



A focus for analytical chemistry in Europe

Холостые образцы при валидации методов

**Дополнение к руководству Eurachem по
пригодности аналитических методов для
конкретного применения**

Первое издание 2019

Холостые образцы при валидации методов

Дополнение к руководству Eurachem по пригодности
аналитических методов для конкретного применения

Первое издание

2019

Благодарность

Данный документ разработан рабочей группой Eurachem по валидации методов.
Список разработчиков этого дополнения приведён ниже.

Project group

Vicki Barwick	LGC (Великобритания)
Burcu Biniçi	UME (Турция)
Helen Cantwell (Editor)	The State Laboratory (Ирландия)
John Clancy	Henkel Ireland (Ирландия)
Pieter Dehouck	European Commission (Европейский союз)
Elin L. F. Gjengedal	Norwegian University of Life Sciences (Норвегия)
Emanuela Gregori	Istituto Superiore di Sanità (Италия)
Anders Karlsson	RISE Research Institute of Sweden (Швеция)
Guy Lamon	SGS (Бельгия)
Pedro P. Morillas Bravo	Canal de Isabel II (Испания)
Ulf Örnemark	Emendo Dokumentgranskning (Швеция)
Marina Patriarca	Istituto Superiore di Sanità (Италия)
Francisco Raposo	CSIC (Испания)
Lorens P. Sibbesen (chair)	Labquality International (Дания)
Isabelle Vercruysse	BELAB (Бельгия)
Perihan Yolci Ömeroglu	Bursa Uludag University (Турция)

Название оригинала

H. Cantwell (ed.) Blanks in Method Validation - Supplement to Eurachem Guide The Fitness for Purpose of Analytical Methods, (1st ed. 2019). Публикация доступна на сайте www.eurachem.org.”

Холостые образцы при валидации методов

Издание на английском языке

Первое издание 2019

Авторские права © 2019

Авторские права на этот документ принадлежат авторам. Все запросы относительно воспроизведения на любом носителе, включая перевод, следует направлять в секретариат Eurachem.

Содержание

Предисловие	1
1 Введение и область действия	3
2 Типы и режимы использования холостых образцов при валидации методов	4
2.1 Калибровочный холостой образец	4
2.2 Холостой образец методики	4
2.3 Холостой реактив	4
2.4 Холостой растворитель	4
2.5 Холостая проба	4
2.6 Подходы к решению ситуаций, когда нет подходящей холостой пробы	5
Библиография	7

Предисловие

«Пригодность аналитических методов для конкретного применения. Руководство для лабораторий по валидации методов и смежным вопросам» (2-е изд.) было опубликовано в 2014 году. С тех пор рабочая группа по валидации методов определила области, в которых могут потребоваться дополнительные рекомендации. Эти дополнительные рекомендации были разработаны в форме вспомогательных документов. Этот вспомогательный документ не предназначен для отдельного использования, его следует использовать вместе с руководством.

1 Введение и область действия

Холостые образцы являются важным инструментом и используются при определении большинства характеристик в процессе валидации (см. раздел 5.4.1 в руководстве [1]). Их также часто включают в каждую аналитическую серию в ходе практического использования методики измерения. Существует много разных типов холостых образцов, и аналитик должен решить, какие холостые образцы включить в ходе подготовки плана валидации. Цель этого документа – описание различных видов холостых образцов, которые могут использоваться в ходе валидации методов, и предоставить рекомендации для ситуаций, когда может быть трудно получить подходящую холостую матрицу. Не все холостые пробы, рассматриваемые в этом документе, необходимы для каждой валидации и холостые пробы, используемые во время практического использования метода, например, для поправки на нулевой уровень, не входят в область действия этого документа. Стоит отметить, что некоторые методы, такие как хроматография, основаны на обнаружении пика выше уровня шума. Например, для определения некоторых характеристик, таких как предел обнаружения (LOD) и предел количественного определения (LOQ), необходимо использовать образец с низким содержанием аналита, а не холостой образец. Дальнейшие рекомендации по этому вопросу приведены в разделе 6.2.2 руководства. На Рисунке 1 показаны различные типы холостых образцов, классифицированные по их общему предполагаемому применению (калибровочные холостые образцы, холостые образцы методики) и по составу (холостые реактивы, растворители и пробы) вместе с их возможным использованием при валидации методов. Это рассматривается в следующих разделах.

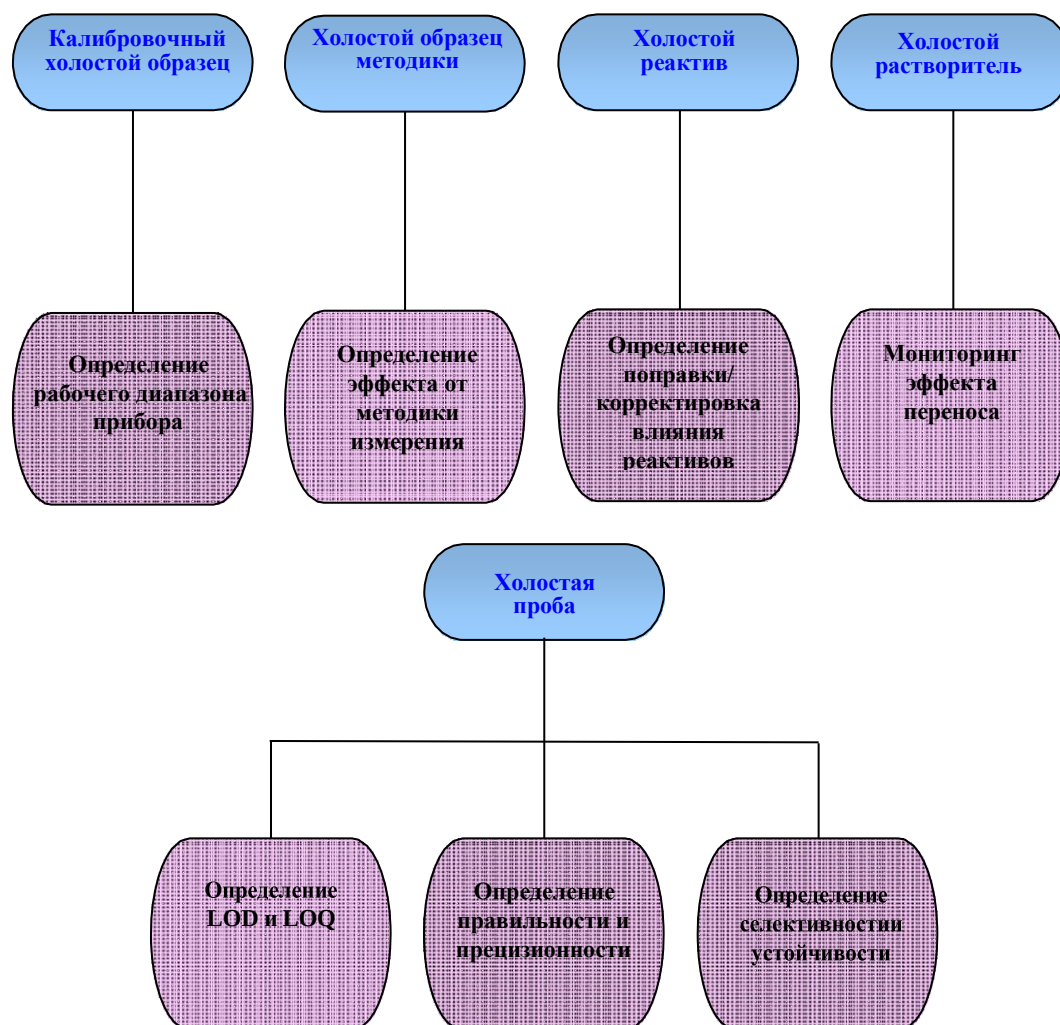


Рисунок 1 - Типы и режимы использования холостых образцов при валидации методов

2 Типы и режимы использования холостых образцов при валидации методов

2.1 Калибровочный холостой образец

В разделе 6.3 руководства рассматривается характеристика – рабочий диапазон. При определении рабочего диапазона прибора (то есть диапазона концентраций обрабатываемых образцов, которые могут быть помещены в прибор для выполнения измерения), необходимо подготовить и измерить калибровочный холостой образец, так же как калибровочные стандартные образцы (эталон). Калибровочный холостой образец – это калибровочный эталон, который не содержит интересующего аналита(ов) на обнаруживаемом уровне. Необходимо определить любой сигнал, который может быть обнаружен детектором и причиной которого не является наличие аналита(ов) (этот сигнал называется индикацией холостого образца). При определении рабочего диапазона метода необходимо использовать стандартные образцы или образцы с внутренним стандартом, которые прошли через всю процедуру измерения. В этом случае используемый холостой образец должен быть холостой пробой, см. раздел 2.5.

2.2 Холостой образец методики

Холостой образец методики – это образец, который не содержит матрицу, которая проходит через всю процедуру измерения и анализируется так же, как и образец для испытаний [2]. При приготовлении холостых образцов методики вместо матрицы часто используется вода. Холостые образцы методики могут использоваться для оценки любого загрязнения или влияющих компонентов, вызванных, например, реактивами или пробирками, или используемыми во время выполнения любого пункта методики измерения.

2.3 Холостой реактив

Холостой реактив – это смесь любого растворителя(ей) и/или реактива(ов), которая будет подана на детектор, используемый для анализа испытываемого образца и проанализирована, с целью определить её наличие в измеряемом сигнале. Холостые реактивы часто используются в таких методах, как спектрофотометрия, для обнуления прибора перед измерением испытываемых образцов и других холостых образцов. Холостой реактив также должен включаться, когда перед анализом требуется оценить реакцию (дериватизация, комплексообразование) с аналитом в образцах для испытаний. Холостой реактив может использоваться для определения любых влияющих компонентов во время реакции, и должен быть включён в процесс валидации, а также в ходе практического использования метода. Холостой реактив не содержит матрицу.

2.4 Холостой растворитель

Холостой растворитель изготавливают из растворителя(ей), содержащегося в растворе, подаваемом на прибор. Он может использоваться в ходе валидации для оценки любых влияющих компонентов, которые могут быть в растворителе. Анализ холостых растворителей, проведённый непосредственно после калибровочных эталонов, стандартных образцов или холостых образцов с внутренним стандартом, может использоваться для демонстрации того, имеется ли какой-либо перенос от одного образца к следующему. Они часто используются в хроматографических методах.

2.5 Холостая проба

Руководство вводит понятие холостых проб в разделе 5.4.1, где указано:

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.

Холостые пробы, так называемые холостые матрицы, могут быть:

- включены в эксперименты для определения селективности метода. Анализ холостых проб можно использовать для определения наличия компонентов матрицы, которые могут повлиять на способность метода испытания измерять интересующий аналит [3]. (Селективность рассматривается в разделе 6.1 руководства);
- включены в эксперименты для оценки LOD и LOQ метода (для методов, где измеряемый сигнал получен для холостого образца, например, атомная спектроскопия, см. раздел 6.2 руководства);
- включены в эксперименты для оценки рабочего диапазона метода (см. раздел 6.3.5 руководства);
- использованы для приготовления образцов с внутренним стандартом (когда стандартные образцы отсутствуют) для экспериментов по оценке правильности, прецизионности и устойчивости метода (см. разделы 6.5, 6.6 и 6.8 руководства))

Холостые пробы могут также использоваться в текущих процедурах внутреннего контроля качества, которые должны проводиться для демонстрации того, что процедура измерения остаётся пригодной для использования в ходе практического использования.

Однако существуют ситуации, когда лаборатория не может получить холостую пробу. Например, анализ остатков пестицидов в продуктах питания и кормах часто предполагает использование многоаналитных методов для обнаружения сотен аналитов. Матрица, содержащая не все аналиты, которые количественно измеряются, может быть недоступна, и лабораториям, возможно, придётся использовать пробу матрицы, которая содержит низкие уровни некоторых аналитов. Другие соединения имеют такое широкое распространение, что они присутствуют в окружающей среде, а холостых матриц просто не существует [4, 5].

Компоненты матрицы влияют на сигнал детектора в некоторых случаях применения аналитических методов [6, 7, 8]. Чтобы учесть эти эффекты матрицы, калибровочная кривая обычно готовится в холостой матрице. Трудности возникают, когда матрица изменяема (например, полуфабрикаты, когда компоненты матрицы отличаются от образца к образцу).

Альтернативный подход может быть необходим, когда холостой пробы не существует.

2.6 Подходы к решению ситуаций, когда нет подходящей холостой пробы

2.6.1 Холостая поправка

Рассмотрим случай, упомянутый в разделе 2.5 выше, с многоаналитным методом для анализа пестицидов. Лаборатория, желающая показать селективность метода, должна сделать это с образцом, который содержит несколько аналитов. Проблема получения холостой пробы без всех аналитов, общепризнана. Описание холостой пробы, данное одним органом по аккредитации, представляет собой чистую (соответствующую) матрицу или натуральный образец с известным минимально возможным содержанием [9]. Если содержание аналита известно, то любые измерения, выполненные в ходе процесса валидации, могут быть скорректированы на наличие аналита в образце, используемом вместо холостого образца. Поэтому лаборатория должна определить содержание аналита в образце, который предлагается использовать вместо холостого образца, чтобы получить натуральный образец с известным минимально возможным содержанием. Варианты, доступные для лаборатории, включают:

- повторный анализ образца, который будет использоваться вместо холостого образца, включённого в план экспериментов, чтобы подтвердить селективность. Затем можно

определить оценку содержания аналита в этом образце;

- определение с использованием метода стандартной добавки, если необходимо;
- анализ методом, альтернативным валидируемому (с наиболее низким LOQ);
- анализ валидируемым методом (с наиболее низким LOQ) в другой лаборатории.

Какой бы подход ни использовался, лаборатория должна убедиться, что он позволяет им продемонстрировать, что их метод соответствует цели.

2.6.2 Использование поправочных коэффициентов для калибровочных кривых

Калибровочные кривые, приготовленные в холостых образцах методики, а не в матрице, с последующим применением поправочного коэффициента к результирующей калибровочной кривой, используются в тех случаях, когда холостые пробы не могут быть получены [5]. Реализация этого метода требует демонстрации того, что:

- обе калибровочные кривые (функции) без матрицы и с соответствующей матрицей являются линейными;
- связь между калибровочными кривыми с соответствующей матрицей и без матрицы является постоянной для периода времени/последовательности инъекций [7].

Затем можно рассчитать поправочный коэффициент и провести анализ с использованием калибровочных кривых, приготовленных в растворителе, а не в матрице [10]. Этот поправочный коэффициент должен контролироваться в ходе практического применения метода, чтобы убедиться, что он остаётся приемлемым.

2.6.3 Имитируемый холостой образец

Если холостая проба не может быть получена, то в некоторых случаях возможно создать имитацию. Такие матрицы, как океанская вода, допускают получение имитируемого холостого образца путём растворения в воде соответствующих минеральных солей [11, 12]. Беззольная фильтровальная бумага может быть пригодна в качестве холостого образца при анализе растительного материала [2].

2.6.4 Альтернативные методы

Если вышеприведенные подходы не подходят, лаборатории может потребоваться пересмотреть тип калибровки, используемый в методе, и рассмотреть альтернативный метод, такой как метод стандартной добавки [13].

Процесс выбора холостой пробы или подходящего альтернативного подхода показан на Рисунке 2

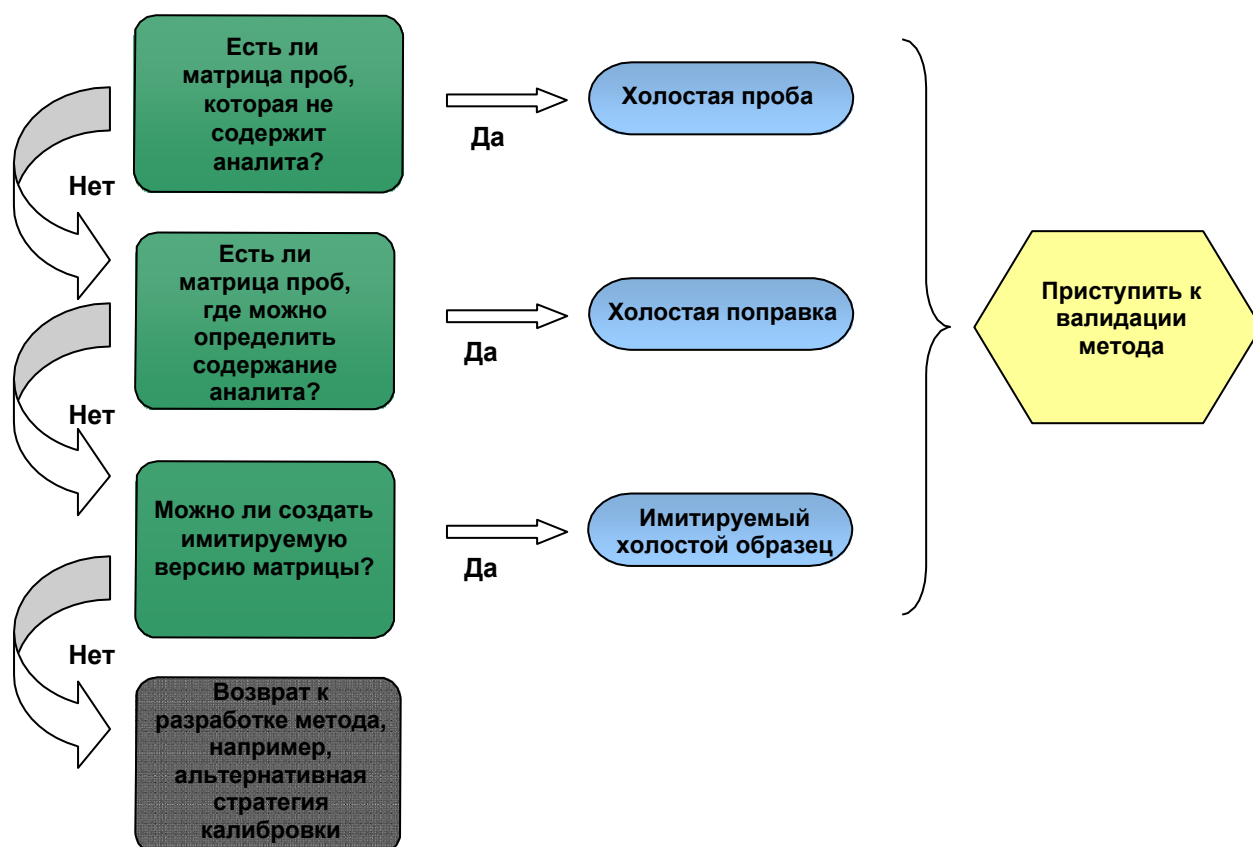


Рисунок 2 - Выбор холостой пробы для валидации метода

Библиография

Список текущих нормативных ссылок, касающихся качества в аналитических измерениях, см. в «Списке литературы» Eurachem в разделе «Публикации» на сайте Eurachem, www.eurachem.org.

1. 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. Available from www.eurachem.org.
2. IUPAC Analytical Chemistry Division, Compendium of Analytical Nomenclature (The IUPAC 'Orange Book'), 3rd edition. Prepared for publication by J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure. Blackwell Science, Ltd., Oxford, UK (1998). http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/
3. Commission Decision of 14 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, (2002/657/EC).
4. S. Net, A. Delmont, R. Sempéré, A. Paluselli, B. Ouddane, Reliable quantification of phthalates in environmental matrices (air, water, sludge, sediment and soil): A review, *Sci. Total Environ.*, **515-516**, 162-180 (2015).
5. A. Vavrous, J. Pavloušková, V. Ševčík, K. Vrbík, R. Čabala, Solution for blank and matrix difficulties encountered during phthalate analysis of edible oils by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *J. Chrom. A*, **1456**, 196-204, (2016).
6. M. J. Gardner and A. M. Gunn, Approaches in GFAAS: direct or standard additions, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **330**, 103-106 (1988).
7. C. F. Poole, Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography, *J. Chrom. A*, **1158**, 241-250 (2007).
8. R. B. Hoff, G. Rübensam, L. Jank, F. Barreto, M. C. R. Peralba, T. M. Pizzolato, M. S. Díaz-Cruz and D. Barceló, Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: Matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis, *Talanta*, **132**, 443-450 (2015).
9. Guide to method validation for quantitative analysis in chemical testing laboratories (ISO 17025), INAB Guide PS15, Issue 4, February 2016. Available from www.inab.ie.
10. F. J. Egea González, M.E. Hernández Torres, E. Almansa López, L. Cuadros-Rodríguez, J. L. Martínez Vidal, Matrix-Effects of vegetable commodities in electron-capture detection applied to pesticide multiresidue analysis, *J. Chrom. A*, **966**, 155-165 (2002).
11. Standard Practice for the Preparation of Substitute Ocean Water. ASTM International. ASTM D1141 – 98 (2013)
12. D. R. Kester, I. W. Duedall, D. N. Connors, D. N. and R. M. Pytkowicz, Preparation of Artificial Seawater, *Limnology & Oceanography*, **12**, 176—179 (1967).
13. S. L. R. Ellison and M. Thompson, Standard additions: myth and reality, *Analyst*, **133**, 992-997 (2008).

