

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКАЯ МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ
ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
КАФЕДРА ГИГИЕНЫ И МЕДИЦИНСКОЙ ЭКОЛОГИИ

С.Ф. Фурс, Т.В. Башун, Л.Л. Бельшева

**ПРИМЕРЫ ПРОЦЕДУРЫ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ
МЕТОДИК В САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ
ЛАБОРАТОРИЯХ**

Учебно-методическое пособие

Минск БелМАПО
2014

УДК 614.3:613:543(075.9)

ББК 51.2Я73

Ф 95

Рекомендовано в качестве учебно-методического пособия
УМС Белорусской медицинской академии последипломного образования
протокол № 2 от 27.03. 2014.

Авторы:

С.Ф. Фурс, Т.В. Башун, Л.Л. Бельшева

Рецензенты:

Кафедра общей гигиены БГМУ

Заведующий лабораторией химии пищевых продуктов ГУ «Республиканский центр гигиены», кандидат химических наук О.В. Шуляковская.

Фурс С.Ф.

Ф 95

Примеры валидации аналитических методик в санитарно-гигиенических лабораториях: учеб-метод. пособие /С.Ф. Фурс, Т.В. Башун, Л.Л. Бельшева – Минск: БелМАПО, 2014.- 24с.

ISBN 978-985-499-780-3

В учебно-методическом пособии описан порядок проведения стандартной операционной процедуры «Валидация аналитических методик». Приведен практический пример валидации методики определения патулина.

Предназначено для врачей-лаборантов центров гигиены и эпидемиологии, а также специалистов испытательных лабораторий.

УДК 614.3:613:543(075.9)

ББК 51.2я73

ISBN 978-985-499-780-3

© Фурс С.Ф., Башун Т.В.,
Бельшева Л.Л., 2014

© Оформление БелМАПО, 2014.

Введение

В настоящее время существует достаточное количество документов, описывающих валидацию различных методов. Они устанавливают характеристики метода для валидации и приводят информацию, которая должна представляться совместно с методикой выполнения измерений при ее утверждении. Для практики валидации методов необходима также информация о том, как организовать процесс, оптимизировать исследования, выбирать числовые критерии, на каком этапе разработки методики проводить валидацию для подтверждения соответствия требованиям СТБ ИСО/МЭК 17025-2007 п.5.4.

Настоящее методическое пособие описывает процесс проведения стандартной операционной процедуры «Валидация аналитических методик». Оно позволит врачам-лаборантам приобрести опыт грамотного проведения процедуры валидации методов в аккредитованных санитарно-гигиенических лабораториях с целью подтверждения посредством экспертизы и представления объективных доказательств того, что выполняются определенные требования для конкретного применения по назначению. Закрепить приобретенные знания и умения позволит рассмотрение конкретного примера проведения валидации методики определения патулина в свежих ягодах, плодах, овощах и фруктах, приведенный на последних страницах пособия.

Пример использования стандартной операционной процедуры «Валидация аналитических методик».

1. Цель

Целью является установление общего порядка действий и подходов к оценке аналитических характеристик при валидации аналитических методик.

2. Область распространения.

Распространяется на действия, направленные на обеспечение и проведение валидаций аналитических методов.

Действует при внедрении методик контроля качества и безопасности пищевых продуктов, пищевых и биологических добавок, сырья в лаборатории химии пищевых продуктов.

3. Ответственность.

Заведующий лабораторией несет ответственность за:

- проведение валидационных испытаний рабочей группой, статистическую обработку полученных данных, составление протокола.
- организацию и проведение полной валидации аналитической методики в соответствии с данной СОП.

4. Определения.

Валидация: подтверждение посредством экспертизы и представление объективного доказательства того, что выполняются определенные требования для конкретного применения по назначению (СТБ ИСО/МЭК 17025).

Аналитическая методика: документированная процедура определения химических и физико-химических показателей. Включает в себя описание подготовки испытуемых образцов, стандартов и реактивов; описание используемого оборудования с указанием параметров; условия получения калибровочных кривых; использование расчетных формул и т.д.

Линейность: способность методики в пределах диапазона применения давать величины, прямо пропорциональные концентрации (количеству) анализируемого вещества в образце.

Прецизионность: близость между независимыми результатами испытаний, полученными при определенных условиях.

Повторяемость: степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в условиях повторяемости, а именно: одним и тем же

методом, на идентичных объектах испытаний (идентичных частях пробы), в одной и той же лаборатории, одним и тем же оператором, с использованием одного и того же комплекта оборудования и средств измерения, предусмотренных в нормативной документации на метод, в пределах короткого промежутка времени.

Промежуточная прецизионность: степень близости друг к другу независимых результатов, полученных в одной лаборатории: одним и тем же методом, на идентичных объектах испытаний, разными операторами, с использованием различных комплектов (экземпляров) оборудования и средств измерения, предусмотренных в нормативной документации на метод.

Точность: степень близости результата измерений к принятому эталонному (опорному) значению.

Смещение: разность между математическим ожиданием результатов испытаний и принятым эталонным значением.

Правильность: близость среднего значения, полученного на основании большой серии результатов испытаний, к эталонному значению величины.

Неопределенность измерения: параметр, связанный с результатом измерения и характеризующий разброс значений, которые с достаточным основанием могут быть приписаны измеряемой величине.

5. Нормативные ссылки.

Данная СОП разработана в соответствии с требованиями:

1. СТБ ИСО/МЭК 17025–2006. Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий. - Минск: Госстандарт, 2006 . - 31 с.

2. СТБ ИСО 5725–2–2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: в 6 ч. - Ч. 2: Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода определений. – Минск: Госстандарт, 2003 . - 48 с.

3. СТБ ИСО 5725–4 –2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений: в 6 ч. –Ч.4: Основные методы определения правильности стандартного метода определений. – Минск: Госстандарт 2003. - 25 с.

4. СТБ ИСО 5725–6 –2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 6. Использование значений точности на практике (ISO 5725-6:1994/Соч.1:2001, IDT)

5. Количественное описание неопределенности в аналитических измерениях: руководство / ЕВРАХИМ/СИТАК; под ред. Л.А. Конопелько. - 2-е изд.; пер. с англ. – СПб, 2002. - 141 с.

6.

6. Выбор аналитических характеристик при валидации методики.

Выбор аналитических характеристик может быть осуществлен в соответствии с классификацией аналитических методик на основании правил, приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Выбор аналитических характеристик при валидации методики

| Характеристики | Типы аналитических методик | |
|---|----------------------------|--------------|
| | Количественные | Качественные |
| Правильность³ | + | - |
| Точность | + | - |
| Прецизионность: | + | - |
| <i>Повторяемость</i> | + | - |
| <i>Промежуточная прецизионность¹</i> | + | - |
| Предел обнаружения ² | + | + |
| Предел количественного определения | + | - |
| Линейность | + | - |
| Диапазон ³ | + | - |
| Чувствительность ³ | + | + |
| 1- в тех случаях, когда проводится исследование воспроизводимости, исследования внутрилабораторной прецизионности не требуется; 2- может потребоваться в некоторых случаях (например, когда предел определения и нормируемый предел содержания определяемой примеси близки) 3- устанавливаются при разработке новых методик | | |

Общие правила выбора аналитических характеристик, приведенные в таблице 1, носят рекомендательный характер и могут иметь исключения.

Следует четко понимать цель аналитической методики, так как от этого зависят аналитические характеристики, которые необходимо оценить. Главным критерием выбора аналитических характеристик является необходимость предоставления аргументированных доказательств соответствия аналитических методик их назначению.

7. Проведение валидации аналитических методик.

Основная цель выполнения валидации аналитической методики – гарантировать, что выбранная аналитическая методика будет давать воспроизводимые и достоверные результаты, соответствующие поставленной цели. Кроме того, изучение аналитических характеристик и качественное выполнение валидационных испытаний позволяет:

- в процессе разработки выявить существенные недостатки методики и улучшить ее;
- представить обоснование выбора предлагаемой методики для оценки качества пищевых продуктов, пищевых и биологических добавок;
- аргументировано обосновать заключение при получении отрицательного или предельного результата;
- повысить понимание персоналом сути методик и необходимость строгого соблюдения ее параметров и, следовательно, снизить вероятность ошибок при выполнении рутинных анализов;
- правильно оценить возможность внесения необходимых изменений или влияние различных параметров при выполнении испытаний.

8. Порядок выполнения валидации.

Необходимым условием выполнения процесса валидации является наличие необходимого оборудования и обученного персонала требуемой квалификации.

При подготовке и проведении непосредственно валидационных испытаний необходимо выполнить следующее:

- определить цель и область применения методики, ее эксплуатационные параметры (измеряемые показатели, требуемая точность измерений, перечень факторов, влияющих на достоверность результата);
- определить необходимые рабочие характеристики оборудования, квалифицировать материалы, например: стандарты и реактивы;
- провести ряд предвалидационных испытаний, выполнить сравнительную метрологическую оценку предполагаемых методов анализа и оценить соответствие критериям приемлемости;
- разработать и утвердить протокол по валидации;
- назначить ответственных за проведение эксперимента и статистическую обработку полученных данных;
- установить сроки проведения валидации метода;
- составить план выполнения экспериментальных исследований;
- провести исследования в соответствии с планом. Выполнить оценку результатов испытаний;
- документировать выполненные эксперименты и результаты валидации в отчете.

9. Документирование валидации аналитических методик.

Протокол по валидации аналитической методики разрабатывается и оформляется в соответствии с п. 10.

10. Протокол о валидации.

Протокол о валидации должен содержать следующие разделы:

1. Цель валидации
2. Методика анализа
3. Ответственные за проведение валидации: Ф.И.О., должность, проводимые работы.

4. Условия проведения испытаний
5. Оборудование и посуда
6. Реактивы и материалы
7. Проведение испытаний для установления линейности, прецизионности и точности методики.
8. Расчет максимальной неопределенности (нижний предел измерений) метода, составление бюджета неопределенности для расчета любого измерения, выполненного данным методом.
9. Вывод.

11. Валидационный отчет.

Экспериментальная часть

Проведение экспериментальных исследований для установления параметров:

- линейность метода;
- повторяемость метода, S_r ;
- промежуточная прецизионность метода, S_{IT} ;
- точность (степень извлечения) метода;

11.1. Определение линейности метода.

Для определения **линейности метода** готовят 5 серий градуировочных растворов по всему диапазону определяемых концентраций. Проводят измерение оптического отклика (площадь пика, оптическая плотность и др.) каждого градуировочного раствора (y_i) трижды. Данные заносят в таблицу 2. По полученным результатам строят градуировочный график $y=bx$ методом наименьших квадратов. Критерием линейности является коэффициент корреляции r , который должен быть не менее 0,99.

Таблица 2 - Данные для построения градуировочного графика

| № измерения | Концентрация градуировочного раствора X_i , мкг/см ³ | Значения y_i | Значения y_{cp} | $X_i y_{cp}$ |
|-------------|---|----------------|-------------------|--------------|
| 1 | X_1 | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 1 | X_2 | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 1 | X_n | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| 1 | X_5 | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| | $\Sigma=$ | $\Sigma=$ | $\Sigma=$ | $\Sigma=$ |

$$r = \frac{n \times \sum_{i=1}^n x_i y_{cpi} - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_{cpi}}{\sqrt{\left[n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right] \left[n \sum_{i=1}^n y_{cpi}^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_{cpi} \right)^2 \right]}} \quad (1)$$

В протокол о валидации представляется графическое изображение графика, уравнение, рассчитанный коэффициент корреляции, а также все экспериментальные данные.

11.2. Определение прецизионности метода.

Для определения **показателей прецизионности** (повторяемость S_r и промежуточная прецизионность S_{IT}) выполняются исследования как минимум в трех точках диапазона измерений (характеризующих начало, середину и конец) в соответствии с валидируемым методом.

Каждый образец подвергается анализу как минимум 15 раз (причем учитывается количество параллельных определений для одного исследования в

соответствии с методикой). Учитываются изменяющиеся факторы: как минимум два - время, оператор (анализ проводится в различные дни различными аналитиками).

Полученные результаты $x_1, x_2 \dots x_n$ заносят в таблицу 3.

Таблица 3 - Данные для расчета прецизионности МВИ

| Определение | Содержание искомого аналита, ед. измерения | | | | | | | |
|-------------|--|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|--------------------------|-------|
| | Концентрация 1-го уровня | | Концентрация 2-го уровня | | Концентрация 3-го уровня | | Концентрация n-го уровня | |
| 1 | x_1 | x_2 | x_1 | x_2 | x_1 | x_2 | x_1 | x_2 |
| 2 | | | | | | | | |
| n | | | | | | | | |
| 15 | | | | | | | | |

11.2.1 Определение повторяемости S_r .

Для определения повторяемости расчет выполняется в соответствии с СТБ ИСО 5725-2-2002 п.7.2.10.

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}, \quad (2)$$

где $n=15$.

Наличие выбросов проверяется по критерию Кохрена (п.7.3.3):

$$C = \frac{s_{\max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2}, \quad (3)$$

где s_{\max} – наибольшее стандартное отклонение в совокупности.

Рассчитанное значение C должно быть меньше 0,471 (критическое значение для критерия Кохрена при $p=15$ и $n=2$).

Полученные данные заносятся в таблицу 4.

Таблица 4 - Абсолютные разности, квадраты разностей, рассчитанный критерий Кохрена, расчетное значение повторяемости S_r

| Определение | Концентрация n-го уровня | | | | | |
|-------------|--------------------------|-------|--------------------|------------------------|--------------------------------------|-------|
| | x_1 | x_2 | (x_1-x_2) s | $(x_1-x_2)^2$ s^2 | Рассчитанный критерий Кохрена C | S_r |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| n | | | | | | |
| 15 | | | | | | |

Показатель повторяемости для методики устанавливается по наибольшему рассчитанному значению S_r из исследуемых уровней концентраций.

11.2.2 Определение промежуточной прецизионности.

Для расчета промежуточной прецизионности $S_{I(TO)}$ используют данные таблицы 3. Для определения потенциальных выбросов применяют критерий Граббса в соответствии с СТБ ИСО 5725-2-2005 п.7.3.4.1. Значения x_i располагают в порядке возрастания для $i=1, 2, \dots, p$. Рассчитывают G_1 и G_2 :

$$G_1 = (\bar{x} - x_1) / s \quad (4)$$

$$G_2 = (x_{15} - \bar{x}) / s \quad (5)$$

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (6)$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (7)$$

Рассчитанные значения G_1 и G_2 : должны быть меньше 2,549. (критическое значение для критерия Граббса при $p=15$).

Промежуточную прецизионность рассчитывают по формуле:

$$s_{I(TO)} = \sqrt{\frac{1}{t(n-1)} \sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (x_i - \bar{x}_j)^2}, \quad (8)$$

где $t=2$, $n=15$.

Результаты представляют в таблицах 5,6.

Таблица 5 - Проверка выбросов с помощью критерия Граббса

| i | Концентрация n-го уровня | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------------|---|------------------|-------------------|---|----------------|--------------------------|---|------------------|-------------------|---|------------------|
| | Концентрация 1-го уровня | | | | | | Концентрация 2-го уровня | | | | | |
| | x ₁ | (x ₁ -x _{ср}) ² | | x ₁ | (x ₁ -x _{ср}) ² | | x ₁ | (x ₁ -x _{ср}) ² | | x ₁ | (x ₁ -x _{ср}) ² | |
| 1 | | | G ₁ = | | | G ₁ | | | G ₁ = | | | G ₁ = |
| 2 | | | | | | | | | | | | |
| n | | | | | | | | | | | | |
| 15 | | | G ₂ = | | | G ₂ | | | G ₂ = | | | G ₂ = |
| | X _{ср} = | Σ= | | X _{ср} = | Σ= | | X _{ср} = | Σ= | | X _{ср} = | Σ= | |
| | | S= | | | S= | | | S= | | | S= | |

Таблица 6 - Расчет промежуточной прецизионности для значений n-уровня

| i | X ₁ | X ₂ | (X ₁ -X _{1ср}) ² | (X ₁ -X _{2ср}) ² | S _{I(ТО)} |
|----|------------------|------------------|--|--|--------------------|
| 1 | | | | | |
| 2 | | | | | |
| n | | | | | |
| 15 | | | | | |
| | X _{1ср} | X _{2ср} | Σ= | Σ= | |

Показатель промежуточной прецизионности для методики устанавливается по наибольшему рассчитанному значению S_{I(ТО)} из исследуемых уровней концентраций.

Критерием приемлемости служит сравнение полученных значений повторяемости и промежуточной прецизионности с установленными в методике (**не более установленных значений**).

В том случае, если методика ранее не валидирована, то полученные значения принимаются за установленные внутрилабораторные значения и могут быть рассчитаны пределы повторяемости и промежуточной прецизионности по формулам:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (9)$$

$$r_{I(ТО)} = 2,8 \times S_{I(ТО)} \quad (10)$$

11.3. Точность (степень извлечения) метода

Точность получаемых по данной методике результатов исследуется в условиях повторяемости путем анализа пробы с известной добавкой: добавка

исследуемого аналита в виде раствора стандартного вещества известной концентрации вносится непосредственно в пробу, которую затем подвергают исследованию в соответствии с методикой.

Величину степени извлечения метода Re_c получают как отношение результата измеренного содержания аналита в пробе с добавкой ($X_{доб}$) к расчетному количеству аналита в пробе с добавкой (γ) в соответствии с экспериментальными данными.

Выполняется по 10 параллельных определений ($n=10, t=2$).

$$Re_c = \frac{X_{доб}}{\gamma} \quad (11)$$

Устанавливают среднюю степень извлечения, стандартное отклонение и стандартную неопределенность соответственно по формулам:

$$\overline{Re_c} = \frac{\sum_{j=1}^p (Re_{c_{1j}} + Re_{c_{2j}})}{2n} \quad (12)$$

$$s(Re_c) = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (Re_{c_{1j}} - \overline{Re_c})^2 + \sum_{j=1}^n (Re_{c_{2j}} - \overline{Re_c})^2}{2n-1}} \quad (13)$$

$$u(\overline{Re_c}) = s(\overline{Re_c}) = \frac{s(Re_c)}{\sqrt{2n}} \quad (14)$$

$$u(\overline{Re_c})\% = \frac{u(\overline{Re_c})}{\overline{Re_c}} \times 100\% \quad (15)$$

Для установления того, значимо ли средняя степень извлечения отличается от 1, проводят проверку на значимость, используя статистический критерий t :

$$t = \frac{|1 - \overline{Re_c}|}{u(\overline{Re_c})}$$

Найденное значение t сравнивают с двусторонним критическим значением 5% точки распределения Стьюдента с $m-1=20-1$ степенями свободы (уровень доверия 95 %)

$$t_{crit} = 2,09$$

Результаты представляются в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты исследований по изучению степени извлечения

| γ | $X_{\text{доб1}}$ | $X_{\text{доб2}}$ | Rec_1 | Rec_2 | | |
|----------|-------------------|-------------------|---------|---------|------------------------|--|
| | | | | | \overline{Rec} | |
| | | | | | $s(Rec)$ | |
| | | | | | $u(\overline{Rec})$ | |
| | | | | | $u(\overline{Rec}) \%$ | |
| | | | | | t | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

Критерием приемлемости служит сравнение величины t с t_{crit} :

$(t < t_{crit})$.

11.4. Неопределенность измерения.

Для расчета неопределенности измерения необходимо провести следующие операции:

1. Описать математическую модель измерений;
2. Исходя из полученной модели выявить основные составляющие неопределенности измерений.

- Например: а) неопределенность, обусловленную случайными факторами (фактор повторяемости);
 б) неопределенность, обусловленную построением и использованием градуировочного графика;
 в) неопределенность, обусловленную смещением метода;
 г) неопределенность, обусловленную подготовкой пробы

Оценивание относительной стандартной неопределенности, обусловленной случайными факторами.

Учитывая, что результат измерения получают усреднением результатов двух параллельных определений, относительную стандартную неопределенность (ОСН) рассчитывают по формуле:

$$u_{F_{rep}} = \frac{S_r}{\sqrt{2}},$$

где S_r - показатель повторяемости, рассчитанный по формуле:

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^i (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}$$

Оценивание относительной стандартной неопределенности, обусловленной смещением метода.

При валидации методики максимальное значение относительной стандартной неопределенности, обусловленной смещением, устанавливается при изучении степени извлечения (таблица 7).

Оценивание неопределенности, обусловленной построением и использованием градуировочного графика

Неопределенность, связанная с построением и использованием градуировочного графика, обусловлена двумя составляющими:

1-я - неопределенность, обусловленная стандартным отклонением для концентрации градуировочных растворов $u_{гр.р-ров} = S_{xi}$.

Расчет стандартного отклонения для концентрации градуировочных растворов проводят по формулам:

$$S_{xi} = \frac{S_o}{b} \sqrt{\frac{1}{t} + \frac{\bar{y}_i^{-2}}{b^2 \sum x_i^2}}$$

$$S_{X(\% отн)} = \frac{S_{xi}}{X_i} \times 100$$

где, \bar{y}_i - измеренное среднее значение y для трех параллельных определений x_i концентрации;

t - количество параллельных измерений анализируемой пробы ($t=2$);

b - коэффициент регрессии прямой $y=bx$;

S_0 - дисперсия, характеризующая рассеяние результатов экспериментальных данных относительно построенной прямой, рассчитывается по формуле:

$$S_0 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - Y_i)^2}{m - 2}}$$

где y_i - опытное значение для i -той точки графика;

Y_i - расчетное (по уравнению $y=bx$) значение для i -той точки графика;

m - число точек на графике ($m=m'=m*n=5*3=15$):

2-я - неопределенность, обусловленная отклонением от приписанных исходных значений концентраций градуировочных растворов. Рассчитывается по формуле:

$$u(x) = \sqrt{\sum \left[\frac{u(x_i)}{n} \right]^2}$$

где n - количество градуировочных растворов ($n=5$);

$$u(x_i) = x_i \sqrt{\sum \left(\frac{u(V_j)}{V_j} \right)^2 + \sum \left(\frac{u(V_p)}{V_p} \right)^2 + \left(\frac{u(m)}{m} \right)^2 + \left(\frac{u(P)}{P} \right)^2}$$

где V_j – j -ый объем аликвотной части градуировочного раствора, взятый с помощью пипетки для разбавления;

$u(V_j)$ – стандартная неопределенность j -го объема V_j аликвотной части градуировочного раствора, взятой с помощью пипетки для разбавления;

V_p - объема колбы для приготовления градуировочного раствора;

$u(V_p)$ – стандартная неопределенность заполнения объема колбы V_p , при приготовлении градуировочного раствора;

m - масса чистого вещества, взятого для приготовления градуировочного раствора;

$u(m)$ – стандартная неопределенность массы чистого вещества, взятой для приготовления градуировочного раствора;

P - содержание основного действующего вещества, используемого для приготовления градуировочных растворов

$u(P)$ – стандартная неопределенность содержания основного действующего вещества, используемого для приготовления градуировочных растворов.

Суммарную относительную стандартную неопределенность градуировочного графика вычисляют по формуле:

$$u_{zx} = \sqrt{u_{xi}^2 + u_{X_i}^2}$$

Полученные данные заносят в таблицу 8.

Таблица 8 - Результаты исследований относительной стандартной неопределенности, обусловленной построением и использованием градуировочного графика.

| Концентрация градуировочного раствора x_i , ед. измерения | $u_{гр.р-ров}$, % | u_{xi} , % | $u_{гр.граф}$, % |
|---|--------------------|--------------|-------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |

Оценивание неопределенности, связанной с подготовкой пробы.

Математическая модель измерения, кроме представленных выше входных величин, оцененных по имеющимся данным по прецизионности и извлечению метода, включает составляющие неопределенности, связанные со взвешиванием пробы, взятой для анализа (u_{nm}) и измерением объемов (u_{nV}).

Значение u_n составляет:

$$u_n = \sqrt{u_{nm}^2 + u_{nV}^2}$$

где u_{nm} – относительная стандартная неопределенность, связанная со взвешиванием пробы.

Вычисляется по формулам:

$$u_{\text{весы}} = \frac{0,3}{\sqrt{3}} \times \sqrt{2} = 0,24$$

$$u_{nm} = \frac{u_{\text{весы}}}{m} \times 100\%$$

u_{nV} – относительная стандартная неопределенность, связанная с измерением объема.

Вычисляется по формулам:

$$u_{nV} = \sqrt{u_{V_o}^2 + u_{V_t}^2}$$

$$u(V_o) = \frac{\Delta_V}{\sqrt{6}}$$

$$u(V_t) = \frac{\zeta \times t \times V}{\sqrt{3}}$$

где ζ – коэффициент расширения растворителя;

t – отклонение температуры, при которой проводились измерения ($\pm 2^\circ\text{C}$)

V – объем анализируемого раствора.

Полученные данные заносят в бюджет неопределенности (таблица 9).

Таблица 9 - Бюджет неопределенности измерений

| Источник неопределенности | Тип оценки | Относительная стандартная неопределенность, % | |
|---|------------|---|--|
| | | | |
| Повторяемость результатов измерений | A | $u_{\text{Фrep}}$ | |
| Обработка пробы | B | $u_{\text{п}}$ | |
| Смещение | A | $u(\text{Rec})$ | |
| Построение и использование градуировочного графика | A | $u_{\text{ГХ}}$ | |
| Суммарная стандартная неопределенность ^{*)} | | u_c | |
| Расширенная неопределенность (k=2) | | U | |
| ^{*)} Суммарная стандартная неопределенность вычисляется по формуле: $u_c = \sqrt{\sum u_i^2}$ | | | |

12. Валидация методики определения патулина в свежих ягодах, плодах, овощах, фруктах.

Целью валидации является установление прецизионности и точности измерений по определению содержания патулина в свежих ягодах, плодах, овощах, фруктах, выполняемых в соответствии со стандартной операционной процедурой (СОП), в основу которой положен ГОСТ 28038-89.

Для установления линейности метода готовились 4 серии градуировочных растворов патулина в соответствии с СОП. Каждый градуировочный раствор подвергался хроматографическому анализу трижды.

По полученным результатам построен градуировочный график линейной зависимости $y=bx$ методом наименьших квадратов с помощью программы Excel.

Коэффициент корреляции составил 0,9997, что удовлетворяет критериям линейности.

Показатели прецизионности (повторяемость и промежуточная прецизионность) определялись на основе набранных статистических данных по результатам анализа образцов рабочих проб следующих продуктов с 3-мя уровнями концентраций:

- клубника свежая (содержание патулина 0,008 мг/кг);
- яблоки (содержание патулина 0,022 мг/кг);
- морковь (содержание патулина 0,058 мг/кг).

Проведено по 15 определений ($n=2$), выполненных с двумя изменяющимися факторами: время, оператор. Затем для каждой части диапазона были проведены статистические исследования прецизионности.

В таблице 10 представлены установленные значения повторяемости и промежуточной прецизионности СОП по определению патулина.

Таблица 10 – Установленные значения показателей повторяемости, промежуточной прецизионности, пределов повторяемости и промежуточной прецизионности СОП по определению патулина.

| Диапазон, мг/кг | S_r % | $S_{I(ТО)}$ % | r % | $r_{I(ТО)}$ % |
|--------------------|------------|------------------|-------------|------------------|
| 0,005 – 0,050 | 6,0 | 6,2 | 16,8 | 17,4 |

Точность результатов, получаемых по данной методике, исследовалась путем анализа пробы сока моркови с известной добавкой патулина в условиях повторяемости. Добавка патулина в виде раствора стандартного вещества концентрации 9,8 мкг/см³ вносилась непосредственно в пробу, которая затем подвергалась исследованию в соответствии с СОП. Точность определения (степень извлечения) составила 97 %.

Следующей стадией валидации является расчет неопределенности измерений, результаты которого представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Бюджет неопределенности измерений патулина

| Источник неопределенности | Тип оценки | Относительная стандартная неопределенность, % | |
|--|------------|---|-------------|
| | | | |
| Повторяемость результатов измерений массовой концентрации патулина в пробе | A | $u_{(Frep)}$ | 4,25 |
| Обработка пробы | B | $u_{п}$ | 0,93 |
| Извлечение | A | $u(Rec)$ | 3,45 |
| Построение и использование градуировочной характеристики | A | $u_{ГХ}$ | 19,0 |
| Суммарная стандартная неопределенность ^{*)} | | u_c | 19,8 |
| Расширенная неопределенность (k=2) | | U | 39,6 |
| ^{*)} Суммарная стандартная неопределенность вычисляется по формуле: $u_c = \sqrt{\sum u_i^2}$ | | | |

Таким образом, в результате проведения валидационных испытаний установлены следующие метрологические характеристики методики определения патулина в свежих ягодах, плодах, овощах, фруктах:

Диапазон определяемых концентраций 0,005 – 0,050 мг/кг;

Нижний предел измерения методики (LOQ) составляет 0,005 мг/кг;

Показатель повторяемости s_r – 6,0 %

Показатель промежуточной прецизионности $s_{I(TO)}$ – 6,2 %

Предел повторяемости (для двух результатов параллельных определений) r – 16,8 %

Предел промежуточной прецизионности (для двух результатов анализа) $r_{I(TO)}$ – 17,4 %

Точность определения (степень извлечения) составляет 97%.

Смещение метода незначимо.

Расширенная неопределенность ($k=2$) для нижней точки диапазона измерений U – 39,6 %

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | Стр. |
|--|------|
| Введение | 3 |
| Пример стандартной операционной процедуры «Валидация аналитических методик» | 3 |
| Цель | 3 |
| Область распространения | 4 |
| Ответственность | 4 |
| Определения | 4 |
| Нормативные ссылки | 5 |
| Выбор аналитических характеристик при валидации методики | 6 |
| Проведение валидации аналитических методик | 7 |
| Порядок выполнения валидации | 7 |
| Документирование валидации аналитических методик | 8 |
| Протокол о валидации | 8 |
| Валидационный отчет | 9 |
| Валидация методики определения патулина в свежих ягодах, плодах, овощах, фруктах. | 20 |
| Оглавление | 24 |

Учебное издание

Фурс Сергей Федорович
Башун Татьяна Васильевна
Бельшева Людмила Леонидовна

**ПРИМЕРЫ ВАЛИДАЦИИ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДИК В
САНИТАРНО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЯХ**

Учебно-методическое пособие

Ответственная за выпуск Башун Т.В.

Подписано в печать 27. 03. 2014. Формат 60x84/16. Бумага «Discovery»

Печать ризография. Гарнитура «Times New Roman».

Печ. л. 1,5. Уч.- изд. л. 1,14. Тираж 60 экз. Заказ 95.

Издатель и полиграфическое исполнение –

Белорусская медицинская академия последипломного образования.

Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/136 от 08.01.2014.

220013, г. Минск, ул. П. Бровки, 3.