

◎主编 周宇艳 周明辉

*Chemical Analysis  
Method Validation Program  
And Application Examples*

# 化学分析 方法验证程序 及应用实例



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

© 主编 周宇艳 周明辉

*Chemical Analysis  
Method Validation Program  
And Application Examples*

# 化学分析 方法验证程序 及应用实例



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS  
浙江大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

化学分析方法验证程序及应用实例 / 周宇艳, 周明辉主编.  
—杭州: 浙江大学出版社, 2015. 8

ISBN 978-7-308-14676-0

I. ①化… II. ①周… ②周… III. ①化学分析—分  
析方法 IV. ①0651

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2015) 第 097301 号

化学分析方法验证程序及应用实例

周宇艳 周明辉 主编



责任编辑 王 波

责任校对 潘晶晶 秦 瑕

封面设计 十木米

出版发行 浙江大学出版社

(杭州市天目山路 148 号 邮政编码 310007)

(网址: <http://www.zjupress.com>)

排 版 杭州金旭广告有限公司

印 刷 杭州杭新印务有限公司

开 本 710mm×1000mm 1/16

印 张 13.25

字 数 226 千

版 印 次 2015 年 8 月第 1 版 2015 年 8 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-14676-0

定 价 39.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部联系方式 (0571)88925591; <http://zjdxcbbs.tmall.com>

# 前 言

商品的质量安全检验离不开快速、准确、灵敏、稳定的分析方法。随着检测技术的不断更新和提高,无论分析方法的内在质量,还是外在表现形式都面临着更高的要求,而建立一项可靠分析方法的关键性工作就是要对所建方法进行方法学验证,以确保方法能够满足商品质量安全检验的需要。经过验证最终建立的确效的方法是化学分析工作正常开展的基本保障。然而许多分析方法在制定过程中,由于缺乏一个统一的验证运作机制,常常出现因无法有效验证而导致技术水平参差不齐的情况,从而使其实用价值与预期相差甚远,造成了极大的资源浪费,所以方法验证在化学分析操作中是一个重点要求。然而,虽深知方法验证的重要性,但对于它的必要性、适用性,以及到底要做什么,分析化学家都缺乏了解。

现有文献专著已提供了许多方法验证的相关建议,并特别涉及具体方法,但往往未得到充分利用。一些分析家认为方法验证只能与其他实验室合作完成,因此不去做。本书旨在讨论方法验证的相关问题,引导读者判别何时需要方法验证,增加读者对所涉及内容及其重要性的认识,简要介绍验证过程并提供基本思路帮助读者自行设计验证策略。最后对成功进行方法验证提出几点建议。本书对以下两类人员有望提供最大帮助:负责确保在其责任范围内的方法得到充分验证的实验室经理和负责将验证目的付诸实施的分析师。其他人员可以将本书作为背景资料的来源而从中获得指导——实验室的高层管理人员可以从管理角度出发去理解,实验室基层人员可以从技术角度出发去理解。

参加本书撰写的技术人员主要有周明辉、周宇艳、程欲晓、赵洁、刘曙、赵雨薇、顾中怡、金樱华、姚春毅、马明、张凯、蔡婧、沈康俊、张琳。本书的研究内容部分来自“双打”质检公益专项(项目编号 2012104020)、国家质检总局科研专项(2013IK003、2013IK017、2014IK253),在此一并致谢。

由于编者学识水平和经验有限,书中缺点和错误在所难免,恳请读者给予批评指正。

编 者

2014 年 12 月



# 目 录

## 第 1 篇 化学分析方法验证程序

|                   |    |
|-------------------|----|
| 第 1 章 方法验证的定义和概述  | 3  |
| 1.1 概述            | 3  |
| 1.2 什么是方法验证?      | 4  |
| 1.3 为什么要进行方法验证?   | 5  |
| 1.4 什么时候应进行方法验证?  | 7  |
| 1.5 方法应该如何验证?     | 7  |
| 1.6 方法验证相关的术语和定义  | 12 |
| 第 2 章 国内外验证活动开展情况 | 15 |
| 2.1 概述            | 15 |
| 2.2 各国方法验证指南或导则综述 | 15 |
| 第 3 章 方法验证的参数     | 23 |
| 3.1 概述            | 23 |
| 3.2 专属性/选择性       | 25 |
| 3.3 准确度           | 27 |
| 3.4 精密度           | 27 |
| 3.5 正确度和回收率       | 30 |
| 3.6 线性、校正曲线和范围    | 34 |
| 3.7 灵敏度           | 35 |
| 3.8 检测限           | 36 |
| 3.9 定量限           | 36 |



|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| 3.10 稳健性/耐用性/适用性 .....       | 37        |
| 3.11 稳定性 .....               | 38        |
| 3.12 测量不确定度 .....            | 39        |
| <b>第4章 化学分析方法验证程序 .....</b>  | <b>42</b> |
| 4.1 总则 .....                 | 42        |
| 4.2 分析方法的本实验室内验证程序 .....     | 44        |
| 4.3 分析方法的独立实验室验证程序 .....     | 45        |
| 4.4 化学分析方法的协同实验验证 .....      | 46        |
| 附录4A 化学分析方法验证流程图 .....       | 48        |
| 附录4B 化学分析方法的稳健性(耐变性)试验 ..... | 49        |
| 附录4C 化学分析方法独立实验室验证指南 .....   | 51        |
| 附录4D 验证实验室通用要求 .....         | 59        |
| 附录4E 样品均匀性与稳定性验证的评价指南 .....  | 60        |
| 附录4F 开展实验室间验证,确定方法精密度 .....  | 65        |
| 附录4G 开展实验室间验证,确定方法正确度 .....  | 77        |
| 附录4H 验证试验报告要求 .....          | 83        |
| 附录4I 测试结果的一致性和离群值检查 .....    | 85        |

## 第2篇 化学分析方法验证程序应用实例

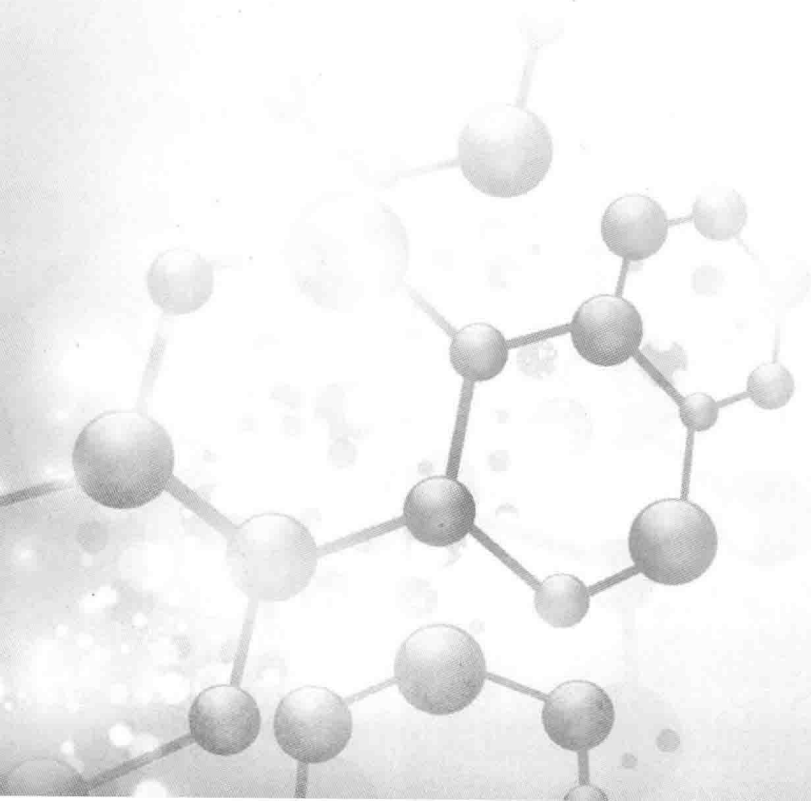
|                                          |            |
|------------------------------------------|------------|
| <b>第5章 “铁矿中砷、汞含量的同时测定——微波消解-原子荧光光谱法”</b> |            |
| 验证实例 .....                               | 101        |
| 5.1 方法适用范围及验证概要 .....                    | 101        |
| 5.2 方法开发背景及与国内外相关标准、文献的关系 .....          | 102        |
| 5.3 方法文本 .....                           | 103        |
| 5.4 方法的开发及技术内容 .....                     | 106        |
| 5.5 方法的实验室内验证 .....                      | 118        |
| 5.6 方法的独立实验室验证 .....                     | 124        |
| 5.7 方法的协同试验验证 .....                      | 128        |
| <b>第6章 “除草剂苯噻磺草胺水分散粒剂有效成分含量的检验方法——</b>   |            |
| <b>高效液相色谱法”验证实例 .....</b>                | <b>140</b> |
| 6.1 方法适用范围及验证概要 .....                    | 140        |



|                                                                   |                         |            |
|-------------------------------------------------------------------|-------------------------|------------|
| 6.2                                                               | 方法文本 .....              | 141        |
| 6.3                                                               | 方法的开发及技术内容 .....        | 144        |
| 6.4                                                               | 方法的验证前准备 .....          | 145        |
| 6.5                                                               | 方法的实验室内验证 .....         | 146        |
| 6.6                                                               | 方法的独立实验室验证 .....        | 152        |
| 6.7                                                               | 方法的协同试验验证 .....         | 152        |
| <b>第7章 “塑料和橡胶中三氯乙烯、四氯乙烯的检测方法——<br/>气相色谱质谱法”验证实例 .....</b>         |                         |            |
| 7.1                                                               | 验证概要 .....              | 154        |
| 7.2                                                               | 方法文本 .....              | 154        |
| 7.3                                                               | 方法技术的确定 .....           | 157        |
| 7.4                                                               | 方法的实验室内及独立实验室验证方案 ..... | 162        |
| 7.5                                                               | 方法的实验室内验证 .....         | 164        |
| 7.6                                                               | 方法协同试验验证方案及结果 .....     | 170        |
| <b>第8章 “煤炭原煤中砷、汞、铅、镉、铬、铍的测定——微波消解-电感<br/>耦合等离子体质谱法”验证实例 .....</b> |                         |            |
| 8.1                                                               | 方法概况 .....              | 176        |
| 8.2                                                               | 方法文本 .....              | 179        |
| 8.3                                                               | 方法的技术开发 .....           | 182        |
| 8.4                                                               | 方法的验证方案及验证前准备 .....     | 187        |
| 8.5                                                               | 方法的实验室内验证 .....         | 193        |
| 8.6                                                               | 方法独立实验室验证方案 .....       | 201        |
| <b>索 引 .....</b>                                                  |                         | <b>203</b> |

## 第 1 篇

# 化学分析方法验证程序







## 第1章>>>

# 方法验证的定义和概述

### 1.1 概述

任何分析测试的目的都是为了获得稳定、可靠和准确的数据结果。为了使实验室客户对分析结果产生信心,实验室必须证明其所使用的分析方法的适用性,而方法验证为分析方法的适用性提供了客观证据。方法验证的结果可以用于判断分析结果的质量、可靠性和一致性,这是所有分析质量管理体系不可分割的一部分。此外,方法验证是 ISO/IEC 17025<sup>[1]</sup> 实验室认可的基本要求,实验室必须证明所使用的所有方法的有效性,包括内部方法、标准方法以及修改过的标准方法。ISO/IEC 标准认为,方法验证通常是成本、风险和技术可能性三者之间的平衡。许多法规和质量标准也要求实验室进行分析方法的验证。

本书描述了方法验证与方法核查时应考虑到的方面,并对如何进行调查和评估做出指导,它适用于所有化学分析方法领域。本书参考并分析了国际上方法验证的主要技术文件,其中包括国际纯粹与应用化学联合会(IUPAC)分析方法的单实验室验证协调导则<sup>[2]</sup>、澳大利亚实验室认可组织(NATA)化学测试方法的验证和确证导则<sup>[3]</sup>、美国分析化学家协会(AOAC)化学分析方法的单实验室验证导则<sup>[4]</sup>和协同试验验证导则<sup>[5]</sup>、欧洲化学协会(Eurachem)方法验证指南<sup>[6]</sup>、欧盟关于分析方法性能和结果解释的指南 2002/657/EC<sup>[7]</sup>以及人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH) Q2B 分析过程的验证:方法学<sup>[8]</sup>。本章以下将讨论“什么是方法验证”、“为什么要进行方法验证”以及“谁



来进行方法验证”等问题,为读者更好地理解 and 开展方法验证提供参考。

## 1.2 什么是方法验证?

在论述怎样进行方法验证之前,需要先了解什么是“方法验证”,“方法验证”的定义是什么。关于“方法验证”,许多法规、标准以及国际机构制定的技术性指南文件或导则文件都对它进行了相关定义。从本质上讲,方法验证就是:根据检测项目的要求,预先设置一定的验证内容,并通过设计合理的试验来验证所采用的分析方法是否符合检测项目的要求。

### 1.2.1 ISO 标准关于验证的定义

国际标准 ISO<sup>[1]</sup> 定义验证 (Validation) 为“Confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specified intended use are fulfilled”。翻译为中文,即“通过检查和提供客观证据,表明指定预期用途的特定要求得到满足”。

### 1.2.2 AOAC 对验证的定义

美国分析化学家协会 (Association of Official Analytical Chemists, AOAC)<sup>[4,5]</sup> 定义验证为“Validation is the process of demonstrating or confirming the performance characteristics of a method of analysis”。翻译为中文,即“验证是对某分析方法的性能特性进行说明或确认的过程”。

验证过程与可接受性问题或测试性能的限制等级是分离的,它们取决于应用目的。验证适用于在合理的浓度范围及时间段内应用该方法的具体操作者、实验室及实验设备。一种化学分析方法的验证通常会导致方法可靠性及适用性等各方面规格标准的产生。验证是费时费力的过程,而且后续方法改变需要再次验证,因此必须在方法优化并稳定后再实施验证。另外,验证稳定性也必须通过对稳定标准物质的定期测试来确认。

### 1.2.3 IUPAC 对验证的定义

国际纯粹与应用化学联合会<sup>[2]</sup> (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) 对验证的定义为“Method validation makes use of a set of tests that both test any assumptions on which the analytical method is based



and establish and document the performance characteristics of a method, thereby demonstrating whether the method is fit for a particular analytical purpose”。翻译为中文,即“方法验证应用一组测试,既测试分析方法建立所基于的任何假设,又记录方法的性能特征,从而说明该方法是否适用于某一特定的分析目的”。

#### 1.2.4 ICH 对验证的定义

人用药物注册技术要求国际协调会议<sup>[8]</sup> (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 定义验证为“The objective of validation of an analytical procedure is to demonstrate that it is suitable for its intended purpose”,即“验证一个分析过程的目的就是去证明它适用于它的预期目标”。

#### 1.2.5 Eurachem 对验证的定义

欧洲化学协会 Eurachem<sup>[6]</sup> 认同 ISO 及 IUPAC 对验证的定义,它认为可以这样解释方法验证:“是定义分析要求的过程,同时用以确证所使用的方法对应用需求有很好的适用性”,隐意就是验证方法的适用性是必要的。Eurachem 认为在方法验证过程中,所使用的设备须规范并被充分校准,操作应正确。同样,进行验证的操作者必须胜任该研究领域的工作,并具有相关工作的丰富知识以便能够依据所发生的现象在研究进展中做出适当的决定。

### 1.3 为什么要进行方法验证?

#### 1.3.1 分析测试的重要性

世界各地成千上万的实验室每天进行着数以百万计的分析测试工作,有无数的原因促使着这些测试的进行。例如:将测试作为一种以贸易为目的的货物评估方法;采用测试支持医疗保健的需要;通过测试确认饮用水水质;通过分析合金中的元素组成以确认其是否适合用于飞机建造;刑事调查中的取证分析;等等。事实上,分析测试通过某种方式在支持着社会的各个方面。进行这些测试的成本很高,并且基于测试结果的一些决定将产生额外费用。例如:测试食物不宜食用可能导致赔偿要求;测试确认存在违禁药物可能导致罚



款。显然,测试出正确的结果并能证明其结果的准确性很重要。而要获得正确的测试结果,首要的要求就是需要一个经过方法学验证的、准确的、可靠的测试方法。因此,由分析测试的重要性,引出了对方法验证必要的需求。

### 1.3.2 分析师的专业责任

如果测试的结果不能被信任,那么它的价值不大,也可能不会被开展。当“客户”委托实验室进行分析时,其假定实验室具有一定程度的专业知识,而这是客户自身不具备的,客户预期信任结果报告。因此,实验室及其工作人员有明确的责任在问题的分析方面向客户提供正确答案,换句话说,结果有显著的“目的适用性”。它意味着测试结果适合客户希望解决的问题,最终报告的分析数据应以客户容易理解并从中得出适当结论的方式给出。方法验证使化学家能够证明该方法的“目的适用性”。

分析结果要符合其预期目的,它必须有足够的可靠性,使任何基于其得出的决定能够实施。因此,方法性能必须进行验证,且结果的不确定性能在一定的置信水平下进行估计。结果不确定性所需要的大多数信息都可从方法的验证过程中获得。

### 1.3.3 方法验证的作用

方法验证在分析方法建立过程中具有重要的作用,已成为质量研究和质量控制的组成部分。在某个分析方法应用的起始阶段,经常会发现以下情况:方法存在缺陷,出现意外干扰,无法获得试剂或设备,仪器需改进,因其他意外问题而需重新开发方法,等等。另外,有的方法在某实验室测试效果良好,但在另一实验室往往无法实施或重现。因而在方法投入常规、大量的测试之前,非常有必要对方法的性能参数进行验证。验证分析方法的首要目的是判断采用的分析方法是否科学、合理,该方法是否满足预期用途。方法的预期用途通常需要解答以下问题:“这是什么产品?”具体包括其通用名或常用名、化学种类或组分;“该产品中某组分的含量是多少?”方法可能的预期用途:

- (1)测定某种重要、必要或特征成分在产品中的含量;
- (2)确定产品是否符合规格;
- (3)确定产品是否符合法规要求;
- (4)研究环境中是否存在某组分、污染物或营养物质并测定其含量;
- (5)对产品或(与)其组分进行定性。



在靠近方法预期用途的过程中,方法开发与验证这两种程序是一个相互重复迭代的过程。

## 1.4 什么时候应进行方法验证?

当有必要确认方法性能参数足够用于解决一个特定分析问题时,该方法需进行验证。一般在下列情况下,要求对分析方法进行验证:

- (1)新开发的方法首次用于常规检测前;
- (2)内部方法转到另一个实验室,或由不同分析员使用,或在不同仪器上操作时;
- (3)质量控制结果表明已建立的方法性能不稳定,随时间发生变化时;
- (4)对于已验证的方法,其条件或方法性参数发生变化时,如仪器参数发生改变或样品基质不同时,并且这种变化超出了方法原有的适用范围;
- (5)表示两种方法等价时,如一个新方法和一个标准方法。

需要验证的程度将取决于所考虑方法的现状、需求与预期应用,以及不同实验室、仪器、操作者和方法环境的变化。新开发的内部方法通常需要严格的验证,而先前实验室内经过验证的操作规程的细微修改,在方法验证过程中只需要一个偏倚核查即可。无论如何,一定程度的验证始终是适当的,即使是在使用标准方法或已公布的方法时。

如果实验室希望应用经过协同实验广泛验证的标准方法(如 ASTM 或澳大利亚标准方法)时,应考虑所需方法验证的程度。

## 1.5 方法应该如何验证?

### 1.5.1 方法的开发

对一项方法进行验证之前,首先要开发出该项方法。方法开发可以采取各种不同的形式,包括在已有方法的基础上进行微小的改进,也包括基于新的检测技术和手段开发一项性能全新的方法。因而,一方面,方法开发可能涉及调整现行方法,稍做更改使其适用于一个新的应用。例如,一个方法要求测定水中甲苯,也许可以采用已建立的水中苯的检测方法。基体是一样的,且这两



种被分析物有大致相同的属性。很可能同样的分离、定性和定量原则适用苯的同时也适用于甲苯。但如果一种方法需要测定土壤中的苯,适用测定水中苯的方法可能不是最好的选择。采取其他测定土壤中有有机物的方法可能更适合。另一方面,分析化学家可能基于新的检测技术,运用自身的专业知识和经验制订了一项全新的方法,这个方法在分析物的测定手段或被测特性的开发上涉及重大创新。这种类型的方法开发显然涉及更大的工作量。这些不同类型、不同程度的方法开发,使得对后续方法验证的要求和程度也各有不同。

### 1.5.2 谁来进行方法验证?

使用方法时实验室需要负责确保它已被充分验证,必要时进行进一步的工作,以补充现有数据。因而,使用方法的实验室是开展方法验证的主体,由该实验室来进行方法验证实验工作,或者组织其他的实验室作为验证实验室来参加验证。然而,使用方法的实验室如何来进行方法验证,取决于它所使用的方法已被验证的程度。例如,对于一个被标准化组织批准的已验证方法,如ISO标准、EN方法、ASTM方法、AOAC方法或我国的国家标准GB方法,甚至是行业标准方法等,使用方法的实验室通常只需要为自己所使用的方法建立性能数据,考察自己对方法应用掌握的程度,这一过程也可称为“方法确认”(Method Verification,见本书1.6.1的定义)。再例如,如果使用的方法正在开发,且将在未来被广泛使用,那么作为方法发布的标准程序,涉及一组实验室的协同研究可能是进行验证的首选方式。然而,协同研究试验并不总是适用于商业实验室,因为方法的应用或许在一定程度上较为复杂,以至于没有实验室愿意合作参与协同试验,这就产生了一些问题:

- (1)开发方法的实验室能独立进行方法验证吗?如果可以,如何进行?
- (2)这种方式的方法验证能被其他实验室认可吗?
- (3)被监控的内部方法(非标方法)可以获得何种认可?

如果要回答上述问题,开发方法的实验室首先要开展独立工作,在本实验室内进行方法的验证,一般称为“实验室内验证”或“单个实验室验证”,这是新方法开发后进行验证的第一个步骤。虽然开发方法的实验室可以独立进行方法验证,但如果一个实验室开展独立工作,就不可避免地减少从一个方法中获取的验证数据的量,尤其是难以获得实验室之间具有可比性的实验数据信息。在这种情况下,如有必要的话,可以通过使用方法对已认证的参照化合物,如有证标准物质(CRM)进行测试,用所获得的结果的正确度来评估方法,或对比该方法与已经验证的方法来取得一些可比性。



### 1.5.3 决定需要什么程度的验证

实验室要决定哪些方法性能参数需要用作验证方法的表征。方法性能的验证是一个代价较高的过程,它不可避免地会受制于实验室对时间和成本的考虑。一般来说,基于常规基础方法的验证是一个相对简单的过程。实验室要通过制定一个验证计划,来决定哪些方法性能参数需要用作方法的验证。无论如何,在时间、成本限制和方法验证需求中寻求平衡是很困难的,有些参数可能在方法开发阶段已被近似确定了,实验室应充分考虑客户需求、现有该方法的经验,以及方法是否需要与其他类似方法或其他实验室使用的方法进行比较。一组特定的实验往往会同时产生几个参数的信息,所以仔细规划可使必要信息获得所需的工作量最小化。

在解决某些分析问题的起始阶段,仅需要单一或极少数实验室对分析方法进行验证。包括与以下相近的情形:

- (1)带研究性质的方法;
- (2)预计的测试样不多;
- (3)用于生产者对某单一产品生产过程中的质量控制;
- (4)核查从别处引入方法的可靠性;
- (5)核查之前使用过但已停用一段时间的方法的可靠性;
- (6)组织协同试验验证时,其他实验室对该方法缺乏关注的情况下;
- (7)用于测定复杂基质中多种目标物的方法,传统实验室间验证无法实施。

如果需要将一个方法投入大量的分析测试中使用,且所得的数据的可靠性和统计性将起到仲裁、合格评定、审价等重要作用,则这样的方法需要进行更加完整和全面的验证。除了单一或极少数实验室进行验证外,还需要8~15家甚至更多的实验室进行协同试验(即实验室间验证),以获得方法的正确度、精密度以及其他性能的详细信息。美国分析化学家协会(AOAC)一直支持将实验室间的验证作为验证方法的首选方式<sup>[5]</sup>。此外,它还还为只与一两个实验室合作的实验室的方法验证提供了“同行验证方法程序”<sup>[9]</sup>。

总的来说,需要什么程度的验证,取决于所开发方法的用途、功效,并要综合考虑方法开发所具备的经费、人力物力、试剂材料、物料的制备能力等多方面的能力和资源。



### 1.5.4 验证和分析的要求

面对一个特定的分析问题,理想状态下,实验室应第一时间与客户就分析要求达成一致,即确定一个方法的性能是否适合解决该分析问题。为满足客户的分析要求,实验室可以评价现有方法的适用性,如有必要也可开发一种新方法。这一开发新方法和评价方法的循环过程在满足客户分析要求的方法出现之前将一直持续。而这一方法的性能及适用性的评价过程即方法验证,如图 1.1 所示。

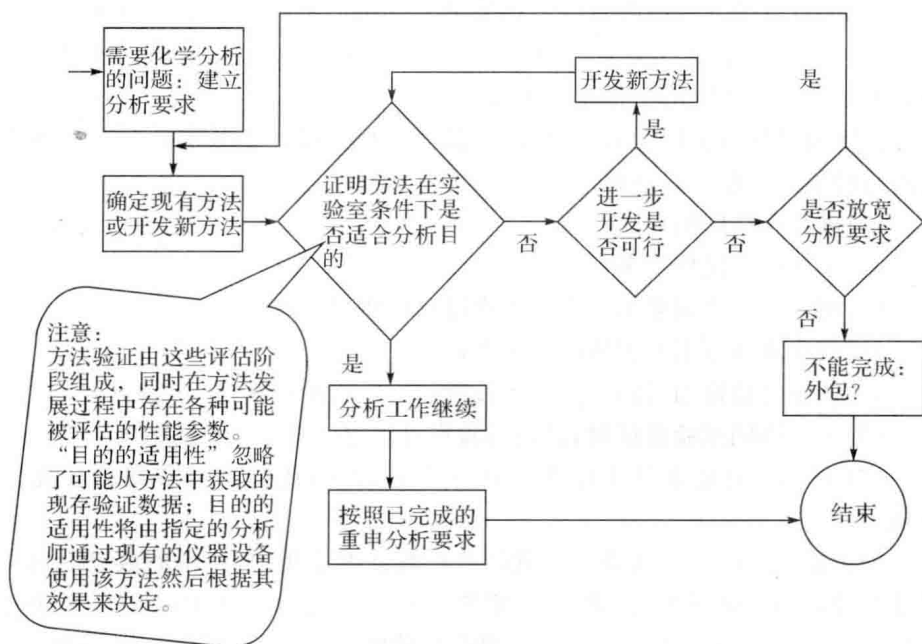


图 1.1 选择、开发和评价方法

表 1.1 表示了一系列可能在分析要求中出现的问题(第 1 栏)及方法中可能需要验证的相应性能参数(第 2 栏)。