

**Пригодность аналитических методов
для конкретного применения
Руководство для лабораторий
по валидации методов и смежным вопросам**

Второе издание

Киев 2016

ГП "Укрметртестстандарт"



Пригодность аналитических методов для конкретного применения

**Руководство для лабораторий
по валидации методов и смежным вопросам
Под редакцией Б. Магнуссона и У. Эрнемарка**

Киев – 2016

Издано ООО "Юрка Любченка"

УДК 543.06-047.44(083.744)=161.1
ББК 24.4я8
П75

Руководство Eurachem "Пригодность аналитических методов для конкретного применения. Руководство для лабораторий по валидации методов и смежным вопросам" под ред. Б. Магнуссона та У. Эрнемарка: перевод второго издания 2014 г. – К.: ООО "Юрка Любченка", 2016. – 96 с.

Настанова Eurachem "Придатність аналітичних методів для конкретного застосування. Настанова для лабораторій з валідації методів та суміжних питань": за ред. Б. Магнуссона та У. Ернемарка: переклад другого видання 2014 р. – К.: ТОВ "Юрка Любченка", 2016. - 96 с.

Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics: B. Magnusson and U. Örnemark (eds.): translation of the second edition, 2014 – Kyiv: LLC "Yurka Liubchenka", 2016. - 96 p.

ISBN 978-617-7221-14-1

В руководстве дано объяснение понятия "валидация метода", описано, какие характеристики определяют при валидации, как ее проводят, как применяют результаты валидации для внутреннего контроля качества, как следует излагать в документах аналитические методики и т.д.

Руководство ориентировано на специалистов в области метрологии и аналитической химии, а также преподавателей, аспирантов и студентов высших учебных заведений.

У настанові пояснено поняття "валідація методу", описано, які характеристики визначають під час валідації, як її проводять, як застосовують результати валідації для внутрішнього контролювання якості, як треба викладати у документах аналітичні методики тощо.

Настанова орієнтована на фахівців з метрології та аналітичної хімії, а також викладачів, аспірантів та студентів вищих навчальних закладів.

Guide explains the concept of method validation, performance characteristics evaluated in course of validation, how a method validation study should be performed, use of validation data in internal quality control, documentation of analytical methods, etc.

The Guide is aimed at professionals working in metrology and analytical chemistry, as well as university teachers, postgraduates, and students.

ISBN 978-617-7221-14-1

© 2014 Участники рабочей группы

© 2016 ГП "Укрметртестстандарт",

перевод на русский язык

**Пригодность аналитических методов
для конкретного применения
Руководство для лабораторий
по валидации методов и смежным вопросам**

Второе издание

Благодарность

Данный документ разработан рабочей группой Eurachem по валидации методов в сотрудничестве с другими привлеченными участниками. Список разработчиков документа приведен ниже.

Рабочая группа проекта

Vicki Barwick	LGC (Великобритания)
Pedro P. Morillas Bravo	Canal de Isabel II Gestión (Испания)
Stephen L. R. Ellison	LGC (Великобритания)
Joakim Engman	National Food Agency (Швеция)
Elin L. F. Gjengedal	Norwegian University of Life Sciences (Норвегия)
Ulla Oxenbøll Lund	Eurofins Miljø A/S (Дания)
Bertil Magnusson (редактор)	SP Technical Research Institute of Sweden (Швеция)
Hans-Thomas Muller	Mersin (Турция)
Marina Patriarca	Istituto Superiore di Sanità (Италия)
Barbara Pohl	Merck KGaA (Германия)
Piotr Robouch	Европейская комиссия (Европейский Союз)
Lorens P. Sibbesen (председатель)	Labquality International (Дания)
Elvar Theodorsson	University Hospital in Linköping (Швеция)
Florent Vanstapel	University Hospital Leuven, Leuven (Бельгия)
Isabelle Vercruyse	BELAB (Бельгия)
Aysun Yilmaz	Cevre Food and Industrial Analysis Laboratory (Турция)
Perihan Yolci Ömeroglu	Okan University (Турция)
Ulf Örnemark (редактор)	Emendo Dokumentgranskning (Швеция)

Авторские права ©

Авторские права принадлежат участникам разработки данного документа. Все запросы, касающиеся воспроизведения документа в любой форме, включая перевод, следует направлять в секретариат Eurachem. Копировать текст для перепродажи запрещено.

Название оригинала

B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Публикация доступна на www.eurachem.org.

Перевод с английского и научно-техническое редактирование

Технический комитет Украины ТК 122 "Анализ газов, жидких и твердых веществ",
ГП "Укрметрестандарт", Eurachem-Ukraine

М. Рожнов, канд. хим. наук (научный руководитель); Е. Левбарг; Е. Неустроева

Оглавление

Предисловие ко второму изданию.....	1
Предисловие к первому изданию	3
Сокращения и символы	4
1. Введение.....	6
1.1 Обоснование и сфера применения данного руководства	6
1.2 Замечания по применению данного руководства	7
1.2.1 Терминология	7
1.2.2 Краткие справки	9
2. Что такое валидация метода?	10
2.1 Определения	10
2.2 В чем разница между валидацией и верификацией?	11
3. Почему необходима валидация метода?	12
3.1 Важность аналитических измерений.....	12
3.2 Профессиональный долг химика-аналитика	12
3.3 Разработка метода	13
4. Когда методы нужно валидировать или верифицировать?	15
4.1 Валидация метода.....	15
4.2 Верификация метода.....	15
5. Как делают валидацию методов?	16
5.1 Кто выполняет валидацию методов?.....	16
5.1.1 Подходы к валидации методов	16
5.1.2 Межлабораторная валидация	16
5.1.3 Валидация в одной лаборатории.....	17
5.2 Объем валидационных исследований	17
5.3 Программа и протокол валидации.....	18
5.4 Средства валидации	19
5.4.1 Холостые образцы.....	19

5.4.2 Рутинные исследуемые пробы	20
5.4.3 Материалы/растворы с добавками.....	20
5.4.4 Материалы со связанными добавками	20
5.4.5 Эталоны	21
5.4.6 Статистика	22
5.5 Требования к валидации	22
5.6 Процесс валидации метода.....	22
6. Характеристики метода.....	26
6.1 Селективность.....	26
6.1.1 Термины и определения	26
6.1.2 Влияние помех.....	26
6.1.3 Оценка селективности	27
6.2 Предел обнаружения и предел количественного определения	29
6.2.1 Термины и определения	29
6.2.2 Определение стандартного отклонения на низких уровнях концентрации	30
6.2.3 Оценка LOD.....	34
6.2.4 Оценка LOQ.....	35
6.2.5 Альтернативные методики	36
6.2.6 Способность к обнаружению для качественного анализа	36
6.3 Рабочий диапазон	38
6.3.1 Определение	38
6.3.2 Общие замечания по проверке диапазона при валидации	38
6.3.3 Рабочий диапазон метода и прибора	38
6.3.4 Оценка рабочего диапазона прибора.....	39
6.3.5 Оценка рабочего диапазона метода.....	40
6.4 Аналитическая чувствительность.....	42
6.4.1 Определение	42
6.4.2 Применение.....	42
6.5 Правильность	42

6.5.1 Терминология для описания качества измерения	42
6.5.2 Определение смещения	44
6.5.3 Интерпретация результатов определения смещения	46
6.6 Прецизионность.....	49
6.6.1 Повторные измерения.....	49
6.6.2 Условия прецизионности.....	49
6.6.3 Пределы прецизионности	51
6.6.4 Одновременное определение сходимости и промежуточной прецизионности	51
6.7 Неопределенность измерения	53
6.8 Устойчивость	54
6.8.1 Определение	54
6.8.2 Проверка на устойчивость.....	54
7. Применение валидированных методов	56
8. Использование данных валидации для контроля качества	58
8.1 Введение.....	58
8.2 Внутренний контроль качества.....	58
8.3 Внешний контроль качества.....	60
9. Изложение валидированных методов.....	62
9.1 От проекта до окончательной версии.....	62
9.2 Рекомендации	62
9.2.1 Проверка правильности изложения.....	62
9.2.2 Рекомендации стандартов	63
9.2.3 Управление документацией	63
10. Использование данных валидации для расчета и представления результатов	65
Приложение А. Структура описания метода.....	67
Приложение В. Статистическое обоснование расчета предела обнаружения	74
Приложение С. Дисперсионный анализ (ANOVA).....	76
Приложение D. Замечания о качественном анализе.....	79
Библиография	83

Предисловие ко второму изданию

За время, прошедшее после выхода в свет в 1998 г. первого издания данного руководства, в области обеспечения качества аналитических измерений произошли важные изменения. Во-первых, были пересмотрены стандарты серии ISO 9000, которые широко используются как основа для систем управления качеством. основополагающие принципы этих стандартов являются неотъемлемой частью международных стандартов и руководств по оценке соответствия, которые устанавливают требования к компетентности лабораторий, провайдеров проверки квалификации (ПК) и производителей стандартных образцов (СО). Во всех этих документах подчеркнута важность применения валидированных методов.

Во-вторых, были разработаны или пересмотрены некоторые общие или отраслевые руководства по валидации методов. Законодательство ЕС содержит обязательные требования к аналитическим измерениям во многих отраслях.

В-третьих, сообщество аналитиков приложило немало усилий для внедрения концепции неопределенности. Например, в документе IUPAC "Гармонизированные рекомендации по валидации методов анализа в одной лаборатории" (2002 г.) содержится прогноз: "... по мере того как неопределенность измерений все более воспринимают как ключевой показатель, характеризующий и пригодность для конкретного применения, и достоверность результатов, химики-аналитики все чаще будут проводить валидацию методов измерений для оценки неопределенности ...". В последующие годы органы по аккредитации опубликовали основные принципы и руководящие документы, однозначно признающие возможность использования результатов валидации методов для оценки неопределенности измерений.

Кроме того, был существенно пересмотрен "Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и связанные с ними термины" (VIM) с учетом особенностей химических и биологических измерений. Несмотря на то, что терминология, относящаяся к валидации методов, еще далека от гармонизации, ситуация улучшилась. Также важно, что VIM является нормативным документом для лабораторий, аккредитованных, например, в соответствии с ISO/IEC 17025 и ISO 15189.

Целью второго издания данного Руководства является отражение изменений в международных стандартах и руководствах, и в нем уделено меньше внимания терминам и определениям. Вместо этого в руководстве даны ссылки на VIM и другие легко доступные источники. Соответственно, из приложений был исключен перечень терминов и определений. Список литературы, цитируемой в данном издании Руководства, приведен в разделе "Библиография" в конце документа. Дополнительные источники и литературу по

разработке и валидации методов можно найти в "Списке для чтения" ("Reading list") в разделе "Публикации" ("Publications") на сайте Eurachem www.eurachem.org. Приложение А было пересмотрено в соответствии с изменениями, внесенными в стандарт ISO 78-2. Кроме того, настоящее издание дополнено информацией о статистическом обосновании расчета предела обнаружения (Приложение В), дисперсионном анализе (Приложение С) и качественном анализе (Приложение D).

В рядовых лабораториях, особенно в клиническом секторе, все чаще используют серийно выпускаемые измерительные системы. Это означает, что ответственность за валидацию несет, главным образом, производитель. Работа лаборатории будет состоять в проверке характеристик, указанных производителем, и демонстрации того, что метод работает у конечного пользователя.

Тем не менее, возвращаясь к предисловию к первому изданию, можно сказать, что шесть принципов, изложенные в нем, остаются актуальными и согласуются с требованиями международных стандартов, в частности, ISO/IEC 17025.

Предисловие к первому изданию*

В ходе кампании по распространению в Великобритании надлежащей практики аналитических измерений были сформулированы шесть принципов, совокупность которых образует "правила наилучшей практики". Этими принципами, которые более подробно описаны в отдельном руководстве,[†] являются:

1. "Аналитические измерения должны удовлетворять согласованным требованиям" (т.е. поставленной цели).
2. "Аналитические измерения должны проводиться с использованием методов и средств, пригодность которых для конкретного применения была проверена".
3. "Персонал, выполняющий аналитические измерения, должен быть достаточно квалифицированным и компетентным для выполнения поставленной задачи" (и продемонстрировать, что он может выполнять анализ должным образом).
4. "Должна проводиться регулярная независимая оценка технических показателей работы лаборатории".
5. "Результаты аналитического измерения, полученные в одной лаборатории, должны быть сопоставимы с результатами, полученными в других лабораториях".
6. "Организации, выполняющие аналитические измерения, должны иметь четко определенные процедуры контроля и обеспечения качества".

Эти принципы в равной мере относятся как к лабораториям, работающим самостоятельно, так и к тем, чьи результаты должны быть сопоставлены с результатами других лабораторий.

Основной задачей данного документа является содействие лабораториям в осуществлении принципа №2, и, соответственно, он содержит рекомендации по оценке методов испытаний с целью демонстрации их пригодности для конкретного применения.

* Первое издание (1998 г.) настоящего руководства было подготовлено рабочей группой Eurachem на основе проекта, предложенного LGC. Членами рабочей группы Eurachem в то время были: D. Holcombe, P. De Bièvre, D. Böttger, C. Eastwood, J. Hlavay, M. Holmgren, W. Horwitz, M. Lauwaars, B. Lundgren, L. Massart, J. Miller, J. Morkowski, B. te Nijenhuis, B. Nyeland, R. Philipp, P. Radvila, J. Smeyers-Verbeke, R. Stephany, M. Suchanek, C. Vandervorst, H. Verplaetse, H. Wallien, M. Walsh, W. Wegscheider, D. Westwood, H. J. van de Wiel.

[†] The manager's guide to VAM, UK Department of Trade and Industry, Valid Analytical Measurement Programme. Опубликовано как VAM Principles M. Sargent. Anal. Proc., 1995, 32, 201-202.

Сокращения и символы

В данном руководстве использованы следующие аббревиатуры, акронимы и символы:

AMC	Комитет по аналитическим методам
ANOVA	дисперсионный анализ
AOAC International	всемирно признанная организация, разрабатывающая стандарты
ASTM International	всемирно признанная организация, разрабатывающая стандарты
BIPM	Международное бюро мер и весов
CCQM	Консультативный комитет по количеству вещества – метрологии в химии
CEN	Европейский комитет по стандартизации
CITAC	Сотрудничество по международной прослеживаемости в аналитической химии
CLSI	Институт клинических и лабораторных стандартов
CRM	аттестованный стандартный образец
EA	Европейское сотрудничество по аккредитации
EC	Европейская комиссия
EPA	Агентство по защите окружающей среды
EQA	внешняя оценка качества
EU	Европейский союз
GUM	Оценка результатов измерений. Руководство по выражению неопределенности измерений
ICH	Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для человека
IEC	Международная электротехническая комиссия
ISO	Международная организация по стандартизации
IUPAC	Международный союз теоретической и прикладной химии
JCGM	Объединенный комитет по руководствам в метрологии
LOD	предел обнаружения
LOQ	предел количественного определения
NATA	Национальная ассоциация органов по испытаниям
QA	обеспечение качества
QC	контроль качества
RSC	Королевское химическое общество
SANCO	Генеральный директорат Европейской комиссии по здравоохранению и защите прав потребителей
SOP	стандартная операционная процедура
PT	проверка квалификации
RM	стандартный образец
RSD	относительное стандартное отклонение
UV/VIS	ультрафиолетовый/видимый
VIM	Международный словарь по метрологии. Основные и общие понятия и связанные с ними термины

b	абсолютное смещение
b (%)	относительное смещение, %
k_Q	коэффициент, используемый при расчете предела количественного определения
m	количество измерений
n	количество повторных результатов наблюдений, усредняемых при представлении результатов
n_b	количество результатов холостых опытов, усредняемых при расчете поправки на холостой опыт
r	предел сходимости
R	предел воспроизводимости
R (%)	степень извлечения (эффективная степень извлечения), %
R' (%)	степень извлечения добавки, %
s	стандартное отклонение
s_0	оценка стандартного отклонения единичных результатов для нулевой или близкой к нулю концентрации
s'_0	стандартное отклонение, используемое для вычисления LOD или LOQ
s_I	стандартное отклонение промежуточной прецизионности
s_r	стандартное отклонение сходимости
s_R	стандартное отклонение воспроизводимости
u	стандартная неопределенность
$\bar{x}$	среднее значение (среднее арифметическое)
x_{ref}	опорное значение
$\bar{x}_{ref}$	среднее значение результатов измерений, полученных альтернативным методом, например, референтным методом
$\bar{x}'$	среднее значение для образца с добавкой в эксперименте по определению степени извлечения
x_{spike}	добавленная концентрация в эксперименте по определению степени извлечения

1. Введение

1.1 Основание для разработки и сфера применения данного руководства

Валидация методов является существенной и необходимой частью работы аналитической лаборатории. Большинство химиков-аналитиков осознают ее важность, однако не всегда понимают, почему и когда ее следует проводить и что именно при этом нужно делать. Некоторые аналитики рассматривали валидацию метода как нечто такое, что можно делать только в сотрудничестве с другими лабораториями, и, следовательно, не проводили ее. Прояснению этого вопроса способствовали требования таких стандартов, как ISO/IEC 17025 [1], ISO 15189 [2] и ISO 15195 [3]. Например, необходимость демонстрации того, что методы соответствуют поставленной задаче, содержится в п. 5.4.2 ISO/IEC 17025: *"Лаборатория должна использовать методы испытаний и/или калибровки, включая методы отбора проб, которые соответствуют требованиям заказчика и которые подходят для испытаний и/или калибровок, выполняемых лабораторией ..."*, и далее: *"Если заказчик не указывает метод, который следует использовать, лаборатория должна сама выбрать подходящие методы ..."*.

Задача данного руководства – рассмотреть вопросы, связанные с валидацией методов, и помочь читателю лучше понять, в чем она состоит, почему важна и дать некоторое представление о том, как ее можно осуществить.

Данное руководство может быть наиболее полезно для а) руководителей лабораторий, ответственных за надлежащую валидацию методов, применяемых их лабораториями, а также б) аналитиков, ответственных за планирование и выполнение исследования методов с целью их валидации. Для других сотрудников руководство может быть полезно как источник базовой информации: для старшего персонала – с точки зрения управления, для младшего – с технической и образовательной точки зрения. В руководстве рассматривается, главным образом, валидация метода в одной лаборатории. Цель руководства – нацелить читателя на ознакомление с установленными протоколами валидации, а для тех случаев, где они отсутствуют, дать доступное введение в процессы, которые охватывает валидация, и представить некоторые основные принципы, позволяющие разработать собственные подходы к валидации. Руководство содержит ссылки на дополнительные материалы по конкретным техническим аспектам валидации.

Настоящее руководство посвящено валидации количественных методов. Тем не менее, некоторые принципы, описанные здесь, также применимы к качественным методам

обнаружения одного или более аналитов, например, понятия селективности и предела обнаружения (LOD).

В руководстве не рассмотрены подробно статистические методы, хотя, несомненно, тем, кто обладает практическими навыками применения элементарной статистики, будет проще понять и реализовать процесс валидации метода. В руководстве приведены несколько ссылок на публикации по основам статистики для химиков [4, 5, 6].

У аналитиков могут возникнуть сложности в понимании валидации метода из-за того, что многие метрологические и технические термины, используемые для описания процессов оценивания метода, отличаются в разных областях применения аналитических измерений – как по значению, так и по способу их определения. Данное руководство не позволяет определить, насколько корректно использован где-то тот или иной термин, хотя оно и должно внести некоторую ясность. Лучше всего при использовании термина, который может быть истолкован неверно, сослаться на источник и принятое соглашение.

Когда речь идет о валидации метода, неявным образом подразумевают, что исследования с целью определения характеристик метода* выполняют с помощью оборудования, которое соответствует техническим требованиям, исправно работает и должным образом откалибровано. В связи с этим данное руководство не касается отдельно понятий "оценка оборудования" или "оценка прибора". Аналогично считается, что аналитик, проводящий исследования, является компетентным в конкретной области и обладает достаточными специальными знаниями, чтобы принимать правильные решения по результатам, полученным в процессе исследования.

1.2 Замечания по применению данного руководства

1.2.1 Терминология

При пересмотре настоящего руководства основное внимание мы уделили обновлению терминологии и библиографических ссылок, чтобы учесть изменения, произошедшие в течение пятнадцати лет после публикации его первого издания. В терминологии мы придерживались, по возможности, 3-го издания VIM, впервые опубликованного в 2007 г. [7, 8]. Чтобы отразить термины, которые обычно используют в аналитических лабораториях, дополнительно была использована, при необходимости, терминология из

* Характеристики метода часто также называют "параметрами метода", "метрологическими характеристиками" и "рабочими характеристиками".

ISO/IEC 17025:2005 [1], других документов ISO [9, 10, 11] и Гармонизированного руководства IUPAC по валидации в одной лаборатории от 2002 г. [12].

В некоторых случаях, когда существуют несколько сходных терминов, бывает трудно решить, какой из них следует применить. Для ясности изложения было решено использовать термины однозначно во всем тексте руководства. В качестве примера можно привести термин, которым называют документ с подробным описанием метода, подлежащего валидации с участием персонала и применением оборудования конкретной лаборатории. Для процедур количественного анализа в VIM использован термин "методика измерения", в ISO/IEC 17025 – "метод", в ISO 15189 [2] – "методика исследования", а многие лаборатории ссылаются на свои "стандартные операционные процедуры" (SOP). Рабочая группа приняла решение придерживаться стандарта ISO/IEC 17025 и использовать общий термин "метод". Таким образом, в настоящем руководстве использован общепринятый термин "валидация метода", хотя правильнее было бы говорить "валидация методики".

При выборе между терминами "ruggedness" и "robustness" (оба означают "устойчивость"), а также между "selectivity" ("селективность") и "specificity" ("специфичность") [13] предпочтение было отдано первым вариантам, так как именно их использует IUPAC [12].

Работы, выполняемые в лаборатории, называют по-разному, например, "калибровка", "измерение", "испытание", "анализ" и "исследование". В настоящем руководстве в качестве общего термина использован "анализ", а при необходимости указаны конкретные особенности. Кроме того, в руководстве часто говорится об измеренной концентрации, хотя в химической лаборатории регулярно измеряют и другие величины [14].

Когда говорят об отборе проб, их подготовке и анализу, используют такие термины, как "целевой объект", "первичная проба", "инкремент", "составная проба", "промежуточная проба", "лабораторная проба", "тестовый образец", "тестовая порция" и "тестовый раствор" [15, 16]. В этом руководстве, как правило, мы используем общий термин "проба" или "тестовый образец"* [17]. Наиболее важные термины, используемые в руководстве, определены в тексте. Там, где это возможно, были приведены определения из VIM, ISO 9000 [9] и IUPAC [17, 18]. Термины из VIM, связанные с аналитической химией, дополнительно разъяснены в Руководстве Eurachem "Терминология в аналитических измерениях" [8]. Следует отметить, что до сих пор нет полного согласия в определении некоторых терминов, используемых в отношении валидации методов.

* Тестовый образец – образец, приготовленный из лабораторной пробы, из которого извлекают тестовые порции для испытания или анализа [17].

1.2.2 Краткие справки

В разделе 6 в затемненных таблицах содержатся "краткие справки" по определению конкретных характеристик метода. Следует, однако, признать, что во многих случаях лаборатории не располагают достаточными временем и ресурсами для проведения столь тщательных экспериментов. Выполнение операций, описанных в этих таблицах, с меньшим количеством повторов позволит все же получить полезную информацию и, конечно, это лучше, чем ничего не делать совсем. Тем не менее, эта информация будет менее надежна, чем полученная при полном количестве повторов.

2. Что такое валидация метода?

2.1 Определения

Определения *валидации*, взятые из трех международных документов, приведены в таблице 1.

Таблица 1. Определения понятия "валидация" в ISO 9000, ISO/IEC 17025 и VIM

Определение	Ссылка
Подтверждение путем предоставления объективных доказательств того, что требования, установленные для конкретной задачи или применения, были выполнены	ISO 9000 [9] ^a
Подтверждение путем исследования и предоставления объективных доказательств того, что определенные требования, установленные для конкретного применения, выполняются.	ISO/IEC 17025 [1]
Верификация, при которой установленные требования соответствуют предполагаемому применению.	VIM [7] ^b
^a ISO 9000 определяет "процесс квалификации" как "процесс демонстрации способности выполнить установленные требования". ^b VIM определяет "верификацию" как "предоставление объективных доказательств того, что данный объект соответствует установленным требованиям".	

Валидация метода – это по сути своей процесс установления аналитических требований и подтверждения того, что возможности рассматриваемого метода соответствуют поставленной задаче. Неотъемлемой частью этого является оценивание характеристик метода. Важным моментом в данном определении является оценка пригодности метода; в прошлом валидация метода, как правило, сводилась только к оцениванию его характеристик.

Принято считать, что валидация очень тесно связана с разработкой метода. Действительно, многие характеристики метода (Таблица 2), определяемые при валидации, обычно оценивают, хотя бы приблизительно, в ходе его разработки. Тем не менее, следует помнить о необходимости формальной валидации окончательного варианта метода (документированной методики).

В некоторых отраслях используют понятия "первичная валидация" и "вторичная валидация", последнее – в смысле верификации [19]. Понятия "квалификация" и "метрологическое подтверждение" [20] также, по всей видимости, охватывают верификацию (см. таблицу 1).

Таблица 2. Перечень характеристик, которые, как правило, оценивают при валидации метода

Характеристики
Селективность
Предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ)
Рабочий диапазон
Аналитическая чувствительность
Правильность • смещение, степень извлечения
Прецизионность • сходимость, промежуточная прецизионность и воспроизводимость
Неопределенность измерений ^a
Устойчивость (робастность)
^a Строго говоря, неопределенность измерения является не характеристикой конкретной методики измерения, а свойством результатов, полученных с помощью этой методики.

2.2 В чем разница между валидацией и верификацией?

ISO 9000 [9] определяет верификацию как "подтверждение путем предоставления объективных доказательств того, что установленные требования были выполнены". Это очень близко к определению валидации из Таблицы 1. Согласно VIM [7], верификация – это "предоставление объективных доказательств того, что данный объект соответствует установленным требованиям", а валидация – это "верификация, при которой установленные требования соответствуют предполагаемому применению".

Лаборатория может воспользоваться валидированной методикой, которая, например, была опубликована как стандарт, или приобрести для конкретного применения готовую измерительную систему у производителя. В обоих случаях основная работа по валидации уже была выполнена, но лаборатория все равно должна подтвердить свою способность применять метод. Такое подтверждение является **верификацией**. Это значит, что нужно выполнить некоторые эксперименты, которые подтвердят, что метод нормально работает в лаборатории конечного пользователя. Тем не менее, объем работ, по всей вероятности, будет значительно меньшим по сравнению с валидацией метода, разработанного в лаборатории.

Термины "валидация" и "верификация" также рассмотрены в руководстве Eurachem по терминологии аналитических измерений [8].

3. Почему необходима валидация метода?

3.1 Важность аналитических измерений

Каждый день в тысячах лабораторий по всему миру выполняют миллионы испытаний, измерений и исследований. Существует множество причин для их проведения, например: оценка товара в торговых целях; потребности здравоохранения; проверка качества питьевой воды, пищевых продуктов и кормов; анализ элементного состава сплава в целях подтверждения его пригодности для применения в авиастроении; судебная экспертиза биологических жидкостей в уголовных делах. Практически все аспекты жизни общества тем или иным образом связаны с аналитическими исследованиями.

Стоимость этих измерений высокая, а решения, принятые на основании полученных результатов, могут вызвать дополнительные затраты. Например, следствием испытаний, в результате которых продукты питания были признаны непригодными для употребления, может быть иск о компенсации ущерба; исследование, подтвердившее наличие запрещенных препаратов, может повлечь за собой штраф, тюремное заключение, а в некоторых странах – даже смертную казнь. Совершенно очевидно, насколько важно корректно выполнить измерение и быть в состоянии доказать правильность полученных результатов.

3.2 Профессиональный долг химика-аналитика

Если результатам исследования нельзя доверять, значит, пользы от него мало, и его можно было вообще не проводить. Когда лаборатории поручают аналитическое исследование, исходят из того, что она имеет уровень компетентности, которым сам заказчик не обладает. Заказчик предполагает, что он может доверять представленным результатам, и, как правило, ставит их под сомнение лишь тогда, когда возникают разногласия. Таким образом, лаборатория и ее персонал бесспорно обязаны оправдать доверие заказчика, дав правильный ответ на аналитическую часть задачи, или, другими словами, результаты, для которых можно продемонстрировать "пригодность для конкретного применения". Это подразумевает, что испытания, выполненные лабораторией, соответствуют аналитической части задачи, которую желает решить заказчик, и что в окончательном протоколе результаты анализа представлены таким образом, что заказчик может их легко понять и сделать на их основании соответствующие выводы. Валидация метода позволяет химикам продемонстрировать его "пригодность для конкретного применения".

Чтобы аналитический результат соответствовал поставленной цели, он должен быть достоверным до такой степени, чтобы на его основании можно было уверенно принимать

решение. Таким образом, характеристики метода должны быть подтверждены, а неопределенность результата – оценена с заданным доверительным уровнем. Способы оценки и представления неопределенности должны быть общепризнанными, внутренне непротиворечивыми и легко понятными [21]. Бóльшая часть информации, необходимая для оценки неопределенности, может быть получена при валидации метода. Этот вопрос кратко рассмотрен в разделе 6.7 и более подробно – в руководстве Eurachem/CITAC "Количественная оценка неопределенности в аналитических измерениях" [22].

Как бы ни был метод совершенен, а персонал – квалифицирован, аналитическая задача может быть решена путем анализа проб только при условии, что эти пробы отобраны в соответствии с поставленной задачей. Правильный отбор проб – это работа, требующая высокой квалификации, понимания конкретной задачи и связанных с ней разделов химии. В рамках поддержки заказчиков лаборатории должны, по возможности, давать им рекомендации по отбору проб. Здесь, конечно, речь идет о случаях, когда сами лаборатории не могут отбирать пробы или каким-либо образом влиять на отбор проб. В этих случаях результаты анализа будут относиться к пробам, которые предоставил лаборатории заказчик, и этот момент должен быть четко отражен в протоколе.

Понятно, что основное внимание мы уделили основной цели валидации метода, т.е. демонстрации того, что метод "пригоден для конкретного применения". Тем не менее, следует отметить, что исследования в процессе валидации метода приносят дополнительную пользу лаборатории, проводящей валидацию. Они позволяют приобрести прочные знания и практические навыки реализации метода, в том числе понимание всех критически важных этапов процесса. Валидация добавляет лаборатории и ее персоналу уверенности в полученных результатах.

3.3 Разработка метода

Валидации предшествует стадия разработки, в которой может участвовать различный персонал и которая может принимать разные формы.

Один крайний случай – это адаптация существующего метода путем внесения незначительных изменений, которые позволяют применить его для решения новой задачи. Например, метод определения толуола в воде может быть разработан путем адаптации стандартизованного метода определения бензола в воде. Матрица здесь одна и та же, а свойства этих двух аналитов во многом сходны. Вполне вероятно, что принципы отделения, идентификации и количественного определения, применяемые к бензолу, можно также применить к толуолу. С другой стороны, если нужно определять бензол в почве, адаптация метода определения бензола в воде может быть не лучшим вариантом. Возможно, для

определения органических веществ в почве лучше было бы взять за основу какой-то другой метод.

В другом крайнем случае химик-аналитик может начать с некоторых общих идей и, применив свои знания и опыт, разработать подходящий метод. Ясно, что это потребует гораздо больших усилий, а степень уверенности в успехе разработки будет значительно меньшей. Довольно часто при разработке метода одновременно рассматривают нескольких вариантов и в итоге выбирают из них наилучший.

Независимо от того, сколько усилий вложено в процесс разработки метода, нет никакой гарантии, что он будет работать нормально во время валидации (или в обычных условиях в конкретной лаборатории). Если в разработке и валидации участвуют разные сотрудники, это позволяет проверить, насколько инструкции (методика измерения) понятны и могут быть реализованы на практике.

4. Когда методы нужно валидировать или верифицировать?

4.1 Валидация метода

Метод валидируют, когда необходимо убедиться в том, что его характеристики подходят для конкретного применения. Например, в п. 5.4.5.2 ISO/IEC 17025 [1] указано, что лаборатория должна валидировать:

- нестандартные методы;
- методы, созданные/разработанные в лаборатории;
- стандартные методы, используемые вне их установленной сферы применения;
- расширения и модификации стандартных методов.

Объем работ по валидации должен быть достаточным для выполнения требований, связанных с определенной задачей или применением [23]. Степень ("масштаб", "область распространения") валидации зависит от конкретного применения, характера внесенных изменений и условий, в которых метод будут применять.

Валидация также необходима, когда нужно подтвердить эквивалентность результатов, полученных двумя методами, например, вновь разработанным и существующим стандартным/нормативным.

4.2 Верификация метода

Если лаборатория использует стандартные (стандартизованные) методы, например, опубликованные ISO или ASTM, она может не делать их валидацию. Тем не менее, лаборатория должна проверить ("верифицировать") характеристики метода согласно п. 5.4.2 ISO/IEC 17025:

"... Лаборатория должна подтвердить, что она может правильно использовать стандартные методы, прежде чем приступить к испытаниям или калибровке".

Верификация также необходима при внесении существенных изменений, например, при замене прибора на аналогичный новый, перемещении оборудования и т.д.

В лабораторной медицине большинство измерений и испытаний выполняют с помощью серийных методик, которые уже были валидированы производителем, но которые должен проверить конечный пользователь [24]. В ISO 15189 [2] подчеркнуто, что *"методики исследования, используемые без изменений, подлежат независимой верификации лабораторией перед введением их в повседневное использование"*. Это также относится к тем случаям, когда в приборе обновлено программное обеспечение или когда при контроле качества установлено, что характеристики применяемого метода изменяются со временем.

5. Как делают валидацию методов?

5.1 Кто выполняет валидацию методов?

5.1.1 Подходы к валидации методов

По завершении начального этапа разработки метода лаборатория должна составить детальный документ на методику измерения (см. Приложение А). Именно эта изложенная в документе методика является объектом формальной валидации.

Есть два основных подхода к валидации метода: валидация с помощью межлабораторных сличений и валидация в одной лаборатории. Независимо от подхода, ответственной за обеспечение соответствия метода поставленной задаче и, при необходимости, проведение дальнейших работ с целью получения новых данных в дополнение к имеющимся результатам валидации является лаборатория, применяющая этот метод.

5.1.2 Межлабораторная валидация

Валидации метода путем специально организованных межлабораторных сличений, которые часто называют "совместными исследованиями" ("collaborative studies") или "коллективными исследованиями" ("cooperative studies"), посвящено множество публикаций. Существует ряд документов, относящихся к такого рода валидации [25, 26, 27, 28], а также стандарты ISO 5725 [29], которые можно считать наиболее общеприменимыми. Когда разрабатывают метод для широкого применения, который, возможно, будет опубликован как стандартная методика, тогда, очевидно, предпочтительным способом проведения валидации является совместное исследование с участием группы лабораторий. С помощью такой валидации будет подтверждена устойчивость стандартного метода. Опубликованная информация обычно содержит оценки прецизионности (сходимость, воспроизводимость и/или соответствующие пределы прецизионности) и, в некоторых случаях, смещения. Если метод валидирован организациями, которые издаются стандарты, например, ISO, CEN или AOAC International, пользователю, как правило, достаточно проверить опубликованные данные по характеристикам и/или установить характеристики метода для собственного применения. Следовательно, при таком подходе снижаются трудозатраты лаборатории, которая использует метод.

5.1.3 Валидация в одной лаборатории

В практике лабораторий случаются ситуации, когда нужно применить какой-либо метод, но он отсутствует в виде опубликованного стандарта. Если метод разработан для применения в одной лаборатории, например, из-за отсутствия общего интереса к данному методу или из-за того, что другие лаборатории являются конкурентами, тогда оправданной будет валидация в одной лаборатории [12].

Возможность применения методов, валидированных в одной лаборатории, для регуляторных целей зависит от действующих руководящих документов, касающихся определенной области измерений. Как правило, официальное разъяснение может дать соответствующий регуляторный орган.

5.2 Объем валидационных исследований

Лаборатория должна определить, какие характеристики нужно исследовать для валидации метода (см. таблицу 2 и раздел 6) и, в некоторых случаях, насколько тщательно нужно исследовать каждую характеристику. В Протоколе IUPAC [12] перечислен ряд ситуаций с учетом, среди прочего, статуса метода и компетентности лаборатории.

Если сфера аналитических работ четко определена и выполняемые задачи все время одни и те же, организация или подразделение могут издавать общие рекомендации по объему валидационных исследований. В таблице 3 приведен пример из фармацевтической отрасли.

Хорошей основой для планирования валидации может быть внимательное рассмотрение аналитических требований, приведенных в разделе "Область применения" документа на методику (см. А.5 в Приложении А), но следует признать, что на практике проверить их полностью не всегда возможно. Оценка характеристик метода может быть ограничена различными факторами. Это признано в ISO/IEC 17025, п. 5.4.5.3: *"Валидация - это всегда компромисс между затратами, риском и техническими возможностями"*. В рамках накладываемых ограничений лаборатория должна сделать максимум возможного, принимая во внимание требования заказчиков и нормативных документов, накопленный опыт применения метода, имеющиеся технические средства (раздел 5.4), а также необходимость в метрологической совместимости [7] с другими подобными методами, которые уже использует эта или другие лаборатории. Некоторые характеристики могут быть приблизительно определены в ходе разработки метода или его внедрения. Часто из определенной совокупности экспериментов можно получить данные о нескольких характеристиках, и тогда рациональное планирование позволит избежать излишней затраты усилий на получение необходимой информации.

Таблица 3. Объем валидации для четырех типов аналитических задач. Пример взят из фармацевтической отрасли [13]. Значком 'х' отмечены характеристики, обычно определяемые при валидации

Характеристики	Тип аналитической задачи			
	Обнаружение	Количественное определение примесей	Проверка на соответствие предельному содержанию примесей	Количественное определение основного компонента
Селективность	X	X	X	X
Предел обнаружения			X	
Предел количественного определения		X		
Рабочий диапазон, включая линейность		X		X
Правильность (смещение)		X		X
Прецизионность (сходимость и промежуточная прецизионность)		X		X
Примечание. Таблица упрощена и адаптирована к структуре и терминологии, используемой в настоящем руководстве.				

Рассмотреть ограничения, о которых шла речь выше, особенно важно в тех случаях, когда метод не предполагают использовать регулярно. Процесс валидации методов, применяемых на регулярной основе, описан сравнительно хорошо. Очевидно, что к эпизодическим анализам применимы те же принципы, что и к регулярным. Полученные результаты должны обладать должным уровнем достоверности. Достичь баланса между затратами времени и средств, с одной стороны, и необходимостью валидации – с другой, довольно сложно. В некоторых случаях имело бы смысл передавать выполнение анализов в другую лабораторию, которая делает их регулярно.

5.3 Программа и протокол валидации

Валидацию нужно выполнять и представлять ее результаты в соответствии с документированной процедурой.

Требования к программе валидации и форме протокола могут быть приведены в отраслевых руководящих документах (см. 5.5). Минимальные требования к документам по валидации могут устанавливать национальные органы по аккредитации [23]. Простой шаблон для объединенных программы валидации и протокола валидации может состоять, например, из следующих разделов.

- **Название.** В этом разделе нужно указать метод, а также – кто и когда выполняет эту работу. Следует дать краткую информацию о сфере применения метода и краткое его описание, а также привести сведения о статусе метода (например, международный стандарт, метод, разработанный в лаборатории и т.д.), аналите, измеряемой величине, единице измерения, типах проб и назначении. Отбор проб и промежуточных проб может быть частью методики измерения, и в таких случаях эти операции нужно валидировать. Даже если эти этапы валидации выполняют в другом месте, информацию о них целесообразно включать в программу/протокол валидации.
- **Планирование.** В этом разделе следует указать цель, например: полная валидация нового метода, верификация характеристик стандартизированного метода, расширение области применения метода и т.д. Необходимо указать объем работ по валидации, т.е. перечень характеристик, которые будут исследованы, а также какие-либо сопутствующие требования.
- **Характеристики.** В этом разделе должно быть дано краткое пояснение характеристик, повторно приведены конкретные требования, описание планируемых экспериментов и методов оценки результатов. Должны быть приведены результаты и выводы по результатам экспериментов. Каждую характеристику описывают в отдельном пункте.
- **Выводы.** В последнем разделе должны быть подытожены работы по валидации и результаты исследований. Могут быть представлены выводы относительно регулярного применения метода, внутреннего и внешнего контроля качества. И что наиболее важно, здесь должен быть заключительный вывод о пригодности метода для конкретного применения. Отметим, что такое требование есть в ISO/IEC 17025 [1].

5.4 Средства валидации

5.4.1 Холостые образцы

Используя различные типы холостых образцов, можно оценить, какая часть измеренного сигнала обусловлена наличием аналита, а какая – другими причинами. Существуют различные типы холостых образцов:

- **холостые реактивы*:** реактивы, используемые в процессе анализа (в т.ч. растворители, применяемые для экстрагирования или растворения), анализируют, чтобы определить, дают ли они вклад в измерительный сигнал.

* Холостой реактив, к которому применяют аналитическую методику в целом, иногда называют "холостым образцом методики" ("procedural blank")

- **холостые пробы:** это, по существу, матрица пробы, в которой отсутствует аналит, например, проба мочи человека, не содержащая определенного вида наркотиков, или проба мяса без остаточных гормонов. Холостые пробы иногда трудно получить, но такие материалы необходимы для правильной оценки возможного влияния матрицы на результаты анализа проб.

5.4.2 Рутинные исследуемые пробы

Рутинные (обычные) исследуемые пробы полезны тем, что с их помощью можно получить значения характеристик прецизионности, влияния матрицы и т.д., которые могут реально иметь место при регулярном применении метода. Если содержание аналита в исследуемом материале точно известно, его можно использовать для оценки смещения результатов измерения. Точную оценку содержания аналита можно получить с помощью референтного метода, хотя такие методы не всегда существуют.

5.4.3 Материалы/растворы с добавками

Это материалы или растворы, в которые преднамеренно добавляют определяемый аналит (аналиты). Эти материалы и растворы могут уже содержать определяемый аналит, поэтому необходимо обращать внимание на то, чтобы после внесения добавки содержание аналита не выходило за пределы рабочего диапазона метода. Добавление известного количества аналита позволяет измерить соответствующее увеличение выходного сигнала и рассчитать его отношение к добавленному количеству, несмотря на то, что абсолютное количество аналита до и после внесения добавки не известно. Следует отметить, что в большинстве вариантов метода добавки аналит вносят таким образом, что он будет связан с матрицей пробы не так сильно, как в реальных образцах. Следовательно, можно ожидать, что оценки смещения, полученные методом добавок, будут слишком оптимистичными.

Добавкой не обязательно должен быть только определяемый аналит. Это могут быть любые компоненты, добавляемые в пробу для оценки их влияния. Например, в пробу можно добавлять разное количество некоторого компонента, чтобы выяснить, какая его концентрация отрицательно скажется на определении аналита. Очевидно, что необходимо указывать природу добавки.

5.4.4 Материалы со связанными добавками

Это материалы, для которых определяемый аналит может быть по природе своей чужеродным, но его вводят в материал в определенный момент, предшествующий отбору пробы. Следовательно, аналит будет более тесно связан с матрицей, чем в случае его

внесения в виде обычной добавки. Содержание аналита будет зависеть от количества аналита, контактирующего с материалом, скорости поглощения и выделения его матрицей и любых других потерь вследствие обмена веществ, спонтанного распада или других химических и физических процессов. Полезность проб со связанными добавками для валидации зависит от того, насколько точно можно определить содержание аналита. Ниже приведены примеры применения связанных добавок.

1. Гербициды в муке из зерновых, опрысканных гербицидами в процессе роста.
2. Активные ингредиенты в фармацевтических препаратах, добавленные в процессе приготовления.
3. Порошок яичного белка (с известным содержанием белка), добавленный перед выпечкой в тесто для печенья при исследовании аллергенов.

5.4.5 Эталоны

Если в текстах на английском языке вам встретился термин "standard" или вы сами его употребляете, нужно быть внимательным, поскольку он может означать как документ – стандарт, например, стандарт ISO, так и эталон. Когда речь идет о веществах, используемых для калибровки или идентификации, их лучше называть "measurement standards" (эталоны) или "calibrants/calibrators" (калибраторы) [7]. Обычно в таких случаях подразумевают растворы одного вещества, но на практике это может быть любой объект, конкретный параметр или свойство которого определены в достаточной мере, чтобы он мог служить в качестве метрологической основы для сравнения.

Важно различать стандартные образцы (reference materials, RM) и аттестованные стандартные образцы (certified reference materials, CRM) [7, 30], учитывая существенное отличие в возможностях их применения в процессе валидации метода (6.5.2). Стандартным образцом может быть практически любой образец, используемый в качестве основы для сравнения, в частности, лабораторные реактивы известной чистоты, промышленные реактивы или другие объекты. Интересующие нас свойство или содержание аналита должны быть стабильными и однородными, но образец не обязательно должен иметь такой высокий уровень характеристики, метрологической прослеживаемости, неопределенности и документации, как аттестованные стандартные образцы.

Аттестованное значение параметра для аттестованного стандартного образца, как правило, определяют более строго, чем для стандартного образца, и, кроме того, это значение устанавливают с документированной метрологической прослеживаемостью и неопределенностью. Характеризацию образца обычно проводят с использованием нескольких различных методов или одной первичной методики измерения, чтобы, насколько

это возможно, уменьшить или даже устранить какое-либо смещение аттестованного значения.

Для оценки смещения нужна надежная основа для сравнения, желательно, аттестованный стандартный образец с той же матрицей и концентрацией аналита, что и в тестовых образцах.

5.4.6 Статистика

Статистические методы необходимы для обобщения данных и для вынесения объективных суждений о различиях между наборами данных (проверка на значимость). Аналитики должны владеть, по крайней мере, основными элементами статистической теории, необходимыми, в частности, для оценки прецизионности, смещения, линейного диапазона, предела обнаружения (LOD), предела количественного определения (LOQ) и неопределенности измерений. Сведения о некоторых полезных изданиях, посвященных применению статистики в аналитической химии, приведены в разделе "Библиография" [5, 6, 31, 32, 33, 34].

5.5 Требования к валидации

Требования к тому, как нужно проводить валидацию метода, могут быть изложены в руководствах для конкретных секторов, где применяется определенный метод [например, 13, 25, 35]. Если такие требования существуют, желательно их выполнять. Это гарантирует уверенность в том, что специальную терминологию, относящуюся к валидации, а также применяемую статистику вы интерпретируете так, как это принято в соответствующем секторе. Для официального признания метода может потребоваться определение его характеристик путем совместного исследования.

5.6 Процесс валидации метода

Получив конкретное задание от заказчика, лаборатория должна сначала установить аналитические требования, т.е. определить, какими должны быть характеристики метода, чтобы можно было выполнить это задание (рис. 1).

Исходя из этих требований, лаборатория должна выбрать подходящий имеющийся метод или, если это необходимо, разработать/модифицировать метод. Отметим, что некоторые руководящие документы могут содержать требование о применении конкретного метода. В таблице 4 показаны вопросы, которые могут быть поставлены при формулировании аналитических требований (колонка 1), и соответствующие характеристики метода, которые, возможно, нужно будет определить (колонка 2). Далее лаборатория

выбирает нужные характеристики, определяет их значения и сопоставляет с аналитическими требованиями. Процесс валидации заканчивается заключением о соответствии или несоответствии аналитическим требованиям. Если аналитические требования не выполнены, нужно продолжить разработку метода. Этот процесс разработки и оценки продолжается до тех пор, пока метод не будет признан соответствующим поставленным требованиям.

В действительности аналитические требования редко согласуют заранее с заказчиком таким формальным образом. Обычно у заказчиков есть свои требования к затратам средств и/или времени, и в редких случаях они знают, какими должны быть характеристики методов, хотя требования к характеристикам могут быть известны, когда методы используют для проверки соответствия регуляторным требованиям или техническим условиям. Например, Европейский союз опубликовал требования к анализу питьевой воды [36], анализам, выполняемым согласно водной рамочной директиве [37], определению уровня остатков ветеринарных препаратов в пищевых продуктах животного происхождения [38] и остатков пестицидов в продуктах питания и кормах [39].

Тем не менее, аналитику, как правило, приходится самому решать, какими должны быть характеристики метода. Очень часто в таких случаях аналитические требования устанавливают в соответствии с известными характеристиками метода (например, приведенными в стандартизированных методах, полученными при проверке квалификации или оцененными с помощью математических моделей, таких как функция Хорвица [40]).

Из-за финансовых ограничений разработка метода, который удовлетворял бы определенным аналитическим требованиям, может оказаться экономически нецелесообразной, и тогда нужно либо снизить требования до достижимого уровня, либо пересмотреть основания для проведения анализа.

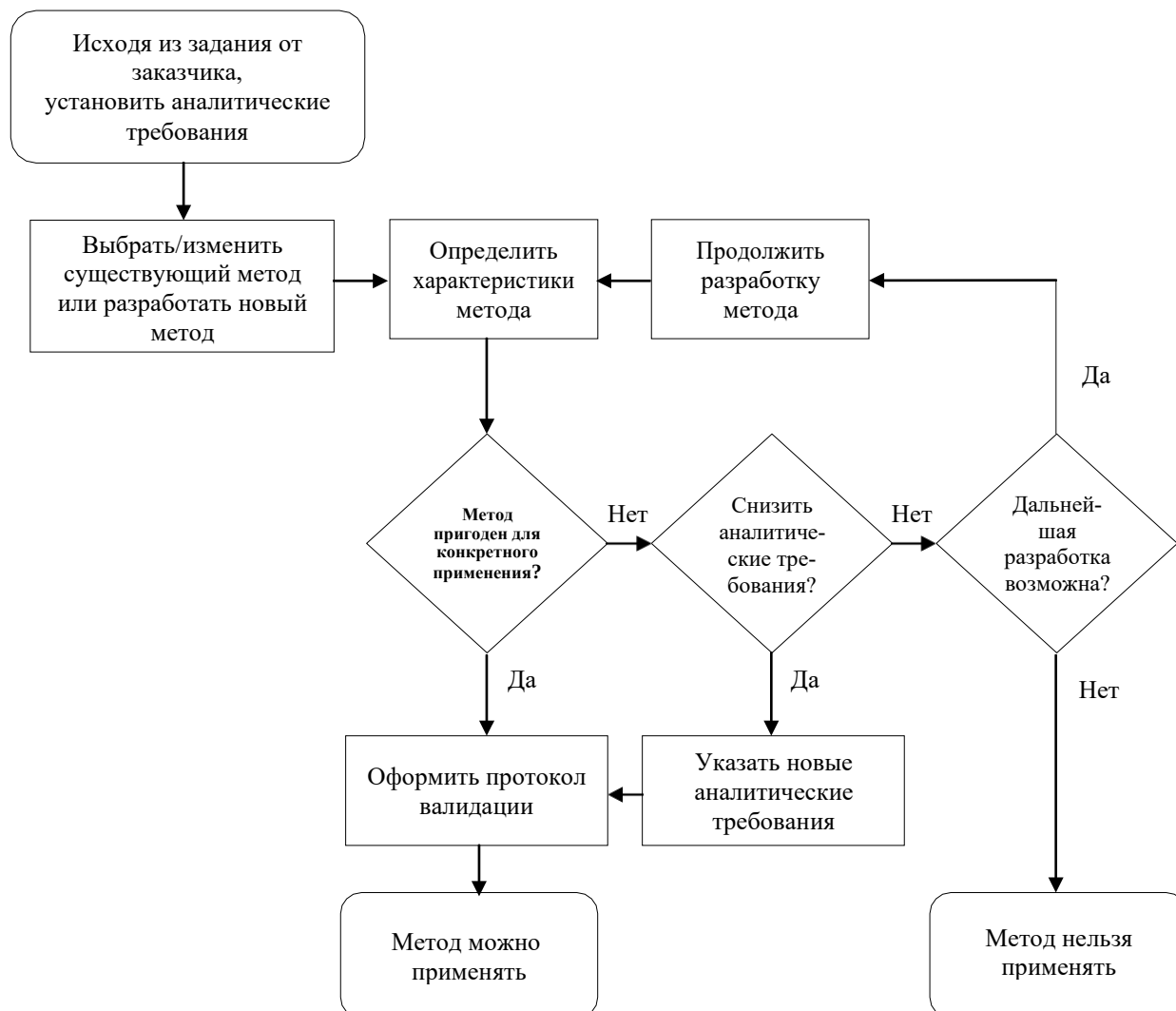


Рис. 1. Процесс валидации метода: от задачи, поставленной заказчиком, до решения лаборатории о том, возможно ли удовлетворить запрос заказчика с помощью определенного метода. Примечание: валидация метода включает этап, на котором оценивают характеристики и затем сравнивают их с аналитическими требованиями. Независимо от уже имеющихся, возможно, данных по характеристикам метода, его пригодность к применению будет определяться тем, какие характеристики получает конкретный аналитик на имеющихся приборах/оборудовании.

Таблица 4. Вопросы, которые могут быть поставлены при формулировании аналитических требований, определяемые характеристики и ссылки на соответствующие разделы данного руководства

Вопрос	Характеристика	Раздел	Примечание
Есть ли ресурсные ограничения и какие именно (персонал, время, деньги, приборы и реактивы, лабораторное оборудование)?	-	-	а)
Требуется ли отбор проб и промежуточных проб (и будут ли это делать в лаборатории)?			
Есть ли ограничения на размер/наличие проб?			
Какова химическая, биологическая и физическая природа матрицы?			
Аналит является рассеянным или локализованным?			
Требуется ответ качественный или количественный?	Селективность LOD и LOQ	6.1 6.2	
Какие нужно определять аналиты и каков вероятный уровень их содержания (% , мкг/г, нг/г и т.д.)? Присутствуют ли аналиты в более чем одной химической форме (например, разные степени окисления, стереоизомеры) и нужно ли различать эти формы?	Селективность LOD и LOQ Рабочий и линейный диапазоны	6.1 6.2 6.3	
Какую величину нужно измерять (что есть "измеряемая величина")? Это "полная" концентрация присутствующего аналита или его "извлеченное количество" при определенных условиях?	Степень извлечения	6.5	
Какие требуются правильность и прецизионность? Какая целевая неопределенность и как она должна быть выражена?	Правильность и коэффициент восстановления Сходимость, промежуточная прецизионность, воспроизводимость Неопределенность	6.5 6.6 6.7	б)
Каковы возможные помехи для аналита(-ов)?	Селективность	6.1	
Установлены ли предельные значения для всех параметров, важных для выполнения анализа (например, время экстрагирования, температура инкубации)?	Устойчивость	6.8	в)
Нужно ли сравнивать результаты с результатами других лабораторий?	Неопределенность	6.7	б)
Нужно ли сравнивать результаты с внешними требованиями?	Неопределенность	6.7	б)
а) Некоторые элементы аналитических требований непосредственно не связаны с требованиями валидации метода, но они в более общем плане влияют на возможность применения конкретных методов. Например, различные методы будут применимы в зависимости от того, рассеян ли аналит в объеме пробы или сосредоточен на поверхности. б) Существенным элементом аналитических требований является возможность судить о том, подходит ли метод для данного конкретного применения, и, следовательно, они должны включать допустимую неопределенность, выраженную либо как стандартная неопределенность, либо как расширенная неопределенность. в) Как правило, устойчивость опубликованных стандартных методик в пределах их области применения, т.е. для определенных типов матрицы и рабочего диапазона, установлена. В связи с этим верификация при внедрении в лаборатории опубликованной стандартной методики обычно не включает проверку устойчивости.			

6. Характеристики метода

6.1 Селективность

6.1.1 Термины и определения

Аналитическую селективность определяют как "степень, до которой метод можно применять для определения конкретных аналитов в смесях или матрицах без помех со стороны других компонентов с аналогичными свойствами" [41].

Определения в различных документах [7, 18, 42] более или менее согласуются с такой интерпретацией. Хотя IUPAC рекомендует использовать термин "селективность", в некоторых областях, например, в фармацевтике [13], используют термины "специфичность" или "аналитическая специфичность". Последний вариант рекомендуют использовать во избежание путаницы с термином "диагностическая специфичность", применяемым в лабораторной медицине [43].

6.1.2 Влияние помех

В общем случае можно сказать, что аналитические методы состоят из этапа измерения и, при необходимости, предварительного этапа отделения аналита. На этапе измерения, как правило, не измеряют непосредственно концентрацию аналита, а количественно определяют какую-то связанную с ней конкретную величину (например, интенсивность света). Следовательно, очень важно установить, что измеренное значение величины обусловлено только наличием аналита, а не какого-то другого компонента с подобными химическими или физическими свойствами, и не возникает случайно, тем самым вызывая смещение результата измерения. Для улучшения селективности измерительной системы может потребоваться этап отделения аналита, предшествующий этапу измерения.

Помехи могут вызывать смещение, увеличивая или уменьшая сигнал, относимый к измеряемой величине. Степень воздействия для данной матрицы обычно пропорциональна сигналу, и поэтому такое воздействие иногда называют "пропорциональным". Оно изменяет угол наклона калибровочной функции, но не ее свободный член. Это воздействие также называют "вращательным" [44].

"Поступательное" или "фиксированное" воздействие обусловлено сигналом от помех, присутствующих в тестовом растворе. Следовательно, оно не зависит от концентрации аналита. Его часто называют "фоновой помехой" или "помехой базовой линии". Это воздействие влияет на свободный член калибровочной функции, но не на угол ее наклона.

Во многих случаях пропорциональные и поступательные воздействия могут присутствовать одновременно. Методом стандартных добавок можно корректировать только пропорциональные воздействия.

6.1.3 Оценка селективности

Селективность необходимо устанавливать для методов, разработанных внутри лаборатории или адаптированных из научной литературы, а также методов, опубликованных органами по стандартизации, но используемых за пределами сферы применения, указанной в стандарте на метод. Если методы, опубликованные органами по стандартизации, используют в рамках установленной сферы применения, то для такого случая их селективность, как правило, уже была исследована в процессе стандартизации.

Селективность метода обычно исследуют путем изучения его способности измерять содержание заданного аналита в пробах, куда специально были введены определенные вещества-помехи (которые предположительно могут присутствовать в пробах). Если не ясно, присутствуют помехи или нет, селективность метода можно исследовать, изучая его способность измерять содержание аналита в сравнении с другими независимыми методами. Ниже в примерах 1 и 2, а также в "Краткой справке 1" рассмотрены практические аспекты проверки селективности.

Проверить правильность идентификации компонентов можно путем подтверждения другими методами. Чем больше будет доказательств, тем лучше. Конечно, всегда приходится искать компромисс между затратами средств и времени, необходимыми для идентификации аналита, и уверенностью в том, что идентификацию выполнили правильно.

В то время как для оценки сходимости проводят несколько повторных измерений с помощью одного метода, для подтверждения идентификации аналита нужно выполнить измерения с помощью нескольких, желательно независимых, методов. Подтверждение повышает уровень доверия к исследуемому методу, и оно особенно полезно, когда подтверждающие методы основаны на существенно отличных принципах. В некоторых случаях, например, при анализе органических проб неизвестного состава методом газовой хроматографии, использование подтверждающих методов является очень важным. Если оцениваемый метод измерения обладает высокой селективностью, то подтверждение другими методами можно не делать.

Важным аспектом селективности, на который следует обратить внимание, является возможность существования аналита в пробе более чем в одной форме, например: связанной или несвязанной; неорганической или металлоорганической; с различной степенью окисления. Следовательно, во избежание недоразумений очень важно определить, что является измеряемой величиной для данного метода.

Пример 1. Хроматография

Пик на хроматограмме может быть идентифицирован как соответствующий некоторому анализу на том основании, что стандартный образец, содержащий этот анализ, порождает сигнал в той же точке хроматограммы. Однако неизвестно, обусловлен ли этот сигнал данным анализом или каким-то другим веществом, элюируемым одновременно, т.е. нет ли здесь "фиксированного" воздействия? Возможна одна из этих причин или обе одновременно. Идентификация анализа только этим способом не является достоверной, и требуется какое-то дополнительное подтверждение. Например, можно повторить хроматографический анализ с применением колонки другой полярности, с другим принципом разделения, и посмотреть, по-прежнему ли сигналы от пробы и от стандартного образца будут появляться в одно и то же время. Если пик обусловлен более чем одним компонентом, то колонка другой полярности может быть хорошим средством разделения компонентов. Во многих случаях высокую селективность могут обеспечить современные масс-спектрометрические приборы, например, газовые или жидкостные хроматографы с масс-спектрометрическим детектором.

Пример 2. Спектроскопия

В инфракрасной спектроскопии идентификацию неизвестных соединений можно выполнять путем сопоставления сигналов оптического поглощения (т.е. "пики") в спектре анализа с пиками эталонного спектра, записанного в библиотеку в памяти спектрометра. После того как соединение было идентифицировано, нужно записать спектр стандартного образца анализа точно при тех же условиях, что и спектр пробы. Чем больше пиков у анализа и стандартного образца совпадают, тем выше вероятность правильной идентификации. Также стоило бы исследовать, насколько форма спектра зависит от способа отделения анализа и подготовки к инфракрасному анализу. Например, если спектр записан с помощью солевого диска, то распределение по размеру частиц тестовой порции в диске может повлиять на форму спектра.

Краткая справка 1. Селективность

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
Выполнить анализ проб и стандартных образцов исследуемым методом и другими независимыми методами.	1	Исходя из результатов подтверждения с помощью других методов, определить способность метода идентифицировать анализ и измерять содержание анализа при отсутствии помех.	Принять решение, какое количество дополнительных доказательств будет достаточным для достижения нужной достоверности.
Выполнить анализ проб, содержащих различные предполагаемые помехи в присутствии определяемых анализов.	1	Изучить влияние помех. Препятствуют ли помехи обнаружению или измерению содержания анализа?	Если помехи препятствуют обнаружению или измерению содержания анализа, нужно доработать метод.

6.2 Предел обнаружения и предел количественного определения

6.2.1 Термины и определения

Есть три общих понятия, важных для измерения в области низких концентраций. Во-первых, бывает нужно установить значение результата анализа, при получении которого отличие уровня содержания аналита от нуля будут считать значимым. Достижение этого уровня часто влечет за собой некоторое действие, например, признание материала загрязненным. Этот уровень называют "критическим значением", "пределом принятия решения" или, в директивах ЕС, СС α [38].

Во-вторых, важно знать самую низкую концентрацию аналита, обнаруживаемую с помощью данного метода при заданном доверительном уровне. То есть, при какой истинной концентрации с высокой вероятностью будет превышено критическое значение, описанное выше? Для этого понятия используют такие термины, как "предел обнаружения" (LOD), "минимальное обнаруживаемое значение" или, в директивах ЕС, СС β [38].

В-третьих, важно также установить самый низкий уровень, при котором значения характеристик являются приемлемыми для типичного применения. Этот уровень обычно называют "предел количественного определения" (LOQ)*.

Терминология, касающаяся всех этих понятий, очень разнообразна и отличается в различных секторах. Например, термин "предел обнаружения" (LOD или DL) ранее не был общепринятым, хотя его и использовали в некоторых секторальных документах [13, 38]. Тем не менее, в настоящее время он включен в VIM [7] и IUPAC GoldBook [17]. ISO использует общий термин "минимальное обнаруживаемое значение приведенной переменной состояния", который применительно к химическому анализу звучит как "минимально обнаруживаемая приведенная концентрация" [45, 46, 47, 48]. В настоящем руководстве для трех описанных выше понятий используются термины "критическое значение", "предел обнаружения" (LOD) и "предел количественного определения" (LOQ). При валидации метода наиболее часто определяют LOD и LOQ.

Также необходимо различать предел обнаружения прибора и предел обнаружения метода. Предел обнаружения прибора можно определить по результатам анализа пробы, часто холостого реактива, которую вводят непосредственно в прибор (т.е. исключая все стадии подготовки пробы), или по отношению сигнал/шум, например, на хроматограмме. Предел обнаружения метода (LOD) нужно определять по данным анализа проб, которые

* Используют также синонимы "предел определения", "предел представления данных" и "предел применения".

подверглись всем операциям методики измерения, с использованием результатов, рассчитанных по тем же уравнениям, которые используют для рутинных проб. Предел обнаружения метода является самой важной для валидации метода характеристикой, и поэтому именно ему уделено наибольшее внимание в настоящем руководстве.

В следующих разделах описана экспериментальная оценка LOD и LOQ. Статистическое обоснование расчета LOD приведено в Приложении В. Поскольку и LOD, и LOQ зависят от прецизионности в нулевой точке или вблизи ее, сначала в разделе 6.2.2 описана экспериментальная оценка стандартного отклонения результатов вблизи нуля.

6.2.2 Определение стандартного отклонения на низких уровнях концентрации

Как правило, LOD и LOQ рассчитывают путем умножения стандартного отклонения (s'_0) на соответствующий коэффициент. Важно, чтобы это стандартное отклонение отражало прецизионность при анализе типичных тестовых проб и чтобы число повторных измерений было достаточным для получения надежной оценки. В этом разделе стандартное отклонение s'_0 определяют через стандартное отклонение s_0 для единичных результатов вблизи нуля с учетом усреднения и введения поправок на холостую пробу, применяемых на практике (см. ниже). Альтернативные подходы рассмотрены в разделе 6.2.5.

Определяя LOD и LOQ в экспериментах с простым повторением, нужно принимать во внимание следующие моменты.

Пробы для оценки LOD и LOQ. Желательно использовать либо а) холостые пробы, т.е. матрицы, не содержащие определяемый аналит, либо б) тестовые пробы с концентрацией аналита, близкой к предполагаемому LOD или ниже его. Холостые пробы более пригодны для методов, где на этих пробах получают хорошо измеряемый сигнал, например, для спектрофотометрии и атомной спектроскопии. Однако для таких методов, как хроматография, которая основана на обнаружении пика над уровнем шума, необходимы пробы с концентрацией, близкой к LOD или превышающей его. Их можно приготовить, например, вводя добавки в холостую пробу (см. раздел 5.4).

В случаях, когда холостые пробы или тестовые пробы с низкой концентрацией аналита отсутствуют, часто используют холостые реактивы*. Если эти реактивы не

* Имеет место разнобой в терминологии, относящейся к холостым пробам (подробнее см. раздел 5.4.1).

подвергают всем операциям методики измерений, а вводят непосредственно в прибор, по результатам таких опытов будут получены LOQ/LOD прибора.

Охват сферы применения метода. Если область применения метода включает существенно различные матрицы, может потребоваться определение стандартного отклонения отдельно для каждой матрицы.

Обеспечение репрезентативности повторных измерений. Стандартное отклонение должно отражать характеристики метода при его применении в лаборатории, т.е. стандартное отклонение нужно рассчитывать по результатам измерений, при которых анализы выполнены в строгом соответствии с документом на методику измерения в целом, включая все этапы подготовки пробы. Значения величины, используемые для расчета s_0 , должны быть выражены в единицах измерения, указанных в методике.

Условия измерений. Стандартное отклонение, как правило, определяют в условиях сходимости, и именно такая процедура описана в данном разделе. Тем не менее, более надежную оценку можно получить в условиях промежуточной прецизионности. Этот подход рассмотрен далее в разделе 6.2.5.

Количество наблюдений. Число повторов (m) должно быть достаточным для получения адекватной оценки стандартного отклонения. Как правило, считают необходимым выполнить от 6 до 15 повторов; в методиках/программах валидации часто рекомендуют делать 10 повторов (см. раздел 6.2.5.1).

Учет усреднения. Во многих методиках измерения предусмотрено, что измеренное значение определяют как среднее из результатов повторных измерений, причем при каждом повторе выполняют все операции методики измерения. В таком случае стандартное отклонение единичных результатов s_0 необходимо откорректировать путем деления на квадратный корень из n , где n – количество усредняемых повторных результатов, указанное в методике.

Учет влияния поправок на холостую пробу. Если методика измерения предполагает введение поправки на холостую пробу, то нужно это учитывать при определении стандартного отклонения, используемого для расчета LOD и LOQ. Если во все результаты, полученные в ходе валидационного исследования, вводят одну и ту же поправку на холостую пробу (подход, рекомендованный здесь для упрощения), тогда стандартное отклонение результатов будет меньше, чем получаемое на практике, когда в результаты вводят различные поправки, полученные в разных повторах. В этом случае s_0 необходимо

откорректировать, умножив на $\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}}$, где n – количество усредняемых результатов повторных наблюдений, при каждом из которых выполняют все операции методики

измерения, а n_b – количество наблюдений с холостыми пробами, по результатам которых рассчитывают поправку.

Следует отметить, что в условиях промежуточной прецизионности в результаты будут внесены различные поправки на холостую пробу, поэтому корректировать стандартное отклонение не нужно (см. раздел 6.2.5).

Варианты расчета приведены в примере 3, а блок-схема на рис. 2 иллюстрирует алгоритм того, как следует учитывать усреднение и введение поправки на холостую пробу.

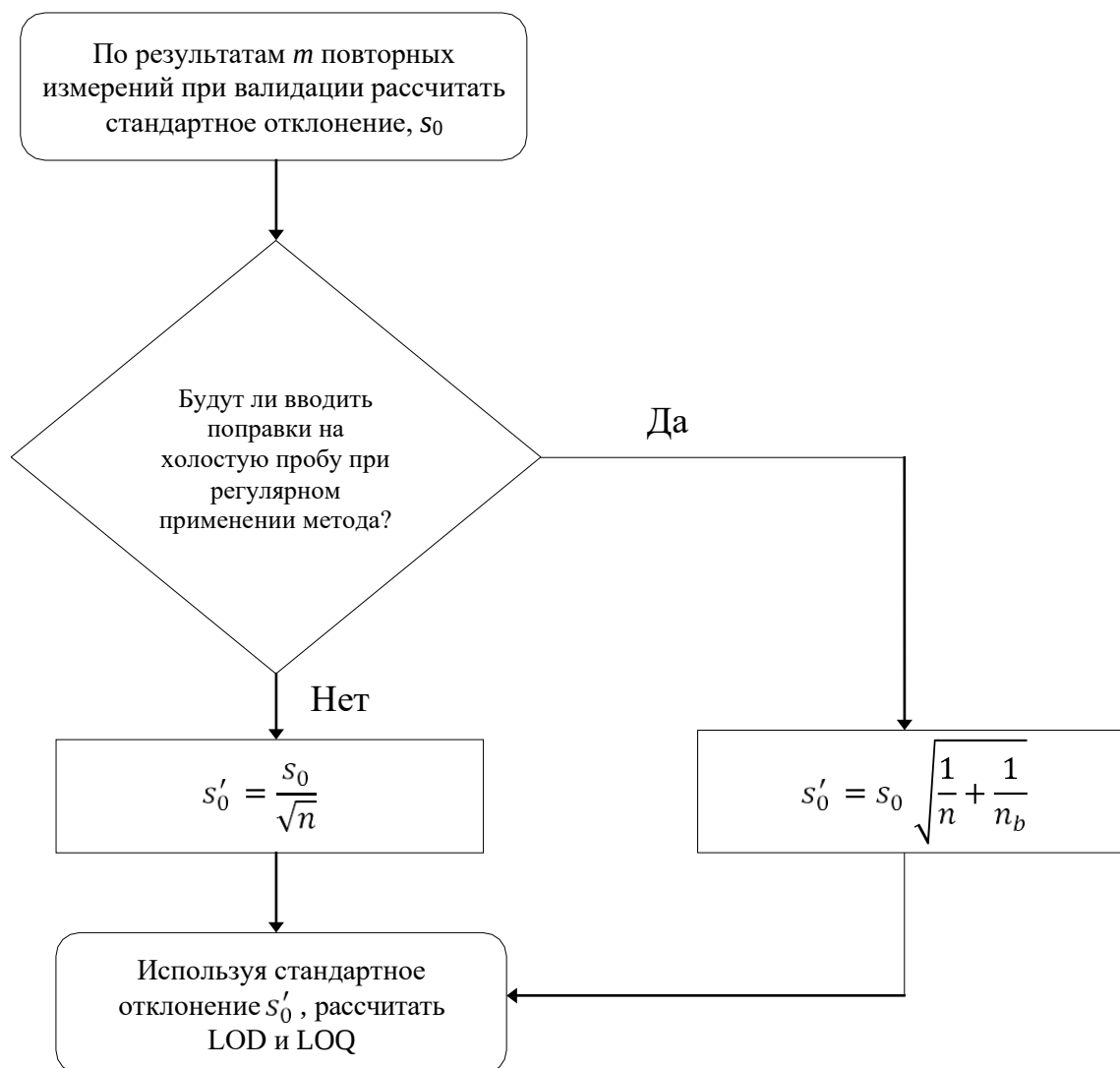
Пример 3. Валидационное исследование выполняют путем анализа холостой пробы. В условиях сходимости проводят десять (m) независимых анализов холостой пробы. Полученное среднее измеренное значение равно 2 мг/кг, стандартное отклонение s_0 – 1 мг/кг.

Случай 1. Методика измерения предусматривает, что тестовые пробы анализируют один раз ($n = 1$), а поправку вводят по результатам анализа одной холостой пробы ($n_b = 1$). В серии измерений каждый опыт состоит из единичного анализа тестовой пробы и единичного анализа холостой пробы (n_b). Тогда, согласно рис. 2, стандартное отклонение, по которому рассчитывают LOD/LOQ, равно:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{1} + \frac{1}{1}} = 1\sqrt{2} = 1,4 \frac{\text{мг}}{\text{кг}}$$

Случай 2. Методика измерения предусматривает, что тестовые пробы анализируют дважды ($n = 2$), и также дважды анализируют холостую пробу. В серии измерений каждый опыт состоит из двукратного анализа ($n = 2$) тестовых проб и двукратного анализа ($n_b = 2$) холостых проб. Концентрацию, полученную для тестовых проб, корректируют путем вычитания среднего значения для двух холостых проб. Тогда, согласно рис. 2, стандартное отклонение, по которому рассчитывают LOD/LOQ, равно:

$$s'_0 = s_0 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{n_b}} = 1 \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{2}} = 1 \frac{\text{мг}}{\text{кг}}$$



s_0 – стандартное отклонение m единичных результатов в нулевой точке или вблизи нее;

s'_0 – стандартное отклонение, используемое для расчета LOD и LOQ;

n – количество усредняемых результатов повторных наблюдений, при каждом из которых выполняют все операции методики измерения;

n_b – количество усредняемых результатов наблюдений с холостыми пробами, по которым рассчитывают поправку на холостую пробу в соответствии с методикой измерения.

Рис. 2. Расчет стандартного отклонения s'_0 , которое используют для оценки LOD и LOQ. Блок-схема начинается с экспериментального стандартного отклонения, s_0 , рассчитанного по результатам повторных измерений в условиях сходимости для пробы с концентрацией, близкой к нулю, с введением или без введения поправки на холостую пробу, которую применяют ко всем результатам в соответствии с методикой. Эта поправка может быть получена из одного опыта с холостой пробой или как среднее значение из результатов нескольких опытов с холостой пробой.

6.2.3 Оценка LOD

Обычно для целей валидации достаточно получить приближенное значение LOD, т.е. уровня, на котором обнаружение аналита становится проблематичным. Для этого можно, как правило, воспользоваться "правилом $3s$ ", описанным в "Краткой справке 2".

Если метод применяют для оценки соответствия нормативным или техническим требованиям, требуется более строгий подход, в частности, необходимо учитывать число степеней свободы, связанное с s_0 . Подробно это описано в документе IUPAC [49] и других источниках [50, 51]. Если критическое значение и/или LOD используют для принятия решений, тогда необходимо регулярно контролировать прецизионность и, при необходимости, пересчитывать эти пределы. В различных секторах и/или нормативных документах могут использовать разные подходы для оценки LOD. Приводя предел обнаружения, желательно указывать правила, по которым он был определен. В отсутствие каких-либо секторальных руководств по оценке LOD, в общем случае можно воспользоваться подходами, приведенными в "Краткой справке 2".

Краткая справка 2. Предел обнаружения (LOD)

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
а) Повторные анализы холостых проб, т.е. матриц, не содержащих определяемого аналита или Повторные анализы тестовых проб с низкой концентрацией аналита.	10	Рассчитать стандартное отклонение результатов s_0 . Исходя из s_0 рассчитать s'_0 согласно блок-схеме на рис. 2 Рассчитать LOD по формуле $LOD = 3 \times s'_0$	
б) Повторные анализы холостых реактивов или Повторные анализы холостых реактивов с низкой концентрацией добавленного аналита.	10	Рассчитать стандартное отклонение результатов s_0 Исходя из s_0 рассчитать s'_0 согласно блок-схеме на рис. 2 Рассчитать LOD по формуле $LOD = 3 \times s'_0$	Подход б) приемлем, когда невозможно получить холостые пробы или тестовые пробы с низкой концентрацией аналита. Если эти холостые реактивы не проходят все этапы методики измерения и их подают непосредственно в прибор, тогда расчет даст LOD прибора.
Примечания: 1) Для некоторых аналитических методов, например, хроматографии, в тестовую пробу со слишком низкой концентрацией аналита или в холостой реактив, возможно, потребуется вводить добавку, чтобы получить ненулевое стандартное отклонение. 2) При каждом определении нужно полностью выполнить все этапы методики измерения. 3) Стандартное отклонение выражают в единицах концентрации. Если стандартное отклонение выражено в единицах сигнала, LOD представляет собой концентрацию, соответствующую сигналу на холостой пробе $y_B + 3 \times s'_0$. Краткий пример расчета LOD через сигнал приведен также в [5].			

6.2.4 Оценка LOQ

LOQ представляет собой самый низкий уровень содержания аналита, который можно определить с приемлемыми показателями точности. В различных руководствах в качестве критериев приемлемости указывают разные характеристики, например прецизионность, правильность и прецизионность, неопределенность измерения [52]. На практике, однако, LOQ обычно рассчитывают как концентрацию аналита, равную полученному стандартному отклонению (s'_0) на низких уровнях концентрации, умноженному на некоторый коэффициент, k_Q . В Рекомендациях IUPAC [49] принято значение по умолчанию $k_Q = 10$, и если стандартное отклонение примерно постоянное на низких концентрациях, этот множитель соответствует относительному стандартному отклонению (RSD), равному 10 %. Также иногда используют множители 5 или 6, тогда значения RSD составляют 20 % и 17 %, соответственно [53, 54]. См. далее [8] и "Краткую справку 3".

Краткая справка 3. Предел количественного определения (LOQ)

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
а) Повторные анализы холостых проб, т.е. матриц, не содержащих определяемого аналита или Повторные анализы тестовых проб с низкой концентрацией аналита.	10	Рассчитать стандартное отклонение результатов s_0 Исходя из s_0 рассчитать s'_0 согласно блок-схеме на рис. 2 Рассчитать LOQ по формуле $LOQ = k_Q \times s'_0$	Множитель k_Q обычно равен 10, но часто используют и другие значения, например, 5 или 6 (исходя из критерия "пригодности для конкретного применения")
б) Повторные анализы холостых реактивов или Повторные анализы холостых реактивов с низкой концентрацией добавленного аналита.	10	Рассчитать стандартное отклонение результатов s_0 Исходя из s_0 рассчитать s'_0 согласно блок-схеме на рис. 2 Рассчитать LOQ по формуле $LOQ = k_Q \times s'_0$	Подход б) приемлем, когда невозможно получить холостые пробы или тестовые пробы с низкой концентрацией аналита. Если холостые реактивы не проходят все этапы методики измерения и их подают непосредственно в прибор, тогда расчет даст LOQ прибора.
Примечания: 1) Для некоторых аналитических методов, например, хроматографии, в тестовую пробу со слишком низкой концентрацией аналита или в холостой реактив, возможно, потребуется вводить добавку, чтобы получить ненулевое стандартное отклонение. 2) При каждом определении нужно полностью выполнить все этапы методики измерения. 3) Стандартное отклонение выражают в единицах концентрации.			

6.2.5 Альтернативные методики

В предыдущих разделах описан общий подход к оценке LOD и LOQ на основе стандартного отклонения результатов для концентрации, близкой к нулю, полученных в условиях сходимости. Такой подход является широко распространенным, но в стандартах и программах валидации приводят и другие методики.

В некоторых случаях, например, когда результаты для холостых проб существенно различаются день ото дня, определение проводят в условиях промежуточной прецизионности, а не сходимости. Например, если имеются результаты контроля качества для проб с низким уровнем концентрации, то для оценки LOD и LOQ можно использовать стандартное отклонение этих результатов. Когда для расчета LOD и LOQ используют стандартное отклонение, полученное в условиях промежуточной прецизионности, не нужно проводить показанную на рис. 2 корректировку, учитывающую введение поправки на холостую пробу. Следовательно, экспериментальное стандартное отклонение, полученное по данным внутреннего контроля качества, будет равно стандартному отклонению s'_0 , которое используют для расчета LOD и LOQ. В ISO 11843-2 [46] описано, как можно определить LOD прибора непосредственно по калибровочной кривой.

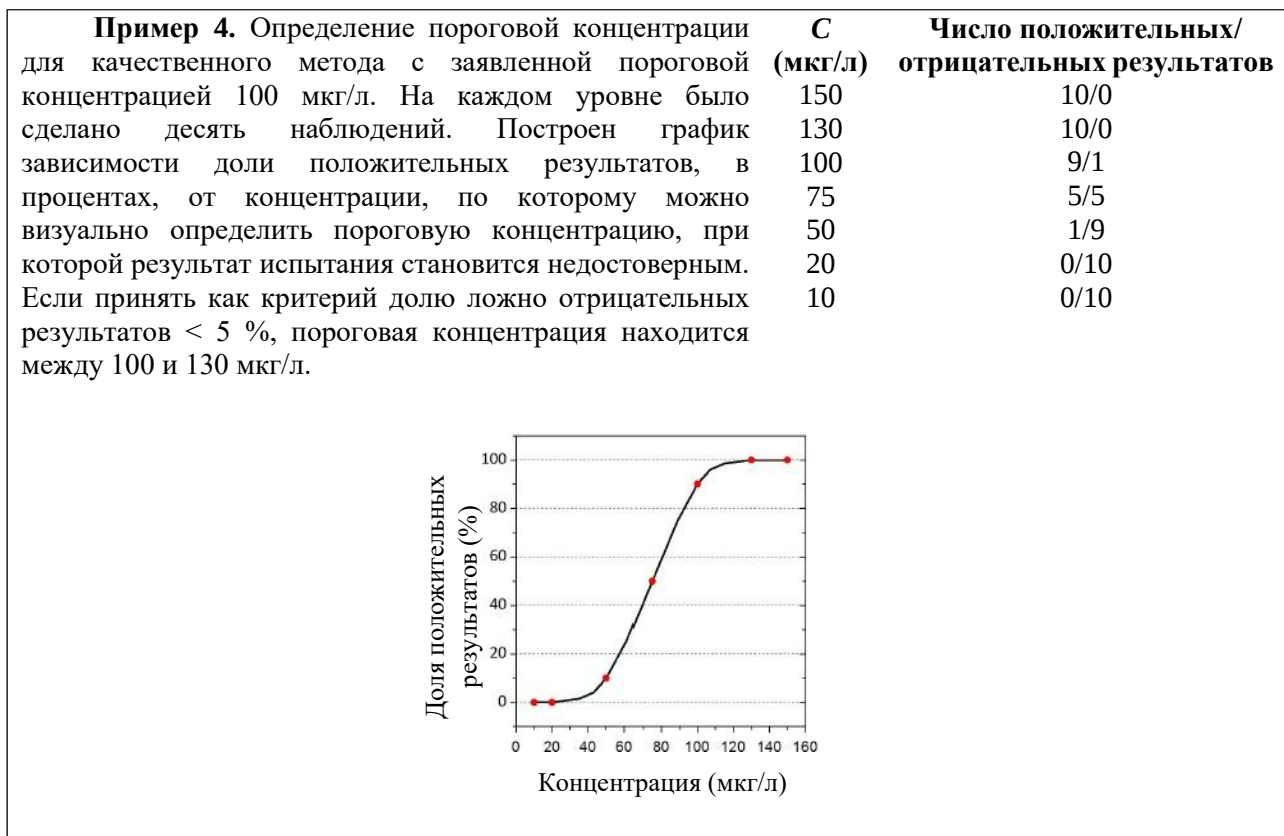
6.2.5.1 Достоверность оценок LOD и LOQ

Следует отметить, что даже при 10 повторях, указанных в "Краткой справке 2" и "Краткой справке 3", оценки стандартного отклонения являются по сути своей непостоянными. Таким образом, оценку LOD/LOQ, полученную в ходе валидации, следует воспринимать как ориентировочное значение. Этого будет достаточно, если с помощью оценки LOD/LOQ нужно просто показать, что концентрация аналита в пробах значительно превышает LOD/LOQ. Если можно предполагать, что концентрация аналита в лабораторных пробах будет низкой, LOD/LOQ необходимо регулярно контролировать.

6.2.6 Способность к обнаружению для качественного анализа

Задачей качественного анализа (Приложение D) является идентификация или классификация веществ, и по сути он дает ответ "да/нет" на вопрос о превышении заданной пороговой концентрации аналита [55]. Для качественных методов прецизионность нельзя представить как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение, но можно выразить через долю истинно и ложно положительных и отрицательных результатов. При валидационном исследовании пороговую концентрацию можно определить путем установления доли ложно положительных и отрицательных результатов на нескольких

уровнях ниже и выше предполагаемой пороговой концентрации. Пороговым уровнем считают такую концентрацию, при превышении которой доля ложно отрицательных результатов будет невелика – в соответствии с заданной вероятностью, например, 5 %. При валидации оценивают пороговый уровень, заявленный в документе на методику (см. пример 4 и "Краткую справку 4").



Краткая справка 4. Предел обнаружения (LOD) для качественного анализа

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным
Проанализировать в случайном порядке холостые пробы с добавками аналита на разных уровнях концентрации.	10	Построить график зависимости доли положительных или отрицательных результатов, в процентах, от концентрации, и по графику визуальным образом определить пороговую концентрацию, при которой результат испытания становится недостоверным.

6.3 Рабочий диапазон

6.3.1 Определение

"Рабочий диапазон"* – это интервал, в пределах которого метод обеспечивает результаты с приемлемой неопределенностью. Снизу рабочий диапазон ограничен пределом количественного определения LOQ. Верхняя граница рабочего диапазона определяется концентрацией, при которой наблюдаются значительные аномалии аналитической чувствительности. Примером этого является эффект плато при высоких значениях оптической плотности в UV/VIS спектроскопии.

6.3.2 Общие замечания по проверке диапазона при валидации

Рабочий диапазон метода, подлежащего валидации, должен быть указан в документе на метод (см. А.5 в Приложении А). При валидации необходимо подтвердить, что метод можно использовать в этом диапазоне. Чтобы оценить рабочий диапазон, лаборатория должна рассмотреть как линейность метода, так и предлагаемую процедуру калибровки, изложенную в методике.

6.3.3 Рабочий диапазон метода и прибора

Многие методы предусматривают, что пробы для испытаний, полученные лабораторией (лабораторные пробы), подвергают обработке (дигестии, экстрагированию, разбавлению) и после этого подают на измерительный прибор и снимают его показания. В таких случаях есть два рабочих диапазона. Рабочий диапазон метода, указанный в его области применения (например, раздел А.5 в Приложении А), относится к концентрации аналита в лабораторной пробе. Для твердой пробы, в частности, он может быть выражен в миллиграммах на килограмм. Рабочий диапазон прибора выражают в единицах концентрации аналита в обработанной тестовой пробе, которую подают на прибор для измерения (например, в миллиграммах на литр для раствора после экстрагирования пробы). Пример рабочего диапазона прибора показан на рис. 3А, где приведена зависимость сигнала прибора от концентрации аналита в калибровочных эталонах. Пример рабочего диапазона метода показан на рис. 3В, где приведено соотношение измеренной концентрации и известной концентрации аналита в анализируемой пробе. Измеренная концентрация – это

* Термин в VIM [7] – "интервал измерений" или "рабочий интервал"

результат, полученный согласно методике измерения (включая все этапы подготовки пробы) с использованием прибора, откалиброванного в соответствии с документом на методику.

В ходе валидации необходимо оценить как рабочий диапазон прибора, так и рабочий диапазон метода. Данные о рабочем диапазоне часто получают в ходе разработки метода. В таких случаях достаточно включить эти данные в протокол валидации.

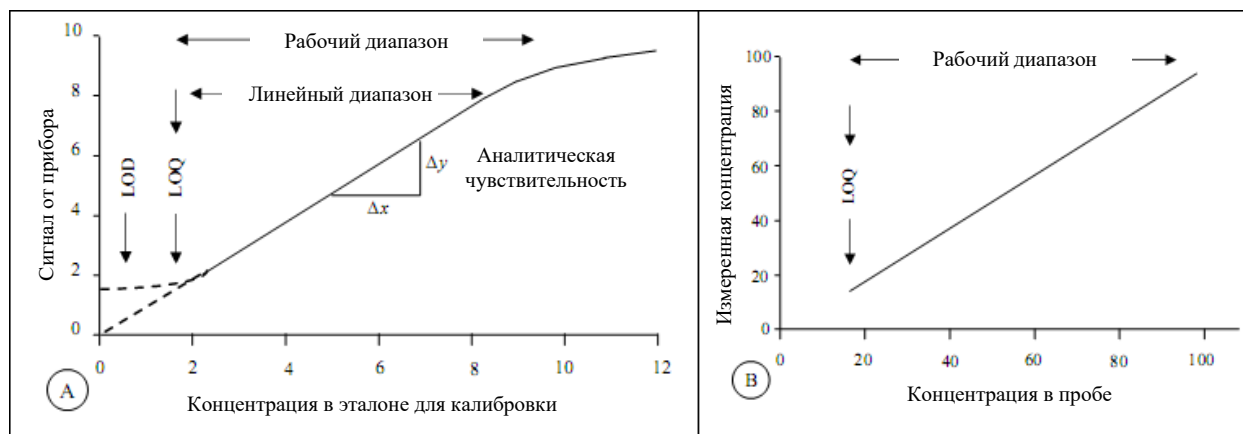


Рис. 3. А) Типовой пример калибровочной кривой, полученной инструментальным методом. Показаны характеристики "рабочий диапазон", "линейный диапазон", "аналитическая чувствительность", "LOD" и "LOQ". В) Типовой пример кривой, полученной по методике измерения, где представлена зависимость измеренной концентрации от концентрации аналита в пробе.

6.3.4 Оценка рабочего диапазона прибора

Между LOQ и верхним пределом рабочего диапазона прибора его выходной сигнал описывается определенной зависимостью, линейной или нелинейной. В процессе валидации необходимо: 1) подтвердить эту зависимость, 2) продемонстрировать, что рабочий диапазон прибора совместим с интервалом, указанным в области применения метода и 3) убедиться в правильности выбора предлагаемой методики калибровки прибора (одноточечная, двухточечная или многоточечная).

Чтобы оценить рабочий диапазон прибора и подтвердить его пригодность для конкретного применения, нужно исследовать его с помощью калибровочных эталонов, которых перекрывают предполагаемый диапазон концентрации на $\pm 10\%$ или даже $\pm 20\%$, и построить график (см. "Краткую справку 5", шаг 1). Для диапазона от 1 до 100 мг/л перекрытие на $\pm 20\%$ означает интервал от 0,8 до 120 мг/л. Выбранные концентрации должны быть равномерно распределены по всему диапазону. Сначала рабочий диапазон оценивают визуально по виду калибровочной кривой. Следующим шагом является подтверждение вида зависимости между концентрацией и выходным сигналом прибора с

помощью статистических характеристик регрессии и графика остатков для выбранной модели (например, линейной или квадратичной) (см. "Краткую справку 5", шаг 2). Оценка также может включать применение специальных статистических приемов, таких как проверка по "критериям согласия" [56, 57]. По калибровочной кривой и соответствующим статистическим характеристикам, полученным в рабочем диапазоне прибора, можно судить о приемлемости процедуры калибровки, приведенной в методе. Дополнительно это оценивают при проверке рабочего диапазона метода.

6.3.5 Оценка рабочего диапазона метода

Для оценки рабочего диапазона метода необходимо следующее: 1) наличие проб с известной концентрацией и холостых проб; 2) пробы должны быть подвергнуты всем операциям методики измерения; 3) концентрация различных проб должна, по возможности, охватывать весь интересующий диапазон и 4) прибор должен быть откалиброван в соответствии с предложенной методикой калибровки. Результат измерения для каждой пробы рассчитывают в соответствии с документом на методику (см. "Краткую справку 5", шаг 3). Строят график, на котором вдоль оси y откладывают измеренные значения, а вдоль оси x – известную концентрацию в пробах, как показано на рис. 3В. Рабочий диапазон метода и линейность оценивают визуально по графику и подтверждают оценку с помощью статистических данных и графика остатков для линейной регрессии.

Для оценки рабочего диапазона можно использовать результаты исследований прецизионности и смещения (см. разделы 6.5.2 и 6.6.2.1), при условии, что эти исследования охватывают весь рабочий диапазон метода.

Рабочий диапазон метода должен быть установлен для каждой матрицы, входящей в область применения метода. Это связано с возможным нарушением линейности выходного сигнала под воздействием помех и с тем, что способность метода к экстракции/извлечению аналита может меняться в зависимости от матрицы пробы.

Краткая справка 5. Рабочий и линейный диапазоны

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
1) Проанализировать холостые пробы и калибровочные эталоны с 6 – 10 значениями концентрации, равномерно распределенными по <i>всему интересующему диапазону</i> .	1	Построить график зависимости выходного сигнала (ось y) от концентрации (ось x). Рассмотреть график и примерно определить линейный диапазон и верхнюю и нижнюю границы рабочего диапазона прибора. Затем перейти к п. 2).	Это даст нам визуальное подтверждение линейности или нелинейности рабочего диапазона. Примечание. Если сигнал не прямо пропорционален концентрации, например, как у электродов рН или других ион-селективных электродов или в случае иммунометрических методов, то перед проведением оценки линейности необходимо преобразовать измеренные значения.
2) Проанализировать 2 – 3 раза холостые пробы и калибровочные эталоны с 6 – 10 значениями концентрации, равномерно распределенными по <i>линейному диапазону</i> .	1	Построить график зависимости выходного сигнала (ось y) от концентрации (ось x). Проверить визуально на наличие выбросов, которые могут быть не выявлены регрессией. Рассчитать соответствующие статистические параметры регрессии. Рассчитать и нанести на график остатки (разности между наблюдаемым и рассчитанным по линейной зависимости значениями y для каждого значения x). Случайное распределение остатков вокруг нулевого значения подтверждает линейность. Систематическое отклонение свидетельствует о нелинейности или зависимости дисперсии от уровня концентрации.	Этот этап необходим для исследования рабочего диапазона, который предполагается линейным, особенно в том случае, когда в методе используется калибровка по двум точкам. Если стандартное отклонение пропорционально концентрации, тогда рассматривают вопрос о расчете взвешенной регрессии вместо простой невзвешенной линейной регрессии. Не стоит удалять выбросы без предварительной проверки с помощью дополнительных измерений при близких значениях концентрации. В некоторых случаях калибровки приборов стоит попробовать описать данные нелинейной зависимостью. При этом следует увеличить количество проб. Как правило, не рекомендуется использовать функции порядка выше второго.
3) Откалибровать прибор в соответствии с предложенной методикой калибровки. Проанализировать 2-3 раза, в соответствии с документом на методику, холостые пробы и стандартные образцы или холостые пробы с добавками с 6 – 10 значениями концентрации, равномерно распределенными по <i>всему интересующему диапазону</i> .	1	Построить график зависимости измеренной концентрации (ось y) от концентрации в пробах (ось x). Рассмотреть график и примерно определить линейный диапазон и верхнюю и нижнюю границы рабочего диапазона. Рассчитать соответствующие статистические параметры регрессии. Рассчитать и нанести на график остатки (разности между наблюдаемым и рассчитанным по линейной зависимости значениями y для каждого значения x). Случайное распределение остатков вокруг нулевого значения подтверждает линейность. Систематическое отклонение от нуля свидетельствует о нелинейности.	Этот шаг позволяет оценить, насколько предложенные диапазон прибора и методика калибровки пригодны для данного применения. Если имеются результаты исследования смещения и прецизионности, охватывающие интересующий диапазон, тогда отдельное исследование рабочего диапазона метода может не понадобиться.

6.4 Аналитическая чувствительность

6.4.1 Определение

Аналитическая чувствительность – это изменение выходного сигнала прибора, которое соответствует изменению измеряемой величины (например, концентрации аналита), т.е. это градиент калибровочной кривой [7, 18]. Прилагательное "аналитическая" рекомендуется использовать для того, чтобы избежать путаницы с понятием "диагностическая чувствительность" из области лабораторной медицины [43]. Иногда термином "чувствительность" называют предел обнаружения, но такое его употребление не рекомендует VIM.

6.4.2 Применение

Аналитическая чувствительность не является особо важной характеристикой. Однако ее полезно применять, по крайней мере, в двух случаях:

1. Иногда нам известна теоретическая аналитическая чувствительность. Многие ион-селективные электроды ведут себя в соответствии с законом Нернста, например, изменение сигнала исправного стеклянного электрода должно составлять 59 мВ/рН.
2. Для спектрофотометрических измерительных систем оптическую плотность можно рассчитать по закону Ламберта – Бера. Это дает возможность проверить характеристики прибора, и некоторые стандарты требуют проведения такой проверки [58].

6.5 Правильность

6.5.1 Терминология для описания качества измерения

В данном руководстве для описания качества результатов, полученных с помощью определенного метода, мы используем три связанные между собой характеристики: *правильность*, *прецизионность* и *неопределенность*. Тем не менее, исследователи часто используют другие понятия, например, разные виды погрешностей (случайная, систематическая и суммарная), точность (правильность и прецизионность) и неопределенность. Некоторые из этих понятий являются качественными, некоторые – количественными. Со временем многие термины и определения менялись и появлялись новые термины. Кроме того, в различных секторах до сих пор отдают предпочтение разным терминам, и все это приводит к немалой путанице. На рис. 4 показана связь между терминами, а более подробную информацию можно найти в VIM [7] и руководстве Eurachem по терминологии [8].

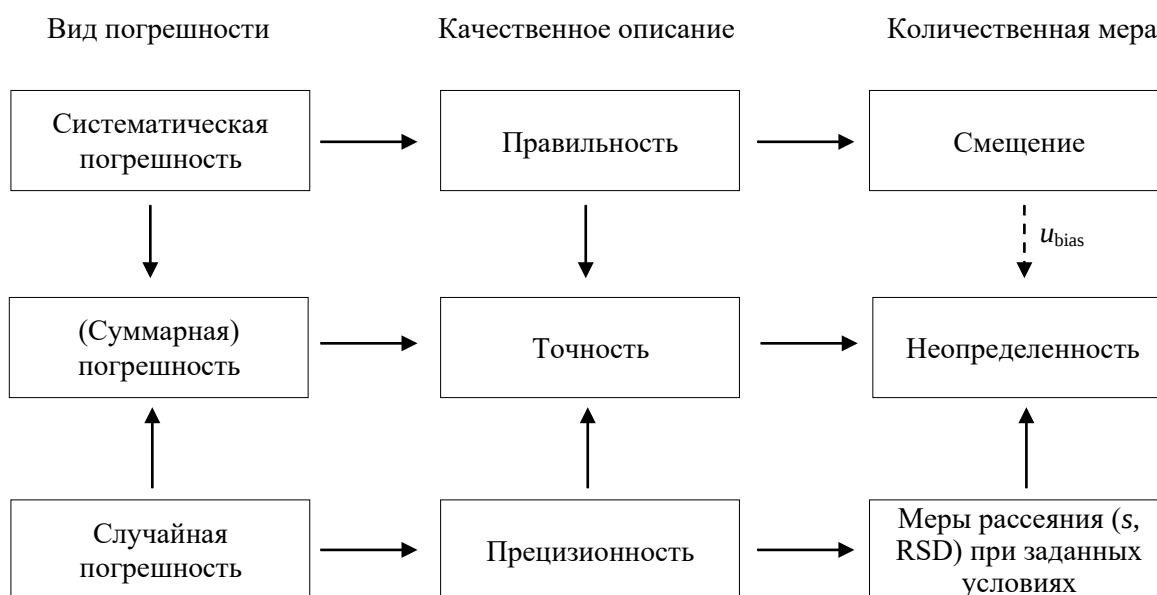


Рис. 4. Связь между некоторыми основными понятиями, используемыми для описания качества результатов измерений (на основе работы Menditto et al. [59]). Оценка неопределенности в соответствии с GUM [21] предполагает введение поправки на известное смещение и включение неопределенности поправки u_{bias} в окончательный бюджет неопределенности. На рисунке это обозначено пунктирной стрелкой под блоком "смещение". Как концепция точности, так и концепция неопределенности предполагают, что измерения выполняют в соответствии с документом на методику и что "грубые ошибки" (промахи) не учитывают.

"Точность" измерения выражает близость единичного результата к опорному значению* [29, 48] (точное определение см. в VIM, п. 2.13). Валидация метода направлена на исследование точности результатов путем оценки систематических и случайных влияний на единичные результаты. Поэтому, как правило, исследуют две составляющие точности: "правильность" и "прецизионность". Кроме того, все более распространенным становится представление точности через единую числовую характеристику – "неопределенность измерения". Оценка правильности рассмотрена ниже, прецизионности – в разделе 6.6, а неопределенности – в разделе 6.7.

"Правильность" измерения является выражением того, насколько близко среднее значение бесконечного количества результатов измерений (полученных исследуемым методом) к опорному значению. Поскольку невозможно выполнить бесконечное количество измерений, то правильность измерить нельзя. Можно, однако, получить практическую оценку правильности. Эту оценку, как правило, количественно выражают через "смещение".

* Опорное значение иногда называют "истинным значением" или "условно истинным ("действительным") значением".

6.5.2 Определение смещения

Практическое определение смещения состоит в сравнении среднего значения результатов ($\bar{x}$), полученных с помощью исследуемого метода, с соответствующим опорным значением (x_{ref}). Есть три основных способа оценки: а) анализ стандартных образцов, б) экспериментальное определение степени извлечения с использованием проб с добавками и в) сравнение с результатами, полученными другим методом (см. "Краткую справку 6"). Исследование смещения должно охватывать всю область применения метода, и поэтому может потребоваться анализ различных типов проб и/или определение различных уровней содержания аналита. Чтобы этого достичь, может понадобиться сочетание различных указанных выше способов.

Смещение можно представить в абсолютном виде:

$$b = \bar{x} - x_{ref} \quad (1),$$

в относительном (в процентах):

$$b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100 \quad (2)$$

или как степень извлечения добавки:

$$R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{spike}} \times 100 \quad (3)$$

где $\bar{x}'$ – среднее значение для пробы с добавкой, а x_{spike} – добавленная концентрация.

Кроме того, в некоторых видах аналитических измерений используют также "степень извлечения" ("эффективную степень извлечения"), выраженную в процентах [60]:

$$R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100 \quad (4)$$

Чтобы определить смещение с помощью стандартных образцов, находят среднее значение и стандартное отклонение в серии повторных измерений и сравнивают результаты с аттестованным значением стандартного образца. Идеальным стандартным образцом является аттестованный матричный стандартный образец со значениями свойств, близкими к свойствам исследуемых проб. Аттестованные стандартные образцы (CRM) являются общепризнанным средством установления метрологической прослеживаемости [61, 62]. Также важно помнить, что в ходе валидационного исследования конкретный стандартный образец можно использовать только с одной целью. Например, стандартный образец, используемый для калибровки, нельзя использовать для оценки смещения.

В сравнении с большим разнообразием типов проб и аналитов, с которыми сталкиваются лаборатории, количество доступных стандартных образцов является весьма ограниченным, и при этом еще важно, чтобы выбранный образец *подходил для данного применения*. В некоторых случаях следует знать детали характеристики стандартного

образца, например, не предусматривает ли процедура подготовки пробы, используемая при характеристике образца, определение не общего содержания аналита, а только его количества, извлекаемого при определенных условиях. Для работ в регуляторной сфере необходимо использовать соответствующие аттестованные образцы, по возможности, с идеально близкой к пробам матрицей. Для постоянного контроля смещения методов, используемых в течение длительного времени в работах для собственных нужд, можно применять стабильный внутрилабораторный образец, однако при первоначальной оценке необходимо использовать аттестованный стандартный образец.

В отсутствие подходящих стандартных образцов оценить вероятный уровень смещения можно по данным о степени извлечения (полученным в опытах с добавками). Аналит может присутствовать в образце в различных формах, и иногда определять нужно только некоторые из них. Следовательно, конкретный метод может быть специально предназначен для определения только одной из форм аналита. Неудача с определением всего присутствующего аналита или его части может быть связана с самой сущностью метода. Таким образом, необходимо оценивать эффективность метода для обнаружения всего присутствующего аналита [60, 63].

Поскольку обычно не известно, какое количество конкретного аналита присутствует в пробе, нельзя наверняка быть уверенным в эффективности метода с точки зрения извлечения аналита из матрицы пробы. Одним из способов определения эффективности экстракции является добавление аналита в пробу в различных концентрациях с последующим экстрагированием и измерением концентрации аналита. Существенная проблема в данном случае состоит в том, что аналит, введенный таким образом, вероятно, не будет связан так же сильно, как тот, что присутствует в матрице пробы естественным образом, поэтому данный способ покажет завышенную эффективность экстракции.

Можно оценить смещение путем сравнения результатов, полученных с помощью исследуемого метода, с результатами, полученными другим методом. Существует два основных типа альтернативных методов – референтный метод и метод, который в настоящее время лаборатория использует в своей регулярной работе. С помощью референтного метода получают "принятое опорное значение" измеряемой величины, причем, как правило, с меньшей неопределенностью по сравнению с исследуемым методом. Особым видом референтного метода является первичный метод*. Второй случай имеет место, когда целью

* "Первичный метод" – это метод, имеющий наивысшие метрологические свойства, реализация которого полностью описана и понятна в единицах SI, и результаты которого получают без сравнения с эталоном той же величины (CCQM). Соответствующий термин в VIM (см. п. 2.8) – "первичная референтная методика измерений".

валидации является демонстрация эквивалентности результатов, полученных с помощью исследуемого метода, и результатов, которые дает существующий метод. Здесь задача состоит в том, чтобы установить отсутствие значимого смещения по отношению к результатам, полученным с помощью существующего метода (хотя результаты измерения этим методом могут сами по себе быть смещенными).

В обоих случаях сравнивают результаты, полученные с помощью исследуемого и альтернативных методов для одного и того же образца или образцов. Это могут быть внутрилабораторные стандартные образцы или просто типичные пробы. Преимущество такого подхода состоит в том, что здесь образцы не обязательно должны быть аттестованными стандартными образцами, т.к. опорное значение дает альтернативный метод. Следовательно, метод можно проверить на "реальных" образцах, близким к пробам, с которыми будет иметь дело лаборатория в своей повседневной работе.

6.5.3 Интерпретация результатов определения смещения

На рис. 5 показаны две составляющие смещения, которые мы назовем "смещением метода" и "лабораторным смещением".

Смещение метода возникает вследствие систематических погрешностей, присущих этому методу, независимо от того, какая лаборатория его применяет. Лабораторное смещение возникает вследствие дополнительных систематических погрешностей, характерных для лаборатории и ее реализации метода. Лаборатория сама по себе может оценить только суммарное (общее) смещение от этих двух источников. Проверяя смещение, необходимо принимать во внимание действующие договоренности, принятые в определенных случаях. Например, некоторые регуляторные нормы для пищевых продуктов выражены как значения величины, определяемой с помощью конкретного эмпирического ("операционно определенного") стандартного метода. По определению, смещение метода для "эмпирических" методик измерения равно нулю. Тогда смещение, обусловленное исключительно конкретным методом (см. рис. 5), не принимают во внимание, и основным вопросом является метрологическая сопоставимость с другими лабораториями, которые применяют тот же метод. В этом случае лаборатория должна, в идеале, определять смещение, используя стандартный образец, аттестованный с помощью конкретного регуляторного или исследуемого эмпирического метода, и тогда можно следовать обычным правилам проверки и интерпретации смещения. Если такого образца нет или нужна дополнительная информация, лаборатория может использовать другие образцы, но тогда при интерпретации результатов следует принимать во внимание все известные различия между исследуемым методом и методом(-ами), использованным для получения опорного значения.

Бывает так, что для выполнения конкретного аналитического требования содержание одного и того же аналита можно измерить с помощью нескольких разных измерительных приборов на разных рабочих местах в пределах одной организации. Тогда в этой организации возникают многочисленные комбинированные источники смещения. В такой весьма распространенной сложной ситуации организация может установить процедуры оценки репрезентативной неопределенности, охватывающей все рабочие места/приборы для каждой аналитической задачи. Для этого желательно использовать образец, имеющий те же свойства, в том числе матрицу, что и пробы, подлежащие анализу. С помощью вариационного анализа можно выявить основные факторы изменчивости, вносящие вклад в суммарную неопределенность измерений, и далее предпринять действия для уменьшения различий в пределах организации.

Однако в большинстве случаев решение о приемлемости смещения следует принимать исходя из суммарного смещения, измеренного с помощью соответствующих стандартных образцов, проб с добавками или референтных методов, с учетом прецизионности метода и всех данных по неопределенности опорных значений, а также точности, необходимой для конечного применения. Рекомендуется проводить статистические проверки на значимость [64, 65].

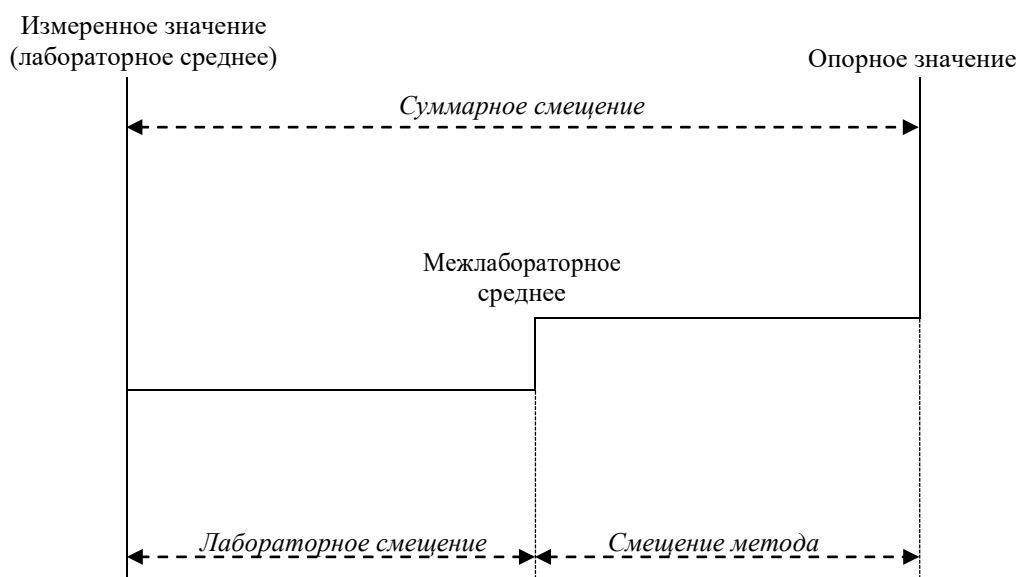


Рис. 5. Общее измеренное смещение состоит из смещения метода и лабораторного смещения. Примечание. Показанные здесь лабораторное смещение и смещение метода имеют один и тот же знак. В действительности это не всегда так.

Краткая справка 6. Правильность

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
а) Анализ стандартного образца исследуемым методом.	10	Сравнить среднее значение, $\bar{x}$ с опорным значением, x_{ref} , стандартного образца. Рассчитать смещение, b , относительное смещение, b (%), или степень извлечения: $b = \bar{x} - x_{ref}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{x_{ref}} \times 100$	Получаем оценку смещения с учетом как смещения метода, так и лабораторного смещения.
б) Анализ матричных холостых проб или тестовых проб без добавок и с добавками определяемого аналита в заданном диапазоне концентрации.	10	Сравнить разницу между средним значением, $\bar{x}'$, для проб с добавками и средним значением, $\bar{x}$, со значением добавленной концентрации, x_{spike} . Рассчитать степень извлечения добавки, R' (%), для различных значений концентрации: $R'(\%) = \frac{\bar{x}' - \bar{x}}{x_{spike}} \times 100$	Чтобы оценить чистую степень извлечения добавки, пробы с добавкой нужно сравнивать с той же пробой без добавки. Степень извлечения, определенная по пробам с добавками или матричным холостым пробам, будет, как правило, выше, чем для реальных образцов, в которых связь аналита с матрицей является более сильной.
в) Анализ стандартного образца/пробы исследуемым методом и альтернативным методом.	10	Сравнить среднее значение, $\bar{x}$ со средним значением, $\bar{x}_{ref}$, полученным альтернативным методом. Рассчитать смещение, b , или относительное смещение, b (%), или степень извлечения $b = \bar{x} - \bar{x}_{ref}$ $b(\%) = \frac{\bar{x} - \bar{x}_{ref}}{\bar{x}_{ref}} \times 100$ $R(\%) = \frac{\bar{x}}{\bar{x}_{ref}} \times 100$	Получаем оценку смещения относительно альтернативного метода. В качестве альтернативного можно использовать или референтный метод, или, если есть намерение заменить один метод другим и нужно продемонстрировать их эквивалентность, метод, применяемый в настоящее время в лаборатории. Сам по себе альтернативный метод может быть со смещением, и в этом случае эксперимент не даст абсолютную оценку правильности.
Примечание. Смещение может изменяться в зависимости от матрицы и уровня концентрации, и из этого следует, что в плане валидации должны быть указаны матрицы и уровни концентрации, которые нужно исследовать.			

6.6 Прецизионность

6.6.1 Многократные измерения

Многократные измерения необходимы для получения надежных оценок характеристик метода, таких как прецизионность и смещение. Эксперименты с многократными измерениями нужно планировать с учетом всех возможных изменений рабочих условий, которые могут иметь место при регулярном применении метода. Целью должно быть определение типичной, а не минимальной изменчивости.

6.6.2 Условия прецизионности

Прецизионность (прецизионность измерения) является мерой близости результатов между собой [7, 29]. Обычно ее выражают статистическими параметрами, которые характеризуют рассеяние результатов. Как правило, это стандартное отклонение (или относительное стандартное отклонение), рассчитанное по результатам многократных измерений на подходящей пробе при заданных условиях. Выбор "заданных условий" является важным аспектом оценки прецизионности измерения, поскольку условия определяют тип полученной оценки прецизионности. "Сходимость измерений" и "воспроизводимость измерений" являются двумя крайними возможными показателями прецизионности. Как правило, документы на стандартизированные методы (например, стандарты ISO) содержат, когда это применимо, данные и по сходимости, и по воспроизводимости.

Сходимость, которая характеризует предположительно наименьший разброс результатов, является мерой изменчивости результатов измерений, выполняемых одним аналитиком, с использованием одного и того же оборудования в течение короткого интервала времени*.

Воспроизводимость, которая характеризует предположительно наибольший разброс результатов, является мерой изменчивости результатов между лабораториями†.

Между этими крайними показателями находится "промежуточная прецизионность (измерения)", которая дает оценку разброса результатов, полученных в одной лаборатории,

* Сходимость иногда называют "внутрисерийной", "внутрипартийной" и "внутрианалитической" прецизионностью.

† При валидации воспроизводимость понимают как разброс между лабораториями, применяющими один и тот же метод. Воспроизводимость может также относиться к разбросу между лабораториями, которые применяют различные методы, но для измерения одной и той же величины [7].

но в условиях более изменчивых, чем условия сходимости. В каждом конкретном случае эти условия нужно точно указывать. Такая оценка прецизионности должна отображать все источники разброса, которые имеют место в одной лаборатории в процессе ее регулярной работы (разные аналитики, продолжительный интервал времени, различное оборудование и т.д.)^{*}.

6.6.2.1 Оценка прецизионности – общие аспекты

Прецизионность, как правило, зависит от концентрации аналита, и поэтому ее необходимо определять в нескольких точках во всем исследуемом диапазоне. Этими точками могут быть некоторая заданная концентрация (например, регуляторный предел) и пределы интервала измерения. При необходимости нужно установить соотношение между прецизионностью и концентрацией аналита. Если измеренная концентрация существенно превышает предел обнаружения, прецизионность часто бывает пропорциональна концентрации аналита. В таких случаях прецизионность целесообразно выражать через относительное стандартное отклонение, поскольку оно будет приблизительно постоянным во всем исследуемом диапазоне.

Для качественных методов прецизионность нельзя выразить как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение, но ее можно представить как долю истинно и ложно положительных (и отрицательных) результатов [55] (см. раздел 6.2.6).

Оценка прецизионности требует проведения достаточного количества многократных измерений на подходящих образцах. Образцы должны быть близки к исследуемым пробам по матрице, концентрации аналита, однородности и стабильности, но это не обязательно должны быть аттестованные стандартные образцы. Многократные измерения должны быть независимыми, т.е. должен быть повторен полный процесс измерения, в том числе все этапы подготовки пробы. Минимальное количество повторов в разных программах валидации составляет, как правило, от 6 до 15 для каждого образца, используемого в процессе исследования.

Следует помнить, что получить надежную оценку стандартного отклонения по данным из серии с малым количеством повторов достаточно сложно. Если это допустимо, для получения оценок с достаточным числом степеней свободы можно объединять в одну совокупность результаты нескольких небольших серий повторных измерений.

Эффективным средством для получения оценок сходимости и промежуточной прецизионности с достаточным числом степеней свободы являются некоторые планы эксперимента с обработкой результатов методами дисперсионного анализа (ANOVA) (более

^{*} Промежуточную прецизионность иногда называют "внутрилабораторной воспроизводимостью", "межсерийным разбросом", "межпартийным разбросом" или "межаналитическим разбросом".

подробно этот подход описан в разделе 6.6.4 и приложении С). Информация об экспериментальной оценке прецизионности приведена в "Краткой справке 7".

6.6.3 Пределы прецизионности

По стандартному отклонению s можно рассчитать "предел прецизионности" [29, 48]. Он позволяет аналитику принять решение о значимости, при заданном доверительном уровне, различия между результатами повторных анализов пробы, полученными при заданных условиях. Предел сходимости (r) рассчитывают по формуле:

$$r = \sqrt{2} \times t \times s_r \quad (5)$$

где коэффициент $\sqrt{2}$ отражает то, что речь идет о разнице между двумя результатами измерений, t – двусторонний критерий Стьюдента для определенного числа степеней свободы (которое относится к оценке s_r) при заданном доверительном уровне. Для относительно большого количества степеней свободы $t \approx 2$ при доверительном уровне 95 %, поэтому предел сходимости часто рассчитывают приблизительно по формуле:

$$r = 2,8 \times s_r \quad (6)$$

Предел промежуточной прецизионности и предел воспроизводимости (R) рассчитывают аналогичным образом, заменив s_r на s_I и s_R , соответственно.

Как правило, документы на стандартизированные методы (например, стандарты ISO) содержат, когда это применимо, значения и предела сходимости, и предела воспроизводимости.

6.6.4 Одновременное определение сходимости и промежуточной прецизионности

Методы одновременного определения сходимости и промежуточной прецизионности описаны в ISO 5725-3 [29]. Кроме того, определить сходимость и промежуточную прецизионность в одном исследовании позволяет план эксперимента, основанный на "Гармонизированном руководстве по валидации методов анализа в одной лаборатории" [12]. Промежуточные пробы из отобранного для исследований материала неоднократно анализируют в условиях сходимости в нескольких различных сериях при максимально отличных условиях между сериями (разные дни, разные аналитики, разное оборудование и т.д.). С помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA [5, 6] можно рассчитать сходимость как внутригрупповую прецизионность, а промежуточную прецизионность вычислить как квадратный корень из суммы квадратов внутригрупповой и межгрупповой прецизионности. Такой план может быть эффективным средством для получения оценок сходимости и межгрупповой прецизионности с достаточным числом степеней свободы. Например, 8 групп из двух повторов дают 8 и 7 степеней свободы для оценок сходимости и межсерийной прецизионности, соответственно. (Подробнее это изложено в приложении С).

Краткая справка 7. Сходимость, промежуточная прецизионность и воспроизводимость

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
Анализ стандартных образцов, избыточных тестовых проб или холостых проб с добавками при различных значениях концентрации во всем рабочем диапазоне. Сходимость и промежуточную прецизионность можно определить в отдельных исследованиях (см. а) и б) ниже) либо одновременно в одном исследовании (см. в)).			
а) Один аналитик, одно оборудование, одна лаборатория, короткий промежуток времени.	6 – 15 повторов для каждого образца.	Определить стандартное отклонение (s) результатов для каждого образца.	Получаем стандартное отклонение сходимости s_r для каждого образца. ^а
б) Разные аналитики, разное оборудование, одна лаборатория, длительный промежуток времени.	6 – 15 повторов для каждого образца.	Определить стандартное отклонение (s) результатов для каждого образца.	Получаем стандартное отклонение промежуточной прецизионности s_I для каждого образца.
в) Разные аналитики, разное оборудование, одна лаборатория, длительный промежуток времени.	6-15 групп двойных измерений ^б в условиях сходимости в разные дни/на разном оборудовании для каждого образца.	Рассчитать стандартное отклонение сходимости по результатам ANOVA для каждого образца. Рассчитать межгрупповое стандартное отклонение по результатам ANOVA и объединить со стандартным отклонением сходимости для каждого образца.	Получаем стандартное отклонение сходимости s_r для каждого образца. Получаем стандартное отклонение промежуточной прецизионности s_I для каждого образца.
г) Разные аналитики, разное оборудование, разные лаборатории, длительный промежуток времени.	6-15 групп двойных измерений ^б в условиях сходимости в разных лабораториях для каждого образца.	Рассчитать стандартное отклонение сходимости по результатам ANOVA для каждого образца. Рассчитать межлабораторное стандартное отклонение по результатам ANOVA и объединить со стандартным отклонением сходимости для каждого образца.	Получаем стандартное отклонение сходимости s_r для каждого образца. Получаем стандартное отклонение воспроизводимости s_R для каждого образца. Для этого нужны специальные межлабораторные сличения ("совместное исследование").
^а Стандартное отклонение сходимости можно оценить, объединив нескольких небольших серий данных, например, $n = 2$, полученных в разные дни.			
^б Двойные измерения в пределах каждой группы обеспечивают сбалансированное количество степеней свободы для оценок внутри- и межгрупповых стандартных отклонений. Увеличение количества повторов в каждой группе увеличивает количество степеней свободы, связанных с оценкой сходимости.			

6.7 Неопределенность измерения

Детальное рассмотрение неопределенности (измерения) выходит за рамки данного руководства, но подробную информацию можно найти в других источниках [21, 22]. Неопределенность – это интервал, связанный с результатом измерения, выражающий диапазон значений, которые можно обоснованно отнести к измеряемой величине. Оценка неопределенности должна учитывать *все выявленные факторы*, влияющие на результат. Неопределенности, связанные с каждым из факторов, объединяют по установленным правилам.

Различные способы оценивания неопределенности результатов химических измерений описаны в [22, 66, 67, 68]. Они учитывают:

- общую долговременную прецизионность метода (т.е. промежуточную прецизионность или воспроизводимость);
- смещение и его неопределенность, в том числе статистическую неопределенность, связанную с измерением смещения, и неопределенность опорного значения [69, 70, 71, 72, 73];
- калибровку оборудования. Неопределенность, связанная с калибровкой оборудования, например, весов, термометров, пипеток и колб, часто пренебрежимо мала по сравнению с общей прецизионностью и неопределенностью смещения. Если такое предположение является обоснованным, тогда неопределенность калибровки можно не включать в оценку неопределенности;
- любые другие существенные факторы. Например, диапазоны температуры или времени, разрешенные методом, могли быть не полностью исследованы при валидации, и, возможно, нужно будет дополнительно учесть их влияние на неопределенность. Такие воздействия можно количественно оценить при исследовании устойчивости (см. раздел 6.8) или в других исследованиях, которые позволяют установить степень влияния определенного фактора на результат.

Если вклад отдельных факторов существенный, например, для калибровочных лабораторий, тогда необходимо рассматривать составляющие от каждого фактора в отдельности.

Отметим, что стандартное отклонение воспроизводимости можно считать рабочей оценкой суммарной стандартной неопределенности, когда лабораторное смещение, определенное с помощью надлежащих образцов, невелико по сравнению со стандартным отклонением воспроизводимости, внутрилабораторная сходимость сопоставима со сходимостью стандартного метода и промежуточная прецизионность лаборатории не превышает приведенное в публикациях стандартное отклонение воспроизводимости

(дополнительно нужно рассматривать факторы, выходящие за рамки совместного исследования) [67].

6.8 Устойчивость

6.8.1 Определение

"Устойчивость" аналитической методики – это "мера ее способности сохранять свои характеристики при малых, но преднамеренных изменениях параметров метода. Устойчивость является показателем надежности метода при его нормальном применении" [13].

6.8.2 Проверка на устойчивость

В любом методе есть определенные этапы, недостаточно точное выполнение которых может существенно повлиять на характеристики метода и даже привести к тому, что метод вообще не будет работать. Такие этапы нужно выявлять, как правило, в процессе разработки метода и, по возможности, оценивать их влияние на характеристики метода с помощью "проверки на устойчивость". В документе АОАС [74] дано определение этого термина и описание принятой методики выполнения такой проверки с использованием плана эксперимента Плакетта-Бермана.

"Проверка на устойчивость" предполагает внесение преднамеренных изменений в метод и исследование их влияния на характеристики метода.* По результатам эксперимента можно определить переменные параметры метода, которые оказывают наибольшее влияние, и затем тщательно их контролировать при реализации метода. Если потребуются усовершенствовать метод, то вероятно, можно будет сосредоточиться на тех частях метода, которые являются наиболее уязвимыми.

Устойчивость должна быть установлена для методов, разработанных в лаборатории или взятых из научной литературы, а также методов, опубликованных органами по стандартизации, но применяемых вне сферы, указанной в стандарте на метод. Устойчивость методов, опубликованных органами по стандартизации, в случае их применения в рамках указанной сферы, была, как правило, исследована в процессе стандартизации. Поэтому в большинстве случаев исследовать устойчивость на уровне одной лаборатории не обязательно. Информация об устойчивости должна быть приведена в лабораторной методике

* Обычно исследуют влияние на измеряемую величину, но можно также исследовать влияние на некоторый экспериментальный параметр, например, разрешение пиков на хроматограмме.

в виде установленных допустимых пределов для критических с точки зрения устойчивости параметров эксперимента (см. пример 5 и "Краткую справку 8").

Пример 5. Выдержки из ISO 11732 [58]. Пункты, показывающие критичность некоторых параметров эксперимента.

- NH_4Cl высушивают до постоянной массы при температуре $(105 \pm 2)^\circ\text{C}$.
- Данные значения величины можно уменьшить (например, на одну десятую).
- При хранении в пластиковой (полиэтиленовой) бутылке при комнатной температуре раствор стабилен в течение примерно 1 месяца.
- Оптическая плотность раствора должно составлять от 0,3 до 0,5.
- Дегазировать и очистить раствор..., залить его в емкость с реактивом и выдержать не менее 2 часов.
- Этот раствор можно хранить в холодильнике не более одной недели.
- Для отбора проб можно использовать емкости из стекла, полиалкенов или политетрафторэтилена (ПТФЭ).
- В исключительных случаях пробу можно хранить до двух недель при условии, что она была профильтрована через мембрану после подкисления.

Краткая справка 8. Устойчивость

Что делать	Сколько раз	Что вычислить/определить по полученным данным	Комментарии
Определить переменные параметры, которые могут существенно повлиять на характеристики метода. Выполнить эксперименты (анализ стандартных образцов или тестовых проб) для изучения влияния систематического изменения параметров на результаты измерений.	Выбрать оптимальное количество, используя методы планирования эксперимента. Например, по плану эксперимента Плакетта-Бермана [74] можно исследовать 7 параметров в 8 опытах.	Определить влияние каждого изменения условий на результаты измерений. Составить перечень переменных параметров в порядке убывания степени их влияния на характеристики метода. С помощью тестов на значимость проверить, являются ли наблюдаемые эффекты статистически значимыми.	Разработать меры контроля качества или изменить метод, чтобы контролировать критические переменные параметры, например, путем установления для них надлежащих допустимых пределов в стандартной операционной процедуре.

7. Применение валидированных методов

Используя метод, разработанный не вашей лабораторией, будь то метод, разработанный в какой-то другой лаборатории, опубликованный метод или даже стандартный или нормативный метод, нужно иметь в виду два важных момента.

Во-первых, достаточно ли вам имеющихся данных валидации или нужна дополнительная валидация? Также стоит отметить, что, помимо объема предоставленной информации, важна надежность источников данных о валидации. Результаты совместных исследований или данные, полученные признанными организациями по стандартизации, как правило, считаются надежными, и в меньшей мере это относится к данным, опубликованным только в научной литературе или предоставленным производителями оборудования и/или реактивов. Во-вторых, если данных по валидации достаточно, может ли лаборатория выполнить верификацию заявленных характеристик метода (см. раздел 2.2)? Есть ли в лаборатории все необходимые приборы и оборудование? Если в процессе валидации метод был всесторонне исследован при всех предельных значениях рабочих условий, тогда при применении его новым компетентным аналитиком характеристики метода, вероятнее всего, будут находиться в пределах установленных значений. Тем не менее, это всегда необходимо проверять. При условии, что стандартный метод используют в пределах установленной сферы применения, достаточно, как правило, убедиться в способности аналитика получить заданную сходимость и проверить результаты на наличие какого-либо смещения. Подробнее это описано ниже.

Стандартизированные методы, как правило, разрабатывают органы по стандартизации путем проведения совместных исследований в той или иной форме, и в этих органах часто имеются специалисты по статистике, которые обеспечивают правильное планирование, выполнение и оценку результатов валидационных исследований. Стандарт ISO 5725 [29] описывает модель, на которой должны основываться межлабораторные сличения методов для обеспечения надежной информации об их характеристиках. Эта модель находит все большее распространение, однако не ко всем стандартным методам она была применена. Было бы неправильно считать, что все стандартные методы были должным образом валидированы, и поэтому аналитик должен проверить, достаточно ли полной и надежной является представленная информация о характеристиках метода.

Также зачастую считают, что любой аналитик может просто "взять с полки" стандартный метод и сразу же добиться заявленных характеристик. Такое предположение может оказаться безосновательным. Чтобы полностью освоить метод, даже специалист в

конкретной области химии, где этот метод применяется, должен сначала поработать с ним практически.

Для достижения приемлемых показателей при использовании валидированных (а также, в данном контексте, любых других) методов желательно придерживаться следующих правил.

1. Во-первых, аналитик должен полностью ознакомиться с новым методом, прежде чем использовать его впервые. Лучше всего, если сначала аналитику метод покажет специалист, который уже этот метод освоил. Тогда на начальном этапе аналитик должен применять метод под пристальным наблюдением такого специалиста. Степень контроля постепенно снижают, пока аналитик не станет достаточно компетентным, чтобы работать самостоятельно. Критерием компетентности может быть, например, способность аналитика достичь заявленных значений характеристик метода – сходимости, предела обнаружения и т.д. Такой способ освоения новых методов является весьма распространенным, и процедуры обучения в лаборатории часто планируют именно таким образом, устанавливая объективные показатели компетентности, которые периодически контролируют в процессе обучения. В любом случае аналитик должен прочитать методику полностью, ознакомиться с теорией, на которой основаны измерения, мысленно пройти все этапы, определяя моменты, когда можно делать перерывы, и части процесса, которые аналитик должен выполнять непрерывно. Когда нужно готовить реактивы, насколько они стабильны после приготовления? Нужно ли их готовить заранее? Классическая ошибка – это когда тратят несколько часов на подготовку проб, а затем обнаруживают, что процесс приготовления реактива, необходимого для следующего этапа работы, включает в себя сложный синтез, тем временем подготовленные пробы могут начать разрушаться.

2. Во-вторых, нужно оценить, с каким количеством проб стоит работать одновременно. Лучше проанализировать хорошо несколько проб, чем пытаться сделать сразу много анализов, а потом большую часть их переделывать.

3. Наконец, до начала работ следует убедиться в наличии всего необходимого для реализации метода. Должны быть собраны вместе нужное оборудование, реактивы и эталоны (соответствующим образом приготовленные), зарезервировано, при необходимости, место в вытяжных шкафах и т.д.

При адаптации или изменении метода, валидированного в другой лаборатории, необходимо провести соответствующую повторную валидацию. В зависимости от характера изменений, их внесение может привести к тому, что данные первоначальной валидации утратят смысл.

8. Использование данных валидации для контроля качества

8.1 Введение

"Обеспечение качества" и "контроль качества" – термины, значение которых часто зависит от контекста. Согласно ISO, "обеспечение качества" относится к действиям, которые совершает лаборатория для обеспечения уверенности в том, что требования к качеству будут выполнены, а "контроль качества" включает отдельные меры, направленные на практическое выполнение этих требований [9].

Валидация метода дает представление о возможностях и ограничениях, присущих методу при его регулярном применении, когда метод находится под контролем. Чтобы убедиться в том, что метод находится под контролем, т.е. его характеристики соответствуют ожидаемым, нужно предпринимать определенные действия. На этапе валидации метод, в основном, применяют к образцам известного состава. Далее, при регулярном применении метода, его используют для анализа проб неизвестного состава. Надлежащим средством внутреннего контроля качества может быть дальнейший регулярный анализ стабильных тестовых образцов, что позволит аналитику понять, чем вызван разброс полученных результатов – действительным различием между собой проанализированных проб или же непредполагаемым и нежелательным изменением характеристик метода. На практике анализ этих тестовых образцов как часть процесса контроля качества нужно выполнять с каждой партией проб. Проведение проверок будет зависеть от характера, важности и частоты анализов, размера партии, степени автоматизации и сложности испытания, а также от опыта, приобретенного во время разработки и валидации метода. Контроль качества может осуществляться в разных формах, как внутри лаборатории (внутренний контроль), так и между лабораторией и другими лабораториями (внешний контроль).

8.2 Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества – это действия, которые выполняет персонал лаборатории для непрерывного контроля операций и результатов измерений, чтобы определить, достаточно ли результаты достоверны для того, чтобы их можно было выдавать заказчику [18, 75]. Такими действиями могут быть анализы стабильных проб, холостых проб, эталонных растворов или материалов, подобных тем, которые используют для калибровки, проб с добавками, слепых проб и образцов для контроля качества [76]. Для постоянного отслеживания результатов контроля качества рекомендуют использовать контрольные карты [76, 77]. Установленные процедуры контроля качества должны быть доказательно

достаточны для обеспечения достоверности результатов. Для контроля различных параметров изменчивости процесса можно использовать разные способы контроля качества. Периодический анализ образцов для контроля качества в аналитической партии позволяет выявить дрейф в системе; используя различные типы холостых проб, можно определить составляющие выходного сигнала прибора, не обусловленные наличием аналита; повторные анализы позволяют проверить сходимость.

Образцы для контроля качества – это типичные пробы, которые достаточно стабильны и однородны в течение заданного периода времени, чтобы полученные на них результаты были постоянны (с учетом случайного изменения характеристик метода), и имеются в количестве, достаточном для проведения повторных анализов в течение определенного времени. В течение этого периода можно проверить промежуточную прецизионность метода, фиксируя результаты анализа образца для контроля качества, которые обычно наносят на контрольную карту. На карте устанавливают границы (как правило, "предупредительные границы" устанавливают на расстоянии $\pm 2s$, а "границы действия" – $\pm 3s$ от среднего значения). Если нанесенные на карту данные контроля качества соответствуют определенным критериям, связанным с установленными границами, результаты контроля качества признают удовлетворительным. Если результат, полученный на образце для контроля качества, является приемлемым, то, вероятно, результаты анализа проб из партии, в которую был включен этот образец, можно считать достоверными. Приемлемость значения, полученного на образце для контроля качества, необходимо проверять как можно раньше, насколько это позволяет процесс анализа, чтобы в случае выявления отклонений свести к минимуму напрасную трату усилий на получение недостоверных результатов.

Во время валидации метода получают первоначальные оценки различных показателей прецизионности. Чтобы установленные на контрольной карте границы были реалистичными, измерения нужно выполнять в условиях, характерных для предстоящего регулярного применения метода. Таким образом, в процессе валидации нужно моделировать все возможные изменения рабочих условий: различные аналитики; изменение температуры в лаборатории и т.д. Если этого не сделать, то стандартное отклонение будет заниженным, и в результате на карте будут установлены границы, оставаться в пределах которых при регулярном применении метода будет невозможно. По этой причине, как правило, установленные границы рекомендуют оценивать заново через год или после того, как будет набрано достаточное количество результатов [76].

Используя различные типы холостых проб, аналитик может вводить в расчетные значения содержания аналита поправки, учитывающие должным образом все составляющие

выходного сигнала, не связанные с присутствием аналита. С помощью повторных анализов рутинных проб можно выявлять изменения прецизионности аналитического процесса, которые могут негативно сказаться на результатах [78]. Для проверки сходимости можно делать повторы один за другим в пределах партии.

Анализ слепых проб фактически является формой повторного анализа и средством проверки прецизионности. Сущность его состоит во включении в аналитическую партию дублированных тестовых порций (это может сделать руководитель лаборатории), и называют метод так потому, что аналитик, как правило, не знает, что тестовые порции являются идентичными или дублированными. Таким образом, у аналитика отсутствует предвзятая мысль о том, что конкретные результаты должны быть связаны между собой.

Если эталоны или материалы, аналогичные тем, что используют для калибровки, включить в определенном порядке в аналитическую партию, это позволит проверить стабильность отклика аналитического процесса на содержание аналита.

Обязанностью руководства лаборатории является установление и обоснование надлежащего уровня контроля качества исходя из оценки рисков и с учетом надежности метода, важности работы, а также возможности повторения анализа, если первая попытка была неудачной. Общепринятый уровень внутреннего контроля качества при рутинном анализе составляет 5 %, т.е. одна из каждых 20 проанализированных проб должна быть образцом для контроля качества. Тем не менее, для устойчивых рутинных методов с высокой производительностью можно использовать более низкий уровень контроля качества. Для сложных методик этот уровень иногда составляет 20 %, а в некоторых случаях может потребоваться контроль даже на уровне 50 %. Для редко выполняемых анализов нужно каждый раз делать полную валидацию системы. Этот процесс, как правило, предусматривает использование стандартных образцов с аттестованной или известной концентрацией аналита и проведение последующих многократных анализов пробы и пробы с добавкой (пробы, в которую добавили известное количество аналита). Для анализов, выполняемых чаще, должны выполняться систематические процедуры контроля качества с применением контрольных карт и контрольных образцов.

8.3 Внешний контроль качества

Регулярное участие в программах проверки квалификации (ПК), которые также известны как внешняя оценка качества (ВОК), является общепризнанным способом, с помощью которого лаборатория может контролировать показатели своей работы и сопоставлять их как со своими собственными требованиями, так и с показателями других

подобных лабораторий. ПК помогает выявить межлабораторные различия (воспроизводимость) и систематические погрешности (смещение).

Программы ПК и другие виды межлабораторных сличений являются важным средством контроля степени эквивалентности аналитических результатов на национальном и международном уровне. Полезность этих программ признана органами по аккредитации, и они настоятельно рекомендуют лабораториям участвовать в программах ПК/ВОК как неотъемлемой части их систем управления качеством [79]. Важно постоянно контролировать результаты ПК как части процедур контроля качества и выполнять, при необходимости, корректирующие действия.

В некоторых случаях органы по аккредитации могут устанавливать требование об участии лаборатории в конкретной программе ПК как необходимом условии для аккредитации. Польза от участия в ПК, естественно, зависит от того, насколько хороша сама по себе программа ПК. Требования к компетентности провайдеров программ ПК установлены стандартом ISO/IEC 17043 [80]. Практические сведения о выборе, использовании и интерпретации программ ПК содержатся в руководстве Eurachem [81]. Информацию о большом количестве программ можно найти в базе данных EPTIS (www.eptis.bam.de). Тем не менее, программы, целиком подходящие для новых или редко выполняемых видов анализа, могут отсутствовать. Эти и другие особые случаи рассмотрены в недавно изданном руководстве [82], которое требует, чтобы аккредитованные лаборатории разрабатывали стратегию своего участия в программах ПК.

9. Изложение валидированных методов

9.1 От проекта до окончательной версии

Метод, подлежащий валидации, реализуют в соответствии с документом на методику измерения, который следует считать проектом до тех пор, пока не будет утвержден протокол валидации. Когда валидация завершена, необходимо изложить документ на аналитическую методику так, чтобы метод мог быть реализован четко и однозначно. Для такого требования есть следующие основания:

- Оценки различных параметров метода, сделанные в процессе валидации, предполагают, что метод каждый раз будут применять одинаково. В противном случае фактические характеристики метода не будут соответствовать значениям, рассчитанным по результатам валидации. Таким образом, методика должна быть изложена так, чтобы ограничить возможность внесения в метод случайных изменений.
- Надлежащее изложение документа необходимо также для аудита и оценивания, и, кроме того, может быть важным с точки зрения выполнения договорных или регуляторных требований.
- Правильное изложение метода будет способствовать тому, чтобы от раза к разу метод был реализован единообразно. Поскольку от качества документации прямо зависит постоянство реализации метода, она может повлиять на прецизионность и неопределенность измерения. В реальности составляющая неопределенности, обусловленная нечеткостью изложения метода, может быть настолько велика, что метод фактически станет бесполезным. Чтобы получить разумную оценку неопределенности, нужно сначала устранить все неточности в документации.

9.2 Рекомендации

9.2.1 Проверка правильности изложения

Правильно написать документ на метод анализа не так просто. Информацию нужно излагать примерно в том порядке, в каком она может понадобиться пользователю. Распространенное заблуждение – полагать, что все будут понимать механизм работы метода так же хорошо, как и тот, кто его разработал и описал. Это рискованное предположение. Чтобы проверить правильность изложения метода, можно попросить компетентного коллегу выполнить все действия, строго следуя документу. Если эти действия будут соответствовать тому, что имел в виду разработчик, тогда документом смогут пользоваться разные аналитики

и получать сопоставимые результаты. В противном случае документ нужно переработать, описав операции более подробно и устранив неоднозначность.

9.2.2 Рекомендации стандартов

В ряде стандартов имеются указания о том, какую информацию нужно включать в документы на методы. Вероятно, наиболее полезными для химиков являются стандарты серии ISO 78, которые содержат требования к изложению разного рода методов химического анализа (органы по стандартизации ежегодно разрабатывают, валидируют и, конечно, документально оформляют множество методов, им нужны как можно более гармонизированные подходы к этому, и они разрабатывают такие стандарты, главным образом, для облегчения работы своих технических комитетов). В ISO 78-2 [83] даны рекомендации по изложению общих химических методов. Структура документа, основанная на этом стандарте, приведена в Приложении А. Стандарты устанавливают логический порядок изложения материала, с рекомендованными заголовками разделов и указаниями об информации, которую нужно включать в каждый раздел. Пользуясь этими стандартами, следует стремиться к компромиссу между гибкостью подхода и соответствием общей схеме. Хотя и желательно, чтобы все документы на методы были изложены в одном формате, стоит признать, что не для всех документов нужна одинаковая степень детализации, поэтому во многих случаях в описание метода можно не включать некоторые рекомендованные разделы.

9.2.3 Управление документацией

Для лаборатории, документально оформляющей свои собственные методы, очень полезной может быть разработка "внутреннего стиля". Помимо изложения необходимой информации в логичной и удобной для пользователя последовательности, он также дает возможность распределить нагрузку между несколькими авторами. Проекты, разработанные несколькими авторами, может проверить на взаимное соответствие одно контрольное подразделение.

Документы на методы составляют важную часть системы управления качеством лаборатории и должны подвергаться надлежащему контролю. Целью такого контроля является обеспечение того, что использовать будут только те методы и методики, пригодность которых для применения была установлена. Таким образом, документация на метод должна содержать информацию, которая позволит пользователю судить о том, допущен ли метод к применению и является ли он завершенным. Также должны быть указаны номер версии и дата документа, автор, количество сделанных копий и какие-либо ограничения на копирование.

Со временем иногда возникает необходимость обновить метод. Например, может быть усовершенствована технология, лежащая в его основе. Управление документацией позволяет организованно отменять устаревшие методы и вводить обновленные. В настоящее время процесс управления документацией значительно упрощен благодаря специальному программному обеспечению. Вносить изменения должен только уполномоченный персонал. Контроль за этим можно осуществлять с помощью программного обеспечения, в котором к большинству соответствующих файлов есть широкий доступ "только для чтения" и очень ограниченный – с возможностью внесения изменений.

10. Использование данных валидации для расчета и представления результатов

Аналитик должен уметь превращать данные, полученные при анализе проб с применением валидированного метода, в результаты, которые непосредственно нужны для решения задачи заказчика. Для этого можно использовать характеристики, установленные в процессе валидации. С помощью данных по сходимости, промежуточной прецизионности и воспроизводимости можно проверить значимость различий, наблюдаемых при анализе проб. Контроль качества на основе данных валидации позволяет подтвердить, что метод находится под контролем и дает значимые результаты. Оценка неопределенности измерений позволяет выражать результат в виде диапазона значений с принятым доверительным уровнем.

Для аналитика важно иметь доступ к данным валидации, которые можно использовать для подтверждения достоверности результатов. Другой вопрос, предоставлять ли эту информацию заказчику. Очень часто заказчик не обладает достаточными навыками, чтобы правильно понять ее смысл. В таких обстоятельствах, вероятно, целесообразно было бы предоставлять эти данные по запросу.

В некоторых случаях таким вопросам как валидация метода, изменчивость и неопределенность измерений следует уделять особое внимание, например, в контексте правовом или судебно-медицинском. Лучше открыто заявлять о неопределенности, присущей результатам измерений, и быть готовым обосновать решения, принятые с учетом этой неопределенности.

Следует с осторожностью использовать результаты анализа, включая их неопределенность, для принятия решения о соответствии исходной партии, из которой была взята проба, техническим требованиям или нормативам [84]. Такое заключение может не входить в обязанности аналитика, хотя могут потребоваться его советы по техническим вопросам, которые помогут в принятии решения.

Представляя результаты, аналитик должен решить, следует ли вводить поправки на какие-либо систематические смещения, которые могли быть обнаружены, или привести результаты без поправок, но признать наличие смещения.

Также обратим внимание на представление результата в форме "не обнаружено". Само по себе это утверждение не несет никакой информации и должно сопровождаться указанием того, какой был в данном случае предел обнаружения. Иногда стоит приводить числовое значение, даже если оно ниже установленного ранее предела обнаружения. В некоторых случаях регуляторные органы могут потребовать указать предел количественного определения.

Если с результатом должна быть указана неопределенность, можно привести расширенную неопределенность, применив соответствующий коэффициент охвата. Например, коэффициент охвата, равный 2, соответствует интервалу с доверительным уровнем около 95 %. Подробные указания о представлении неопределенности измерения можно найти в разделе 9 Руководства Eurachem/CITAC [22].

Приложение А. Структура описания метода

В разделе 9 настоящего руководства описано, как нужно документально оформлять метод. Ниже приведен типовой формат описания метода. Он основан на ISO 78-2 [83], но содержит некоторые дополнительные рекомендации по калибровке, контролю качества и управлению документацией. Приложение А дает только общую схему, которую нужно применять с учетом конкретных требований.

А.1 Предисловие

А.1.1 Сведения об изменениях и пересмотре

Этот структурный элемент имеет двоякое назначение. Во-первых, он позволяет вносить незначительные изменения без полного пересмотра и перепечатывания документа. Во-вторых, каждый метод рекомендуют периодически пересматривать для подтверждения его пригодности, и запись в этом разделе свидетельствует о том, что пересмотр был выполнен. Сведения, как правило, помещают в самом начале документа, прямо на передней обложке.

А.1.2 Изменения

Любые рукописные изменения в тексте метода допустимы только при условии, что они также внесены в приведенную ниже таблицу (запись может быть сделана от руки) и должным образом авторизованы. Авторизация подразумевает подтверждение того, что влияние изменений на валидацию метода было исследовано и никаких проблем они не создали, а также того, что изменения внесены во все экземпляры документа.

№	Раздел	Содержание изменения	Дата	Авторизация
1	3.4	Измененное значение расхода 1,2 л/мин	08.02.96	DGH
.....				

А.1.3 Пересмотр

Нужно следить за тем, чтобы дата применения метода всегда находилась в интервале между "датой пересмотра" и "датой следующего пересмотра", указанными в таблице.

Дата пересмотра	Результат пересмотра	Дата следующего пересмотра	Авторизация

А.2 Введение

Во введение, при необходимости, включают комментарии, касающиеся технического содержания методики, оснований для ее разработки и т.д. Если необходима сопутствующая информация о методе, ее желательно включать в этот раздел.

А.3 Название

Название должно содержать информацию о типах проб, к которым можно применять данный метод, определяемых аналитах или характеристиках и принципе измерения. По возможности, название должно включать только приведенные ниже элементы. Рекомендуется следующий формат названия:

Определение А {аналит или измеряемая величина} (в присутствии В {влияющие компоненты} в С {матрица} с применением D {принцип определения}).

А.4 Требования безопасности

Указывают все возможные источники опасности и меры предосторожности, необходимые для ее устранения. Подробно эти меры могут быть описаны в соответствующих разделах, но привлечь внимание к источникам риска и необходимым мерам предосторожности нужно здесь. Следует должным образом предупредить о любых рисках, связанных со следующим:

- обращение с пробами;
- обращение с растворителями, реактивами, стандартными образцами и другими материалами или их приготовление;
- эксплуатация оборудования;
- требования особых условий для работы, например, необходимость использовать вытяжные шкафы;
- последствия выхода за установленные параметры эксперимента (пределы взрываемости).

А.5 Область применения

Этот раздел позволяет быстро оценить, может ли метод подойти для решения поставленной задачи и существуют ли определенные ограничения. Необходимо привести следующую информацию:

- описание решаемой задачи (для чего необходим метод);
- аналиты или измеряемые величины, которые можно определять с помощью данного метода;

- определяемая форма аналита – какие именно формы существования аналита в материале можно определить, общее или извлекаемое его содержание и т.д.;
- матрицы проб, в которых может быть определен аналит;
- рабочий диапазон (интервал измерения), в пределах которого можно применять метод. Его выражают через свойства лабораторной пробы например, концентрацию;
- известные влияющие компоненты, которые препятствуют применению метода или ограничивают его;
- оборудование, используемое в методе;
- минимальный размер пробы.

В пищевой отрасли [35] в качестве синонима сферы применения используют понятие "применимость" и определяют его как "аналиты, матрицы и концентрации, для которых можно удовлетворительно использовать метод анализа".

A.6 (Нормативные) ссылки

Этот раздел содержит перечень документов, необходимых для применения метода. Документы, которые были только источниками для разработки метода, нужно указывать в библиографии в конце документа.

A.7 Определения

В этом разделе приводят все определения используемых в тексте терминов, которые необходимы для его полного понимания. По возможности следует использовать определения ISO. Давайте ссылки на источники. При необходимости в раздел можно включать химические структурные формулы.

A.8 Сущность метода

Указывают основные этапы метода, принцип, на котором основана методика анализа. Можно представить блок-схему или причинно-следственную диаграмму. Раздел должен быть изложен так, чтобы из него можно было легко понять, как работает метод. Необходимо также объяснить принцип выполнения расчетов. Если это нужно для объяснения метода или расчетов, приводят детали соответствующих химических реакций, относящихся к методу (например, в случае применения дериватизации или титриметрии).

Пример: "Концентрацию измеряют с помощью построенной по 6 точкам калибровочной кривой, по которой определяют значение концентрации, соответствующее оптической плотности пробы, вводят в него поправку на холостую пробу и умножают на коэффициент концентрирования".

A.9 Реакции

Раздел должен содержать информацию об основных реакциях, если это необходимо для лучшего понимания текста или вычислений. С помощью уравнений реакций можно обосновать расчеты, выполняемые по экспериментальным данным, и лучше объяснить метод, особенно если имеют место несколько последовательных изменений степени окисления определяемого элемента. В случае титрования уравнения реакции особенно полезны тем, что показывают число эквивалентов в одном моле реагента.

A.10 Реактивы и материалы

В этом разделе приводят перечень всех реактивов и материалов, необходимых для анализа, и их основные характеристики (концентрация, плотность и т.д.). Следует указывать:

- регистрационные номера CAS (при наличии);
- сведения о любой опасности, связанной с образцами и реактивами, и инструкции по их утилизации;
- класс реактива или его чистоту;
- необходимость брать материалы для калибровки и для контроля качества из независимых партий;
- детали приготовления, в том числе необходимость готовить реактивы заранее;
- требования к упаковке и хранению;
- срок годности исходного материала и приготовленного реактива;
- необходимый состав с указанием вида концентрации или другой величины;
- требования к маркировке.

A.11 Оборудование

Нужно описать каждую единицу оборудования и способ их соединения достаточно подробно, чтобы исключить любую неоднозначность при сборе установки. Пронумеруйте их, чтобы далее можно было ссылаться на номера. Для большей ясности можно использовать диаграммы и блок-схемы. Все проверки функционирования собранной аппаратуры необходимо описать в подразделе "Предварительный опыт" или "Пробный опыт" раздела "Выполнение измерений" (см. A.13).

В разделе указывают предельно допустимые значения характеристик оборудования и требования к его верификации со ссылками на раздел "Калибровка" (см. A.13) и всю необходимую эксплуатационную документацию. В соответствующих случаях следует давать ссылки на международные стандарты или другие международно признанные документы на

лабораторную посуду и оборудование. В этот раздел также включают требования к средствам обеспечения надлежащих условий измерений (вытяжные шкафы и т.п.).

A.12 Отбор проб

Здесь подразумевается, что отбор проб охватывает как процесс отбора для получения лабораторной пробы, так и промежуточный отбор из лабораторной пробы тестового образца, из которого извлекают тестовую порцию.

Если процесс отбора пробы и подготовки лабораторной пробы не зависит от химического анализа как такового, то, как правило, достаточно дать ссылку на методику, описывающую конкретно отбор пробы. Если подходящей методики не существует, раздел "Отбор проб" может содержать план и методику отбора проб, включая указания о том, как избежать изменения состава материала и учесть требования к применению статистических методов.

Данный раздел должен содержать всю информацию, необходимую для приготовления тестового образца из лабораторной пробы. Укажите условия хранения, кондиционирования (предварительной обработки) и утилизации проб. Если этап отбора проб достаточно сложный, можно составить отдельный документ с пошаговыми инструкциями.

A.13 Выполнение измерений

Раздел должен содержать последовательное описание всех операций. Если метод уже описан в другом стандарте, тогда пишут "использовать метод, установленный ISO 12345" или "использовать один из методов, установленных ISO 12345" и указывают, при необходимости, какие-либо изменения в методе. Следует обратить внимание на операции, которые требуют особых мер предосторожности. Раздел "Выполнение измерений", как правило, включает в себя подразделы, описывающие следующие элементы и этапы методики:

- тестовая порция (ее приготовление из тестовой пробы или лабораторной пробы и требуемая масса или объем);
- опыты с холостыми пробами (условия и ограничения);
- предварительный или пробный опыт (например, для проверки характеристик измерительного прибора);
- измерение или испытание. Указывают количество измерений или испытаний (например, "повторить дважды") и подробно описывают все этапы;
- калибровка. Определяют самые важные этапы аналитического процесса. Правильность их выполнения обеспечивают за счет точного следования методике и калибровки. Дают ссылки на соответствующие разделы, описанные выше. Приводят

указания по калибровке приборов – что нужно калибровать, как, чем и как часто. Необходимо обратить внимание на соответствующую метрологическую прослеживаемость калибраторов.

A.14 Расчеты

В разделе описывают, как нужно рассчитывать результаты. Приводят информацию о единицах, в которых должны быть выражены результаты измерения и другие величины; уравнение, используемое для расчета; значения символов, используемых в уравнении; количество десятичных знаков или значащих цифр, с которым должен быть представлен результат. Символы величин должны соответствовать ISO 80000 [14].

A.15 Прецизионность

Если для метода проводились межлабораторные сличения, нужно привести данные по прецизионности (т.е. сходимости и воспроизводимости). Данные по прецизионности должны быть рассчитаны (и, желательно, опубликованы) согласно соответствующей части ISO 5725 или другому подходящему международному стандарту (на который нужно дать ссылку). Четко указывайте, в какой форме дана прецизионность – абсолютной или относительной, и представлена ли она в виде пределов прецизионности.

A.16 Обеспечение качества и контроль качества

Одним из результатов валидации должно быть описание необходимых процедур внутреннего и внешнего (проверка квалификации) контроля качества. Нужно объяснить, в какой форме выполняют контроль качества, указать частоту операций контроля качества при анализе партии, критерии приемлемости результатов, действия, которые нужно предпринять в случае отрицательного результата. Дайте ссылки на соответствующие описанные выше разделы.

A.17 Особые случаи

Указывают все изменения, которые необходимо вносить в методику при наличии или отсутствии определенных компонентов в продукте, подлежащем анализу. Об этих изменениях должно быть уже сказано выше в разделе "Область применения". Каждый особый случай нужно представлять под своим заголовком.

A.18 Протокол испытаний

Этот раздел должен содержать перечень информации, которую нужно включать в протокол испытаний. Как правило, представляют следующие данные:

- ссылку на применяемый метод;

- результаты и, при необходимости, соответствующие показатели качества измерения (прецизионность, неопределенность, доверительный интервал), включая ссылки на раздел "Расчеты";

- какие-либо отклонения от методики;
- какие-либо замеченные необычные особенности;
- дата проведения испытания.

A.19 Приложения

Чтобы облегчить восприятие, некоторую информацию удобнее представлять в приложениях. Нужно четко указывать, является ли приложение нормативным или справочным. В приложения, например, могут быть вынесены данные, полученные при валидации метода, анализ рисков и расчет неопределенности. В последнем случае необходимо указать основные составляющие неопределенности, присущие методу, и привести их установленные значения. Следует упомянуть также несущественные составляющие, которые не были учтены в окончательном расчете. Нужно привести суммарную стандартную неопределенность и/или расширенную неопределенность и пояснить, как она была рассчитана. Более подробный расчет может содержаться в отдельном документе, на который дают ссылку.

A.20 Библиография

Если нужны ссылки на источники информации, их можно давать непосредственно в тексте, или, если их несколько, в библиографии в конце документа.

Приложение В. Статистическое обоснование расчета предела обнаружения*

В "Краткой справке 2" в разделе 6.2.3 указано, что предел обнаружения (LOD) можно рассчитать путем умножения соответствующего стандартного отклонения на коэффициент, равный 3. В настоящем приложении приведено статистическое обоснование этого коэффициента.

Целью определения LOD обычно является установление самой низкой концентрации аналита в пробе, которую можно обнаружить с помощью данной методики измерения с заданной доверительной вероятностью. Определение LOD состоит из двух этапов. Сначала определяют "критическое значение". Его устанавливают так, чтобы при реальном *отсутствии* аналита в пробе вероятность получения результата измерения, превышающего критическое значение, была не более α . Превышение критического значения является основанием для признания пробы "положительной". Вероятность ложно положительного результата обычно устанавливают на уровне $\alpha = 0,05$; в таком случае критическое значение будет равно примерно $1,65s$ (где s – стандартное отклонение большого количества результатов, полученных на холостой пробе или пробе с низкой концентрацией аналита, а $1,65$ – значение одностороннего коэффициента Стьюдента t для бесконечного числа степеней свободы и уровня значимости $\alpha = 0,05$). Критическое значение удобнее всего выражать как концентрацию, хотя, в принципе, это может быть любая наблюдаемая величина, например, площадь пика. Каждый результат, превышающий критическое значение, должен быть признан положительным.

Тем не менее, если бы истинное значение концентрации в пробе было точно равно критическому значению (выраженному как концентрация), то следовало бы ожидать, что примерно половина результатов измерения окажется ниже критического значения, и тогда доля ложно отрицательных результатов составит 50 %. Очевидно, что вероятность ложно отрицательного результата на уровне 50 % слишком высока для практического применения; метод не позволяет надежно получать результаты, превышающие критическое значение, если концентрация равна критическому значению. LOD определяют как такую истинную концентрацию, для которой при установленном критическом значении доля ложно отрицательных результатов будет приемлемой. Исторически сложилось так, что вероятность ложно отрицательного результата, β , обычно принимают равной вероятности ложно

* Текст составлен на основе руководства Eurachem по терминологии в аналитических измерениях [8].

положительного результата (IUPAC рекомендует значения по умолчанию $\alpha = \beta = 0,05$ [49]). При $\alpha = \beta = 0,05$ значение LOD должно на $1,65s$ превышать установленное критическое значение. Таким образом, при $\alpha = \beta = 0,05$ коэффициент для расчета LOD будет равен $1,65 + 1,65 = 3,30$. Это значение часто округляют, и тогда, как показано в "Краткой справке 2", LOD принимают равным $3s$. Такой подход основан на некоторых аппроксимациях, описанных в литературе [49].

Множитель 3, рассчитанный в предыдущем абзаце, получен из одностороннего коэффициента Стьюдента t для бесконечного числа степеней свободы с округлением до одной значащей цифры. Для статистически строгой оценки LOD коэффициент должен учитывать число степеней свободы, связанное с оценкой s . Например, если s получают по результатам 10 повторных измерений, коэффициент Стьюдента для $\alpha = 0,05$ равен 1,83 (9 степеней свободы). В этом случае LOD будет равен $3,7s$.

Приложение С. Дисперсионный анализ (ANOVA)

Основная идея, на которой основан "дисперсионный анализ" (ANOVA), состоит в следующем: если данные из совокупности результатов многократных наблюдений можно сгруппировать определенным образом, например, по исполнителям, приборам, датам, лабораториям, методам и т.д., суммарную дисперсию всей совокупности можно представить как объединение межгрупповой (s^2) и внутригрупповых дисперсий. ANOVA можно использовать для оценки результатов того типа экспериментального исследования, который показан на рисунке С.1. По такому "гнездовому плану" многократные измерения (как правило, в условиях сходимости) повторяют в различных сериях измерений и получают p групп данных. Для получения оценки промежуточной прецизионности по результатам такого исследования необходимо максимальное изменение условий между сериями (разные дни, разные исполнители и т.д.).

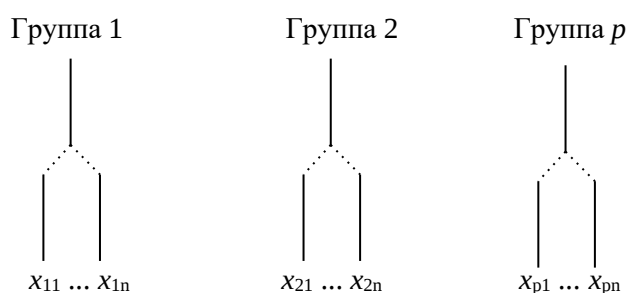


Рис. С1. Пример "гнездового плана" эксперимента, посредством которого можно оценить различные показатели прецизионности с применением ANOVA

На рис. С.2 показан общий вид таблицы однофакторного ANOVA для суммарного количества результатов N в p группах с числом наблюдений n и числом степеней свободы ν . Строки таблицы соответствуют отдельным составляющим дисперсии. В первой строке представлена дисперсия между среднегрупповыми значениями, во второй – внутригрупповая дисперсия и в третьей – дисперсия совокупности данных в целом. Электронные таблицы и статистическое программное обеспечение дают также значение F , критическое значение F и соответствующее значение вероятности P .

Составляющие дисперсии	Сумма квадратов (SS)	ν	Средний квадрат (MS)	F	P	F_{crit}
Межгрупповая	SS_b	$p - 1$	$MS_b = SS_b/(p-1)$	MS_b / MS_w		
Внутригрупповая (остатки)	SS_w	$N - p$	$MS_w = SS_w/(N-p)$			
Суммарная	$SS_{tot} = SS_b + SS_w$	$N - 1$				

Рис. С2. Структура таблицы однофакторного ANOVA

Показатели межгрупповой дисперсии почти всегда либо называют "межгрупповыми", либо обозначают фактором группирования (например, исполнитель, день или лаборатория). По отношению к внутригрупповой дисперсии в программном обеспечении, учебниках и т.д. используют различные термины, из которых чаще всего встречаются "внутригрупповая дисперсия", "дисперсия остатков", "дисперсия погрешности" и "дисперсия измерений".

Если предположить, что "гнездовой план", представленный на рис. С.1, реализован в одной лаборатории, многократные измерения в каждой группе выполнены в условиях сходимости и условия анализа различались между группами, то сходимость и промежуточную прецизионность можно рассчитать следующим образом:

1. Стандартное отклонение сходимости s_r вычисляют как квадратный корень из внутригруппового среднего квадрата, который характеризует внутригрупповую дисперсию:

$$s_r = \sqrt{MS_w} \quad (C1)$$

2. Вклад в суммарную дисперсию от фактора группирования ($s_{between}$) также получают из таблицы ANOVA:

$$s_{between} = \sqrt{\frac{MS_b - MS_w}{n}} \quad (C2)$$

3. Промежуточную прецизионность s_I можно рассчитать путем объединения указанных выше составляющих от внутригрупповой и межгрупповой дисперсии:

$$s_I = \sqrt{s_r^2 + s_{between}^2} \quad (C3)$$

Эксперимент, о котором шла речь в разделе 6.6.4, можно проиллюстрировать следующим образом. В рамках валидации метода, проведенной в одной лаборатории, выполняли повторные измерения в течение каждого из восьми дней (Таблица С1). Чтобы воспроизвести условия регулярного применения метода, в течение каждого дня измерения выполняли в условиях сходимости, но в разные дни это делали разные аналитики, использовали разное оборудование и т.д.

Таблица С1. Пример плана эксперимента, позволяющего оценить сходимость и промежуточную прецизионность с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с приемлемым числом степеней свободы

День	1		2		3		4		5		6		7		8	
Результат	$x_{1,1}$	$x_{1,2}$	$x_{2,1}$	$x_{2,2}$	$x_{3,1}$	$x_{3,2}$	$x_{4,1}$	$x_{4,2}$	$x_{5,1}$	$x_{5,2}$	$x_{6,1}$	$x_{6,2}$	$x_{7,1}$	$x_{7,2}$	$x_{8,1}$	$x_{8,2}$

Однофакторный ANOVA позволяет отделить дисперсию, присущую методу (сходимость), от дисперсии, обусловленной различиями в условиях измерений, т.е.

различными исполнителями, оборудованием, продолжительным интервалом времени (промежуточная прецизионность). Отметим, что при таком подходе невозможно сделать вывод о том, какой из факторов – исполнитель, оборудование или время – вносит наибольший вклад в промежуточную прецизионность, но, как правило, на этапе валидации это не требуется.

Применив однофакторный ANOVA к данным, приведенным в таблице C1, мы получим результаты, аналогичные показанным на рис. C2. Значения F , критического F и P позволяют непосредственно судить о том, существенно ли дисперсия результатов, полученных в разные дни, превышает дисперсию результатов, полученных в течение одного дня. Значения двух показателей прецизионности (s_r и s_l) можно легко рассчитать по приведенным выше формулам (C1) – (C3). Число степеней свободы (ν) для s_r будет равно $N - p = 16 - 8 = 8$. Значение ν для промежуточной прецизионности определить сложнее, но оно будет не менее чем $p - 1$, т.е. не менее 7 в данном случае (см. рис. C.2). В результате мы имеем разумный компромисс между затраченными усилиями и неопределенностью оценок прецизионности.

Приложение D. Замечания о качественном анализе

Качественный анализ основывается на тех же принципах, что и количественный анализ, но для описания свойств качественного метода и интерпретации результатов нужно использовать специальные понятия. В этом приложении приведена краткая информация о качественном анализе и даны указания по определению характеристик методов.

IUPAC дает такое определение качественного анализа: *анализ, при котором вещества идентифицируют или классифицируют по их химическим или физическим свойствам, таким как химическая активность, растворимость, молекулярная масса, температура плавления, излучательные свойства (излучение, поглощение), масс-спектры, период полураспада ядра и т.д.* [17]. Это означает, что результаты выражают по номинальной шкале, что является более низким уровнем представления по сравнению со шкалой отношений. По этой причине качественный анализ рекомендуют выполнять вместо количественного, главным образом, в целях предварительного исследования с применением недорогих методов или когда концентрация аналита близка к пределу обнаружения (LOD).

По сути, "качественный метод" дает ответ "да" или "нет" на вопрос о превышении заданной пороговой концентрации аналита [55]. При валидации определяют пороговую концентрацию для **классификации/диагностирования состояния**, например, наличия или отсутствия загрязнителя в воде в соответствии с директивой, законом и т.д., устанавливающих, какой должна быть пороговая концентрация.

Наилучший способ охарактеризовать свойства качественного метода – применить количественный метод с более высокими метрологическими характеристиками, например, более низким LOD, (подтверждающий метод), позволяющий определить действительное состояние объекта. Свойства качественного метода нужно определять для различных значений концентрации – ниже, на уровне и выше пороговой. Применение подтверждающего количественного метода является предпочтительным по сравнению с использованием холостых проб с добавками и без добавок.

Для качественных методов прецизионность нельзя представить как стандартное отклонение или относительное стандартное отклонение, но можно выразить через долю истинно положительных, ложно положительных, истинно отрицательных и ложно отрицательных результатов [55, 85, 86, 87]. (См. рис. D.1).

	Пробы с концентрацией выше пороговой	Пробы с концентрацией ниже пороговой	
Положительный результат	Истинно положительные результаты	Ложно положительные результаты (ошибка 1-го рода)	Общее количество положительных результатов
Отрицательный результат	Ложно отрицательные результаты (ошибка 2-го рода)	Истинно отрицательные результаты	Общее количество отрицательных результатов
	Общее количество проб с концентрацией выше пороговой	Общее количество проб с концентрацией ниже пороговой	

Рис. D1. Таблица 2×2 , используемая для вычисления доли ложно положительных и ложно отрицательных результатов

"Диагностическая чувствительность" – это относительное число проб, находящихся в некотором искомом состоянии (например, в них концентрация аналита превышает пороговую), для которых результат качественного испытания был положительным. Диагностическая чувствительность является самым главным свойством качественного метода, которое характеризует его способность к обнаружению небольшого количества аналита в пробе с выдачей бинарного ответа "да/нет" при заданном уровне вероятности.

$$\text{Диагностическая чувствительность} = \frac{\text{число истинно положительных результатов}}{\text{суммарное число проб в искомом состоянии}} \quad (D1)$$

"Диагностическая специфичность" – это относительное число проб, не находящихся в искомом состоянии (например, в них концентрация аналита ниже пороговой), для которых результат качественного испытания был отрицательным.

$$\text{Диагностическая специфичность} = \frac{\text{число истинно отрицательных результатов}}{\text{суммарное число проб не в искомом состоянии}} \quad (D2)$$

Если есть такая возможность, нужно использовать результаты сравнения с подтверждающим методом. В противном случае можно прибегнуть к анализу холостых проб с добавками и без добавок.

Важными параметрами качества определения в качественном анализе являются LOD и минимальное пороговое значение (рис. D.2). LOD определяют точно так же, как и в количественном анализе: это концентрация аналита, при которой сигнал будет статистически отличим от среднего значения сигнала для соответствующих холостых проб. Минимальное пороговое значение, если его определить правильно, – это значение концентрации, при превышении которого относительное число ложно отрицательных результатов будет

малым – в соответствии с заданной вероятностью. Во время валидации проверяют минимальное пороговое значение, приведенное в документе на методику.



Рис. D2. Два количественных параметра, с которыми связан бинарный результат квалификационного/классификационного качественного анализа: 1. Предел обнаружения (LOD), присущий данному методу. 2. Минимальное пороговое значение, приведенное в документе на методику. Они показаны на воображаемой шкале возрастания концентрации. Минимальное пороговое значение, лежащее в зоне обнаружения выше предела обнаружения, позволяет выделить зоны концентрации компонента, в которых будет получен правильный бинарный результат, т.е. "нет" для концентрации ниже пределов и "да" – для концентрации выше пределов.

В качественном анализе используют и некоторые другие понятия (Таблица D1).

Прогностическая ценность результатов может быть тем большей, чем больше распространенность случаев превышения порогового значения концентрации в пробах, исследуемых с помощью качественного метода, а данные о распространенности можно получить, например, с помощью других источников информации, отличных от качественного химического метода. Это позволит существенно увеличить практическую ценность метода качественного определения.

Селективность качественного метода является качественным понятием – это степень того, как компоненты, отличные от целевого аналита, влияют на результаты анализа. Эта чрезвычайно важная черта метода также может быть определена как способность обеспечивать результаты, не подверженные влиянию матрицы. Чем выше селективность, тем больше достоверность идентификации и классификации пробы.

Таблица D1. Определение и формулы расчета показателей, характеризующих диагностические свойства методов измерения, в том числе качественных методов

Показатель (символ)	Описание	Формула
Отношение правдоподобия положительного результата ($LR+$)	Отношение доли истинно положительных результатов к доле ложно положительных результатов.	$LR+ = \frac{\text{диагностическая чувствительность}}{1 - \text{диагностическая специфичность}}$
Отношение правдоподобия отрицательного результата ($LR-$)	Отношение доли ложно отрицательных результатов к доле истинно отрицательных результатов.	$LR- = \frac{1 - \text{диагностическая чувствительность}}{\text{диагностическая специфичность}}$
Диагностическое отношение вероятностей (DOR)	Объединяет диагностическую чувствительность, диагностическую специфичность и отношения правдоподобия в единый параметр.	$DOR = LR+ / LR-$
Прогностическая ценность положительного результата (PPV)	Доля истинно положительных результатов качественного исследования в общем числе положительных результатов. Учитывает распространенность определяемого состояния в целевой совокупности проб.	$PPV = \frac{\text{число истинно положительных}}{\text{общее число положительных}}$
Прогностическая ценность отрицательного результата (NPV)	Доля истинно отрицательных результатов качественного исследования в общем числе отрицательных результатов. Учитывает распространенность определяемого состояния в целевой совокупности проб.	$NPV = \frac{\text{число истинно отрицательных}}{\text{общее число отрицательных}}$

Бібліографія

(Текущие обновления наиболее важных источников можно найти в "Списке для чтения Eurachem" ("The Eurachem reading list"), размещенном в разделе "Публикации" ("Publications") на сайте Eurachem www.eurachem.org.)

1. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO Geneva.
2. ISO 15189:2012 Medical laboratories – Requirements for quality and competence, ISO Geneva.
3. ISO 15195:2003 Laboratory medicine – Requirements for reference measurement laboratories, ISO Geneva.
4. J. N. Miller, Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review, *Analyst*, 1991, 116, 3.
5. J. C. Miller, J. N. Miller, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 6th ed., Pearson, Harlow, 2010, ISBN 978-0-273730422.
6. S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, T. J. Duguid Farrant, Practical statistics for the analytical scientist. A bench guide, 2nd ed., RSC Publishing, Cambridge, 2009, ISBN 978-0-85404-131-2.
7. International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), JCGM 200:2012, www.bipm.org. A previous version is published as ISO/IEC Guide 99:2007, ISO Geneva.
8. V. J. Barwick, E. Prichard (eds.), Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction to VIM 3, Eurachem, 2011, ISBN 978-0-948926-29-7, www.eurachem.org*.
9. ISO 9000:2005 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary, ISO Geneva.
10. ISO 9001:2008 Quality management systems – Requirements, ISO Geneva.
11. ISO online browsing platform (OBP), <https://www.iso.org/obp/ui/>.
12. M. Thompson, S. L. R. Ellison, R. Wood, Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report), *Pure Appl. Chem.*, 2002, **74**(5), 835.
13. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1), ICH harmonised tripartite guideline, 2005, www.ich.org.

* Перевод на український язык: Термінологія аналітичного вимірювання. Вступ до VIM 3: за ред. В. Барвік та Е. Прічард: переклад першого видання настанови Eurachem 2011 р. – К.: ТОВ "Юрка Любченка", 2015. – 82 с., ISBN 978-617-7221-09-7, www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/TAM_2011_UA2dISBN.pdf (прим. перекладача)

14. ISO 80000-1:2009 Quantities and units – Part 1: General, ISO Geneva.
15. M. H. Ramsey and S. L. R. Ellison (eds.), Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches, Eurachem, 2007, ISBN 978-0-948926-26-6, www.eurachem.org*.
16. AMC technical brief No. 19, March 2005, M. Thompson (ed.), Terminology – the key to understanding analytical science. Part 2: Sampling and sample preparation, www.rsc.org.
17. Compendium of chemical terminology (IUPAC Gold Book), www.iupac.org.
18. Compendium of analytical nomenclature (IUPAC orange book), www.iupac.org.
19. Method validation of U.S. Environmental Protection Agency microbiological methods of analysis. Prepared for The EPA forum on environmental measurements (FEM). The FEM Microbiology Action Team, FEM Document Number 2009-01, 7 Oct., 2009.
20. ISO 10012:2003 Measurement management systems - Requirements for measurement processes and measuring equipment, ISO Geneva.
21. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM), JCGM 100:2008 (corrected version 2010), www.bipm.org. Printed as ISO/IEC Guide 98-3:2008, ISO Geneva.
22. S. L. R. Ellison, A. Williams (eds.), Eurachem/CITAC Guide CG4: Eurachem/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurement, 3rd ed., Eurachem, 2012, www.eurachem.org.
23. Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories, INAB Guide
24. CLSI, User verification of performance for precision and trueness; Approved guideline – 2nd ed. CLSI document EP15-A2. Wayne PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2005, www.clsi.org.
25. AOAC Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis, 2002, www.aoac.org.
26. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, (IUPAC technical report), Pure Appl. Chem., 1995, **67**(2), 331.
27. ASTM E1601-12 Standard practice for conducting an interlaboratory study to evaluate the performance of an analytical method, 2012, www.astm.org.

* Перевод на русский язык: Руководство Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC "Неопределенность измерения, связанная с отбором пробы. Руководство по методам и подходам": под ред. М. Рэмзи и С. Эллисона: перевод первого издания 2007 г. – К.: ООО "Юрка Любченка", 2015. – 156 с., ISBN 978-617-7221-08-0, www.metrology.kiev.ua/mizhnarodna-metrologiya/pereklad-mizhnarodnikh-dokumentiv (прим. переводчика)

28. CEN/TR 10345:2013 Guideline for statistical data treatment of inter laboratory tests for validation of analytical methods, CEN Brussels.
29. ISO 5725 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Parts 1-6, ISO Geneva.
30. ISO Guide 30:1992/Amd 1:2008 Terms and definitions used in conjunction with reference materials, ISO Geneva.
31. M. Thompson, P. J. Lowthian, Notes on statistics and data quality for analytical chemists, Imperial College Press, 2011, ISBN 978-1848166172.
32. E. Mullins, Statistics for the quality control chemistry laboratory, RSC, Cambridge, 2003, ISBN 978-0-854074-671-3.
33. W. Funk, V. Dammann, G. Donnevert, Quality assurance in analytical chemistry: Applications in environmental, food, and materials analysis, biotechnology, and medical engineering, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2006, ISBN 978-3-527-31114-9.
34. A. Kallner, Laboratory statistics. Handbook of formulas and terms (1st ed.), Elsevier, 2013, ISBN 978-0-12-416971-5.
35. Codex Alimentarius Commission, Procedural manual 21st ed., 2013.
36. Council Directive 98/83/EC (3 November 1998) on the quality of water intended for human consumption.
37. Commission Directive 2009/90/EC (31 July 2009) laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.
38. Commission Decision 2002/657/EC (12 August 2002) implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results.
39. SANCO/12571/2013 (19 Nov. 2013) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.
40. AMC technical brief No. 17, July 2004, M. Thompson (ed.), The amazing Horwitz function, www.rsc.org.
41. Selectivity in analytical chemistry (IUPAC recommendations 2001), Pure Appl. Chem., 2001, **73**(8), 1381.
42. NATA – Technical report #17 – Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative methods, 2012.
43. E. Theodorsson, Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry, Bioanalysis, 2012, **4**(3), 305.
44. AMC technical brief No. 37, March 2009, M. Thompson (ed.), Standard additions: myth and reality, www.rsc.org.

45. ISO 11843-1:1997/Cor 1:2003 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, ISO Geneva.
46. ISO 11843-2:2007 Capability of detection – Part 2: Methodology in the linear calibration case, ISO Geneva.
47. ISO 11843-3:2002 Capability of detection – Part 3: Methodology for determination of the critical value for the response variable when no calibration data are used, ISO Geneva.
48. ISO 3534 Statistics – Vocabulary and symbols – Parts 1-3, ISO Geneva.
49. Nomenclature in evaluation of analytical methods, including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995), *Pure Appl. Chem.*, 1995, **67**, 1699.
50. L. A. Currie, Detection in analytical chemistry – Importance, theory, and practice, ACS Symposium Series 361, American Chemical Society, Washington, DC 1988.
51. Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, *Analyst*, 1987, **112**, 199.
52. A. Shrivastava, V. B. Gupta, Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods, *Chronicles of Young Scientists*, 2011, **2**(1), 21.
53. United States Pharmacopeia, Validation of compendial methods, 26th revision, National Formulary, 21st ed. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2003.
54. Commission Regulation (EC) No 333/2007 (28 March 2007) laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs, *Off. J. EU*, L 88/29, 29 March 2007.
55. M. Valcarcel, S. Cardenas, D. Barcelo et al., Metrology of qualitative chemical analysis, report EUR 20605 EN, European Commission, 2002, ISBN 92-894-5194-7.
56. H. Sahai, R. P. Singh, The use of R^2 as a measure of goodness of fit: An overview, *Virginia Journal of Science*, 1989, **40**(1), 5.
57. Analytical Methods Committee, Uses (proper and improper) of correlation coefficients, *Analyst*, 1988, **113**, 1469.
58. ISO 11732:2005 Water quality – Determination of ammonium nitrogen – Method by flow analysis (CFA and FIA) and spectrometric detection, ISO Geneva.
59. A. Menditto, M. Patriarca, B. Magnusson, Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision, *Accred. Qual. Assur.*, 2007, **12**, 45.
60. D. T. Burns, K. Danzer, A. Townshend, Use of the terms “recovery” and “apparent recovery” in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002), *Pure Appl. Chem.*, 2002, **74**(11), 2201.

61. S. L. R. Ellison, B. King, M. Rosslein, M. Salit, A. Williams (eds.), Eurachem/CITAC Guide Traceability in chemical measurement. A guide to achieving comparable results in chemical measurement, 1st ed, Eurachem, 2003, www.eurachem.org.
62. P. De Bievre, R. Dybkaer, A. Fajgelj, D. Brynn Hibbert, Metrological traceability of measurement results in chemistry: Concepts and implementation (IUPAC Technical Report), Pure Appl. Chem., 2011, **83**(10), 1873*.
63. AMC technical brief No. 21, Sept. 2008, M. Thompson (ed.), The estimation and use of recovery factors, www.rsc.org.
64. ISO Guide 33:2000 Uses of certified reference materials, ISO Geneva.
65. T. Linsinger, Application note 1, Rev. 3 2010. Comparison of a measurement result with the certified value, www.erm-crm.org.
66. B. Magnusson, T. Naykki, H. Hovind, M. Krysell, Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, Nordtest Report TR 537 (ed. 3.1) 2012, www.nordtest.info.
67. ISO 21748:2010 Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation, ISO Geneva.
68. Eurolab, Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation, Technical report No. 1/2007, www.eurolab.org.
68. Eurolab, Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation, Technical report No. 1/2007, www.eurolab.org.
69. S. L. R. Ellison, A. Williams, Measurement uncertainty: the key to the use of recovery factors? From “The use of recovery factors in trace analysis”, M. Parkany (ed.), RSC, Cambridge, 1996.
70. V. J. Barwick, S. L. R. Ellison, Measurement uncertainty: approaches to the evaluation of uncertainties associated with recovery, Analyst, 1999, **124**, 981.
71. S. L. R. Ellison, V. J. Barwick, Estimating measurement uncertainty: Reconciliation using a cause and effect approach, Accred. Qual. Assur., 1998, **3**, 101-105.
72. G. E. O'Donnell, D. B. Hibbert, Treatment of bias in estimating measurement uncertainty, Analyst, 2005, **130**, 721.
73. B. Magnusson, S. L. R. Ellison, Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements, Anal. Bioanal. Chem., 2008, **390**, 201.

* Перевод на русский язык: Поль Де Бивр, Рене Дибкер, Алеш Файгель, Д. Бринн Гибберт, Метрологическая прослеживаемость результатов измерений в химии: понятия и реализация (Технический отчет IUPAC), www.metrology.kiev.ua/mizhnarodna-metrologiya/pereklad-mizhnarodnikh-dokumentiv (прим. переводчика)

74. W. J. Youden, E. H. Steiner, Statistical Manual of the AOAC, AOAC International, 1975, ISBN 0-935584-15-3.
75. Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories, (IUPAC technical report), Pure Appl. Chem., 1995, **67**(4), 649.
76. H. Hovind, B. Magnusson, M. Krysell, U. Lund, and I. Makinen, Internal quality control – Handbook for chemical laboratories, Nordtest technical report 569, 4th ed., 2011, www.nordtest.info.
77. ISO 7870 Control charts – Parts 1-5, ISO Geneva.
78. AMC technical brief No. 9, Feb. 2002, M. Thompson (ed.), A simple fitness-for-purpose control chart based on duplicate results obtained from routine test materials, www.rsc.org.
79. ISO/IEC 17011:2004 Conformity assessment – General requirements for accreditation bodies accrediting conformity assessment bodies, ISO Geneva.
80. ISO/IEC 17043:2010 Conformity assessment – General requirements for proficiency testing, ISO Geneva.
81. I. Mann, B. Brookman (eds.), Eurachem Guide: Selection, use and interpretation of proficiency testing (PT) schemes by laboratories, 2nd ed., Eurachem, 2011, www.eurachem.org.
82. EA-4/18 TA, Guidance on the level and frequency of proficiency testing participation, European co-operation for Accreditation, 2010, www.european-accreditation.org.
83. ISO 78-2:1999 Chemistry – Layouts for standards - Part 2: Methods of chemical analysis, ISO Geneva.
84. S.L.R. Ellison, A. Williams (eds.), Eurachem/CITAC Guide: Use of uncertainty information in compliance assessment, Eurachem, 2007, www.eurachem.org.
85. R. R. Galen, S. R. Gambino, Beyond normality: The predictive value and efficiency of medical diagnoses, John Wiley and Sons, 1975, ISBN 978-0471290476.
86. M. S. Pepe, The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, Oxford University Press, Oxford, 2003, ISBN 978-0-19-850984-4.
87. X-H. Zhou, N.A. Obuchowski, D.K. McClish, Statistical methods in diagnostic medicine, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, 2011, ISBN 978-0-470-18314-4.

Для заметок

[illegible]

**Пригодность аналитических методов
для конкретного применения
Руководство для лабораторий
по валидации методов и смежным вопросам**

Формат 60×84/8

Усл. печ. л. 11.16

Уч.-изд. л. 7.22

Бумага офсетная. Гарнитура Times

Подписано в печать 23.02.2016

Тираж 95 экз.

Издано ООО "Юрка Любченка"

Свидетельство о внесении в Государственный реестр издателей,

изготовителей и распространителей

издательской продукции серии ДК № 4685 от 6.03.2014

e-mail – u19-07@ukr.net, тел. 098-444-06-68

г. Киев, ул. Дегтяревская, 25а

