МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
ФИЛИАЛ «НАУЧНО – ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР САНИТАРНО – ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПЕРТИЗЫ И МОНИТОРИНГА» РГП НА ПХВ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Л.Т. Молдаязова, К. Бакел

ПРОВЕДЕНИЕ ВНУТРИЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ ТОЧНОСТИ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЛАБОРАТОРИЯХ ТОКСИКОЛОГИИ ПЕСТИЦИДОВ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

(методические рекомендации)

Алматы, 2023

УДК 615.9
ББК 52.84
М75

Рецензенты:

1. Баспакова А.М. – к.м.н., ассоциированный профессор руководитель Департамента по научной работе НАО ЗКМУ им. М.Оспанова
2. Кожахметов Н.Б. – к.м.н., главный специалист Управления санитарно-гигиенического мониторинга Филиала «НПЦ СЭЭМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ» МЗ РК

Авторы:

Молдаязова Л.Т. – к.м.н., врач высшей категории, заведующая референс-лаборатории по контролю химических веществ и остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ».

Бакел К. - врач высшей категории, врач-лаборант референс-лаборатории по контролю химических веществ и остаточных количеств пестицидов в объектах окружающей среды филиала «НПЦСЭЭиМ» РГП на ПХВ «НЦОЗ».

Проведение внутрилабораторного контроля точности исследований в лабораториях токсикологии пестицидов Республики Казахстан / Молдаязова Л.Т., Бакел К. // Алматы: Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга, 2023. - 37 с.

ISBN 978-601-305-549-7

В методических рекомендациях представлены современные принципы и требования к проведению внутрилабораторного контроля качества проводимых исследований и оценка главных критерии точности полученных результатов.

Методические рекомендации предназначены для применения в лабораториях токсикологии пестицидов Республики Казахстан с целью, обеспечения внутреннего контроля качества результатов анализа.

Утверждено и разрешено к изданию типографским способом РГП на ПХВ «Национальный научный центр развития здравоохранения имени Салидат Каирбековой» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол заседания Департамента развития науки и образования РГП на ПХВ ННЦРЗ им. Салидат Каирбековой) № 433 от «29» декабря 2023 года

© Молдаязова Л.Т., Бакел К., 2023

Содержание

Перечень сокращений и условных обозначений…….. 4
Термины и определения…….. 5
Общие положения ……... 12
Введение ……... 13
1. Основные требования к проведению внутрилабораторного контроля
для оценки точности пробоподготовки ……. 13
2. Основные требования к проведению внутрилабораторного контроля
для оценки точности аналитической части …….. 19
3. Основные требования к проведению внутрилабораторного контроля
для оценки точности хроматографии…… 23
4. Оценка неопределенности полученных результатов …….. 27
Заключение…….. 30
Список использованных источников…… 31
Приложение 1…….. 32

Перечень сокращений и условных обозначений

ВЛК - внутренний лабораторный контроль
IQC - внутренний контроль качества
API - ионизация при атмосферном давлении (для ЖХ-МС)
ESI - ионизация электрораспылением
APCI - химическая ионизация при атмосферном давлении
AQC - аналитический контроль качества
SRM - сертифицированный эталонный материал
ХИ - химическая ионизация
ЭЗД - электрон-захватывающий детектор
ЭИ - электронная ионизация
ELISA - твердофазный иммуноферментный анализ
EU - Европейский Союз
(i) - холостой образец
ПФД - плазменно-фотометрический детектор
FWHM - полная ширина на половине высоты
ГХ - газовая хроматография (газо-жидкостная хроматография)
LCL - самый низкий калибровочный уровень
ЖХ-МС - жидкостно-хроматографическое разделение совместно с масс-спектрометрическим детектированием
LOD - предел обнаружения
LOQ - предел количественного определения
MRL - максимальный уровень содержания остатков
МС - масс-спектрометрия
МС/МС - тандемная масс-спектрометрия
NPD - азотно-фосфорный детектор
RSD - относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации)
SRL - уровень отчетности при скрининге
SD - стандартное отклонение
SIM - мониторинг выбранных ионов
R - воспроизводимость
SN - соотношение сигнала к шуму
SPME - микровыделение твердой фазы

Термины и определения

В разработанной методической рекомендации используются нижеследующие термины с соответствующими определениями:

Точность (accuracy): - степень близости результата измерений к принятому эталонному значению. Применительно к серии результатов тестирования – это сумма случайной ошибки (рассчитываемой как точность) и систематической ошибки (истинной или смещения) [4].

Аналит – химические вещества, концентрация (или масса) которых подлежит измерению. В данных процедурах это пестициды или их метаболиты, продукты деградации или производные пестицидов, а также внутренние стандарты.

Серия (анализ) – для экстракции, очистки и подобных процессов: это серия образцов, над которыми аналитики (или группа аналитиков) обычно работают параллельно в течение дня и которые должны включать как минимум одно определение коэффициента извлечения. Для количественных систем: серия – это ряд операций, выполняемых без значимых временных перерывов, включая соответствующие количественные определения во время калибровки (также называется «аналитическая последовательность», «хроматографическая последовательность», и т.д.). Серия определения может включать несколько серий экстракций.

Смещение – также принадлежит к «Точности». Разница между рассчитанным средним назначением и истинным значением, то есть сумма систематических ошибок.

Последовательная калибровка – организуйте серию измерений таким образом, чтобы система обнаружения калибровалась непосредственно перед и после анализа образца. Например, калибрант 1, калибрант 2, образец n, калибрант 1, калибрант 2.

Калибровка – это определение зависимости между сигналом, наблюдаемым от интересующего аналита в экстракте пробы (реакции, происходящей в системе детектирования), и известным количеством аналита, приготовленного в качестве стандарта. В настоящем документе калибровка весовых и объемных устройств, калибровка средств измерения массы масс-спектрометров и т.д. не рассматриваются как калибровка.

Калибровочный стандарт – растворы (или другие разведения) аналитов (внутренних стандартов, если они используются), используемые для калибровки измерительной системы. Они могут быть приготовлены из рабочих стандартов и подобраны к матрице.

Измельчение – процесс дробления твердых образцов на мелкие кусочки.

Подтверждение – комбинация из двух или более исследований, которые согласуются друг с другом (в идеале с использованием по крайне мере одного ортогонального метода отбора, удовлетворяющего критериям идентификации).

Не имеет подтверждения полного отсутствие остатков, принятие уровней отчетности LCL, позволяет избежать неоправданно высоких затрат на

подтверждение наличия или отсутствия остатков на слишком низком уровне. Характер и степень подтверждения, необходимого для положительного результата, зависит от значимости результата и частоты обнаружения аналогичных остатков.

Подтверждение требуется для анализов на основе ЭЗД из-за недостаточной специфичности этих анализов.

Масс-спектрометрия часто является наиболее практичным и наименее сомнительным методом подтверждения. Процедуры AQC для подтверждения должны быть строгими.

Контаминация – непреднамеренная фальсификация проб, экстрактов, внутренних стандартов и т.д. аналитами любым способом или на любом этапе отбора проб или анализа.

Система определения/детектирования – системы для обнаружения измерения концентрации или массы аналита.

Диагностический ион – масс-спектрометрический термин, обозначающий, наиболее характерный для анализируемого соединения.

Ложноотрицательный – результат, который неверно указывает, что концентрация аналита не превышает заданного значения.

Ложноположительный – ложные результаты, указывающие на то, что концентрация аналита превышает заданное значение.

Идентификация – качественный результат, полученный методом, который может предоставить структурную информацию (например, масс-спектрометрическое (МС) обнаружение) и который отвечает приемлемым критериям для аналитических целей.

Процесс создания достаточного количества доказательств для обеспечения достоверности результатов для конкретного образца. Аналитики должны быть точно идентифицированы для проведения количественного анализа. Процедуры AQC для проверки должны быть строгими.

Интерференция – положительные или отрицательные реакции, производимые соединениям и, отличными от аналита, которые вступают в реакцию, измеряемую для аналита, или интегрируют реакцию аналита, тем самым снижая достоверность и точность. Помехи также неточно называют «химическим шумом» (в отличие от электронного шума «плазменного шума» и т.д.). Матричные эффекты – еще один вид помех. Некоторые виды помех можно свести к минимуму, улучшив селективность детектора. Если помехи невозможно устранить или уравнять, их влияние может быть терпимым, если оно невозможно устранить или уравнять, их влияние может быть терпимым, если оно не оказывает существенного влияния на точность (смещение) или прецизионность.

Внутренний стандарт – к каждому образцу и каждому калибровочному стандарту добавляется аналит, который не присутствует в образце и по физико-химическим свойствам максимально близко к определяемому аналиту. Концентрация аналита рассчитывается по его реакции на реакцию внутреннего

стандарта; если используется МС-детектирование, идеальными внутренними стандартами являются изотоп намеченные аналиты, если это необходимо.

LOQ – предел количественного определения (также известный как предел обнаружения, LOD). Минимальная концентрация или масса аналита, которая может быть определена количественно с приемлемой точностью и достоверностью. Должен применяться к полным аналитическим методам. Существуют различные определения, но это должен быть показатель, превышающий предел обнаружения. Для большинства методов и систем обнаружения не существует фиксированного значения LOQ.

LOQ предпочтительнее LOD, чтобы избежать путаницы с «пределом обнаружения». Однако в законодательстве, MRL, установленные на уровне количественного определения/предела обнаружения, называются «LOD MRLs», а не «LOQ MRLs». Скорее они называются «LOD MRLs».

Точность измерения массы – это отклонение между измеренной точной массой и рассчитанной правильной массой иона. Она может быть выражена как относительная величина в частях на миллион (ppm) и рассчитывается следующим образом:

(точная масса – правильная масса)

Пример: экспериментально измеренная масса = 239,15098

Теоретическая масса иона (м/з) = 239,15028

Точность массы = (239,15098-239,15028)= 7,0 мДа

Или (точность массы – правильная масса)/ верная масса *10^6

Пример: экспериментально измеренная масса = 239,15098

Теоретическая масса иона (м/з) = 239,15028

Точность измерения массы=(239,15098-239,15028)/239,15028x10^6=2,9 pmm.

Разрешение массы – разрешающая способность масс-спектрометра – это его способность различать два иона с одинаковыми отношениями массы к заряду (определение IUPAC[8]: наименьшая разница в массе между двумя одинаковыми пиками данного количества, для которых впадина между ними составляет определенную часть высоты пика).

Примечание 1: для магнитных приборов используются разные определения («10% впадины»). Грубо говоря, разница между двумя определениями составляет 2 (т.е. 10 000 разрешающая способность по методу 10% впадина равна 20 000 разрешающей способности по FWHM).

Примечание 2: масс-разрешающую способность часто путают или используют как взаимозаменяемый с термином разрешение массы (см. определение выше).

Эффект матрицы – влияние одного или нескольких не обнаруживаемых компонентов в образце на концентрацию или измерение массы аналита. На реакцию некоторых систем обнаружения (например, ГХ, ЖХ-МС, ELISA) может влиять присутствие сопутствующих компонентов в образце (матрице). На разделение в газовых анализах и SPME также часто влияют компоненты в образце. Эти матричные эффекты возникают в результате различных физических и химических процессов, и их трудно или невозможно устранить. Матричные эффекты могут проявляться в виде увеличения или уменьшения отклика детектора по сравнению с откликами детектора, полученными при анализе простого раствора аналита. Наличие или отсутствие таких матричных эффектов может быть продемонстрировано путем сравнения отклика,

полученного от аналита в простом растворе растворителя, с откликом, полученным от того же количества аналита в присутствии образца или экстракта образца. Матричные эффекты обычно изменчивы и их появление невозможно предсказать, хотя некоторые методы и системы (например, ВЭЖХ-УФ, изотопное разбавление) по своей природе менее восприимчивы к ним. При использовании методов или приборов, которые могут быть подвержены влиянию, матричная калибровка может обеспечить более надежную калибровку. Калибровка матрицы может компенсировать влияние матрицы, но не устраняет первопричину. Первопричина остается, а сила влияния может варьироваться от матрицы к матрице, от образца к образцу и от «концентрации» матрицы. Разведение изотопов или добавление стандартов можно использовать, когда влияния матрицы зависит от образца.

Калибровка в соответствии с матрицей – калибровочные кривые предназначены для коррекции влияния матрицы и допустимых помех. Холостые образцы матрицы (см. холостые образцы) готовятся также, как для анализа проб. На практике пестицид добавляют в холостой образец экстракта матрицы, аналогичной анализируемой матрице (или в холостой образец профазного анализа). Используемая матрица холостого образца может отличаться от матрицы образца, если доказано, что она корректирует ее влияние. Однако при измерении остатков, достигающих или превышающих MRL, следует использовать ту же матрицу (или стандартную добавку).

Валидация метода – процесс определения характеристик и эффективности метода в отношении диапазона, специфичности, прецизионности (смещения), чувствительности, воспроизводимости и воспроизводимости в лаборатории. Информация обо всех характеристиках, за исключением воспроизводимости в лаборатории, должна быть получена до анализа образца, но данные о воспроизводимости и расширенном охвате могут быть получены AQC во время анализа образца. По возможности, оценка точности (смещения) должна охватывать анализ сертифицированных стандартных образцов, участие в квалификационных испытаниях или других межлабораторных сравнениях.

Первичное заполнение (ГХ дозаторов и колонок) – эффект первичной упаковки похож на долговременный эффект матрицы и часто наблюдается в хроматографии. Аликвота неочищенного экстракта образца может быть подана, обычно после установки новой колонки или пипетки, или в начале серии измерений. Цель – инактивировать систему ГХ и максимально увеличить перенос аналита в детектор. В некоторых случаях с этой же целью могут вводиться большие объемы аналита. В таких случаях очень важно перед анализом ввести растворитель или экстракт холостой пробы, чтобы гарантировать, что аналит не мигрирует. Эффекты первичного заполнения редко бывают стабильными, и нельзя исключать влияние матрицы.

(Квази) – молекулярные ионы – молекулярные ионы (M^+ или M^-) или протонированные молекулы ($M+H^+$) или депротонированные молекулы ($M-H^+$).

Извлечение (аналита посредством аналитического метода) – процентное содержание аналита, остающееся при окончательном определении после добавления аналита (обычно к холостой пробе) непосредственно перед экстракцией. Обычно выражается в процентах.

Рутинная экстракция – это количественное определение, выполняемое для каждого анализа серии образцов.

Эталонный материал – вещество, характеризующееся теоретически однородным содержанием аналита. Сертификационные стандартные образцы обычно характеризуются в нескольких лабораториях с точки зрения однородности концентрации и распределения аналита. Эталонные материалы для внутреннего использования характеризуются в лаборатории владельца, поэтому их точность измерений (смещение) может быть неизвестна.

Эталонный спектр – спектры поглощения (например, УФ, ИК), флуоресценции, продуктов ионизации (МС) и.т.д., полученные от анализируемого вещества и характерных для него. Эталонные масс-спектры должны быть приготовлены из «чистых» стандартов (или растворов «чистых» стандартов) с помощью прибора, используемого для анализа образца, и с применением аналогичных условий ионизации.

Чистый стандарт – относительно не загрязненный образец твердого/жидкого аналита (или внутреннего стандарта) с известной чистоты. За исключением некоторых технических пестицидов, эта частота обычно превышает 90%.

Повторяемость (r) – точность измерения (стандартное отклонение) аналита (обычно полученного путем экстракции или анализа стандартного материала). Точность результата измерения одного и того же образца в одной и той же лаборатории одним и тем же методом в течение короткого периода времени, когда не должно быть никаких различий в используемых материалах и оборудовании и/или участвующих аналитах. Значение прецизионности обычно выражается в виде не определенности и рассчитывается как стандартное отклонение результатов испытаний.

Она также может быть определена как значение, при котором абсолютное расхождение между двумя отдельными результатами испытаний одного итого же материала, полученными в одинаковых условиях, должны быть меньше или равно определенной вероятности (95%).

Уровень отчетности – самый низкий уровень, на котором остатки представлены в виде конкретной цифры. Может представлять собой практический LOQ или может превышать LOQ в целях экономии средств. Не должен быть ниже, чем соответствующий LCL. Для целей мониторинга ЕС, если исследовательский образец анализируется в течение более 12 месяцев, должен быть, достигнут один и тот же предел отчетности в течение года.

Репрезентативный аналит – аналит, используемый для оценки возможных аналитических характеристик по отношению к другим аналитам, теоретически необходимым для анализа. Приемлемые данные для репрезентативных аналитов, должны указывать на то, что эффективность

аналитического метода является удовлетворительной для репрезентативных аналитов. Репрезентативные аналиты должны включать аналиты, для которых ожидаются наихудшие результаты.

Воспроизводимость (R) – это точность (стандартное отклонение) измерения (обычно путем экстракции или анализа стандартного материала) аналита, полученного одним и тем же методом в определенном количестве лабораторий, на разных анализаторах или с использованием разных материалов и оборудования. Оценка точности обычно выражается в виде неопределенности и рассчитывается как стандартное отклонение результата испытания.

Внутренняя воспроизводимость выполняется в одной и той же лаборатории и при одних и тех же условиях.

ЕЕ также можно определить как абсолютное значение разницы между двумя отдельными результатами и испытаний одного итого же вещества, полученными в одинаковых условиях, которое меньше или равно значению, которое можно было бы ожидать с определенной вероятностью (например, 95%).

Отклик – абсолютный или относительный сигнал, выдаваемый детектором при появлении аналита.

Образец – общий термин, имеющий множество значений, в данном руководстве он обозначает лабораторный образец, образец для тестирования, часть образца для тестирования или аликвоту экстракта.

Приготовление образцов – первый из двух этапов, необходимых для преобразования лабораторного образца в образец для испытаний. При необходимости удалите части, неподлежащие анализу.

Обработка образца – второй из двух этапов, необходимых для превращения лабораторного образца в образец для испытания. Такие процессы, как гомогенизация, измельчение и смешивание, в зависимости от ситуации.

Селективность – способность систем экстракции, очистки, дериватизации, разделения и (в частности) детекторов различать аналиты и другие соединения. ГХ-ЭЗД является селективной системой количественного определения и не обеспечивает специфичности.

Необходимо – в данном документе «Необходимо» означает рекомендацию, которой можно пренебречь только в определенных обстоятельствах (по веским причинам) и которую следует тщательно оценить, подкрепив ее достаточными основаниями для отказа от рекомендации, прежде чем выбрать другой способ действий.

Не следует, означает, что это может быть приемлемо в определенных обстоятельствах, но не рекомендуется.

Значащие цифры – число, которое известно с определенностью плюс неопределенная первая цифра.

Пример: 3 значащих цифры

1,104; 1,04; 104; 1,04 x 10^4

1 и 0 в середине – определенные, 4 – неопределенная, но значимая.

Примечание: нули вначале никогда не бывают значащими. Экспоненциальное число не оказывает влияния на количество значащих цифр.

Твердофазное разведение – разбавление пестицида путем диспергирования его в тонкоизмельченном твердом веществе, таком как крахмальный порошок. Обычно используется только для нерастворимых аналитов, таких как сложные дитиокарбаматы.

Специфичность – способность детектора (вместе с экстракцией, очисткой, дериватизацией и селективностью разделения, если требуется) обеспечивать сигнал, эффективно идентифицирующий аналит. ГХ-МС с ЭИ это неселективная система детектирования с высокой специфичностью. Масс-спектрометрия высокого разрешения и MS^n позволяют достичь как высокой селективности, так и высокой специфичности.

Обогащения – добавление аналитов с целью выявления коэффициентов извлечения или стандартного добавления.

Стандарт – общий термин для обозначения «чистых» стандартов, маточных стандартов, рабочих стандартов и калибровочных стандартов.

Маточный стандарт – преимущественно концентрированный раствор (или разведение твердого вещества и т.д.) «чистого» стандарта или внутреннего стандарта, из которого используются аликвоты для приготовления рабочих стандартов или калибровочных стандартов.

Суррогатный стандарт – вещество известной концентрации, добавляемое к образцу для контроля качества. Вещество должно быть маловероятным для обнаружения в других образцах и иметь сходные свойства с целевым пестицидом (может потребоваться несколько суррогатных стандартов для представления широкого спектра аналитов). Суррогатные стандарты предназначены для мониторинга различий в скорости извлечения проблем, возникающих при анализе экстракции и детерминантов. Добавление суррогатных стандартов на различных этапах аналитической процедуры может помочь выявить источники ошибок.

Общие положения

Методические рекомендации «Проведение внутреннего контроля точности исследований в лабораториях токсикологии пестицидов Республики Казахстан» устанавливают общие требования к способности лаборатории оценивать пригодность результатов исследований при подтверждении (верификации), идентификации, валидации, повторении методов, проводимых от этапа отбора проб до получения результатов анализов.

Данные методические рекомендации дают возможность проводить внутрилабораторный контроль качества проводимых испытаний и оценивать воспроизводимость и точность, которые являются основными критериями достоверности полученных результатов. Согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025, внутрилабораторное сравнение – это сравнение одного итого же или это организация, проведение и оценка измерений или испытаний одного и того же или нескольких аналогичных образцов в рамках одной лаборатории в соответствии с заранее установленными условиями. Внутрилабораторное сравнение также называют внутрилабораторной прецизионностью. Условия для внутрилабораторной точности включают:

- применение одной и той же методологии;
- использование одних и тех же образцов;
- проведение измерений в одной и той же лаборатории;
- варьирование различных факторов (например, времени, аналитика, реагентов и т.д.).

Настоящие методические рекомендации «Проведение внутреннего контроля точности исследований в лабораториях токсикологии пестицидов Республики Казахстан» были составлены в соответствии с пунктом 2 статьи 94 Кодекса «О здоровье народа и системы здравоохранения».

В соответствии со Статьей 11 Регламента 882/2004 [3] методы анализа, используемые в рамках официального контроля, должны соответствовать установленным правилам Сообщества или международного признанным правилам или протоколам или, в случае отсутствия вышеупомянутых, другим методам, подходящим для намеченной цели или разработанным в соответствии с научными протоколами.

Введение

Качество лабораторных исследований имеет очень большое значение, поскольку цели внутреннего контроля качества результатов анализа – обеспечение необходимой точности результатов текущего анализа и экспериментального подтверждение лабораторией своей технической компетентности. Под обеспечением необходимой точности понимают обеспечения точности результатов анализа не ниже требуемой точности анализа.

Эффективным средством выявления и оценки ошибок, при помощи которого лаборатория оценивает достоверность получаемых результатов, является внутрилабораторный контроль качества (ВКК). Внутрилабораторный контроль является основным элементом подтверждения достоверности результатов анализа. В соответствии с требованиями, установленными в ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 [1], лаборатория должна иметь процедуру для мониторинга достоверности результатов своей деятельности (т.е. процедуру, которая охватывает и внутрилабораторный контроль).

Внутрилабораторный контроль качества планируется и реализуется лабораторией для валидированных методик измерений с установленными рабочими характеристиками и методик, прошедших процедуру верификации.

1. Основные требования к проведению внутрилабораторного контроля для оценки пробоподготовки

1.1. Подготовка и обработка образцов перед анализом

После получения образцов лаборатория присваивает каждому образцу неповторимый регистрационный код.

Подготовка проб, обработка проб и отбора проб для взятия части анализируемой пробы должны проводиться до появления видимых признаков порчи. Это особенно важно, если результаты анализа будут использоваться для оценки потребления потребителем. Пробы консервированных, обезвоженных и аналогично обработанных продуктов должны быть проанализированы в течение установленного срока хранения.

Подготовка проб должна соответствовать определениям товара и анализируемой части [4].

Должна быть доказано, что процедуры обработки и хранения проб не оказывают существенного влияния на остатки, присутствующие в анализируемой пробе. Если есть данные о том, что измельчение (нарезка и гомогенизация) при комнатной температуре существенно влияет на разложение остатков некоторых пестицидов, рекомендуется гомогенизировать образцы при низких температурах (например: в замороженном виде и/или «сухого льда»). Если известно, что измельчение влияет на остатки пестицидов (например, дитиокарбаматы или фумиганты)

и нет практических альтернативных методов, часть образца, подлежащая тестированию, должна состоять из всего продукта или отделенной части от более крупной единицы. Для всех остальных анализов лабораторные образцы должны быть измельчены целиком (в большинстве случаев 0,5-1кг.). Все анализы должны проводиться как можно скорее, чтобы минимизировать срок хранения образцов. Анализ нестабильных или быстро улетучивающих остатков пестицидов следует начинать в день получения пробы и завершать процедуры, которые могут привести к потере аналита. В любом случае при просеивании пробы следует убедиться, что проба достаточно однородна, чтобы допустить приемлемую вариабельность под выборки. Если этого достичь не удается, следует рассмотреть возможность использования большей тестовой порции пробы.

Если часть проанализированной пробы оказывается нерепрезентативной, следует проанализировать часть повторной пробы, чтобы лучше оценить точные значения.

1.2 Стандарты пестицидов, калибровочные и рабочие растворы

1.2.1.Идентичность, чистота и хранение стандартов

«Чистые» аналитические стандартные образцы должны иметь приемлемый уровень чистоты, каждый из них должен быть уникально идентифицирован, а дата получения должна быть зарегистрирована. Эталонные материалы должны храниться при низких температурах, предпочтительно в морозильной камере, без доступа света и влаги, т.е. в условиях, сводящих к минимуму возможность порчи. При таких условиях срок годности, указанный поставщиком, который часто определяется на основе менее строгих условий хранения, может быть заменен соответствующей датой для каждого образца и может храниться до 10 лет. Чистые стандарты можно хранить, если доказано, что их чистота находится в приемлемых пределах, и назначен новый срок годности. В идеале, если анализ проводится впервые в лаборатории, необходимо проверить идентичность вновь приобретенного «чистого» образца.

1.2.2 Подготовка и хранение исходных стандартных растворов

При приготовлении исходных стандартов (растворов, дисперсий, газовых разбавителей) «чистых» стандартов аналитов или внутренних стандартов следует регистрировать идентичность и массу (или объем в случае высоколетучих соединений) «чистого» стандартного раствора, а также идентичность и объем растворителя (или другого разбавителя). Растворитель должен соответствовать анализируемому веществу (растворимый, нереактивный) и методу анализа. Обеспечьте влажность при доведении «чистых» стандартов до комнатной температуры перед использованием и отрегулируйте концентрацию в соответствии с чистотой «чистого стандарта».

Взвесьте не менее 10 мг «чистого» эталонного материала на весах с точностью до пяти десятичных знаков. Температура окружающей среды должна быть такой же, как температура, при которой калибруется стеклянная посуда, в противном случае подготовка эталонного материала должна основываться на измерении массы. Летучие жидкие аналиты следует дозировать непосредственно в растворитель по весу и объему (если известна плотность). Газообразные (фумигантные) аналиты можно поместить в растворитель путем барботирования и взвешивания перенесенной массы или путем получения газообразного разбавителя (например, избегая контакта с реактивными металлами и используя герметичный шприц).

Запасные стандартные растворы должны иметь не смываемую маркировку, срок годности, помещаться в контейнеры, предотвращающие утечку растворителя и попадание воды, и храниться при низкой температуре в темноте. По имеющимся данным, стандартные растворы большинства пестицидов в толуоле и ацетоне хранятся в морозильной камере не менее пяти лет, если они помещены в плотно закрытые стеклянные контейнеры.

Поскольку суспензии (например, дитиокарбаматов) и растворы (или газовые разведения) высоколетучих фумигантов необходимо готовить заново, точность раствора следует сравнивать со вторым раствором, полученным отдельно от первого в то же время.

1.2.3 Подготовка, использование и хранение рабочих стандартов

При приготовлении рабочих стандартов записывайте идентичность и количество всех используемых растворов и растворителей. Растворитель должен соответствовать аналиту (растворимый или нереактивный) и методу анализа. Стандартные растворы должны быть промаркированы, иметь срок годности, помещены в контейнеры, предотвращая утечку растворителя и попадание воды, и храниться при низкой температуре в темноте. Резиновые герметичные крышки (септы) особенно подвержены потере при испарений (помимо того, что являются источником загрязнения), поэтому при хранении растворов их следует заменять как можно скорее после прокола. Растворы, доведенные до комнатной температуры, должны быть повторно перемешаны, чтобы убедиться в отсутствии нерастворенных аналитов, особенно если растворимость ограничена при низких температурах.

При разработке и валидации метода или для аналитов, впервые используемых в лаборатории, необходимо продемонстрировать, что обнаруженная реакция обусловлена аналитом, а не примесями или артефактами. Если используемый метод может разрушать аналит во время экстракции, очистки или разделения, что приводит к образованию продуктов, которые обычно наблюдаются в образце, но не учитываются при измерении остатков, положительный результат должен быть подтвержден с помощью метода, позволяющего избежать этой проблемы.

1.2.4 Тестирование и замена стандартов

При использовании стандартных растворов, срок годности которых истек, необходимо проверить стабильность. Существующие стандарты или рабочие растворы могут быть проверены относительно вновь полученных растворов путем сравнения показаний детекторов, полученных из соответствующих растворов отдельных стандартов или смесей стандартов. Чистоту старого «чистого» стандартного раствора можно проверить, получив новый стандартный раствор и сравнив показания детекторов, полученные при разбавлении старого и нового стандартных растворов. Если существует неясная разница между фактическими концентрациями старого и нового стандартных растворов, необходимо выяснить причину.

Среднее значение, полученное в результате не менее трех повторных измерений тестового вещества для каждого из двух растворов (старого и нового), как правило, недолжно отличаться более чем на ±10%[1]. Среднее значение, полученное при использовании нового раствора, должно составлять 100%. Если среднее значение, полученное со старым стандартом, отличается от нового более чем на ±10%, результаты должны быть проверены путем сравнения со вторым раствором, полученным отдельно от первого раствора при соответствующем изменении условий хранения и периода хранения. Использование растворов внутренних стандартов сокращает количество повторных инъекции испытуемого вещества, необходимых для получения разницы в ±10%.

1.3. Экстрагирование и концентрация

1.3.1. Условия и эффективность экстрагирования

Для обеспечения максимальной эффективности экстракции (например, при измерении фумигантов и поверхностных остатков) каждая часть исследуемого образца должна быть тщательно разделена в процессе экстракции. Если такие параметры, как температура и pH, влияют на эффективность экстракции, стабильность аналитов содержание растворителя, их необходимо контролировать. Для повышения эффективности экстракции товаров с низким содержанием влаги (крупяные изделия, сухофрукты) рекомендуется добавлять воду в образец перед экстракцией. Однако следует контролировать время между добавлением воды и экстракцией, чтобы избежать значительных потерь пестицидов.

1.3.2. Концентрация экстракта и разведение объема

При выпаривании и высушивании экстракта следует соблюдать осторожность, так как могут быть потеряны следовые количества аналита. В качестве «фиксаторов» следует использовать небольшие количества высококипящих растворителей, а температура выпаривания должна быть как можно ниже. Следует избегать интенсивного кипения экстракта с образованием пузырьков и рассеиванием капель. Сухой поток азота или центробежное

вакуумное выпаривание обычно предпочтительнее использования воздушного потока для мелкомасштабного выпаривания. Это связано с тем, что воздушные потоки с большей вероятностью могут привести к окислению и добавлению влаги и других загрязняющих веществ.

При разбавлении экстрактов до фиксированного объема следует использовать тщательно откалиброванные емкости вместимостью не менее 1 мл и избегать дальнейшего испарения.

Стабильность аналита в экстракте должна быть изучено во время валидации метода. Хранение экстракта в холодильнике или морозильной камере может минимизировать разделение, однако не следует игнорировать возможность потерь из-за горячих полок дозаторов.

1.4. Контаминация и интерференция

1.4.1. Контаминация

Во время транспортировки в лабораторию и хранения в ней образцы должны быть отделены друг от друга и от других потенциальных источников загрязнения. Это особенно важно в случае поверхностных и пылевых остатков и летучих аналитов. Образцы, которые, как известно или предполагается, содержат такие остатки, должны быть дважды запечатаны в пластиковые и нейлоновые пакеты, транспортироваться и обрабатываться отдельно.

Борьба с вредителями в лаборатории или вблизи нее должна ограничиваться использованием пестицидов, остатки которых не исследуются в лаборатории.

Объемные инструменты, такие как колбы, пипетки и шприцы, должны тщательно очищаться, особенно при повторном использовании. Во избежание перекрестного загрязнения следует по возможности использовать отдельную стеклянную посуду или другое оборудование для стандартов экстрактов образцов. Следует избегать использования стеклянной посуды с многочисленными царапинами или мутными поверхностями. Убедитесь, что растворители, используемые для анализа остаточных фумигантов, не содержат аналита.

Если используется внутренний стандарт, следует избегать случайного загрязнения экстракта или раствора аналита внутренним стандартом или наоборот.

Если аналиты изначально содержатся в образце или получены из него (например, неорганический бромид во всех товарах, сера в почве, сероуглерод, выделенной из Brassicaceae), остатки, содержащиеся в следовых количествах в результате применения пестицидов, невозможно отличить от их естественного содержания. Естественное содержание этих аналитов, должно учитываться при интерпретации результатов. Дитиокарбаматы, этилентиомочевина и дифениламин могут быть обнаружены в резиновых изделиях, поэтому следует избегать таких источников загрязнения.

1.4.2 Интерференция

Оборудование, контейнеры, растворители (включая воду), реагенты и ускорители фильтрации должны быть проверены на предмет возможного вмешательства. Частыми источниками являются резиновые и пластиковые изделия (например, герметичные колпачки, защитные перчатки, флаконы для ополаскивания), абразивные и смазочные материалы. Крышки ампул должны быть из политетрафторэтилена. Экстракт не должен соприкасаться с крышкой, особенно после прокола, и этого можно добиться, храня ампулы в вертикальном положении. Если необходимо провести повторный анализ экстракта, герметичную крышку ампулы следует заменить сразу после прокола. Анализ холостых образцов реагентов требует выявления источников помех в используемом оборудовании и материалах.

Помехи, связанные с естественными компонентами образца, возникают часто. Помехи могут быть специфичны для используемой системы определения, возникать с разной частотой и интенсивностью или быть малозаметными по своей природе. Если помехи проявляются в виде наложения реакции на аналит, может потребоваться отдельная система очистки или количественного определения. Помехи в виде подавления или усиления реакции системы обнаружения обсуждаются в параграфе 45. Если помехи не могут быть устранены или с корректированы калибровкой по матрице, общая погрешность (смещение) и точность анализа должны соответствовать критериям, указанным в пунктах 64-64.

2. Основные требования к проведению внутрилабораторного контроля для оценки точности аналитической части

2.1. Аналитическая калибровка, репрезентативные анализы, эффекты матрицы и хроматографическая интеграция

2.1.1. Общие требования

Правильная калибровка зависит от правильной идентификации аналита. Последовательные калибровки следует использовать, если не доказано, что в измерительной системе нет значительных отклонений в абсолютном отклике (внешняя стандартизация) или в относительном отклике (внутренняя стандартизация). В серии параллельных анализов калибровочные стандарты распределяются для выявления различий в отклике, связанных с положением. Реакции, используемые для количественного определения остатков, должны находиться в пределах динамического диапазона детектора.

Серия измерений должна быть рассчитана таким образом, чтобы показания детектора при однократном введении стандарта для непрерывной калибровки не отклонялись более чем на >20% при ≥ 2 x LCL (минимальный уровень калибровки). Если отклонение превышает эти значения, повторные измерения не требуются, если ясно, что проба не содержит аналитов, при условии, что

показания калибровочного уровня, соответствующие отчетному уровню (RL), остаются измеряемыми на протяжении всей серии измерений.

Экстракты, содержащие высокие концентрации остаточных веществ, можно разбавить, чтобы получить значения в пределах калибровочного диапазона. Если калибровочный раствор поставлен с матрицей, концентрацию матричного экстракта также необходимо скорректировать.

2.1.2 Калибровка

Остатки ниже LCL, соответствующего RL, считаются не калиброванными и должны быть представлены как <RL, независимо от того, происходит реакция или нет. Если получено остаток ниже LCL, соответствующего исходному RL, измерение следует повторить при более низком LCL. Если соотношение LCL, недостаточно (менее 6:1), в качестве LCL следует выбрать более высокий уровень. Дополнительная точка калибровки, например, вдвое превышающая LCL, обеспечивает резервный LCL на случай, если указанный LCL наподдаётся измерению. Валидация аналитического метода должна включать определение восстановления на предлагаемом уровне RL.

Калибровка путем интерполяции между двумя уровнями приемлема, если разница между двумя уровнями меньше или равна коэффициенту 4, а средний коэффициент реакции, полученный при определении повторно тестируемого вещества на каждом уровне, показывает приемлемую линейность реакции, причем наибольший коэффициент реакции не превышает 120% от меньшего коэффициента реакции (110%, если он приближается или превышает MRL). Допустимо.

При использовании трех и более уровней можно рассчитывать и использовать соответствующую калибровочную функцию между самым низким и самым высоким калибровочными уровнями. Калибровочная кривая (которая может быть или не быть прямой линией) не должна проходить через линию старта. Калибровка должна проводиться и проверяться визуально и/или по остаточному содержанию, чтобы убедиться, что она удовлетворена в областях, относящихся к определяемым остаткам, избегая при этом чрезмерного доверия к коэффициентам корреляции. Если индивидуальное остаточное содержание отклоняется от калибровочной кривой более чем на ± 20% (±10% приближении или превышении MRL) в соответствующей области, следует использовать другую калибровочную функцию. В общем случае рекомендуется использовать линейную и взвешенную линейную регрессию (1/x).

Одноуровневая калибровка может дать более точные результаты, чем многоуровневая, если показания детектора меняются с течением времени. При использовании одноуровневой калибровки, если MRL превышен, ответ образца должен быть в пределах ±20% от ответа калибровочного стандарта; если MRL не превышен, ответ образца должен быть в пределах ±20% от ответа калибровочного стандарта, если только дальнейшая экстраполяция не подтверждается данными о приемлемой линейности ответа. Если аналиты

добавляются для определения коэффициента восстановления на уровне, соответствующем LCL, для расчета значения восстановления < 100% можно использовать одноточечную калибровочную кривую на уровне LCL. Данная калибровочная кривая предназначена только для демонстрации аналитической эффективности достигаемой при LCL, и не подразумевает, что остатки < LCL должны измеряться таким образом.

2.1.3 Репрезентативные аналиты

По возможности, каждая система обнаружения должна быть откалибрована по всем аналитам для каждой серии анализов. Если это требует несоразмерно большого количества калибровок, систему обнаружения следует калибровать по минимальному количеству репрезентативных аналитов. Использование репрезентативных аналитов связано с повышенным риском получения неточных результатов, особенно ложноотрицательных. Поэтому репрезентативные аналиты следует выбирать очень тщательно, чтобы обеспечить достаточно подтверждение того, что для всех остальных аналитов был проведен приемлемый скрининг. Он должен быть выбран в соответствии с вероятностью обнаружения остатков в образце и физико-химическими свойствами аналита, т.е. аналит, который, скорее всего, будет вызывать наиболее слабые и изменчивые реакции. Репрезентативное число аналитов для калибровки в каждой серии должно составлять 15 аналитов плюс 25% от общего числа аналитов в аналитическом диапазоне каждой системы обнаружения. Например, если аналитический диапазон инструментального метода содержит 40 аналитов, измерительная система должна быть откалибрована как минимум по 25 репрезентативным аналитам. Если аналитический диапазон системы обнаружения составляет менее 20, калибровке подлежат все аналиты.

2.1.4 Эффекты матрицы и калибровка в соответствии с матрицей

Вероятность возникновения матричных эффектов должна быть определена в ходе валидации метода. Известно, что возникновение и интенсивность матричных эффектов сильно варьируются, но некоторые методы особенно восприимчив к ним. Если используемый метод по всей природе не защищен от таких эффектов, калибровку следует проводить по матрице в соответствии с установленными процедурами, если только не будет найден альтернативный подход, гарантирующий равную или более высокую точность. По возможности для калибровки можно использовать холостые матричные экстракты того же типа что и проба (или калибровочные образцы для парофазного анализа и анализа методом SPME); альтернативный практический подход к минимизации матричных эффектов в ГХ-анализе заключается в использовании «протектантов аналита» (например: сорбит, γ-гулонолактон, δ-глуконолактон, 3-этокси-1,2-пропандиол, (этилглицерин)), добавляемых в калибровочный раствор (в чистом растворителе или матрице). Наиболее эффективным методом устранения матричных эффектов является калибровка путем добавления стандарта и

разбавления изотопа внутренним стандартом, меченным изотопом, который добавляется на любом этапе процедуры предварительного измерения.

Потенциальная проблема заключается в том, что разные образцы, разные типы экстрактов, разные товары и разные «концентрации» матрицы могут иметь матричные эффекты разной величины. Если можно допустить небольшой риск ошибки калибровки, можно использовать репрезентативные матрицы для калибровки различных типов образцов. Если это требуется для ГХ-анализа, первоначальное заполнение следует проводить непосредственно перед первым циклом измерений как часть калибровки в серии анализов.

2.1.5 Добавление стандартов

Добавление стандартов может использоваться в качестве альтернативы использованию стандартов для калибровки, совместимых с матрицей. Рекомендуется использовать добавление стандартов для подтверждающего количественного определения, особенно в случае превышения MRL и/или отсутствия подходящих контролей для приготовления матрично-совместимых стандартных растворов. *В качестве стандартов могут использоваться стандарты или валидированные смеси, которые должны быть выбраны таким образом, чтобы содержание интересующего аналита в образце охватывало весь аналитический диапазон рабочего образца и оставалось стабильным в течение эксперимента.*

Добавление стандартов – это процедура, при которой исследуемый образец делится на три или более тестовых порций: одна порция анализируется как есть, а к остальным порциям добавляется известное количество стандартного аналита непосредственно перед экстракцией. Количество добавленного стандартного аналита должно в 1-5 раз превышать рассчитанное количество аналита в образце. Данная процедура предназначена для определения содержания аналитов в образце с учетом коэффициента извлечения аналитической процедуры и поправки на влияние матрицы. Количество аналитов в экстракте «необогащенного» образца рассчитывается как простое соотношение. Этот метод предлагает, что концентрация аналита в образце в некоторой степени известна, поэтому количество аналита, которое необходимо добавить, равно количеству аналита, присутствующего в образце. Если концентрация аналита неизвестна, необходимо «сконцентрировать» большое количество повторно исследуемых образцов с возрастающими количествами аналита, а затем построить калибровочную кривую аналогично обычной стандартной калибровочной кривой. При использовании этого метода восстановление и калибровка регулируются автоматически. Добавление стандартов естественным образом не устраняет хроматографические помехи, связанные с перекрывающимися/неразделенными пиками из совместно экстрагируемой композиции. В методе добавления стандартов концентрация неизвестных аналитов в образце определяется путем экстраполяции, поэтому для получения точных результатов важна линейная характеристика в подходящем диапазоне концентраций.

Добавление известного количества аналита к аликвоте, например, экстракта образца, пред инъекцией также является формой добавления стандарта, но в этом случае корректируется только калибровочная кривая, включающая эффекты матрицы.

2.1.6 Воздействие смесей пестицидов на калибровку

Калибровки с использованием, например, смесей аналитов, приготовленных в чистых растворителях, должны быть проверены во время валидации метода, чтобы убедиться, что показания детектора аналогичны показаниям, полученным для отдельных аналитов. Если показания значительно отличаются или вызывают сомнения, следует нанести стандарт для индивидуальной калибровочной кривой на матрицу или, что еще лучше, добавить стандарт для определения остаточного количества.

2.1.7 Калибровка для пестицидов, которые представляют собой смеси изомеров

Если калибровочные стандарты представляют собой смеси, например, изомерованалита, то молярные соотношения отдельных компонентов позволяют считать, что показания детекторов одинаковы. Однако в ферментных анализах, иммуноанализе и других биологических анализах могут возникать ошибки в калибровочной кривой, если соотношение компонентов стандарта значительно отличается от соотношения компонентов измеряемого остатка. Для количественного определения таких остатков следует использовать другую систему анализа. Если реакция «селективного» детектора на изомеры различна (например, эффективность захвата электронов изомерами ГХЦГ), следует использовать отдельные калибровочные стандарты. Если отдельные стандартны не доступны, для определения остатков следует использовать отдельную систему количественного определения.

2.1.8 Калибровка с использованием производных соединений или продуктов распада

Если пестицид идентифицирован как продукт деградации или производное соединение, калибровочный раствор должен быть приготовлен из «чистого» эталонного материала для этого продукта деградации или производного соединения. Если это единственный возможный вариант, следует использовать процедурный стандарт.

3. Основные требования к проведению внутрилабораторного контроля для оценки точности хроматографии

3.1 Хроматографическая интеграция

Хроматограммы должны быть просмотрены анализатором, а построение базовой линии проверено и при необходимости с корректировано. Если присутствуют мешающие или отклоненные пики, положение базовой линии

должно быть согласовано. Можно использовать данные о высоте и площади пика. Если не используется биосенсорное детектирование, можно использовать более точные измерения общей площади пика, общей высоты пика или одного компонента, если эталонный материал откалиброван как смешанный изомер (или аналогичный компонент).

3.2. Валидация методов и критерии эффективности

3.2.1 Методы качественного скрининга

Качественные методы скрининга (например, биопробы, химические методы с автоматическим определением на основе MS) полезны для выявления пестицидов, присутствие которых в образце маловероятно.

Качественные методы скрининга должны обеспечить достоверность обнаружения и идентификации аналита при заданном уровне концентрации. Валидация в случае качественных методов скрининга сосредоточена на способности к обнаружению Обнаружение определяется как минимальный уровень концентрации, при котором не менее 95% образцов (т.е. допустимо 5% ложноположительных результатов) могут обнаружить (но не обязательно идентифицировать) аналит при соответствующей концентрации (например, уровень RL метода, используемого для валидации). Образцы, включенные в валидацию, должны быть репрезентативными для диапазона матрицы скринингового метода. Если метод используется только как качественный метод, то требования к линейности и восстановлению отсутствуют. Что касается селективности, то использование не обогащенных проб (предпочтительно холостых) должно исключить наличие ложноположительных результатов. Однако до тех пор, пока аналиты, обнаруженные входе скрининга, идентифицируются и подтверждаются анализом второй пробы (с выбором соответствующего метода подтверждения), с точки измерения контроля качества критерии, касающиеся количества ложноположительных результатов, не являются настоятельно необходимыми.

При базовой валидации скрининговых методов обычно подается 10 образцов в двух экземплярах для анализа каждой группы продуктов, обогащенных аналитом на прогнозируемом отчетном уровне скрининга (SRL). При использовании в рутинном анализе следует запрашивать информацию о текущем контроле качества и периодически пересматривать валидность метода. Для аналитов, не включенных в (текущую) валидацию, уровень надежности обнаружения при данной концентрации аналита неизвестен. В результате аналиты, не включенные в области валидации, могут быть обнаружены методом, но уровень скрининговой отчетности не может быть точно установлен или гарантирован.

3.2.2 Первичная валидация метода

Валидация аналитического метода в лаборатории должна проводиться для получения доказательств того, что аналитический метод подходит для предполагаемого использования. Валидация метода является требованием органа сертификации, и валидация должна быть облегчена и расширена путем проверки характеристики к входе рутинного анализа (аналитический контроль качества и непрерывная валидация метода). Все процедуры (этапы), выполняемые в рамках метода, должны быть валидированы, если это возможно.

Для многокомпонентных методов и методов селективных остатков можно использовать репрезентативную матрицу. Валидация должна проводиться как минимум на одной репрезентативной позиции из каждой товарной группы. Если методы регулярно используются для более широкого спектра матриц, необходимо получить дополнительную информацию о непрерывном контроле качества валидации входе этих рутинных анализов. Практический подход к процедуре валидации представлен в Приложении 1.

Валидация метода включает оценку чувствительности, среднего восстановления (камеры истинности или смещения), прецизионности и предела количественного определения (LOQ). Это, по сути, указывает на необходимость проведения экспериментов по экстракции с добавками для подтверждения точности метода. Требуется не менее пяти итераций (для проверки точности), как на отчетном уровне (для подтверждения чувствительности метода), так и наиболее высоких уровнях, возможно, на уровне предельно допустимой концентрации (MRL) LOQ (метод) является критерием пригодности эффективности метода (среднее восстановление 70-120% для каждого репрезентативного образца, RSDr $\leq$ 20%) и определяется как минимальный валидационный уровень обогащения пробы. Для демонстрации соответствия аналитического метода критериям эффективности могут использоваться другие подходы, обеспечивающие такой же уровень качества информации. Если в измерение остатка включено более одного аналита, аналитический метод должен быть валидирован для всех аналитов, включенных в измерение, если это возможно.

3.2.3 Приемлемость рабочих характеристик метода – расширенная валидация метода

На этапе первоначальной и расширенной валидации необходимо продемонстрировать, что метод количественного определения обеспечивает средний коэффициент извлечения 70-120% в пределах воспроизводимости RSD_r и внутрилабораторной воспроизводимости $RSD_{wR} \leq 20\%$ по крайне мере для одного репрезентативного товара с каждого уровня обогащения и каждой соответствующей группы. Если метод не позволяет этого делать и нет удовлетворительной альтернативы, то перед принятием мер по обеспечению соблюдения требований следует рассмотреть возможность использования относительно низкого среднего коэффициента извлечения. В особых случаях, когда коэффициент извлечения низкий, но стабильный (т.е. точный), и его

основа хорошо известна (например, из-за подразделения пестицидов), средний коэффициент извлечения менее 70% может быть принят. Однако следует использовать более точные методы, если это целесообразно с практической точки зрения. Внутрилабораторная воспроизводимость (RSD_{wR}) должна составлять менее 20%, за исключением преимуществ, обусловленных неоднородностью образцов.

3.2.4 Непрерывная верификация рабочих характеристик (рутинное определение коэффициента извлечения)

По возможности, для каждой серии анализов следует измерять определенную степень восстановление аналитов. Если требуется непропорционально большое извлечение, в качестве минимально допустимого коэффициента извлечения можно использовать коэффициенты извлечения, приведенные в таблице 2. Пробы должны содержать не менее 10% репрезентативных аналитов для каждой системы обнаружения. Однако количество репрезентативных аналитов в каждой группе должно быть не менее пяти для каждой системы обнаружения. Рекомендуемый вариант использования – анализ стандартных образцов, хотя с практической точки зрения это редко осуществимо из-за отсутствия стандартных образцов.

Если обновленная программа калибровки или экстракции репрезентативного аналита (таблица 1 и 2) показывает неприемлемые результаты, все результаты, полученные после предыдущей успешной калибровки или экстракции этого аналита, следует рассматривать как потенциально ошибочные.

Коэффициент извлечения аналита обычно определяет обогащением в диапазоне, соответствующем 1-10 – кратному уровню RL, уровню MRL или уровню, соответствующему анализируемому образцу. Уровень добавления можно варьировать время от времени или непрерывно, чтобы получить информацию об эффективности анализа в различных диапазонах концентраций. Восстановление на соответствующих уровнях RL и MRL имеет особое значение. Если холостые образцы не доступны (например, при измерении неорганического бромида в низких концентрациях) или если единственный доступный холостой образец содержит мешающие соединения, уровень обогащения восстановления должен быть не менее чем в три раза выше уровня, указанного для холостого образца. Концентрацию аналита (или кондиционированного аналита) в такой холостой матрице следует определять по порции, использованной в нескольких тестах. При необходимости значения холостого образца следует использовать для корректировки коэффициентов извлечения. Значения холостой пробы и коэффициента извлечения до коррекции должны быть указаны в отчете. Они должны быть определены на основе матрицы, использованной в эксперименте по обогащению, а значение холостой пробы не должно превышать 30% от уровня остатков, соответствующего RL.

По возможности, коэффициенты извлечения для всех компонентов, определяемых с использованием MRL, должны устанавливаться в рамках рутинной работы. Если остаток идентифицирован как часто встречающийся компонент, для рутинного определения коэффициента восстановления можно использовать компонент, который доминирует в остатке или имеет самый низкий коэффициент восстановления.

3.3. Требования к хроматографии

В методе ГХ-МС хроматографическое разделение осуществляется с помощью колонки; в методе ЖХ-МС хроматографическое разделение может быть достигнуто с помощью подходящей колонки для ЖХ. В обоих случаях минимальное время удерживания аналитов, должно быть не менее чем в два раза больше времени удерживания, соответствующего объему пустоты колонки. Время удерживания (или относительное время удерживания) аналита в экстракте пробы должно совпадать со временем удерживания калибровочного стандарта (который может быть откалиброван по матрице) в пределах определенного окна, с учетом разрешения хроматографической системы. Отношение времени удерживания в хроматографе к времени удерживания соответствующего внутреннего стандарта, т.е. относительное время удерживания, должно соответствовать времени удерживания калибровочного раствора с допуском ±0,5% для GS и ± 2,5% для LC [5].

4. Оценка неопределенности полученных результатов

4.1. Уточнение результатов с учетом сведений о неопределенности

ГОСТ ISO/IEC 17025 требует от испытательных лабораторий определять и публиковать неопределенность, связанную с аналитическими результатами. Для этого лабораториям должна быть доступна полная информация, полученная в результате валидации/верификации метода, межлабораторных испытаний (например, квалификационных испытаний) и внутренних испытаний по контролю качества, используемых для расчета неопределенности [6].

Неопределенность измерений является количественной мерой достоверности аналитической информации и представляет собой диапазон заявленных результатов или экспериментальных результатов, для которых истинное значение должно быть ложным с определенной вероятностью (уровнем доверия). Диапазон неопределенности должен учитывать все источники неопределенности.

Информацию о неопределенности следует использовать осторожно, чтобы не создать ложного ощущения уверенности в истинном значении. Общие расчеты неопределенности основаны на исторических данных и могут не отражать неопределенность, связанную с анализом текущего образца. Используемые значения могут быть получена из информации валидации лаборатории, аналитических результатов стандартных образцов, информации о

совместной разработке метода или расчетов, основанных на опыте. RSD воспроизводимости (или RSD повторяемости, если информация о воспроизводимости отсутствует) может быть использован в качестве основы, но при этом должны быть включены дополнительные источники неопределенности (например, неоднородность образцов, из которых получены партии испытуемого вещества (из-за различий в процедурах, используемых для подготовки проб, обработки образцов и отбора проб), эффективность экстракции, различия в стандартных концентрациях). Эти значения RSD могут быть получены из информации об экстракции или из анализа стандартов. Данные о неопределенности в основном связаны с аналитами и матрицами, использованными для их получения, поэтому следует соблюдать осторожность при экстраполяции этих данных на другие аналиты или матрицы. Неопределенность, как правило, выше на более низких уровнях, особенно при достижении LOQ. В результате может возникнуть необходимость в получении данных о неопределенности для диапазона концентраций при предоставлении типичных неопределенностей для широкого диапазона информации об остатках.

Еще одним практическим вариантом для лаборатории рассчитать неопределенность измерений и подтвердить свои расчеты на основе собственной внутрилабораторной информации является оценка результатов в входе проверки квалификации. Результаты проверки квалификации могут указать на внутрилабораторные отклонения в неопределенности измерений отдельных лабораторий и косвенно обосновать заявленное значение неопределенности измерений. Повторный анализ конкретного образца в сочетании с определением коэффициентов совместной экстракции может повысить точность результатов конкретной лаборатории и обосновать использование обработанных цифр неопределенности измерений. В этом случае необходимо учитывать влияние внутри лабораторной погрешности. Информация о неопределенности должна включать повторяемость при отборе проб и анализе. Такая практика обычно используется в случаях, когда результаты анализа имеют решающее значение (например, для соблюдения MRL или сомнений в экономической ситуации).

Использование пределов отчетности, основанных на LCL, устраняет необходимость учета определенности, связанной с установленными уровнями остатков < пределов отчетности.

4.2 Интерпретация результатов в целях обеспечения соблюдения требований

4.2.1 Оценка того, содержит ли проба остатки, превышающие предельные значения, обычно проблематична только в том случае, если значение относительно близки к максимальным пределам остатков (MRL). При принятии решения следует учитывать соответствующие данные аналитического контроля качества (AQC) и результаты, полученные при повторном тестировании части

образца, а также типичные оценки неопределенности. Также следует учитывать возможные потери остатков и перекрестное загрязнение до, во время и после отбора проб.

4.2.2 Учитывая результаты, полученные входе квалификационных испытаний в ЕС, расширенное значение неопределенности по умолчанию, равное 50% (соответствующее 95% доверительному уровню и коэффициенту включения 2), в целом покрывает различия между лабораториями в Европе, и рекомендуется, чтобы регулирующий органы использовали его при принятии решений о право применении (превышение максимальных пределов остатков). Регулирующим органам разрешается использовать значение по умолчанию 50% расширенной неопределенности только в том случае, если лаборатория может заранее продемонстрировать, что ее собственная рассчитанная расширенная неопределенность составляет менее 50%. Более низкий уровень расширенной неопределенности может быть использован в качестве меры предосторожности, если превышение максимального остаточного контрольного значения одновременно приводит к превышению острой контрольной дозы.

4.2.3 Если лаборатория демонстрирует неприемлемо высокие относительные стандартные отклонения (RSD_{wR}) в воспроизводимости внутрилабораторной воспроизводимости (например, при очень низких уровнях концентрации) или неудовлетворенности Z-баллы при проверке квалификации, следует использовать соответственно более высокие значения неопределенности. Использование надлежаще высокого значения неопределенности должно быть обсуждено. Для результатов, полученных с помощью методов определения остатка (особенно при использовании внутренних стандартов, меченных стабильными изотопами), использование более низкого расширенного назначения неопределенности может быть оправдано, если значение относительного стандартного отклонения (RSD_R) для меж тестовой воспроизводимости ($\leq 25\%$) является достаточно хорошим.

4.2.4. Общепринятой практикой является то, что результаты анализа на наличие пестицидов не корректируется по коэффициенту извлечения, но они могут корректироваться, если средний коэффициент извлечения значительно отличается от 100 % (обычно, если он находится за пределами диапазона 70-120 % с хорошей прецизионностью). В таких случаях также следует принимать во внимание неопределенность, ассоциированную с коррекцией коэффициента извлечения.

4.2.5. Если требуется, результат следует представлять вместе с расширенной неопределенностью (U), следующим образом: Результат = x ± U (единицы), где x – измеряемая величина. При осуществлении официального контроля пищевых продуктов регламентирующими органами, проверка соответствия максимальному уровню остатка (MRL) должна проводиться, допуская, что нижний предел интервала неопределенности (x – U) – это наибольшая подтвержденная концентрация аналита в образце. Таким образом, максимальный уровень остатка превышен, если x – U > MRL. Например, если MRL = 1, а x = 2,2, то x – U = 2,2 – 1,1 (= 50 % от 2,2), что > MRL.

Заключение

Актуальность и практическая значимость разработанной методической рекомендации определяется тем, что лаборатория – важнейшая основополагающая часть всех систем здравоохранения, которая имеет цель улучшение здоровья населения. Надежные и своевременные результаты лабораторных исследований являются основой для принятия решений. Кроме того, своевременные и надежные лабораторные услуги крайне важны для обеспечения национальной безопасности в сфере охраны здоровья и экономики.

Эффективным средством выявления и оценки ошибок, при помощи которого лаборатория оценивает достоверность получаемых результатов, является внутрилабораторный контроль качества.

Качество лабораторных исследований имеет очень большое значение, поскольку цели внутреннего контроля качества результатов анализа – обеспечение необходимой точности результатов текущего анализа и экспериментального подтверждение лабораторией своей технической компетентности. Одним из критериев аккредитации лабораторий, является наличие правил управления качеством результатов исследований (испытаний) и измерений, в том числе правил планирования и анализа результатов контроля качества исследований (испытаний) и измерений.

Методические рекомендации «Проведение внутреннего контроля точности исследований в лабораториях токсикологии пестицидов Республики Казахстан» устанавливают общие требования к способности лаборатории оценивать пригодность результатов исследований при подтверждении (верификации), идентификации, валидации, повторении методов, проводимых от этапа отбора проб до получения результатов анализов.

Данные методические рекомендации дают возможность проводить внутрилабораторный контроль качества проводимых испытаний и оценивать воспроизводимость и точность, которые являются основными критериями достоверности полученных результатов. Согласно ГОСТ ИСО/МЭК 17025, внутрилабораторное сравнение – это сравнение одного итого же или это организация, проведение и оценка измерений или испытаний одного и того же или нескольких аналогичных образцов в рамках одной лаборатории в соответствии с заранее установленными условиями. Внутрилабораторное сравнение также называют внутрилабораторной прецизионностью. Условия для внутрилабораторной точности включают:

- применение одной и той же методологии;
- использование одних и тех же образцов;
- проведение измерений в одной и той же лаборатории;
- варьирование различных факторов (например, времени, аналитика, реагентов и т.д.).

Список использованных источников

1. ГОСТ ISO/IEC 17025-2019 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий».

2. Регламент (ЕС) No882\2004 Европейского парламента и Совета от 29 апреля 2004 года об официальном контроле, осуществляемом с целью обеспечения проверки соблюдения пищевого и кормового законодательства, правил, касающихся здоровья животных и условий содержания животных.

3. ГОСТ Р ИСО 5725-1-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть I. Основные положения и определения».

4. Регламент (ЕС) 396/2005. Европейского парламента и Совета от 23 февраля 2005г. «О максимальных уровнях остатков пестицидов в/на пищевых продуктах и кормах растительного и животного происхождения» в настоящей поправки в Директивы Совета 91/414/ЕЕС.

5. Решение Комиссии от 12 августа 2002, имплементирующее Директиву Совета 96/23/ЕС в отношении рабочих характеристик аналитических методов и интерпретации результатов (2002657/ЕС).

6. РМГ 43-2001 Применение «Руководства по выражению неопределенности измерений».

Приложение 1
(рекомендуемое)

Процедуры валидации: основные принципы и примеры

Валидация проводится после завершения разработки метода или перед внедрением ранее не использовавшегося метода в рутинный анализ. Мы различаем первичную валидацию количественных аналитических методов, впервые используемых в лаборатории, и валидацию для расширения области применения существующего валидированного аналитического метода на новый аналит или матрицу.

Количественный анализ

Первая полная валидация

Валидация проводится:

- для всех аналитов, входящих в область применения аналитического метода;
- по крайне мере, по одному элементу из каждой группы элементов (в той мере, в какой они входят в заявленную область применения аналитического метода или в той мере, в какой они относятся к образцам, анализируемым в лаборатории).

Экспериментально:

Типичный пример фактической последовательности проверки выглядит следующим образом:

Набор образцов (подпробы из одного гомогенизированного образца)

Реагентная проба

1 необогащенный образец

5 проб, обогащенных до нижнего предела количественного определения (LOQ)

5 проб, обогащенных до уровня 2-10 x LOQ или MRL

Порядок использования прибора

Калибровочный стандарт растворителя на уровне LOQ

Калибровочный стандарт в матрице на уровне LOQ

Холостой реагент

Неконцентрированные образцы

5 концентрированных образцов на уровне LOQ

5 концентрированных образцов на уровне 2-10 x LOQ или MRL

Калибровочные стандарты в матрице на уровне 2-10xLOQ MRL

Оценка данных

Откалибруйте, введите и определите количество образцов в указанном порядке, как указано в документе «Аналитический контроль качества» (ACQ).

На основании полученных данных определите как минимум параметры, указанные в таблице 1, и проведите валидацию в соответствии с заданными критериями.

Таблица 1 – Параметры и критерии валидации

Параметр	Обозначение	Критерии оценки результатов
Линейность	По калибровочной кривой	Остатки < ±20%
Эффект матрицы	Сравнение ответной реакции стандартов растворителя и соответствующих матрице стандартов	-
Предел количественного определения (LOQ)	Посредством определения: самого низкого уровня, для которого было продемонстрировано соответствие критериям точности и прецизионности	≤MRL
Специфичность	Ответная реакция в реагентном холостом образце и контрольных образцах	< 30 % предела количественного определения (LOQ)
Точность	Определить средний коэффициент извлечения для обоих уровней обогащения	70-120 %
Прецизионность (RSD_r)	Определить RSD_r повторяемости, определить для обоих уровней обогащения	≤20 %
Прецизионность* (RSD_{wR})	Определить воспроизводимость внутри лаборатории*	≤20 %

***** Внутрилабораторную воспроизводимость следует определять в ходе непрерывного контроля качества.

Таблица 2 – Частота рутинного извлечения (верификация рабочих параметров)

	Репрезентативные аналиты	Все другие аналиты
Минимальная частота извлечения	10% репрезентативных аналитов (минимум 5 на систему выявления) в каждой серии анализов	В рамки обновляемой программы включают все прочие аналиты (минимум каждый 12 месяцев, предпочтительно каждые шесть).
	В рамках обновляемой программы, касающейся всех репрезентативных аналитов, а также различных типов товаров, минимум на уровне, соответствующем уровню отчетности.	