

食品化学检验方法的确认

王绪卿

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100050)

摘要:为提高食品卫生理化检验工作的质量,对化学分析方法的操作性及分析方法确认的基本准则和具体要求进行了综述。对食品卫生监督检验工作中分析方法的确认提出了建议。

关键词:食品;化学;分析;质量控制

Validation of chemical analytical methods for foods

Wang Xuqing

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100050)

Abstract: Method validation is a principal part of the comprehensive system of quality assurance in analytical chemistry. This paper reviewed the literature in recent years about method validation in analytical chemistry. It stated the typical performance characteristics of analytical methods and the basic principles as well as requirements of method validation. It discussed the scope of validation. Recommendations have been made regarding the validation of analytical methods for food control.

Key Words: Food; Chemistry; Analytical; Quality Control

1 引言

在食品化学检验领域中,食品检验规程规范化和分析方法标准化是检验结果可信性的重要保证。准确、可靠的检验结果是正确评价和保证食品安全性的先决条件,也是国际贸易上公平交易的有力科学依据。国际上的共识为:一个实验室必须有适当的措施以保证其所提供的数据的质量。国际食品法典委员会(CAC)要求各成员国的实验室严格地符合质量要求。其措施为:^[1]按 ISO/IEC 导则 17025 或其派生的准则认可实验室,参加能力考核计划,采用内部质量控制程序,采用确认的分析方法。

近年来,国际分析化学领域热衷于分析方法确认指标的研究。CAC 下属的方法和采样委员会(CCMAS)的年会多次讨论有关检验方法的评价和确认要求。ISO、IUPAC 和 AOAC Int 合作编写和发表了有关的论述。^[2~5]在近两届 CCMAS 年会中,特别讨论了实验室内分析方法的评价指标。我国随着计量认证和实验室认可工作的开展,分析化学工作者对化学分析方法的确认颇为重视。本文将根据近年国际上对化学检验方法的确认办法和指标做一综

述,以供食品分析化学工作者的参考。

2 方法确认的意义

方法确认(Method validation)是化学检验中整个质量保证体系的主要组成部分。通过试验提供客观证据,以证实某一特定的预期用途的特殊要求得到满足。因而实验室所选择和确定的检验方法,无论是标准方法还是非标准方法,在开始使用前,皆应确认。通过试验获得的客观证据,证实该实验室能够正确地掌握和执行此检验方法。方法确认除对方法本身的评价外,还涉及以下几方面:^[6]

证明符合计划要求;提供的资料有助于质量保证/质量控制的设计;为质量控制的基础资料;检定仪器、设备和其它所需的供应;对人员技术能力要求的鉴定;安全和有害废物的排放考虑;方法实施时促进操作效率。

对检验方法的评价和确认的办法,可概略分为两类:^[6]实验室间确认试验(Interlaboratory validation studies,也称合作试验 Collaborative study 或 Collaborative trial)和实验室内确认试验(Intralaboratory validation studies,也称单一实验室确认 Single laboratory validation)。实验室间确认试验是一项大试验,为研究

作者简介:王绪卿 女 研究员

在若干实验室不同的操作者测量的全过程。而实验室内确认试验是仅在特定的实验室内进行确认试验。

分析方法的确认与内部质量控制 (IQC) 和能力考核是截然不同的活动。在分析方法使用期间,进行一次方法确认,可预料该方法未来的表现如何。而 IQC 则是了解该方法执行中的情况。^[4]

3 评价分析方法的要求^[6,8,9]

CCMAS 年会 (1997) 讨论了分析方法的评价和确认要求。评价分析方法的操作性 (Performance characteristics) 包括: 精密度 (Precision) [重复性 (Repeatability) 和再现性 (Reproducibility)]、准确度 (Accuracy) [回收率 (Recovery)]、选择性 (Selectivity) 和基质影响 (Matrix effects)、检测限/测定限 (Limit of detection, LOD/Limit of quantification, LOQ)、线性 (Linearity)、范围 (Range) 和 耐变性 (Ruggedness/Robustness), 对每一特性规定了作法, 包括最少样品数、测定次数等。各特性的定义简述如下。

准确度系指分析方法测得的结果与真值的接近程度。

精密度系指用同一方法多次测定同一样品时, 测得结果的一致程度。通常, 以标准差或相对标准差表示。重复性和再现性代表不同条件下测得结果的变异情况。重复性系指同一样品在短时间间隔内, 在同一试验室, 由同一操作者、使用同一仪器设备测得结果的变异情况; 而再现性系指同一分析方法、同一样品在不同试验室由不同操作者、用不同仪器设备测得结果的变异情况。

检测限系指在规定的试验条件下, 分析方法能够检测出样品中目标物的最低浓度。传统定义是“空白 + 3 s” (IUPAC), s 为空白值信号的标准差。

测定限系指在规定的试验条件下, 分析方法能够定量地测定样品中目标物的最低浓度。传统定义是“空白 + 6 s”(或 + 10 s)。

线性系指一个分析方法给出的仪器响应值或结果与样品中目标物的质量在一定范围内成比例的能力。范围系指在该试验浓度范围内, 其精密度、准确度和线性符合要求。

选择性 (又称特异性, Specificity) 系指在混合物或样品基质的成分存在下, 该分析方法能准确、特异地测定目标物的能力。

耐变性系指一个分析方法在各种正常试验条件下 (如不同试验室、不同人员、不同仪器、不同批号试剂等) 对同一样品分析的试验结果的再现性程度。

笔者认为 Ruggedness/Robustness 译为“皮实性”

更为贴切。美国药典对 Ruggedness 和 Robustness 二名词分别给予定义。Ruggedness 定义基本同上。Robustness 系指分析方法对试验条件的微小变化的敏感度。

由于测定各个操作参数的方法依分析方法本身的目的、原理的不同而异, 具体方法将另文讨论, 本文不作详述。

还需说明的是, 不是所有分析方法均需按照上述操作参数全面确认, 应根据分析方法的应用目的, 选择适宜的操作参数。在食品化学分析中, LOD/LOQ 对常量成分分析意义不大。对低水平污染物 (重金属、农药、兽药及真菌毒素等) 痕量分析时, LOD/LOQ 为重要的性能指标。^[8] 在报告数据的同时, 必须表明所用检验方法的 LOD 和 LOQ。若样品分析后, 未检出目标物, 则应报告样品中目标物浓度为“ <LOD”, 而不应报告为“未检出”。在农药最大残留限量标准中, 可以看到在某种食品中某种农药最大残留限量为其方法的定量限, 而非“不得检出”, 即表示该食品中某农药残留量不得超过方法的定量限。现将确认各类分析方法所需操作参数列于表 1。^[6,7]

表 1 各类分析方法的性能指标

操作特性	主要成分	痕量:LOQ 之上	痕量:LOQ 与 LOD 之间
精密度	Y	Y	N
准确度	Y	Y	?
LOD	N	N	Y
LOQ	N	Y	N
选择性	Y	Y	Y
线性	Y	Y	N
范围	Y	Y	?
耐用性	Y	Y	Y

注: Y=重要; N=不重要; ? = 依方法的应用而定。

除上述操作特性外, CCMAS (2002) 24 届年会中还讨论了一些操作特性,^[10] 即适用性 Applicability 和灵敏度 Sensitivity。其定义分别为: 适用性是指一个分析方法可以满意地测定法典标准所要求的目标物、基质和浓度。灵敏度是指响应值的变化除以校正曲线中相应浓度的变化, 如曲线的斜率 s。

一个方法的全面确认通常包括实验室间方法操作特性的检验, 也即合作试验, 然而, 对分析方法的全面确认不总是实用和必需的, 在以下几种情况, 可采用单一实验室方法确认。

(1) 在进行需用高昂费用的正式合作试验之前, 要保证方法的可行性。

(2) 如果得不到合作试验的数据或者进行合作试验不实际的话, 提供分析方法可行性证据。

(3) 为保证正确重新使用已确认过的分析方法。

将一个分析方法用于常规前,实验室必须投入大量确认工作。而采用一个合作试验过的方法则可大大地减少实验室工作量。一个实验室采用一个符合目的且经过合作试验过的方法,仅需证明能达到该方法的操作特性即可,正确的使用证据比全面确认的代价要小得多。

4 方法确认的基本原则

4.1 确认的规定和范围

确认是考察一个方法应用于以特定类型的试料和目标物浓度范围为目的的运行情况。在确认之前,应规定考察的操作特性和符合目的的指标。

确认试验起着对一个分析方法任何设想的客观检验作用。在特定分析技术(如 GC 分析)成功地应用于一系列目标物分析的长期实践的实验室,这方面确认试验是没问题的。而在经验不足的地方,确认试验需要提供对特定试验所做假设是适宜的有力证据。在给定的情况下,要求确认试验的范围部分地依赖于所用分析技术的积累经验。不熟悉或不常用的分析技术需要更严格的验证。

4.2 方法误差的来源

分析测量误差起因于不同来源,误差来源有:^[11]测量随机误差(重复性),运作偏倚,实验室偏倚,方法偏倚,基质变化影响。

通常,重复性、运作和实验室的影响大小差不多,所以在确认中哪个也不能忽视。单一实验室可能忽视实验室偏倚,而它是上述误差来源对不确定度最大的贡献。在一个实验室确认时,必须对实验室偏倚给予关注。此外,一个方法的确认局限于它的应用范围,即这个方法应用于特定种类的试料。若在已确定的种类中基质类型有实质性变动的话,将会有另外来源的基质影响。当然,如将此方法应用于已确定的种类之外的材料时,则不能认为这个分析体系已确认过。

4.3 方法和实验室影响

在单一实验室方法确认中,考虑方法偏倚和实验室偏倚极为重要。但它们常比重复性和运作影响更难以得到。通常,需要该实验室单独收集资料来评估各个不确定度。这些最有用的资料来源是:(1)来自合作试验的统计资料(在单一实验室方法确认的情况下得不到);(2)来自能力考核的统计资料;(3)来自有证参考物质(CRM)的分析结果。

合作试验直接估算实验室偏倚的变异。虽然在这样的试验设计中可能在理论上有点缺点,但这些变异估算有许多实用意义。因而以不确定度估算和合作试验重现性估算比较,对单一实验室是有意义的。

若没有合作试验进行这样的方法/试料组合的试验,在目标物浓度超过 120 ppb 时,可由 Horwitz 公式计算再现性标准差 s_H , (Horwitz 公式 $s_H = 0.02 c^{0.8495}$)。已观察到浓度 c 低于 120 ppb 时,Horwitz 公式不适用。^[12,13]

能力考核的统计资料特别有意义,因为它们提供实验室和方法组合偏倚的程度。对于参加者来说,提供特定条件下总误差信息。参加者们对一个目标物测试的结果的标准差的统计资料,能作为相似于合作试验时的再现性标准差。事实上,来自能力考核的统计资料可能更难得到,因为它们不像合作试验一样系统地列表和公布。当然,如用这样的统计资料,必然涉及基质和目标物浓度。能力考核计划的各参加者,以给定值比较他们所报告的结果,能够测量出他们估算的不确定度的正确性。

如能得到一个适当的 CRM,则可允许一个实验室以多次分析 CRM 来评估实验室和方法的组合偏倚。分析结果的均值与 CRM 给定值之差即为组合偏倚。

适当的 CRM 不是经常能得到的,所以可能要采用其他材料。为此目的,有时采用能力考核剩余的材料,虽然材料的给定值也许有可疑的不确定度。

在某种程度上它们可以考核总偏倚。另外,可采用添加回收资料来估算这些偏倚。

5 单一实验室方法确认的界限^[1]

一个实验室必须根据检验方法的现状和实验室的能力,对一个新的、修改了的或不熟悉的检验方法进行确认。针对不同情况,确认界限和验证办法如下:

5.1 实验室采用一个“全面”确认过的检验方法

采用的方法已经经过合作试验,实验室必须验证能达到该方法已颁布的操作特性(或者能满足分析任务要求)。实验室应该进行精密度试验、偏倚试验(包括基质变化试验)以及线性试验(可能时),另一些试验如耐变性试验则可以免除。

5.2 实验室采用一个“全面”确认过的检验方法,但用于新基质

采用的方法已经经过合作试验,实验室必须验证新基质没有新的误差来源引入方法体系。按 5.1 要求确认。

5.3 实验室要采用一个已建立的检验方法,但该方法未经过合作试验

按 5.1 要求确认。

5.4 实验室要采用一个已在科学文献上发表、且伴有一些分析特性的方法

实验室应该进行精密度试验、偏倚试验(包括基质变化试验)、耐变性试验和线性试验。

5.5 实验室要采用一个已在科学文献上发表、但无分析特性的方法,或者是内部曾建立的方法

应按 5.4 进行确认试验。

5.6 方法是经验性的

一个经验性的方法是指用该方法所测得的量仅仅是根据规定的步骤检测的结果。它不同于目的在于估量与方法无关的量的测定,如样品中某一特定目标物的浓度,此时方法偏倚通常为零,而且基质变化(在指定种类范围内)与之无关。不能忽视试验室偏倚,但常常难由单一试验室来评价。再者,未必常能得到参考物质。在没有合作试验数据时,能够从一个特殊设计的耐变性试验或采用 Horwitz 公式估算试验室间试验的精密度。

5.7 分析是“特定的”

偶尔需要进行一种费用低、且要求不严格的特定的分析以建立一个数值的一般范围。相应地进行确认所付出的代价有限。应研究偏倚,如目标物添加回收测定或重复测定的精密度。

5.8 人员和设备的变动

主要包括:主要仪器的更换;新批号易变试剂(例如多克隆抗体);试验室房屋搬迁;新人员第一次使用方法;或不用一段时间之后,又再使用的已确认的方法。这时应主要地证明未出现有影响的变化。最少应进行一个单一的偏倚试验,以有代表性的试料或控制材料比较变动前后的结果。通常,所进行的试验应反映分析步骤变化的可能影响。

6 建议

在食品监督检验工作中,为保证检验结果的准确性,选择、采用分析方法时,提出以下几点建议。

(1) 一个实验室确定将一个分析方法用于常规前,无论是标准方法还是非标准方法,皆应对其确认。

(2) 只要可能和实际的话,一个实验室应该采用一个符合国际模式、通过合作试验评价过操作特性的分析方法。

(3) 在没有这样的方法时,采用的分析方法在给客户提供分析数据之前,必须按上述要求进行内部确认。

(4) 单一实验室确认时,要求实验室从以下操

作特性中选择适宜的特性去评价方法:适用性、选择性、准确度、精密度、范围、测定限、检出限、灵敏度、耐变性和可行性。实验室在选择要测量的操作特性时,要考虑客户要求。

(5) 根据客户要求,给客户已评估的特性证据。

参考文献:

- [1] Hompson M, Ellison S L R, Wood R. Harmonised guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis [J]. Pure Appl Chem, 2002, 74:835—855.
- [2] Ortiz W. Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method Performance Studies[J]. Pure Appl Chem., 1995, 67:331—343.
- [3] Thompson M, Wood R. The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Laboratories [J]. J AOAC International, 1993, 76: 926—940.
- [4] Thompson M, Wood R. Harmonised Guidelines For Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories [J]. Pure App Chem, 1995, 67:649—656.
- [5] Thompson M, Ellison S, Fajgelj A, et al. Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement [J]. Pure App Chem, 1999, 71:337—348.
- [6] Intralaboratory analytical method validation — A short course [Z]. AOAC International, Gaithersburg, Maryland, USA, 1996.
- [7] USP XXV 2000: < 1225 > Validation of compendial methods [Z].
- [8] 王绪卿,吴永宁,陈君石. 食品污染监测低水平数据处理 [J]. 中华预防医学杂志, 2002, 36(4): 278—279.
- [9] “Validation of Analytical Methods for Food Control”, Report of a Joint FAO/IAEA Expert Consultation [Z]. December 1997, FAO Food and Nutrition Paper No. 68, FAO, Rome, 1998.
- [10] “Proposed draft guidelines for evaluating acceptable methods of analysis” [Z]. CX/MAS 02/4, CCMAS 24 session, 2002.
- [11] Thompson M. Towards a unified model of errors in analytical measurement [J]. Analyst, 2000, 125:2020—2025.
- [12] Thompson M, Lowthian P L. The Horwitz Function revisited [J]. JAOAC Int, 1997, 80:676—679.
- [13] Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing [J]. Analyst, 2000, 125: 385—386.

[收稿日期:2003-01-26]

中图分类号:R15 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2003)02-0098-04