

化学分析 方法验证与方法确认

鄢国强 CNAS主任评审员



术语和定义

◆ 方法验证 verification of method

阐明实验室的检测条件确实适合于方法的过程。是实验室对拟采用的标准检测方法的操作能力进行验证，以证实实验室具备检测标准所要求的各项资源保证和掌握标准检测的能力要求。

◆ 方法确认 validation of method

核实一种方法是否适合分析目的的过程。是对实验室所制订的非标准方法、实验室设计（制定）的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法通过实验，优化技术操作，以确认所制订的非标准方法、实验室设计（制定）的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法所获得的检测结果具有科学、准确、有效和灵敏的特性，并能满足检测要求的评价过程。

◆ 筛选方法 screening methods

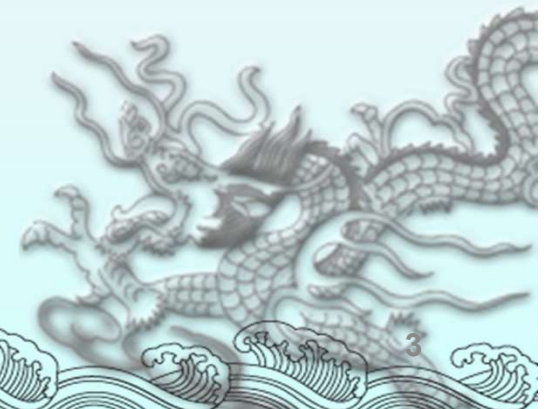
具有处理大量（高通量）样品的能力，用于检测一种物质或一组物质在所关注的浓度水平上是否存在的方法。这些方法用于筛选大量样品可能的阳性结果，并用来避免假阴性结果。此类方法所获得的检测结果通常为定性结果或半定量结果。

◆ 确证方法 confirmatory methods

能提供全部或部分信息，以明确定性，在必要时可在关注的浓度水平上进行定量的方法。

准则对方法验证的要求

- ◆ 7.2.1.5 实验室在引入方法前，应验证能够正确地运用该方法，以确保实现所需的方法性能。应保存验证记录。如果发布机构修订了方法，应在所需的程度上重新进行验证。



方法验证

- ◆ 实验室使用的化学检测标准必须适合检测目的，即方法的适用范围、方法灵敏度和准确度等技术指标和实验室执行标准的能力能满足客户的检测要求。
- ◆ 实验室首次采用的标准方法，在应用于样品检测前应证实实验室是否具备准确操作标准的人员、设备、标准物质、环境条件和质量控制手段等资源条件，并对方法的技术要素进行试验确认，至少应验证标准方法的灵敏度、正确度、精密度是否满足检测要求。当实验室使用新的分析人员、新的设备或者新的基质时必须进行验证。至少在方法使用前用已知浓度的样品或有证标准物质进行验证，以证实实验室对标准方法的操作能力达到所期望的准确度和精确度。
- ◆ 当实验室使用标准方法时。如果缺少指导书可能影响检测和/或校准结果，实验室可对所有相关设备的使用和操作、检测和/或校准样品的准备（或者二者兼有）、关键性操作步骤编制指导书。
- ◆ 当所选择的标准方法为国际标准、区域标准时，有必要时应将国际标准、区域标准翻译成实验室相关人员能理解的文字表述，以作业指导书的方式来指导检测人员的操作。
- ◆ 标准方法在投入使用前应经过实验室技术管理层的审批。
- ◆ 当检测标准发生变更，需要对新标准进行审查和评价，如果标准的技术要求未发生变化，只要实验室的各项资源条件未发生变化，即可使用新版标准方法，并可向认可机构申请标准变更。如果新版标准的技术要求发生变化，则必须按照新标准投入使用前的验证要求重新对新标准的操作能力进行验证。标准方法发生变更时，如技术要求未发生变化，则如新标准的技术要求发生变化，则应重新进行方法验证，再向认可机构申请标准变更。

典型方法验证参数的选择

待评估性能参数	方法验证	
	定量方法	定性方法
检出限*	√	-
定量限	√	-
灵敏度	√	√
选择性	√	√
线性范围	√	-
测量区间	√	-
基质效应	√	√
精密度 (重复性和再现性)	√	√
正确度	√	-
稳健度	-	-
测量不确定度(MU)	(1)	-

注：*：被测物的浓度接近于“零”时需要；√：表示正常情况下需要的性能参数；-：表示正常情况下不需要；(1)：表示如果一个公认测试方法中对不确定度的主要影响因素贡献值和对结果的表达方式有要求，则实验室应该满足于ISO/IEC 17025或同类标准的要求。

- ◆ 定量分析-方法验证过程中关键的参数应当取决于方法的特性和可能用到的样品基质的检测范围，至少应当如通过加标回收和重复试验等方法测定正确度和精密度。对于痕量化学分析实验室，实验室还应确保实现适当的LOD和LOQ。
- ◆ 定性分析-定性分析的精密度通常表示为假阳性或假阴性率，其可以用不同的浓度水平来确定。实验室进行方法验证可分析一组阴性或阳性加强样品。如对每个不同的样品基体，两个重复样品在三个含量水平上加以分析。建议的含量水平为空白（无分析物）、低浓度（接近方法的最低适用范围）和高浓度（接近方法的最高适用范围），可用标准添加法得到适当的浓度含量。假阳性或假阴性率应与方法确认的数据相当，才能证明实验室有能力使用该方法。

新项目开展计划表

QR-06-0504-2-C/0

项目名称：XXX标准方法

编号：

序	计划内容	责任人(部门)	期限	执行结果及说明
1	立项研讨	主持人：技术负责人 参加人：技术骨干		是否需要立项要
2	标准收集	负责人：		
3	熟悉标准	负责人：		
4	人员培训	负责人： 参加者：		
5	设备配备	负责人：		
6	设施与环境条件配置	负责人：		
7	编制检验检测规范	负责人：		
8	编制原始记录表格	负责人：		
9	编制检验检测报告格式	负责人：		
10	检验检测样品准备	负责人：		
11	开展检验检测	负责人： 参加者		
12	测量不确定度评估	负责人： 参加者		
13	原始记录	编写人： 校核人：		
14	检验检测报告	编写人： 审核人： 批准人：		
15	新项目评审	负责人： 参加者		
16	参加CNAS能力验证计划	负责人： 参加者：	CNCA,CNAS 网上有能力 验证计划	

新项目评审表

QR-06-0504-2-C/0

编号:

新项目名称:

依据标准:

评审结论:

检验检测机构经过对“人、机、料、法、环、测”六个因素的评价，并按标准进行了2次完整的检验检测，出具了2份完整典型报告，证明检验检测机构有能力按该标准方法开展检验检测。

评审内容:

1. 收集标准:
2. 熟悉标准:
3. 人员培训:
4. 设备配备:
5. 设施与环境条件配置:
6. 编制检验检测规范:
7. 编制原始记录表格:
8. 编制检验检测报告格式:
9. 检验检测样品准备:
10. 开展检验检测:
11. 测量不确定度评估
12. 原始记录:
13. 检验检测报告。
14. 参加CNAS能力验证计划

技术负责人

年 月 日

准则对方法确认的要求

- ◆ 7.2.2.1 实验室应对非标准方法、实验室制定的方法、超出预定范围使用的标准方法、或其他修改的标准方法进行确认。确认应尽可能全面，以满足预期用途或应用领域的需要。

注 1：确认可包括检测或校准物品的抽样、处置和运输程序。

注 2：可用以下一种或多种技术进行方法确认：

- a) 使用参考标准或标准物质进行校准或评估偏倚和精密度；
- b) 对影响结果的因素进行系统性评审；
- c) 通过改变控制检验方法的稳健度，如培养箱温度、加样体积等；
- d) 与其他已确认的方法进行结果比对；
- e) 实验室间比对；
- f) 根据对方法原理的理解以及抽样或检测方法的实践经验，评定结果的测量不确定度。

方法确认

- ◆ 实验室需对非标准方法、实验室设计（制定）的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行确认的程序制订相应的文件，以规范方法确认的程序及确认要求。
- ◆ 实验室可在综合考虑成本、风险和技术可行性基础上，并根据预期的用途来进行方法确认。实验室进行方法确认的内容应完整，包括但不限于以下内容：方法适用范围、结果的不确定度、检出限、方法的选择性、线性、重复性限和/或复现性限、抵御外来影响的稳健度和/或抵御来自样品（或测试物）基体干扰的交互灵敏度。准确度确认可采用与标准物质、质量控制样、参考方法、或其他常规方法进行比对及参加能力验证等方法。通过评价方法的相关特性用客观证据证明方法能够满足测试要求。
- ◆ 实验室应经过技术条件优化确认非标准方法、实验室设计（制定）的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法的科学性、准确性、有效性和灵敏性。任何对标准方法的偏离，都须确认，即使所采用的替代技术可能具有更好的分析性能。实验室经过确认的方法所得数据的范围、准确度和灵敏度应满足客户的需求。

◆ 实验室在建立非标方法或偏离标准方法的研究过程中，应包括以下内容或相关技术组合：

- (1) 优化样品前处理条件和仪器分析条件；
- (2) 分析干扰因素及其对测试的影响，确定排除干扰的方法；
- (3) 给出方法的线性回归方程、相关系数和线性范围；
- (4) 对不同浓度水平的样品进行大于6次的重复测定，计算精密度、相对标准偏差或变异系数，确认方法的重复性；
- (5) 加标回收试验；
- (6) 确定方法的测定低限；
- (7) 对不同类型、不同浓度的实际样品进行测定，以确定方法的适用范围；
- (8) 与标准方法或公认方法进行比较，两者测定结果经t检验应无显著性差异；
- (9) 使用标准物质或实物标样证明方法的准确性或有效性；
- (10) 不同实验室中进行方法的再现性试验。

- ◆ 实验室通过试验方法的检出限、精密度、回收率、适用的浓度范围和样品基体等特性来对检测方法进行确认，还应包括对测量不确定度的评估。
- ◆ 偏离标准的方法应经方法确认，并通过方法比对证明偏离的有效性。方法应经方法确认，并通过下列方法的比对确认：
 - a) 通过对标准方法的偏离(如试验条件适当放宽，对操作步骤适当简化)，以缩短检测时间，且这种偏离已被证实对结果的影响在标准允许的范围之内；
 - b) 对标准方法中某一步骤采用新的检测技术，能在保证检测结果准确度的情况下，提高效率，或是能提高原标准方法的灵敏度和准确度；
 - c) 由于实验室条件的限制，无法严格按标准方法中所述的要求进行检测，不得不作偏离，但在检测过程中同时使用标准物质或参考物质加以对照，以抵消条件变化带来的影响。
- ◆ 实验室使用非标准方法时应按照实验室质量体系文件的规定编写作业指导书或标准操作规程，在投入使用前应经过实验室技术领导层的审批并获得客户的同意。

确认方法特性参数的选择

- ◆ 化学检测方法的技术验证应对实验室完成的方法检出限、方法线性范围、精密度、回收率进行测试，以验证实验室的各项资源对标准方法的满足程度。当使用非标准方法、实验室设计（制定）的方法、超出其预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法进行检测前，除对测试条件的优化，还应进行方法检出限、方法线性范围、精密度、回收率确认试验，还需要对方法适用的浓度范围、样品基体和测量不确定度等特性进行确认。

- 实验室在选择确认样品基质时，应注意样品的代表性和典型性。对于样品基质差异会导致方法的技术参数发生显著变化时，应分别进行确认。方法的预期用途决定了对方法性能的具体要求，确认参数的选择应根据方法的预期用途加以确定。对于不同类型的化学检测方法，典型参数的选择见表1。

表1：典型确认参数的选择

方法类型		检出限	定量限	正确度	重复性	再现性	特异性	稳健性	测定范围
定性分析方法	S	√	-	-	-	-	√	√	-
	C	√	-	-	-	-	√	√	-
定量分析方法	S	-	√	-	√	√	√	√	√
	C	-	√	√	√	√	√	√	√

注：“S”=筛选方法 (Screening methods)；“C”=确证方法 (Confirmatory methods)；“√”=必选参数。

分析方法特性参数的确认要求

◆ 选择性

对于化学分析方法，在有干扰（如：异构体、代谢物、降解产物、内源性物质、基质成分等）的情况下保证检测结果的准确性至关重要。实验室可联合使用下述两种方法检查干扰：

- 分析一定数量的代表性空白样品，检查在目标分析物出现的区域是否有干扰（信号、峰等）；
- 在代表性空白样品中添加一定浓度的有可能干扰分析物的定性和/或定量的物质。

原则上，分析方法在没有重大干扰的情况下应具有一定的选择性。

◆ 测定范围

方法的测定范围通常应当满足以下条件：

- 方法的测定范围应当覆盖方法的最低浓度水平（定量限）和关注浓度水平；
- 至少需要确认方法测定范围的最低浓度水平（定量限）、关注浓度水平和最高浓度水平的正确度和精密度，必要时可增加确认浓度水平；
- 若方法的测定范围呈线性，还需满足“线性范围”条款的要求。

◆ 线性范围

线性范围通常可参照相关国际标准或国家标准，尽量满足如下要求：

- 采用校准曲线法定量，并至少具有6个校准点（包括空白），浓度范围尽可能覆盖一个或多个数量级，每个校准点至少以随机顺序重复测量2次，最好是3次或更多；对于筛选方法，线性回归方程的相关系数不低于0.98；对于准确定量方法，线性回归方程的相关系数不低于0.99；
- 校准用的标准点应尽可能均匀地分布在关注的浓度范围内并能覆盖该范围。在理想的情况下，不同浓度的校准溶液应当独立配制，低浓度的校准点不能通过稀释校准曲线中高浓度的校准点进行配制；
- 浓度范围一般应覆盖关注浓度的50%~150%，如需做空白时，则覆盖关注浓度的0~150%；
- 应充分考虑可能的基质效应，排除其对校准曲线的干扰。实验室应提供文献或实验数据，说明目标分析物在溶剂中、样品中和基质成分中的稳定性，并在方法中予以明确。通常各种分析物在保存条件下的稳定性都已有很好的研究，监测保存条件应作为常规实验室确认系统的一部分。对于缺少稳定性数据的目标分析物，应提供能分析其稳定性的测定方法。

◆ 检出限和定量限

- 通常情况下，只有当目标分析物的含量在接近于“零”的时候才需要确定方法的检出限（LOD）或定量限（LOQ）。当分析物浓度远大于LOQ时，没有必要评估方法的LOD和LOQ。但是对于那些浓度接近于LOD与LOQ的痕量和超痕量检测，并且报告为“未检出”时，需要利用检出限或定量限进行风险评估或法规决策时，实验室应确定LOD和LOQ。不同的基体可能需要分别评估LOD和LOQ。
- ◆ 对于多数现代的分析方法来说，检出限（LOD）可分为两个部分，方法检出限（MDL）和仪器检出限（IDL）。MDL为用特定方法可靠地将分析物测定信号从特定基体背景中识别或区分出来时分析物的最低浓度或量，也就是说，MDL就是用该方法测定出大于相关不确定度的最低值。在确定MDL时，应考虑到所有基体的干扰；方法的检出限（LOD）不应与仪器最低响应值相混淆。使用信噪比可作为考察仪器性能的一个有用的指标，但不适用于评估方法的检出限（LOD）。目前，大多数的分析都是利用仪器进行分析，每个仪器对于所检测分析物的量都会有一定检出能力。这种检出能力用仪器检出限（IDL）进行表示。随着灵敏度增加，IDL降低，仪器噪音降低，IDL也降低。

◇ 精密度

精密度通常包括两个参数，即重复性和再现性。

- 重复性-可用标准偏差 (s)、方差 (s^2) 和概率分布函数等表示。

- 如果分析方法中涉及到仪器分析，则除了方法重复性外还需确定仪器重复性。

- 重复性体现了测量结果短期变化，同样也适用于评定在单一批次分析中重复测定可能存在的差异。

- 重复性的测定通常应当在自由度至少为6的情况下测定。对一个样品测定7次；或对2个样品，每个样品测定4次；或对3个样品，每个样品测定3次。

- 仪器重复性可通过对校准曲线中标准溶液、加标溶液进样测定7次，然后计算平均值、标准偏差。进样应按随机顺序进行以降低偏差。

- 方法重复性可通过准备不同浓度的样品或浓度与做方法回收率研究相近的样品（样品的准备可采用实际样品，也可采用添加了所需分析物的空白溶液或实际样品），然后在较短的时间间隔内由同一个分析员进行分析测定，并计算平均值、标准偏差和相对标准偏差。

- 再现性-可用标准偏差 (s)、方差 (s^2) 和概率分布函数等表示。

- 例如在利用两种以上校准标准溶液在一段时间、测定一定数量的试样。这些条件包括在不同时间内测定，在与日常使用方法中条件差别尽可能小的情况下测定（如不同分析员利用不同设备的测试）。

- 再现性标准偏差可通过一系列多个样品获得，或多个系列测定结果的合成标准偏差进行计算。测试的自由度可通过系列量和每系列中样品数量进行计算。

重复性自由度和再现性自由度对照表

每系列测试中样品数(n)	系列量(m)	重复性自由度	再现性自由度
7	1	6	不适用
4	2	6	7
3	3	6	8
2	6	6	11
n	m	$(n-1)*m$	$n*m-1$

如果测试方法是用于对一系列样品类型进行测定（如不同分析物浓度或样品基体），则精密度的评估需要选择每个类型代表性的样品进行测定。比如：由于一个方法的精密度通常会随着分析物浓度的降低而变得较差。

◆ 正确度

测量结果的正确度用于表述无穷多次重复性测定结果的平均值与参考值之间的接近程度。正确度差意味着存在系统误差。偏倚是正确度的表示方式。

- 测量结果的偏倚可以看作是由方法本身偏倚、实验室偏倚以及来源于某一个特定分析带来的偏倚之间相互作用的结合。
- 回收试验用于评估偏倚。在高偏倚测试中，测定值与参考值会有重大的偏离。
- 考虑到不同检测批次之间的变化，如果可能的话，可采用覆盖整个浓度测试范围的不同试样评估偏倚。当一个方法不能如预期那样在整个测试范围偏倚一致时（如非线性校准曲线），则需要对不同浓度水平的样品进行测定（至少对高或低含量测试）。否则，实验室应证明在整个测试范围之内具有相同的正确度。
- 最理想的偏倚评估是利用样品的基体匹配且浓度相近的有证标准物质（CRMs）进行测试。
- 如果合适的CRMs无法获得时，需要寻找可替代的物质来评定偏倚。比如采用分析参考物质（RM）来评估回收率（假定基体与待测样品的基体匹配，目标物具有足够的代表性）。另外，经过协同实验室确定了特征性的物质也可以用于评估偏倚。
- 如果合适CRMs或RMs都无法获得，则偏倚只能通过基体空白中加入一系列浓度的目标物所得回收率来评估。在这种情况下，回收率（R）可通过下式计算。公式如下：

$$R=(C_1-C_2)/C_3$$

其中： C_1 是指加标之后测定的浓度； C_2 是指加标之前测定的浓度； C_3 是指加入目标物后的理论浓度。

◆ 稳健度

稳健度可通过由实验室引入预先设计好的微小的合理变化因素，并分析其影响而得出。分析稳健度时，

- 需选择样品预处理、净化、分析过程等可能影响检测结果的因素进行预实验。这些因素可以包括分析者、试剂来源和保存时间、溶剂、标准和样品提取物、加热速率、温度、pH值，以及许多其它可能出现的因素。不同实验室间这些因素可能有一个数量级的变化。因此应对这些因素做适当修改以符合实验室的具体情况；
- 确定可能影响结果的因素，对各个因素稍作改变。采用正交试验设计进行稳健度试验；
- 一旦发现对测定结果有显著影响的因素，应进一步实验，以确定这个因子的允许极限。对结果有显著影响的因素应在标准方法中明确地注明。

◆ 测量不确定度

- 对化学分析结果的不确定度产生影响的因素有很多，如质量、体积、样品因素和非样品因素等，其中样品因素包含取制样和分析样品的均匀性，而非样品因素包含外部数据（通常包括常数和由其他实验得出并导入的量值，如：分子量、基准试剂纯度、标准物质的标准值以及标准溶液的浓度等）和测试过程（包括关键的测试步骤和原理，如样品的前处理、试剂或溶剂的加入、测试所依据的化学反应等）。
- 样品因素和非样品因素存在于所有化学分析中，重量法分析中必然涉及质量因素，而容量分析中必然涉及体积因素。只需能够明确地给出被测量与对其测量不确定度有贡献的分量之间的关系，而这些分量怎样分组以及这些分量如何进一步分解为下一级分量并不影响不确定度的评估。
- 测量不确定度的评估应包括以下几点：
 - 化学分析方法的简要描述，包括用于计算结果的公式等；
 - 用于评估测量不确定度的数学模型；
 - 对测量不确定度有贡献的分量（如：可用鱼骨图分析法进行分析）；
 - 对所选方法的每个测量不确定度分量进行分布计算评估；
 - 用于整合标准不确定度的公式；
 - 扩展不确定的计算；
 - 结果报告的示例。

XXX实验室自制方法确认计划表

QR-06-0505-1-C/0

项目名称：XX自制方法

编号：

序	计划内容	责任人（部门）	期限	执行结果及说明
1	立项研讨	主持人：技术负责人 参加人：XX技术骨干		是否需要立项要
2	资料收集	负责人：		
3	熟悉资料	负责人：		
4	制订自制方法	负责人：		
5	使用参考标准或标准物质（参考物质）进行校准；	负责人： 参加者：		
6	与其他方法所得的结果进行比较（最好与标准方法作比较）；	负责人：		
7	检测机构间比对（3家以上经认可检验检测机构作比对）；	负责人：		
8	对影响结果的因素（人、机、料、法、环、测）作系统性评审；	负责人：		
9	根据对方法的理论原理和实践经验的科学理解，对所得结果不确定度进行的评定。	负责人：		
10	参加CNAS能力验证计划	负责人： 参加者：	CNCA,CNAS网上 有能力验证计划	

XXX实验室自制方法确认评审表

QR-06-0505-2-C/0

编号:

新项目名称:

依据标准:

评审结论:

检验检测机构经过“五种方法进行确认”满足检验检测使用要求。

评审内容:

非标准方法确定的方法性能的技术应当是下列之一，或是其组合：

- 使用参考标准或标准物质（参考物质）进行校准；
- 与其他方法所得的结果进行比较（最好与标准方法作比较）；
- 检验检测机构间比对（3家以上经认可检验检测机构作比对）；
- 对影响结果的因素（人、机、料、法、环、测）作系统性评审；
- 根据对方法的理论原理和实践经验的科学理解，对所得结果不确定度进行的评定。

当对已确认的非标准方法作某些改动时，应当将这些改动的影响制订成文件，适当时应当重新进行确认。

技术负责人： 年 月 日

谢谢!



手机及微信号: **18117303859**;
个人网站: **www.gqyan.com**;
E-mail: **gqyan@vip.sina.com**