

# 化学分析方法验证和确认的应用研究

冯秀梅 陈君

(江阴市产品质量监督检验所; 国家船舶材料质量监督检验中心(江苏), 江苏 江阴 214434)

**摘要** 分析方法的验证/确认是实验室引进新方法时必做的工作,也是实验室技术工作的重点和难点之一。对实验室采用分析方法的验证和确认工作进行归纳总结,详述了分析方法选择性、测量范围、线性范围、检出限和定量限、精密度、准确度的验证/确认方法及结果判定方式。适用于实验室引进的标准方法(包括标准变更)和非标准方法(实验室设计/制定的方法、超出预定范围使用的标准方法、扩充和修改过的标准方法)的验证和确认。

**关键词** 标准方法;非标准方法;验证;确认

**中图分类号:**O65 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-1035(2018)05-0061-06

## Application Research of Verification or Validation of Chemical Analytical Methods

FENG Xiumei, CHEN Jun

(Jiangyin Product Quality Supervision and Testing Institute;  
National Ship Materials Quality Supervision and Testing Center(Jiangsu), Jiangyin, Jiangsu 214434, China)

**Abstract** The verification or validation of the analysis method is a necessary work when the new method is introduced into the laboratory, and it is also one of the key and difficult points in the laboratory technical work. In this paper, the verification and validation of analytical methods adopted in the laboratory are summarized. The methods of verification or validation and result determination of selectivity, measurement range, linear range, detection limit and quantitative limit, precision and accuracy of analytical method are discussed in detail. It is suitable for verification and validation of standard methods introduced in laboratory (including standard change) and non-standard methods (laboratory design or formulation method, standard method used beyond the intended range, extended and modified standard method).

**Keywords** standard method; non-standard method; verification; validation

### 前言

随着经济的快速发展和科学技术的进步,新产品、新物质不断涌现,从而使社会对实验室检测能力和水平提出了更高的要求。然而,由于检测标准无

法与快速发展的检测需求相适应,实验室往往需要采用非标方法来满足客户的要求。另外,随着实验室扩大检测范围或领域,也需要引进一些新的检测标准。为了确保实验室提供的检测结果准确、可靠,实验室应在首次采用标准方法之前,对其进行验证;

收稿日期:2018-05-17 修回日期:2018-07-15

作者简介:冯秀梅,女,高级工程师,主要从事实验室理化检测研究。E-mail:feng-xiu-mei@jqt-cn.com

本文引用格式:冯秀梅,陈君. 化学分析方法验证和确认的应用研究[J]. 中国无机分析化学,2018,8(5):61-66.

FENG Xiumei, CHEN Jun. Application Research of Verification and Validation of Chemical Analytical Methods[J]. Chinese Journal of Inorganic Analytical Chemistry, 2018,8(5):61-66.

在首次采用非标准方法前,对其进行确认。如果依据的检测方法文本中已经给出了验证或确认程序,实验室应严格执行该方法规定的要求;如果未给出验证或确认程序,或给出的程序不明确,则需进行验证或确认。CNAS-CL01:2018《检测和校准实验室能力认可准则》<sup>[1]</sup>和《检验检测机构资质认定评审准则(2015)》<sup>[2]</sup>均要求实验室在使用标准方法和非标准方法前要进行验证和确认,但其并未明确如何进行特性参数的验证和确认。近几年发布的国家标准《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》(GB/T 32465—2015<sup>[3]</sup>)和《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》(GB/T 27417—2017<sup>[4]</sup>)对化学分析方法验证和确认提出了指导性指标的要求,然而实验室在理解和运用这些标准时还存在不少困扰,如不同的分析方法如何获得检出限和定量限,准确度等特性参数,如何进行试验及结果,如何判定等,从而导致实验室在引进新方法时无从下手,或对方法的验证/确认工作不到位。针对以上问题,在总结实验室经验的基础上结合相关标准和文献,对标准方法的验证和非标准方法的确认方法进行了研究并归纳整理,对广大化学实验室具有指导意义。

## 1 方法验证/确认特性参数的选择

在化学分析实验室引入标准分析方法时,应验证操作方法是否满足该标准的要求,即证实该方法(标准方法)能在实验室现有的设施设备、人员、环境等条件下获得令人满意的结果;实验室引入非标准方法时,应提供客观证据对特定的预期用途或应用要求是否满足进行认定。对标准方法特性参数的验证包含(但不限于)分析系统适应性、空白试验、准确度、精密度、检出限和定量限、线性及校准、测量不确定度等;对非标准方法特性参数的确认包含(但不限于)分析系统适用性、选择性、耐用性、线性及校准、回收率、准确度和精密度、检出限和定量限、稳定性、测量不确定度等。实验室可根据现有技术经济条件决定验证/确认的内容,但至少应满足表1的要求。

## 2 方法特性参数的验证/确认

### 2.1 选择性

一般情况下,分析方法在没有重大干扰的情况下应具有一定的选择性。对于化学分析方法,在有干扰的情况下,如:基质成分、代谢物、降解产物、内源性物质等,保证检测结果的准确性至关重要。实验室可选用下述两种方法检查干扰<sup>[3-4]</sup>:

表1 典型分析方法验证/确认参数的选择

Table 1 Selection of verification/validation parameters for typical analysis methods

参数	标准方法(验证)	非标准方法(确认)
检出限	√ <sup>a</sup>	√ <sup>a</sup>
定量限	√ <sup>a</sup>	√ <sup>a</sup>
选择性	√	√
灵敏度	—	√
线性范围	—	√
测量范围	—	√
精密度	√	√
准确度	√	√

注:—表示参数可不评估;√表示该参数必须评估;a对于痕量化学分析时,需要验证或评估。

1)分析一定数量(至少3个)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);

2)在代表性空白样品、标准溶液或纯试剂基质中添加一定浓度的有可能干扰分析物定性和/或定量的物质后,再检查在目标分析物出现的区域是否有干扰。

### 2.2 测量范围

方法的测量范围应覆盖方法的最低浓度水平(定量限)和关注浓度水平<sup>[5]</sup>。

确认方法测量范围时,至少应确认最低浓度水平(定量限)、关注浓度水平和最高浓度水平的正确度和精密度。

测量范围确认及判定方式见表2。

表2 测量范围确认要求及判定方式

Table 2 Validation requirements and determination methods of measurement scope

确认水平	最低浓度水平 (定量限)	关注浓度水平	最高浓度水平
确认方法	准确度(采用2.6.1-2.6.3中的一种或多种合适的方法进行)。 精密度(按2.5中的描述进行)。		
判定方式	准确度满足2.6.1-2.6.3对应确认方法的判定要求。 精密度满足表4的要求。		

### 2.3 线性范围

若方法的测量范围呈线性,除应满足2.2的要求外,还应满足下列要求<sup>[4]</sup>:

1)采用校准曲线法定量,浓度点不得小于6个(含空白浓度,标准中有规定的按标准的规定进行),浓度范围一般应覆盖关注浓度的50%~150%,如需做空白时,则应覆盖关注浓度水平的0%~

150%,每个浓度点至少重复测量2次,根据浓度值与响应值绘制校准曲线。

2)对于准确定量的方法,线性回归方程的相关系数不低于0.99。

## 2.4 检出限和定量限

### 2.4.1 检出限

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或定量限。当分析物浓度远大于定量限时,没有必要评估方法的检出限和定量限。但是对于那些浓度接近于检出限和定量限的痕量和超痕量检测,并且报告为“未检出”时,应确定检出限和定量限。不同的基质需要分别评估检出限和定量限。

检出限的验证或评估可采用下列方法进行:

1)标准方法已给出检出限(LOD或MDL)时:

在给出的MDL浓度水平上,通过分析该浓度水平的样品( $n \geq 10$ ),以验证给出的MDL,分析结果应在给出的MDL( $\pm 20\%$ )范围内<sup>[3]</sup>。

2)方法未给出MDL时,可选用下列一种合适的方法评估检出限:

#### A. 空白标准偏差法<sup>[4]</sup>

即通过分析大量的样品空白来确定检出限。独立测试的次数应不少于10次( $n \geq 10$ ),计算出检测结果的标准偏差( $s$ )。

检出限(LOD)=样品空白平均值+3s

B. 国际纯粹和应用化学联合会(IUPAC)规定对各种光学分析方法<sup>[6]</sup>,可用式(1)计算:

$$D. L = K S_b / s \quad (1)$$

式中:

D. L—方法的最低检出浓度;

$S_b$ —空白多次测量的标准偏差(吸光度);

$s$ —方法的灵敏度(即校准曲线的斜率)。

为了评估,空白测定次数必须足够多,最好能测20次以上,取 $k=3$ (相应的置信水平大约为90%)。

#### C. 信噪比法<sup>[4]</sup>

本方法适用于能显示基线噪音的仪器分析方法。对于定量方法来说,由于仪器分析过程都会有背景噪音,常用的方法就是利用已知低浓度的分析物样品与空白样品的测量信号进行比较,确定能够可靠检出的最小的浓度。

即  $S/N \geq 3$

其中:

$S$ —样品信号值;

$N$ —空白信号值。

### D. 方法分辨率法

在分光光度法中,以扣除空白值后的与0.01吸光度相对应的浓度值为检出限。

滴定分析中,以消耗0.02 mL标准溶液所对应的浓度或含量作为检出限。

### 2.4.2 定量限(报告限)

定量限(LOQ),又称报告限<sup>[5]</sup>,是一个限值,高于该值,定量结果的正确度和精密度可接受。一般实验室取3~10倍检出限作为方法的定量限<sup>[4]</sup>。

注<sup>[5]</sup>:检出限(LOD)。样品中可被(定性)检测,但并不需要准确定量的最低含量(或浓度),是在一定置信水平下,从统计学上与空白样品区分的最低浓度水平(或含量)。

MDL:方法检出限。通过分析方法全部检测过程(包括样品预处理),目标分析物产生的信号能以一定的置信度区别于空白样品而被检测出来的最低浓度或含量。

### 2.4.3 检出限的利用

检出限是分析测试的重要指标,是分析方法的重要基本参数之一。在日常检测过程中,检出限的确定和利用对实验室报出准确检测结果和规避风险具有十分重要的意义。实验室评估出方法检出限后,可参照以下三种情况利用检出限:

1)如检出限等于或略小于标准分析方法所规定的检出限,则仍采用规定值。

2)如检出限显著偏低并被多次测定证实其稳定性很好,也可改用此实测值,但必须在报告中加以说明。

3)如检出限大于标准分析方法的规定值,则表明空白试验值不合格,应找出原因并加以改正,直至小于等于规定值后,实验才能继续进行。

实验室检测结果的表述方式可以分为三种情况(表3)。

## 2.5 精密度

精密度反映了分析方法或测量系统存在的随机误差的大小,测试结果的随机误差越小,测试的精密度越高。精密度通常以相对标准偏差的形式表示。

在考察精密度时应注意以下几个问题:

1)分析结果的精密度与样品中待测物质的浓度水平有关,因此,必要时应取两个或两个以上不同浓度水平的样品进行分析方法精密度检查;

2)标准偏差的可靠程度受测量次数的影响,因此,计算标准偏差时需要足够多的测量次数,一般要求至少重复测定6次,计算时应剔除离群值<sup>[7]</sup>;

3)标准中对精密度有要求的,应满足标准的规定;若标准中无精密度要求,其重复测定的标准偏差应满足表4的要求<sup>[4]</sup>。

表3 检测结果的表述方式

Table 3 Expression of detection results

序号	类别	结果表示
1	检测结果小于检出限	报告“未检出”,并注明检出限; 例如:未检出(检出限为 0.01 μg/kg)。
2	检测结果在检出限和定量限之间	报告“<定量限”,并注明检出限; 例如:小于 0.03 μg/kg (定量限为 0.03 μg/kg)。
3	检测结果大于定量限	直接报告实测值; 例如:0.05 μg/kg。

表4 实验室内相对标准偏差

Table 4 Relative standard deviation in the laboratory

被测组分含量/(μg·kg <sup>-1</sup> )	实验室内相对标准偏差/%
0.1	43
1	30
10	21
100	15
1 <sup>1)</sup>	11
10 <sup>1)</sup>	7.5
100 <sup>1)</sup>	5.3
1 000 <sup>1)</sup>	3.8
1 <sup>2)</sup>	2.7
10 <sup>2)</sup>	2.0
100 <sup>2)</sup>	1.3

注:1)单位为 mg/kg,2)单位为%。

## 2.6 准确度

准确度是反映方法系统误差和随机误差的总和指标,它决定着这个分析结果的可靠性。准确度用绝对误差或相对误差表示。

### 2.6.1 标准样品分析法

通过分析标准样品,由所得结果了解分析的准确度。如果标准中有对准确度的判定方式,则按标准的规定,如无,可用下列方式进行判定。

#### 1) CD<sub>0.95</sub>(临界差)法<sup>[8]</sup>

用于测量的标准方法提供有可靠的重复性标准偏差  $\sigma_r$  和复现性标准偏差  $\sigma_R$  时,可采用 CD 值进行评价,标准方法的临界 CD 值为式(2):

$$CD_{0.95} = \frac{1}{\sqrt{2}} \sqrt{(2.8\sigma_R)^2 - (2.8\sigma_r)^2 \left(\frac{n-1}{n}\right)} \quad (2)$$

注:  $r = 2.8\sigma_r$ ,  $R = 2.8\sigma_R$

实验室在重复性条件下  $n$  次测量的算术平均值  $\bar{X}$  与参考值  $X_{ref}$  之差  $\bar{X} - X_{ref}$  小于临界 CD 值,则该测量结果为满意结果,否则为不满意结果。

#### 2) $E_n$ 值(又称归一化偏差)法<sup>[9]</sup>

当实验室能够对所检测项目进行正确的不确定度评定时,可使用  $E_n$  值对结果评价,见式(3)。

$$E_n = \frac{\bar{X} - X_{ref}}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}} \quad (3)$$

其中,  $\bar{X}$  是测量结果的平均值,  $X_{ref}$  是参考值,  $U_1$  是实验室扩展不确定度,  $U_2$  是参考值的扩展不确定度。

当  $E_n \leq 1$ , 则表明实验室的结果满意,否则为不满意。

#### 3) Z 值法

在 CD<sub>0.95</sub> 值和  $E_n$  值不可获得时,如相关专业标准规定了测试结果的允许差,可按标准规定评价。计算 Z 值,见式(4)。

$$Z = \frac{X_{lab} - X_{ref}}{\Delta} \quad (4)$$

式中:

$X_{lab}$  为实验室测量结果;

$X_{ref}$  为标准品或控制样品的参考值;

$\Delta$  为标准中规定的允许差。

若  $|Z| \leq 1$ , 则测试结果为满意结果,否则为不满意结果。

4)重复分析标准物质,测定含量平均值与真值的偏差指导范围见表 5<sup>[10]</sup>。

表5 测定值与真值的偏差指导范围

Table 5 The guidance range of deviation for determination values and true values

真值含量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	偏差范围/%
<0.001	-50~+20
0.001~0.01	-30~+10
0.010~10	-20~+10
10~1 000	<15
1 000~10 000	<10
>10 000	<5

### 2.6.2 加标回收率测定法<sup>[4,10]</sup>

1) 在样品中加入一定量标准物质测其回收率。

按下式计算回收率  $P$  :

回收率  $P/\%$  = (加标试样测定值 - 试样测定值) / 加标量  $\times 100\%$

2) 进行加标回收时,应注意以下几点:

(1) 加标物质的形态应该和待测物的形态相同;

(2) 回收率应在方法测定低限、两倍方法测定低限和十倍方法测定低限进行三水平试验;

(3) 任何情况下加标量均不得大于待测物含量的3倍(一般取0.5~2倍);

(4) 当样品中待测物浓度高于校准曲线的中间浓度时,加标量应控制在待测物浓度的半量。

3) 回收率的参考范围见表6<sup>[4]</sup>:

表6 回收率范围

Table 6 The range of recovery

被测组分含量/(mg·kg <sup>-1</sup> )	回收率范围/%
>100	95~105
1~100	90~110
0.1~1	80~110
<0.1	60~120

### 2.6.3 与已有方法比较法

通常认为,不同原理的分析方法具有相同不准确度的可能性极小,当对同一样品用不同原理的分析方法测定,并获得一致的测定结果时,可将其作为真值的最佳估计。

当用不同分析方法对同一样品进行重复测定时,若所得结果一致,或经统计检验标准其差异不显著时,则可认为这些方法都具有较好的准确度。所得结果呈现显著性差异,则应以被公认的可靠方法为准。检验两结果是否存在显著性差异的方法有  $t$  值检验法、 $E_n$  值法。

1)  $t$  值检验法

双整体  $t$  检验(独立样本)是检验两个样本平均数与其各自所代表的总体差异是否显著。首先按照  $F$  检验法检验两样品的方差是否存在显著性差异,如无,方可进行  $t$  值检验。

(1)  $F$  值检验法

本方法主要用来评价两组数据的精密度是否存在显著性差异。

计算步骤:

a. 分别计算甲、乙两组数据的方差 ( $S_1$ )<sup>2</sup>、( $S_2$ )<sup>2</sup>;

b. 然后根据  $F = (S_1)^2 / (S_2)^2$ , 计算  $F$  值;

注:  $S_1$  应大于  $S_2$ 。

c. 查  $F$  分布表,  $F_{0.05}, (n_1, n_2)$

d.  $F$  小于  $F_{0.05}$ , 说明两组数据的精密度无显著差异。

(2) 检验统计量为式(5):

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(n_1 - 1)S_1^2 + (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}} \quad (5)$$

其中,

$\bar{X}$  为两个样本平均值;

$S$  为两样品标准偏差;

$n$  为样本的个数。

以0.05为显著性水平,  $f = n_1 + n_2 - 2$ , 查  $t$  值表, 得临界值  $t_{表}$ 。如  $t < t_{表}$ , 则说明两样本平均值无显著性差异, 否则, 说明两样本平均值存在显著性差异。

2)  $E_n$  法

当实验室能够对两个检测项目进行正确的不确定度评定时, 可使用  $E_n$  值对结果评价。本方法还适用于利用标准物质进行验证、已知不确定度的两个实验室间的比对和留样再测情况。

计算公式(6):

$$E_n = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{U_1^2 + U_2^2}} \quad (6)$$

其中,  $x_1$  是一种方法的测量结果,  $x_2$  是另一种方法的测量结果,  $U_1$  是一种方法的实验室扩展不确定度,  $U_2$  是另一种方法的实验室扩展不确定度。

注: ①如进行标准物质验证、实验室间比对、留样再测时, 则可将  $x_2$  改成被测物品参考值、另一个实验室的或上次的测量结果, 将  $U_2$  改成参考值的扩展不确定度、另一个实验室或本实验室的扩展不确定度。

②用于实验室间比对时, 当已知参比实验室的不确定度优于本实验室, 且无法获取具体不确定度值时, 可保守认为与本实验室该结果的不确定度相等。

③如利用标准物质进行验证, 可假定本实验室测量结果的不确定度等同于标准物质证书上给定的不确定度, 以简化计算公式。

判定方式:

如  $E_n \leq 1$ , 则表明实验室的结果满意, 否则为不满意。

准确度可采用2.6.1—2.6.3中的一种或多种合适的方法进行, 汇总情况见表7。

表7 准确度试验及判定方式汇总表

Table 7 Summary of accuracy test and determination method

序号	准确度试验方式	准确度判定方式
1	标准样品分析法 2.6.1	CD法(适用于标准中提供 $r$ 和 $R$ ,或重复性标准偏差和再现性标准偏差的方法) $E_n$ 值法(适用于实验室能够对所检测项目进行正确的不确定度评定时) $Z$ 值法(适用于方法标准规定了测试结果的允许差时) 重复分析标准物质法
2	加标回收率测定法 2.6.2	见表6(适用于无标准样品的准确度试验)
3	与其它方法比较法 2.6.3	$t$ 值检验法(应用两种方法分别对检测对象重复测定6次以上) $E_n$ 值法(适用于实验室能够对两个检测项目进行正确的不确定度评定时)

### 3 结论

检测方法的验证和确认是确保检测结果准确性和可靠性非常重要的环节,也是实验室必做的工作之一。只有做好方法的验证和确认才能确保实验室具有使用新方法进行检测的技术能力。但目前如何进行方法验证和确认却没有统一的做法。本文根据实验室的操作经验和相关标准要求,阐述了如何进行新引进的标准方法的验证和非标方法的确认,旨在为广大化学分析实验室提供一种切实可行的工作方法,确保实验室出具的分析结果科学、准确、可靠。

#### 参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL01:2018 检测和校准实验室能力认可准则[R].  
[2] 中国国家认证认可监督管理委员会. 检验检测机构资质认定评审准则(2015)[R].  
[3] 全国质量监督重点产品检验方法标准化技术委员会. GB/T 32465—2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制要求[S]. 北京:中国标准出版社,2016.

[4] 全国认证认可标准化技术委员会实验室认可分技术委员会. GB/T 27417—2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南[S]. 北京:中国标准出版社,2017.  
[5] 全国质量监督重点产品检验方法标准化技术委员会. GB/T 32467—2015 化学分析方法验证确认和内部质量控制术语及定义[S]. 北京:中国标准出版社,2017.  
[6] The International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). IUPAC Compendium of Analytical Nomenclature[M]. 1998.  
[7] 全国统计方法与应用标准化技术委员会. GB/T 6379.2—2004 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法[S]. 北京:中国标准出版社,2004.  
[8] 全国统计方法与应用标准化技术委员会. GB/T 16306—2008 声称质量水平复检与复验的评定程序[S]. 北京:中国标准出版社,2008.  
[9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS—GL002:2018 能力验证结果的统计处理和评价指南[R].  
[10] 全国认证认可标准化技术委员会. GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]. 北京:中国标准出版社,2008.