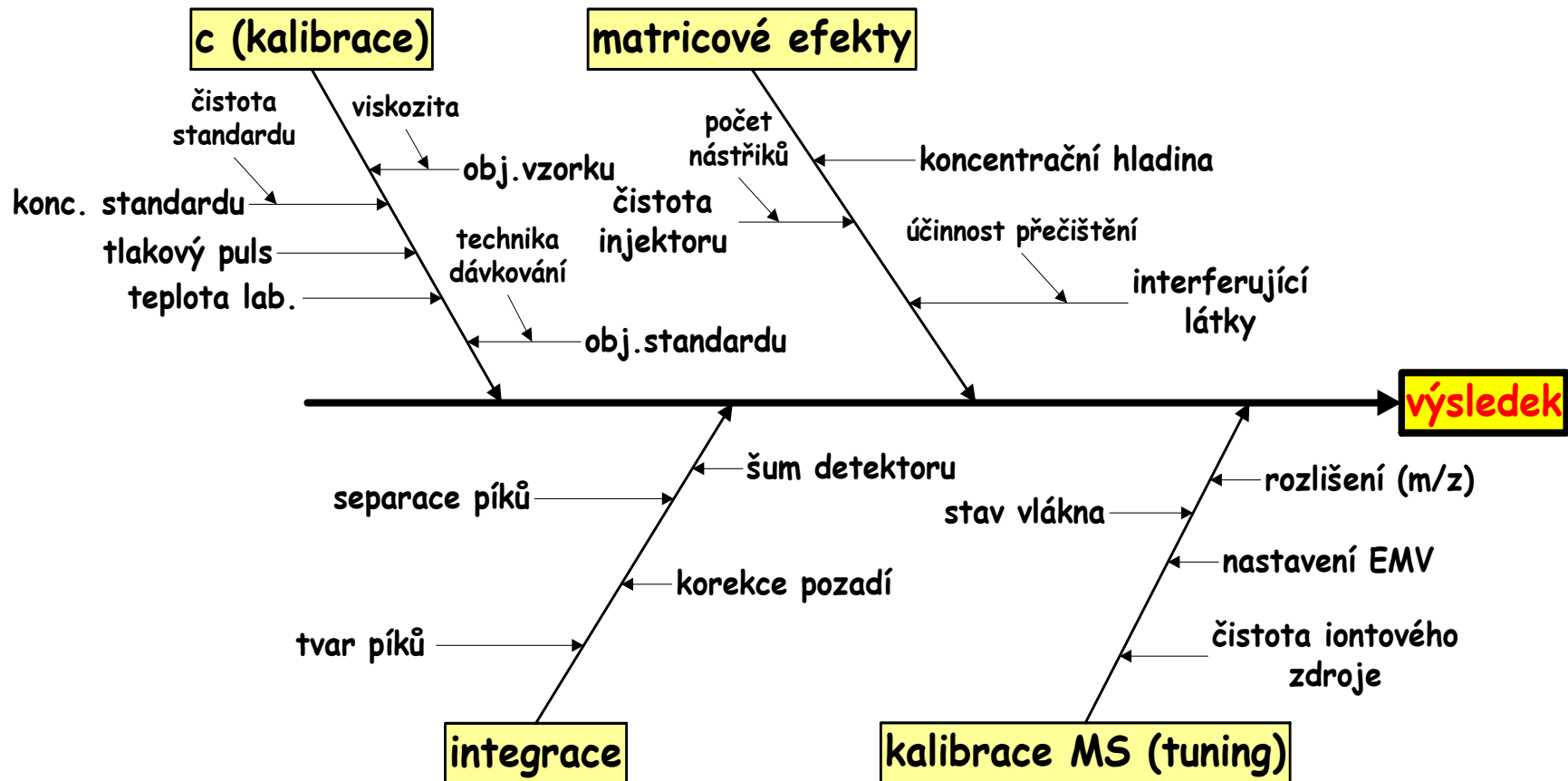
# Identifikace zdrojů nejistoty

Diagram příčin a následků (Ishikawova rybí kost)



# Identifikace zdrojů nejistoty

*Příklad: stanovení reziduí pesticidů GC/MS - měření*



# Výpočet nejistoty

## ◆ STANDARDNÍ NEJISTOTA JEDNOTLIVÝCH KROKŮ

$u(x_i)$  - nejistota měření vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka (příklady):

$$u(x_i) = s_{x_i} \quad \text{nebo rel. } s_{x_i}/x_i \quad (\text{typ A})$$

$$u(x_i) = L_{1,2} / 1,96 \quad (\text{typ B, normální rozdělení})$$

$$u(x_i) = a/\sqrt{3} \quad (\text{typ B, rovnoměrné rozdělení})$$

## ◆ KOMBINOVANÁ STANDARDNÍ NEJISTOTA (jako $\sigma$ )

$$u_c^2 = u^2(x_1) + u^2(x_2) + u^2(x_3) + \dots u^2(x_n)$$

## ◆ ROZŠÍŘENÁ NEJISTOTA (jako INTERVAL)

$$U = k \cdot u_c \quad [\alpha = 0.05; k = 2]$$

# Příklad 1: Kalibrační list vah s uvedením nejistoty

KALIBRAČNÍ LIST

1053-KL-20310-10

List 2 ze 2 listů

**Použité etalony:**

Sekundární etalony hmotnosti I. řádu 1 mg - 200 g, kalibrační list č. 1053-KL-3027-09, kalibrováno ČMI OI Praha

**Kalibrační postup:**

612-MP-C132

**Místo kalibrace:**

B 149

**Podmínky prostředí:**

teplota: (20,3 ± 0,3) °C

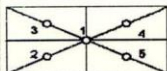
vlhkost: (38 ± 3) %

**Výsledky kalibrace:**

**Opakovatelnost:**

Směrodatná odchylka byla stanovena při: jmenovitém zatížení 100 g a má hodnotu 0,055 mg.

**Excentricita:**



Jmenovité zatížení (g)	Sektor	Indikace I (g)
100	1	100,0000
	2	99,9999
	3	99,9999
	4	99,9999
	5	100,0000

**Správnost:**

Tára (g)	Jmenovité zatížení (g)	Chyba (mg)	Nejistota U (mg)
0	0	0,00	0,06
0	0,01	0,00	0,17
0	0,1	0,00	0,17
0	1	-0,01	0,17
0	5	-0,01	0,17
0	20	0,01	0,18
0	50	0,08	0,18
0	100	-0,01	0,21
0	200	-0,09	0,29
0	220	-0,19	0,29

Standardní nejistota měření byla určena v souladu s dokumentem EA-4/02. Uvedená rozšířená nejistota měření je součinem standardní nejistoty měření a koeficientu  $k$ , který odpovídá pravděpodobnosti pokrytí přibližně 95 %, což pro normální rozdělení odpovídá koeficientu rozšíření  $k = 2$ .



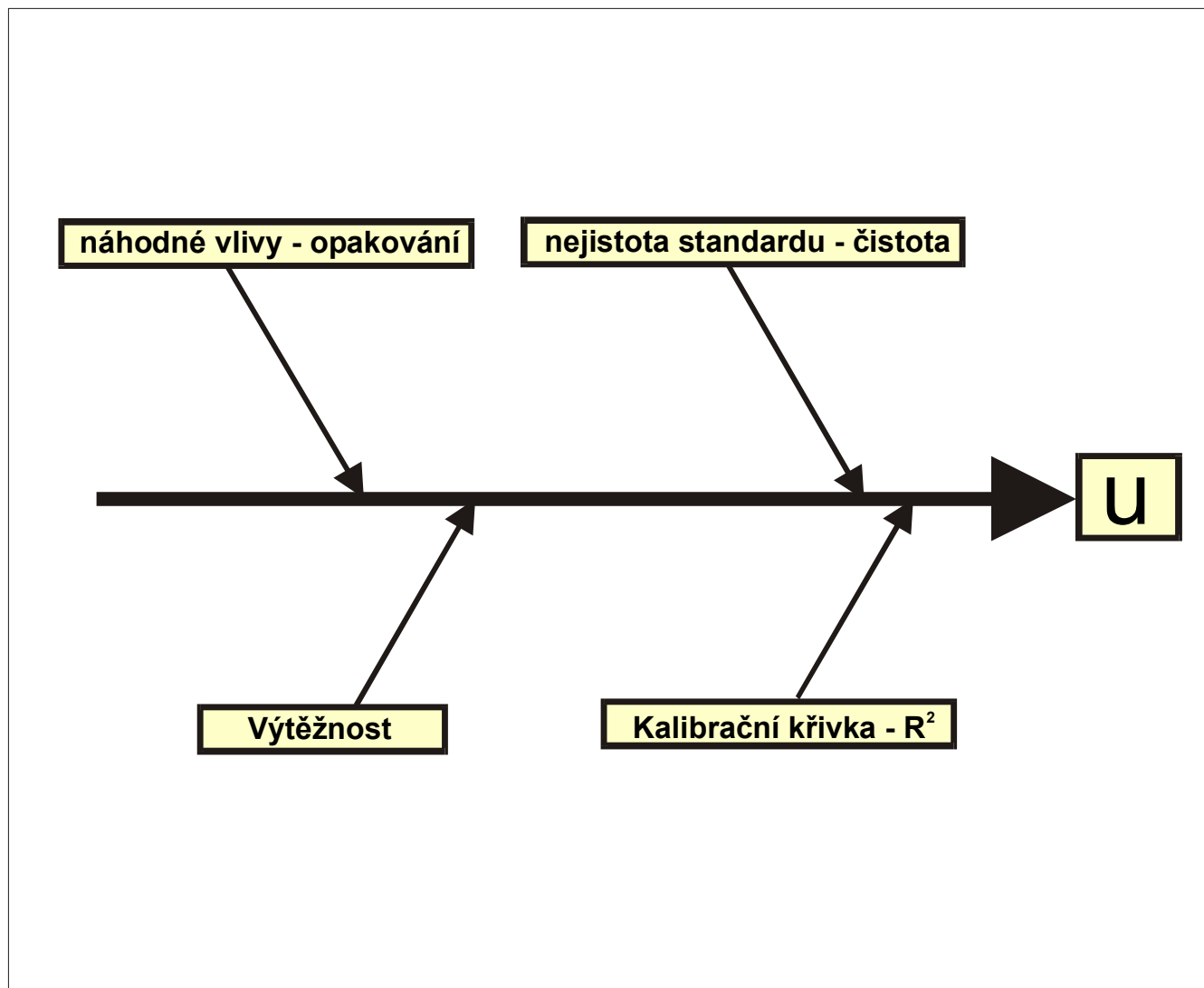
## Alternativní způsoby odhadu nejistot – chemie:

Zpravidla využívají toho, že se většinou  
**nejistota významně neliší od REPRODUKOVATELNOSTI**

1. Mezilaboratorní porovnávání zkoušek (MPZ):  
testování způsobilosti, stanovení shodnosti metod
2. Zajištění návaznosti: používání CRM
3. Statistické řízení procesu – regulační diagramy

Tyto přístupy k dohadu nejistot se označují jako  
**„top down“**

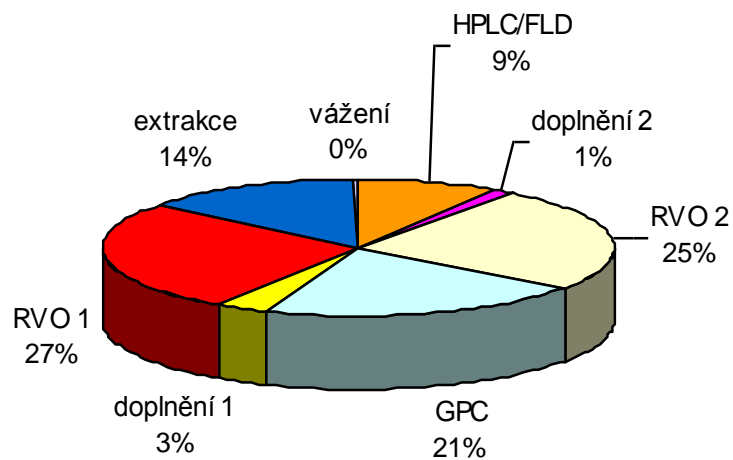
## Alternativní způsoby odhadu nejistot – Příklad :



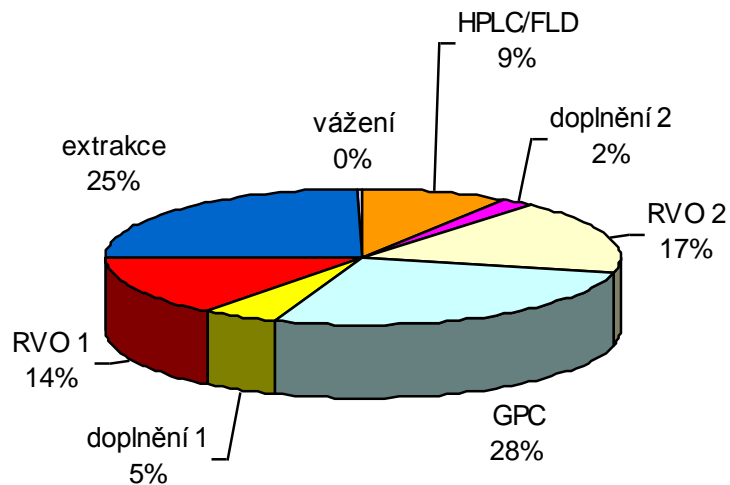
# Nejistota stanovení Phe a B[a]P v rybí svalovině

Posouzení dílčích nejistot – pro kritické operace:

## fenantren



## benzpyren





## Alternativní přístup: „top down“

*ISO 21748:2004 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation*

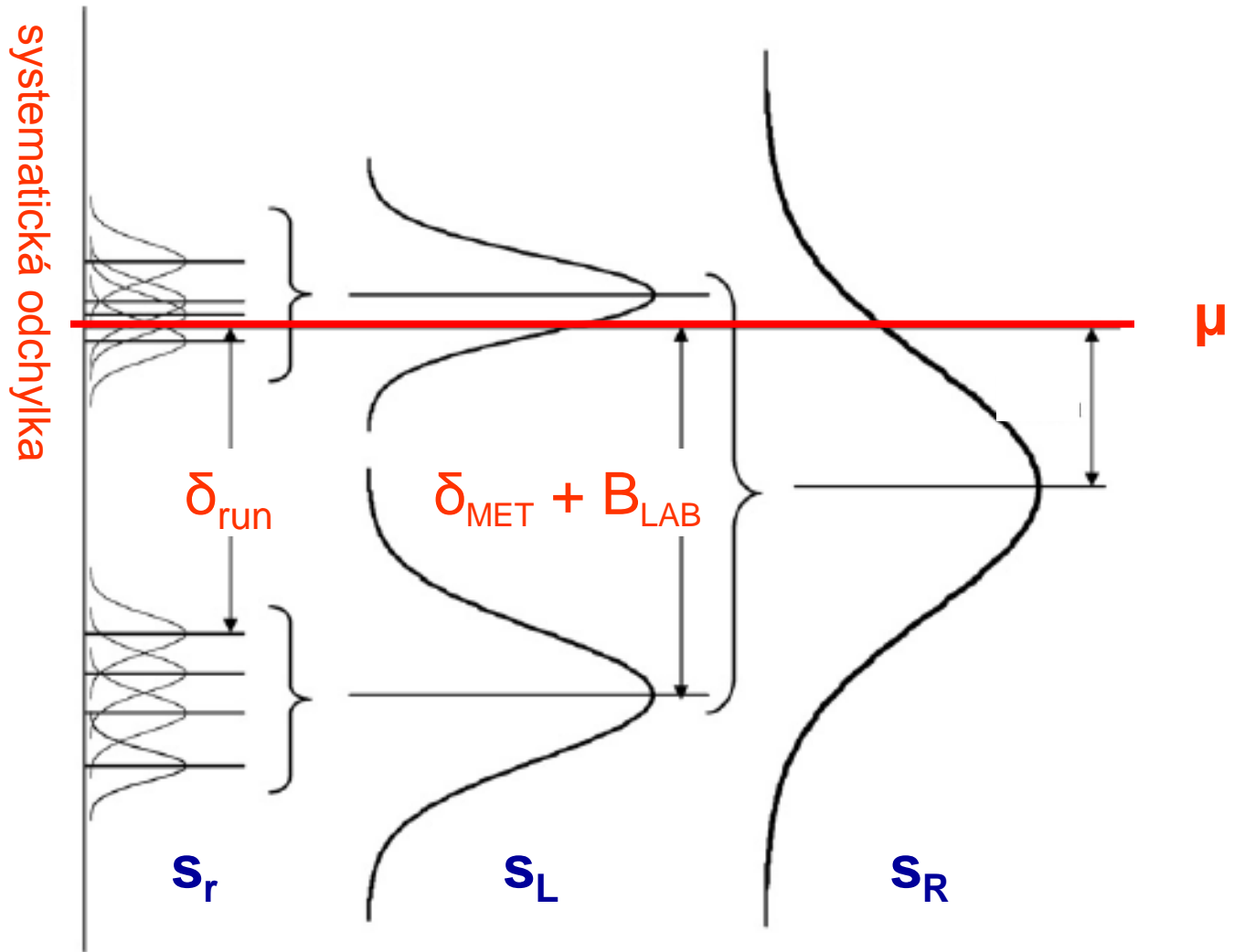
### **Princip:**

Odhadne se celková nejistota na základě:

1. intra- a inter-laboratorního rozptylu výsledků<sup>\*)</sup>, a
2. odhadu nejistoty spojené s pravdivostí (odchylkou) metody a laboratoře.

---

*\*) u normalizovaných analytických metod se vždy uvádí opakovatelnost a reprodukovatelnost určená na základě mezilaboratorní studie dle ČSN ISO 5725-2:1997.*



úroveň: analytici

laboratoře

celá laboratorní komunita

typ přesnosti: **opakovatelnost**

**reprodukovatelnost**

## HANDBOOK FOR CALCULATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY IN ENVIRONMENTAL LABORATORIES

*Bertil Magnusson, Teemu Näykki, Håvard Hovind, Mikael Krysell*

(NT TECHN REPORT 537: Edition 2, Approved 2004-02)

### *Praktická aplikace metody „top-down“:*

- ◆ *náhodné chyby – intralaboratorní odhady*
- ◆ *systematické chyby – na základě CRM a/nebo mezilaboratorního porovnání*

# ■ Příklad: Nejistota stanovení karboxy-THC v moči

„top-down“

- Standard solution: Carboxy-THC 100 µg/mL in methanol;
- Calibration reference solutions: Prepared from the standard solution at the following concentration 5, 10, 20, 30, 45 and 60 ng/mL in urine;
- Control sample: Prepared from the standard solution to give a final concentration of 15 ng/mL in urine;
- Internal standard solution 11-nor- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid at a concentration of 0.5 µg/mL.

2.0 ml urine at pH7  
 ↓  
 50 µL  $\beta$ -glucuronidase (E. coli) 55 °C for 1 hour  
 20 µL (androsterone-D<sub>4</sub>-glucuronide / D<sub>5</sub>-etiocholanolone)  
 ↓  
 100 µL internal standard solution  
 3 mL hexane:ethylacetate (9:1 v/v); Mix 5 minutes  
 Extraction 2x  
 Collect organic portion. Evaporate to dryness  
 ↓  
 50 µL derivatization reagent at 65 °C for 30 minutes  
 ↓  
 GC/MS

Document Number:	TD2010DL
Written by:	WADA Laboratory Committee
Date:	08 May, 2010

	Value	Standard uncertainty $u(x)$	Relative standard uncertainty $u(x)$ %
Intermediate precision	1.0	0.0659	6.59
Recovery (bias)	0.98	0.0374	3.82
Other sources - Homogeneity - Reference standard		na negligible	

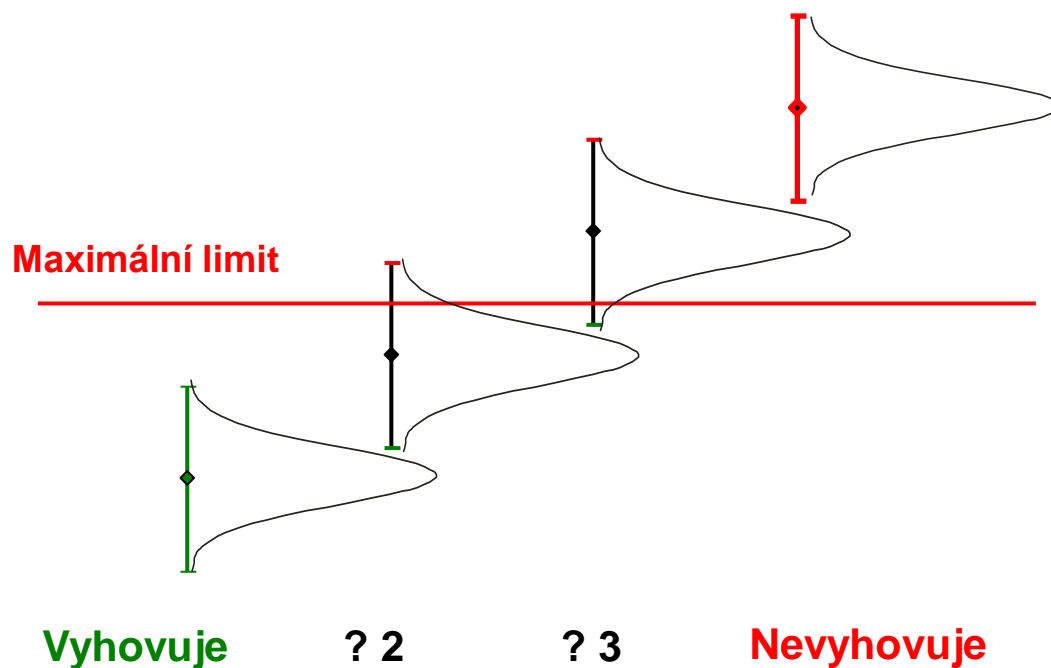
$$u_c = \sqrt{s_w^2 + RMS_{bias}^2}$$

- Combined standard uncertainty =  $\sqrt{6.592^2 + 3.82^2}$   
= 7.6 %
- Expanded uncertainty ( $k=2$ ) = 15.2 % or 2.3 ng/mL



# Rozhodování o shodě s využitím hodnoty nejistoty

Guidelines on the Reporting of Compliance with Specification.  
ILAC-G8:03/2009



Případ 2 a 3: “*není možné prohlásit SHODU*”



*Příklad:*  
**Stanovení  
THC ve  
slinách**

## Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods

Sarah M. R. Wille · Frank T. Peters ·  
Vincent Di Fazio · Nele Samyn

### Method Development

Which matrix?  
Which compounds?  
Qualitative or quantitative?  
Range of concentrations?  
'Client demands'

Are certified reference materials available?

Methods in the literature, laboratory?  
Available equipment?

Saliva collected with collector X  
Tetrahydrocannabinol  
Quantitative (Legal cut-off: 10 ng/ml)  
5-320 ng/ml  
LOQ minimal 10 ng/ml, no specifications for  
measurement uncertainty or accuracy  
No, reference standard spiked to saliva/buffer X



Development of liquid-liquid extraction and  
UPLC-MS/MS method

### Validation

Objective documentation of the quality of the developed method

# Validační schéma

## Selectivity

Acceptance: signal < 20% signal LOQ **OK**

## Extraction efficiency and matrix effect

Acceptance: reproducible extraction efficiency and matrix effect: RSD < 15%  
+ adequate sensitivity **OK**

## Processed sample stability

Acceptance: loss < 10%  
+90%CI within 80-120% mean control **OK**

## Calibration model

Acceptance: homoscedastic  
+bias, precision < 15% **OK**

## Determination of LOQ, Accuracy

Acceptance: bias, precision < 15% **OK**  
LOQ < 20%

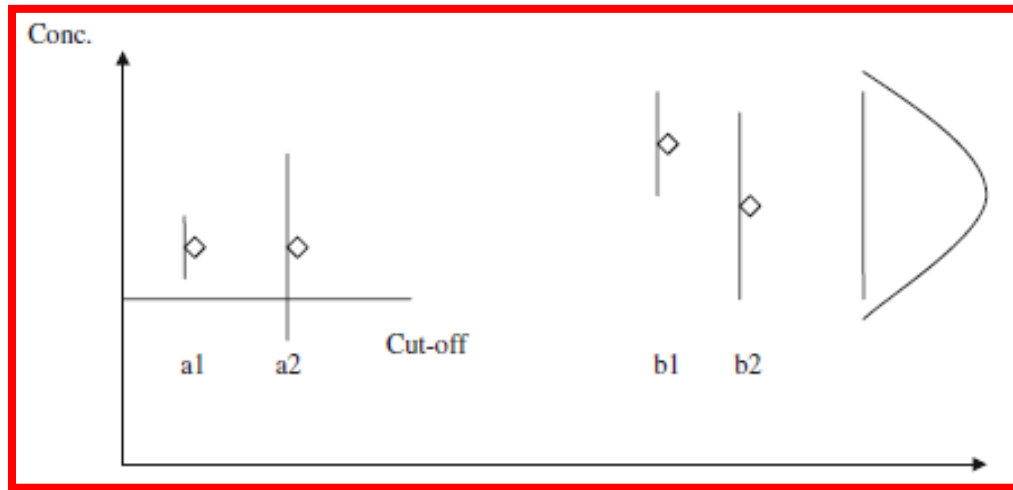
≥ 6 Blank saliva samples from different origin + 2 blanks samples spiked with THC-d3 + saliva spiked with cannabiniol, cannabidiol, hydroxytetrahydrocannabinol  
Result: Signal of the quantification MRM < 0.5%

Matuszewski experiment [16] at low (15 ng/ml THC) and high concentrations (240 ng/ml)  
Result: Extraction efficiency > 95%; RSD < 7%  
Relative matrix effect RSD < 9%  
Detection of 5 ng/ml THC no problem

Analysis of low and high at T=0, 24 and 48 hours  
Result: < 5% loss for THC and THC-d3  
90%CI within 80-120% mean T=0

6 Calibration curves range 5-10-20-40-80-160-320 ng/ml (on 6 different days)  
Result: 1/x-weighted linear calibration model

8 Days, 2 x LOQ (5 ng/ml), 2 x low (15 ng/ml), 2 x mid (60 ng/ml), 2 x high (240 ng/ml) ANOVA  
Result: Bias < 3%, repeatability and intermediate precision < 4% for all concentrations



## Measurement uncertainty and consequences for forensic interpretation

**perpendicular bars:** measurement uncert. interval. a Two methods can give the same quantitative result (e.g. 5 ng/mL tTHC); however, the result of each method should be differently interpreted due to measurement uncertainty. For example, in the drug-and-driving 'lower limit' legislation, case a1 would certainly be prosecuted as a result and its measurement uncertainty is above the legal cut-off. In case a2, the result is above the limit but the limit is within the uncertainty; there is a possibility that the driver has a THC concentration below the legal cut-off and should thus not be prosecuted. b One sample analysed in different laboratories should be compared and interpreted using their measurement uncertainty. If a contra-expertise is demanded because the suspect does not agree with the measurement result of laboratory 1, the result of the second laboratory will differ, but the range of possible values due to uncertainty should overlap. In this figure, laboratory 1 has a method with a smaller uncertainty than laboratory 2. The uncertainty of this domain would be determined via PT



# Quality assurance in forensic science

Accred Qual Assur (1999) 4:253–255  
© Springer-Verlag 1999

Shlomo Levy  
Pinchas Bergman  
Arie Frank

---

## Conclusion

All forensic scientists recognize that inaccuracy and faulty results can lead to serious consequences. However, forensic science still has a long way to go until QA procedures are an integral part of all laboratory work. There are some projects for QC and QA in progress. Every forensic laboratory's goal should be to identify poor performance and improve procedures which are necessary to ensure quality results. This will ensure that whenever scientific evidence is presented in court, the court may be assured of its quality.

# ÚSTAV ANALÝZY POTRAVIN A VÝŽIVY

## Forenzní analýza – jedno z klíčových témat Ústavu

### Nejzajímavější projekty:

- **Průkaz falšování potravin a nutraceutik** (rizikové příměsi...)
- **Rychlá identifikace toxických látek** (šetření kriminálních intoxikací, průnik jedů do potravin či pitné vody - řešení situace při teroristickém útoku či stavu havárie...)
- **Zjišťování historie a příčin znečištění složek životního prostředí** (nebezpečné odpady, požáry, hromadné otravy ryb...)

### ■ POUŽÍVANÉ TECHNIKY:

- chromatografie
- spektrometrie
- analýza obrazu



Špičkové  
vybavení

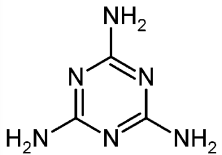


# ■ Příklady bakalářských a diplomových prací

## ■ Falšování mléčné bílkoviny toxickým melaminem

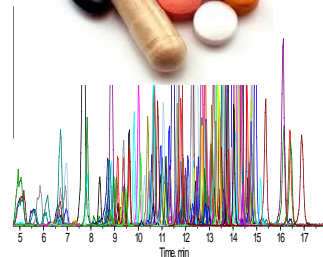


*....Pokles dusíku bílkovin při ředění mléka vodou činští podvodníci maskovali přidaným melaminem. Ten v ledvinách může tvořit smrtelně nebezpečné krystaly. Falšované výrobky se exportovaly do celého světa. VŠCHT je prokázala i v ČR.*



## ■ Zázračné „přírodní“ doplňky...jsou bezpečné?

*Metabolomika je nová metoda, pomocí které získáme záznamy vzorků podobné otiskům prstů. Pokud se neshodují se standardem, je podezření, že jsou falšované. Často obsahují nepovolená farmaka či toxiny*



## ■ Ryba jako bioindikátor ekologické katastrofy

*....V organismu ryb se kumulují různé škodliviny, ze znečištěné vody. Pomocí nové vícerozměrné techniky jsme je v rybách prokázali a upozornili na zdroje znečištění...*

