

C O D E X A L I M E N T A R I U S

Международные стандарты на пищевые продукты



Продовольственная и
сельскохозяйственная
организация
Объединенных Наций



Всемирная
организация
здравоохранения

E-mail: codex@fao.org - www.codexalimentarius.org

**РУКОВОДЯЩИЕ УКАЗАНИЯ В ОТНОШЕНИИ КРИТЕРИЕВ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ АНАЛИЗА,
ПРИМЕНЯЕМЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПЕСТИЦИДОВ В ПИЩЕВЫХ
ПРОДУКТАХ И КОРМАХ**

CAC/GL 90-2017

Приняты в 2017 году.

ЦЕЛЬ

1. Цель настоящих Руководящих указаний заключается в определении и описании критериев эффективности, которым должны соответствовать методы анализа остаточного содержания пестицидов в пищевых продуктах и кормах (далее именуемых "пищевые продукты"). В документе рассматриваются научно обоснованные характеристики/параметры, обеспечивающие уверенность в том, что метод анализа пригоден для использования по назначению и может применяться для надежной оценки остаточного содержания пестицидов для целей национального контроля и/или международной торговли.
2. Настоящий документ применим как к методам, предназначенным для определения одного остатка пестицида, так и к многоостаточным методам (МОН), которые анализируют представляющие интерес соединения во всех продовольственных товарах согласно определению остатка.
3. Руководящие указания охватывают количественный и качественный типы анализа, у каждого из которых свои критерии эффективности. Также рассматриваются критерии эффективности методов идентификации и подтверждения анализа.

ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА И ВАЛИДАЦИИ МЕТОДОВ

A. Определение цели и диапазона применения метода

4. Предполагаемая цель метода обычно описывается в методологической части протокола метода, в которой дается определение аналитов (остатки пестицидов), матрицы и диапазонов концентраций, а также указывается, предназначен ли метод для скрининга, количественного определения, идентификации и/или подтверждения.
5. При применении для нормативных целей максимально допустимый уровень (МДУ) для остаточного содержания выражается в определении остатка. Аналитические методы должны позволять определять все компоненты остатка.
6. *Пригодность метода к использованию* – степень, в которой эффективность аналитической методики отвечает потребностям конечного пользователя и соответствует критериям (требования к качеству данных), согласованным между лабораторией и конечным пользователем данных (или клиентом), с учетом технических и ресурсных ограничений. Критерий *пригодности*, или соответствия метода целевому назначению, может основываться на ряде характеристик, описанных в настоящем документе, но в конечном итоге будет выражаться в допустимой суммарной неопределенности¹.
7. Выбор метода основывается на аналитах и предусмотренной цели анализов².

B. Дополнение к другим руководящим указаниям Комиссии "Кодекс Алиментариус"

8. Комиссия "Кодекс Алиментариус" (CAC) издала руководящие указания³ для лабораторий, участвующих в исследовании пищевых продуктов для импорта/экспорта, в которых таким лабораториям рекомендуется:
 - a) использовать процедуры внутреннего контроля качества, аналогичные процедурам, описанным в *Harmonized Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories*;
 - b) участвовать в соответствующих программах оценки квалификации для анализа продуктов питания, которые соответствуют требованиям, указанным в *The International Harmonized Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories (Pure Appl. Chem., vol 78, No. 1, pp.145-186, 2006)*; и
 - c) использовать, при наличии таковых, методы, которые были валидированы согласно принципам, установленным Комиссией "Кодекс Алиментариус".
9. Аналитические методики должны использоваться в рамках международно признанной, принятой и утвержденной системы управления качеством в лабораториях⁴ в соответствии с принципами оценки качества и контроля качества, изложенными в вышеупомянутых документах.

¹ *Harmonized IUPAC Guidelines For Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis*, Pure & Appl. Chem., 74(5), 2002; 835–855.

² *OECD Guidance Document on Pesticide Residue Analytical Methods*, ENV/JM/MONO (2007)17.

³ *Руководящие положения по оценке компетентности испытательных лабораторий, работающих в области контроля продуктов питания при импорте и экспорте* (CAC/GL 27-1997).

⁴ [General requirements for the competence of testing and calibration laboratories](#), ISO/IEC 17025 (2005).

С. Валидация метода

10. Процесс валидации метода призван подтвердить *пригодность* метода, его соответствие поставленным целям. Это означает, что при проведении анализа прошедшим надлежащую подготовку аналитиком, использующим регламентированное оборудование и материалы и в точности следующим протоколу метода, можно получить точные, достоверные и непротиворечивые результаты в установленных для анализа статистических пределах. Валидация должна позволять идентифицировать аналит и его концентрацию с учетом матричного эффекта, определять статистическую характеристику результатов извлечения и допустимость частоты ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Следуя протоколу метода и соблюдая надлежащие аналитические стандарты, обученный аналитик в любой лаборатории, имеющей опыт проведения анализа остатков, должен получать результаты в пределах установленных критериев эффективности. Для обеспечения того, чтобы эффективность метода сохраняла актуальность с течением времени, валидацию метода следует оценивать на постоянной основе (например, проводить анализы методом добавки).

ПАРАМЕТРЫ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЛЯ АНАЛИТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

11. Общие требования к отдельным критериям эффективности метода кратко излагаются ниже^{1,5}.

А. Документирование метода

12. После валидации при документировании метода помимо критериев эффективности (обеспечение качества данных) указывается следующая информация:
- а) принадлежность аналитов, включенных в определение остатка;
 - б) диапазон измеряемых концентраций, охватываемый валидацией;
 - в) матрицы, использованные в валидации (категории репрезентативных товаров, например, сельскохозяйственные продукты, сходные по характеристикам, включая содержание влаги, жира и сахара, рН);
 - г) протокол с описанием оборудования, реагентов, подробной пошаговой процедуры, включающей допустимые отклонения (например, "нагревать при $100 \pm 5^\circ\text{C}$ в течение 30 ± 5 мин"), процедур калибровки и процедур обеспечения качества, требуемых специальных мер предосторожности, предполагаемого применения и требований к пределам уверенного определения;
 - д) количественный результат расширенной неопределенности измерения (MU) для методики должен быть рассчитан в процессе валидации и предоставлен в случае необходимости.

В. Специфичность

13. В идеале специфичность оценивается, чтобы продемонстрировать отсутствие интерференций, существенно влияющих на анализ. На практике нецелесообразно тестировать метод в отношении каждого потенциального интерферента, но типовые интерференции необходимо проверять посредством проведения анализа холостого реагента (процесса) для каждой партии реагентов. Если реагенты и/или растворители заменяются между партиями проб, можно провести дополнительные анализы холостых образцов реагентов. Фоновые уровни пластификаторов, просачивающихся через септу летучих соединений, чистящих средств, загрязняющих примесей в реагентах, а также внутрилабораторные загрязнения, загрязнения пробы остатками предыдущей пробы и т.д. обычно выявляются в холостых пробах и должны быть идентифицированы аналитиком. Интерференции одного аналита с другим должны выявляться проверкой каждого аналита в смешанных стандартных растворах. Интерференции матриц выявляются анализом проб, о которых известно, что они не содержат аналита; с каждой партией образцов требуется холостая матрица, либо используется стандартный метод добавок для определения количественных значений (см. раздел Е).
14. В целом специфичность должна быть такой, чтобы интерференция не влияла на эффективность методики. Важнейший критерий специфичности включает долю ложноположительных и ложноотрицательных результатов анализов. Для подсчета уровня ложноположительных и ложноотрицательных результатов при валидации методики следует анализировать адекватное число

⁵ OECD Guidance Document for Single Laboratory Validation of Quantitative Analytical Method-Guidance used in support of pre-and post-registration data requirements for plant protection and biocidal products ENV/JM/MONO(2014)20

холостых проб на матрицу [взятых не из того же источника] вместе с обогащенными матрицами на нижней границе определяемых содержаний аналита.

C. Калибровка

15. За исключением погрешностей при подготовке калибровочных материалов, погрешности калибровки обычно составляют незначительный компонент общей неопределенности и могут быть с уверенностью разнесены по другим категориям. Случайные погрешности в результате калибровки являются частью неопределенности, в то время как системные погрешности приводят к аналитической погрешности. Обе категории оцениваются в целом в процессе валидации и текущего контроля качества. Тем не менее, существует несколько характеристик калибровки, о которых полезно знать в начале валидации методики, поскольку они влияют на оптимизацию конечного протокола. Например, следует заранее знать, является калибровочная кривая линейной или квадратичной, проходит ли через начало координат и зависит ли от матрицы пробы. Руководящие указания, описанные в настоящем документе, в большей степени относятся к валидации, которая может быть более детальной, чем калибровка, проведенная в ходе рутинного анализа.
16. Для обеспечения эмпирической оценки неопределенности необходимы параллельные измерения. Следующие процедуры калибровки рекомендуются для начальной валидации методики:
- следует провести определения пяти или более концентраций (оператору рекомендуется по возможности провести нескольких вводов проб на концентрацию);
 - аналитические стандарты должны быть равномерно распределены по интересующему интервалу концентрации; диапазон калибровки должен включать весь возможный интервал концентрации;
 - аналитические стандарты должны быть распределены по всей последовательности аналитического цикла либо охватывать его начало и конец, чтобы показать, что целостность калибровки поддерживается по всей последовательности; согласованность калибровочной функции необходимо отмечать на графике и проверять визуально и/или расчетом остатков (разница между фактической и расчетной концентрациями стандарта), не полагаясь чрезмерно на корреляционные коэффициенты. Если остатки, отраженные на калибровочной кривой, отклоняются более чем на $\pm 20\text{--}30\%$ (30% для концентрации калибровки вблизи предела количественного обнаружения инструмента), следует рассмотреть возможность статистических выбросов, что может привести к повторному анализу последовательности в случае несоблюдения критериев контроля качества.

D. Линейность

17. Линейность можно проверить, изучив график остатков, полученный путем линейной регрессии откликов концентраций в соответствующем наборе для калибровки. Любое отклонение от прямой дает основания предположить *несогласованность*, обусловленную нелинейной функцией калибровки. В таком случае следует испытать и применить другую функцию, например, квадратичную, используя по меньшей мере пять уровней концентрации. Коэффициент детерминации (R^2), несмотря на его широкое использование как показателя качества согласованности, может приводить к неверным результатам, поскольку он приписывает более высокую значимость стандартам с более высокими концентрациями. В таком случае следует рассмотреть соответствующий весовой коэффициент, например, $1/x$ или $1/x^2$, для минимизации потенциального влияния относительного диапазона концентрации.
18. В целом, для определения низких концентраций (миллиардные доли, или мкг/кг) рекомендуется вместо линейной регрессии использовать взвешенную линейную регрессию или взвешенную квадратичную функцию. В идеале уравнение линейной регрессии, примененное к результатам, должно иметь отрезок, отсекаемый на координатной оси близко к нулю, чтобы уменьшить погрешности в расчете концентраций остатков на низких уровнях, при этом кривую калибровки не следует без оснований проводить через начало системы координат.

E. Эффекты матрицы

19. Для компенсации эффектов матрицы обычно используют соответствующую матрицу калибровку. Для калибровки используются экстракты холостых матриц, предпочтительно того же типа, что проба, или сходного. Альтернативным практическим подходом к компенсации матричных эффектов в газохроматографическом анализе (ГХ-анализе) является использование химических компонентов (протектантов), которые добавляют в экстракты пробы и калибровочные растворы для того, чтобы в идеале максимизировать в равной степени отклик пестицидов в калибрантах в растворе и экстрактах пробы. Альтернативные способы компенсации эффектов матрицы включают использование метода стандартных добавок, изотопно-меченых внутренних стандартов (ВС) или химических аналогов.

Однако в случае с MOM применение таких подходов зачастую затруднительно, поскольку в различных матрицах на различных уровнях содержится слишком много остатков для того, чтобы разработать рутинные процедуры, и для слишком многих аналитов изотопно-меченые стандарты отсутствуют. В идеале, при наличии изотопно-меченых стандартов такие стандарты должны представлять диапазон представляющих интерес соединений и извлечений, соответствующий критериям для проб, к которым были добавлены не изотопно-меченые стандарты. Если используется калибровка только по растворителю, необходимо провести измерение эффектов матрицы для демонстрации эквивалентности результатов сравнением откликов стандартов с согласованной матрицей со стандартами только для растворителя.

F. Правильность и степень извлечения

20. Правильность метода анализа представляет собой степень соответствия результата анализа принятому стандартному значению измеряемого параметра. Правильность выражается количественно через погрешность – чем меньше погрешность, тем выше правильность. Как правило, погрешность определяется сравнением отклика в методике с аттестованным (при наличии такого) стандартным образцом с известным значением, присвоенным материалу. В идеале рекомендуется многолабораторное испытание. Если неопределенность в стандартном значении не является пренебрежимо малой, оценка результатов должна учитывать неопределенность стандартного образца, а также статистическую изменчивость при его анализе. Руководства рекомендуют при отсутствии аттестованных стандартных образцов^{1,5} использовать доступный стандартный образец, точно охарактеризованный для целей валидационного исследования.
21. Степень извлечения относится к доле аналита, определенной в конечном результате, относительно количества, добавленного в пробу (обычно холостую) перед извлечением, обычно выражаемой в процентах. Погрешности в измерениях приведут к недействительности измерений степени извлечения, которые будут отклоняться от фактической степени извлечения в конечном экстракте. Рутинное извлечение относится к замеру (замерам), выполненным на пиках контроля качества в анализе каждой партии проб.

G. Прецизионность

22. Прецизионность – степень совпадения с результатами независимого (параллельного) испытания, полученными в регламентированных условиях. Как правило, прецизионность определяется в терминах стандартного отклонения (SD) или относительного стандартного отклонения (RSD), также известного как коэффициент вариации (CV). Различие между прецизионностью и погрешностью зависит от уровня, на котором рассматривается аналитическая система. Так, в плане отдельного определения любое отклонение, влияющее на калибровку, использованную в анализе, будет расцениваться как погрешность. С точки зрения аналитика, рассматривающего проделанную за год работу, аналитическая погрешность каждый день будет разной и является случайной переменной с ассоциированной прецизионностью, включая любые установленные условия для оценки этой прецизионности.
23. При валидации в одной лаборатории имеют значение две группы условий прецизионности: а) повторяемость, вариабельность значений измерений в пределах одной аналитической последовательности и б) внутрилабораторная воспроизводимость, вариабельность результатов при многократном исследовании одной и той же пробы. Важно, чтобы значения прецизионности отвечали сходным условиям испытания. Прежде всего, вариативность условий аналитических циклов должна представлять обычную для лаборатории вариативность во время рутинного использования метода. Добиться этого можно с помощью текущей валидации/верификации эффективности метода. Например, различия в партиях реагента, персонале и оборудовании должны измеряться в ходе текущего контроля качества. Во-вторых, исследуемый материал с точки зрения матрицы и консистенции (в идеале) должен быть схож с материалом, с которым лаборатория будет работать, применяя метод на практике.
24. При валидациях в одной лаборатории прецизионность часто меняется вместе с концентрацией аналита. Естественным будет допустить, что а) прецизионность с уровнем аналита не меняется, либо что б) стандартное отклонение пропорционально уровню аналита или находится в линейной зависимости от него. В обоих случаях допущение следует проверить, если ожидается, что уровень аналита будет значительно различаться (т.е. когда уровень аналита приближается к LOQ).
25. Данные о прецизионности могут быть получены для широкого спектра различных наборов условий в дополнение к минимуму повторяемости и условиям между аналитическими циклами, и целесообразным было бы получение дополнительной информации. Например, это могло бы быть полезным для оценки результатов или совершенствования исследования, с указанием внутрилабораторной прецизионности (разные аналитики, разное время дня, разные дни) или прецизионности, достижимой при использовании одного или нескольких инструментов. Существует целый ряд различных планов проведения и методик статистического анализа, и для всех таких исследований настоятельно рекомендуется тщательно разработать план эксперимента. На начальном

этапе валидацию следует проводить на целевом пределе количественного определения (LOQ) или уровне, о котором следует сообщать в регулятивные органы, и как минимум еще на одном, более высоком уровне, например, 2-10х целевых LOQ или МДУ.

H. Предел количественного определения (LOQ)

26. Согласно давно принятому среди химиков-аналитиков определению, предел количественного определения (LOQ) – концентрация, при которой среднее соотношение сигнал/шум (С/Ш) в анализе составляет 10. На практике LOQ может быть оценен только приблизительно, поскольку точное определение фактического LOQ требует многочисленных анализов обогащенных проб и холостых матриц, при этом LOQ может постоянно меняться в зависимости от производительности оборудования, в числе множества других факторов. Некоторые руководства по валидации требуют проверки соответствия LOQ критериям эффективности метода путем проведения экспериментов с добавками на LOQ, однако повседневные колебания LOQ могут вынуждать аналитика давать слишком завышенную оценку фактическому LOQ метода, что может затруднить использование точного определения LOQ (С/Ш = 10). Таким образом, метод добавок на нижнем валидированном пределе (LVL) является более описательным и верным подходом. Кроме того, не следует проводить количественное определение аналитов ниже наименьшего валидированного предела (LVL) в одной и той же аналитической серии. Соотношение С/Ш на наименьшем пределе калибровки (LCL) должно быть ≥ 10 (концентрация $\geq \text{LOQ}$), которое можно установить в качестве проверочного для каждой аналитической серии. Обогащенную матрицу контроля качества также можно включить в каждую серию, чтобы удостовериться в том, что в анализе достигнут предел количественного определения (обычно $\geq \text{LCL}$). По сути, смысл валидации заключается не в том, чтобы определить LOQ, но в том, чтобы продемонстрировать, что предел количественного определения методики удовлетворяет потребности анализа. Хотя для количественного определения это и не является целесообразным, некоторые аналитики могут пожелать рассчитать предел обнаружения (LOD) (С/Ш = 3), чтобы предполагать присутствие аналита в концентрациях слишком низких для того, чтобы позволить их приблизительную оценку.

I. Аналитическая область

27. Аналитическая область, или диапазон методики – интервал между верхним и нижним уровнями концентрации аналита, в пределах которого метод может считаться валидированным. LVL представляет самую низкую концентрацию, оценивавшуюся в процессе валидации, которая соответствует критериям эффективности метода. Важно понимать, что валидированный диапазон не всегда совпадает с рабочим диапазоном инструментальной калибровки. В то время как калибровка может охватывать широкий диапазон концентраций, валидированный диапазон (который, как правило, более важен для оценки неопределенности) обычно будет охватывать более ограниченную область. На практике большинство методик будут валидироваться для по меньшей мере двух уровней концентрации аналита. Валидированный диапазон может служить в качестве обоснованной экстраполяции из двух этих уровней, но многие лаборатории предпочитают валидацию на третьем уровне, чтобы продемонстрировать линейность. Для целей мониторинга содержания остатков применительно к стандартам Кодекса аналитическая методика должна быть достаточно чувствительной, чтобы LVL для каждого аналита соответствовал актуальному МДУ Кодекса (CXL) или был ниже. Область валидации должна включать существующий CXL. В тех случаях, когда CXL не существует, за самый низкий уровень можно взять МДУ, определенный национальным регулирующим органом. Если для данной пары аналит/матрица CXL или МДУ не существует, в качестве подходящего LVL обычно служит 0,01 мг/кг или LOQ (в зависимости от того, какое значение больше). В МОМ, как правило, типичная аналитическая задача состоит в установлении LVL (и нижней границы определяемых концентраций) в 0,01 мг/кг в разных, но репрезентативных товарах.

J. Устойчивость

28. Устойчивость (часто синонимичная с робастностью) аналитического метода представляет собой способность сохранять результаты, полученные по аналитической методике, при отклонениях от экспериментальных условий, описанных в процедуре. Пределы экспериментальных параметров должны быть указаны в протоколе метода (хотя в прошлом это не всегда делалось), и допустимые отклонения, по отдельности или в любом сочетании, не должны приводить к значимым изменениям в полученных результатах. В данном контексте "значимое изменение" подразумевает, что метод не достигает цели обеспечения качества данных, определяемой пригодностью метода. Следует определить те аспекты метода, которые могут повлиять на результаты, и оценить их воздействие на эффективность метода путем проведения испытаний на устойчивость.
29. К примерам факторов, которые могут проверяться в испытании на устойчивость, относятся: небольшие изменения в оборудовании, марке/партии реагента или смена оператора; концентрация реагента; pH раствора; температура реакции; время, отведенное на выполнение процесса, и/или другие соответствующие факторы.

К. Неопределенность измерения (MU)

30. Формальный подход к оценке неопределенности результатов измерения состоит в расчете по результатам уравнения или математической модели оценки, рядом с которой можно ожидать с достаточной долей вероятности истинное значение. Процедуры, предписываемые валидацией метода, разработаны так, чтобы гарантировать, что уравнение, использованное для *оценки результата*, с должной поправкой на случайные погрешности всех видов, является истинным выражением, включающим все идентифицированные и значимые влияния на результат. Дальнейшие соображения и описания неопределенности результатов представлены в *Руководстве по оценке неопределенности результатов*⁶.
31. Предпочтительно выражать неопределенность измерения в виде функции концентрации и сравнивать эту функцию с критерием *пригодности*, согласованным между лабораторией и клиентом или конечным пользователем данных. Одной из возможностей является расчет неопределенности измерения на основе данных, полученных в процессе проверки квалификации⁶.

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ СКРИНИНГОВЫХ МЕТОДОВ

32. Скрининговые методы обычно являются качественными или полуколичественными по своей природе методами, задача которых состоит в отделении проб, которые не содержат остатков в количествах, превышающих пороговые величины ("отрицательные"), от тех, которые могут содержать остатки в количествах, превышающих пороговые величины ("отмеченные как положительные"). Поэтому задачей стратегии валидации являются установление пороговой концентрации, после превышения которой результаты являются "потенциально положительными", определение основанного на статистических данных уровня ложноположительных или ложноотрицательных результатов, проверка на интерференцию и регламентирование надлежащих условий использования. Скрининг является для лабораторий эффективным средством расширения их аналитической тематики за счет аналитов, вероятность присутствия которых в пробах низка. Мониторинг наиболее часто встречающихся аналитов следует вести с использованием валидированных количественных МОМ. Как и количественные методы, скрининговые методы должны проверяться на специфичность и чувствительность. Для некоторых задач могут быть полезными коммерческие диагностические наборы, но на практике современные методы редко удовлетворяли потребности в многоостаточном скрининге с экономической точки зрения. Специфичность и аналитический диапазон часто улучшаются, если хроматография или другой метод разделения используются на этапе до обнаружения остатков. Другим подходом является использование скрининговых методов, которые включают основанное на масс-спектрометрии (МС) обнаружение, позволяя отличать отдельные химические соединения друг от друга.
33. Специфичность скрининговых методов должна быть такова, чтобы их использование позволяло отличить присутствие представляющего интерес соединения или группы соединений от других субстанций, которые могут присутствовать в материале пробы. Специфичность скрининговых методов, как правило, ниже, чем у количественных методов. Скрининговые методы могут использовать структурную особенность, общую для группы или класса соединений, и могут основываться на иммунохимических пробах или спектрофотометрических сигналах, которые не всегда однозначно идентифицируют соединение.
34. Валидация скринингового метода, основанного на скрининговом пределе обнаружения (SDL), может строиться на выявляемости. Минимальная валидация для каждого репрезентативного типа матрицы (группа товаров)⁷ должна включать анализ по меньшей мере 5 проб, обогащенных на предполагаемом SDL пробы, и по меньшей мере 5 холостых матриц из других источников (например, других рынков или других сельскохозяйственных участков и т.д.). Чем больше параллельных анализов, обеспечивающих разнообразие, тем лучше валидация. Для планируемой работы лаборатории репрезентативным будет минимум две различных пробы для каждого типа матрицы. Дополнительные данные для валидации могут быть взяты из данных текущего контроля качества и верификации эффективности метода в ходе рутинных анализов. SDL качественного скринингового метода представляет собой самый низкий уровень, на котором аналит обнаруживался (необязательно соответствующий критерию идентификации методом МС) по меньшей мере в 95% проб (например, с допустимым уровнем ложноотрицательных результатов в 5%).

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ МЕТОДОВ

35. Специфичность имеет особое значение при определении критериев эффективности количественных методов, используемых в программах контроля содержания остатков пестицидов в пищевых

⁶ *Руководство по оценке неопределенности результатов* (CAC/GL 59-2006)

⁷ Таблица 5, *Руководящие принципы надлежащей лабораторной практики, касающиеся определения остаточного содержания пестицидов* (CAC/GL 40-1993)

продуктах. В идеале метод должен обеспечивать аналитический сигнал, свободный от интерференций других аналитов и соединений матрицы, которые могут присутствовать в пробе или экстракте пробы. Хроматографические анализы, основанные на измерении разрешенных не полностью хроматографических пиков, представляют менее достоверные количественные результаты. Использование детекторов конкретных элементов, различных длин волны детектирования или основанных на МС детекторов, которые могут лучше различать конкретные соединения или структуру, в сочетании с разделением на хроматографе, улучшает специфичность количественных методов.

36. Извлечение остатков нескольких пестицидов в одном экстрагировании повышает вероятность снижения специфичности MOM по сравнению с одноостаточными методами. Использование менее специфичных процедур экстракции и очистки может привести к большему содержанию совместно экстрагированного материала матрицы в конечном экстракте. Характер и количества такого совместно экстрагированного материала могут существенно варьировать в зависимости от матрицы, метода и определяемых аналитов. Поэтому требуется с особым вниманием подходить к установлению критериев для прецизионности и правильности MOM, чтобы химические интерференции не отразились на количественной оценке.
37. Помимо специфичности, метод должен демонстрировать способность обеспечивать достоверный количественный результат (т.е. правильность (см. раздел F) и прецизионность (см. раздел G)). В идеале RSD между оригинальной пробой и параллельными анализами должно составлять менее 20%.
38. На всех этапах валидации методики количественного анализа должно быть продемонстрировано соответствие критериям приемлемости – способность методики обеспечивать приемлемые средние значения извлечения при каждом повышении концентрации аналита (метод добавок). Для валидации рекомендуется провести минимум 5 параллельных анализов (для проверки степени извлечения и прецизионности) на целевых LVL, LOQ, или уровне отчетности метода и по меньшей мере одном дополнительном, более высоком уровне, например, 2-10x LVL или MRL. Если методика используется для проверки соответствия (т.е. соответствует ли продукт установленному МДУ), МДУ (или CXL) должен входить в валидированный диапазон концентраций. Если определение остатка включает два аналита или более, методику следует валидировать для всех аналитов.
39. Правильность метода можно определить, проведя анализ аттестованного стандартного образца и сравнив результаты с результатами, полученными с использованием другого метода, для которого ранее были строго регламентированы критерии эффективности (как правило, в межлабораторном исследовании), или путем определения степени извлечения аналита, обогащенного холостыми пробами с известной концентрацией. Приемлемые средние значения степени извлечения в регулятивных целях должны лежать, как правило, в диапазоне 70–120% с RSD $\leq 20\%$. Для очень низких концентраций (т.е. $< 0,01$ мг/кг) некоторые лаборатории могут принять критерии эффективности метода, которые выходят за эти рамки (например, 60–120% с RSD $< 30\%$). В определенных случаях (как правило, с MOM), могут быть приемлемыми лежащие вне этого диапазона степени извлечения, например, когда степень извлечения ниже, но при этом единообразна (например, демонстрирует хорошую прецизионность). Это более оправдано, если причина систематической низкой погрешности убедительно доказана на уровне химии (например, известным распределением аналита между фазами на этапе фракционирования). Тем не менее, если это возможно практически, следует использовать более точный метод. Степени извлечения $> 120\%$, вероятно, объясняются завышением результата или систематической погрешностью, которые должны быть расследованы.
40. Для обеспечения валидации метода рекомендуется проведение анализа матрицы с активными образцами. При интерпретации результатов следует понимать, что обогащенный в лабораторных условиях аналит может вести себя иначе, чем аналит в активном образце (остаток пестицида). Во многих случаях количество экстрагированного из активного образца аналита будет меньше, чем общее количество аналита в образце. Это может объясняться потерями во время экстракции, внутриклеточным связыванием остатков, присутствием конъюгатов или другими факторами, которые не представлены в полной мере в экспериментах по извлечению, использующих обогащенные аналитом холостые матрицы. Часто для оценки степени извлечения остатков в активных образцах требуются меченные радиоизотопами биологически внесенные остатки или стандартные образцы материала.
41. При относительно высоких концентрациях аналита ожидается, что степень извлечения в анализе может приближаться к ста процентам. При более низких концентрациях, в особенности при использовании методов, предполагающих такие этапы, как масштабная экстракция, разделение и концентрирование, показатели извлечения могут быть ниже, чем при более высоких концентрациях. Независимо от того, какие наблюдаются средние показатели извлечения, желательно извлечение с низкой изменчивостью, чтобы при необходимости можно было сделать надежную корректировку для извлечения в окончательном результате.

42. В целом, если средняя степень извлечения лежит в диапазоне 70–120%, корректировать данные по остаткам необязательно. Корректировки извлечения должны быть сделаны в соответствии с руководящими указаниями, содержащимися в документе CAC/GL 37-2001⁸. Это облегчит прямое сравнение с группами данных. Корректирующие функции необходимо установить на основе надлежащих статистических соображений, документировать, архивировать и сделать доступными для клиентов и проверяющих. Данные должны а) быть представлены таким образом, который четко указывает на то, применялась ли коррекция степени извлечения, и б) в надлежащих случаях, включать сведения о величине коррекции и методе, которым она была получена. Это будет способствовать прямой сопоставимости наборов данных.
43. В соответствии с ИСО/МЭК 17025⁴ лаборатория должна принять участие в программе проверки квалификации. Для лабораторий, проводящих мониторинг остатков пестицидов, во всем мире доступны многочисленные программы проверки квалификации. Также возможно проведение межлабораторных испытаний.

КРИТЕРИИ ЭФФЕКТИВНОСТИ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ АНАЛИТА И ПОДТВЕРЖДЕНИЯ

44. Безусловно, грубые погрешности (грубые ошибки во время пробоподготовки) являются главным источником ложной идентификации при использовании основанных на МС методов. По этой причине правоприменительная практика регулирующих органов в таких случаях как превышение МДУ или отсутствие МДУ для товара, требует подтверждения результата посредством повторной экстракции образца для анализа из исходной пробы и проведения повторного анализа, в идеале с использованием другой пробоподготовки и/или анализа.
45. При выборе методов идентификации специфичность является основным учитываемым фактором. Для обеспечения однозначной идентификации метод должен быть в достаточной степени специфичным. МС в комбинации с методом хроматографического выделения является очень мощным инструментом идентификации аналита в экстракте пробы. Эта методика дает информацию о структуре аналита, которую не может предоставить одна только хроматография. Инструменты ГХ-МС и ЖХ-МС (полное сканирование, режим селективного детектирования ионов, высокое разрешение, тандемная масс-спектрометрия, гибридные системы и другие современные методы) определяют многие измеряемые параметры, например, время удерживания, формы хроматографических пиков, активность ионов и относительное содержание ионов, точные массы и другие важные показатели, помогающие провести идентификацию аналита. В то же время возможны разработка и применение успешных методик с использованием отличных от МС-методов (например, ВЭЖХ с фотодиодной матрицей, ГХ с селективным детектированием ионов), в особенности, если подтверждение результатов анализа сделано с альтернативными колонками⁹.

А. Идентификация на основе МС

46. Общеизвестных критериев идентификации нет. В таблице 1 приведены примеры существующих критериев.
47. Существующие методы качественного и количественного анализов остатков пестицидов обычно включают хроматографию в комбинации с селективным ионным мониторингом (SIM) или тандемную масс-спектрометрию (МС). Приемлемым методом является также полноспектральная МС, использующая совпадения с библиотекой масс-спектров и/или относительные содержания главных ионов в полных спектрах. Последний случай может рассматриваться как отношения ионов в приведенных ниже критериях, использующих минимум 3 иона. В первом случае совпадающие факторы следует использовать для решения задач идентификации в сфере регулирования, и референтные спектры из библиотеки должны быть получены из полученных на том же оборудовании и в тех же условиях, что в анализе пробы, высокочистых эталонов, из которых вычтены фоновые сигналы. Необходимо соответствие перечисленным ниже критериям идентификации:
- Референтные значения времени удерживания аналита определяются из одновременно анализирующихся (в одной и той же партии) калибровочных стандартов высокой концентрации, соответствующих матрице, или же, если известно, что интерференции отсутствуют, можно использовать стандартизированные растворы на неводной основе.
 - Референтные значения отношения ионов должны устанавливаться таким же образом, какой описан в пункте 47а. Разные ионы, использованные для идентификации, должны быть совместно элюируемыми и иметь сходные формы пиков. Ион из калибровочного

⁸ *Harmonized IUPAC Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical Measurement*. Pure & Appl. Chem., 71,1999; 337–348. CAC/GL 37-2001

⁹ *Руководящие принципы надлежащей лабораторной практики, касающиеся определения остаточного содержания пестицидов* (CAC/GL 40-1993)

стандарта с более высокой средней интенсивностью должен использоваться в качестве знаменателя в ионном отношении, выраженном в процентах (из-за флуктуаций сигнала, эффектов матрицы и т.д. допустимы отклонения до 30% от ионных отношений).

- c) Отношения сигнал-шум для измеренных пиков должны быть >3 , и/или сигнал должен превышать уровень пороговой интенсивности по сравнению с сигналом подходящего калибровочного стандарта или контроля, охватывающего представляющий интерес уровень.
 - d) Выбор ионных переходов в целях идентификации должен быть обоснован химически и структурно (следует удостовериться, что выбранные ионы не имеют отношения к продукту распада, загрязнению или смешению с химическим соединением, отличным от аналита).
 - e) Все анализируемые пробы реагента и холостой матрицы должны быть свободны от переносов, контаминаций и/или интерференций, с откликом $>20\%$ LOQ. Для холостых проб матрицы допустимым может быть 30% LOQ.
 - f) Для МС-анализов предпочтителен мониторинг ионов с отношением масса/заряд (m/z) более 100.
48. Минимально допустимое время удерживания для аналита (аналитов) должно быть как минимум вдвое больше времени удерживания, соответствующего "мертвому" объему колонки. Время удерживания для аналита в экстракте должно соответствовать референтному значению (п. 47а) в пределах $\pm 0,2$ мин или $0,2\%$ относительного времени удерживания, как для газовой, так и для жидкостной хроматографии (предпочтительно, по возможности, в пределах $\pm 0,1$ мин).
49. Считается, что методы, основанные на масс-спектрометрии высокого разрешения, обеспечивают более высокую надежность благодаря точному измерению массы/заряда иона, которого нельзя добиться, используя методы масс-спектрометрии, основанные на разрешении в единицу массы (единичном разрешении). Разные типы и модели масс-спектрометрических детекторов обеспечивают разные уровни чувствительности, которая относится к подтверждению достоверности идентификации. Примеры критериев для идентификации, приведенные в Таблице 1, следует рассматривать только как руководство для идентификации, а не как абсолютные критерии доказательства присутствия или отсутствия химического соединения.

В. Подтверждение

50. Если первоначальный анализ не обеспечивает однозначной идентификации или не удовлетворяет требованиям к количественному анализу, требуется подтверждающий анализ. Он может включать повторный анализ экстракта или пробы. При превышении СХЛ/МДУ требуется подтверждающий анализ другой части пробы. Проведение подтверждающего анализа также рекомендуется для необычных комбинаций пестицид/матрица.
51. Если первоначальный подтверждающий метод не основывается на методе МС, подтверждающие методы должны включать идентификацию аналита на основе МС. Кроме того, подтверждающие методы должны использовать независимый подход, основанный на других механизмах химических реакций (таких как разделение в ГХ и ЖХ). В некоторых случаях целесообразным может быть подтверждение независимыми лабораториями. Примеры аналитических методов, отвечающих критериям подтверждающих аналитических методов, приводятся в Таблице 2.

Таблица 1. Критерии идентификации для различных методов МС

МС-детектор / характеристики	Типичные системы (примеры)	Сбор данных	Требования для идентификации	
			Минимальное число ионов	Прочие требования
Разрешение в единицу массы	квадрупольный масс-спектрометр, ионная ловушка, TOF	полное сканирование, ограниченный диапазон m/z, СИМ	3 иона	С/Ш $\geq 3^e$ Пики аналита в экстрагированных ионных хроматограммах должны полностью перекрываться. Отношение ионов $\pm 30\%$ (относительно) среднее калибровочных стандартов из той же последовательности ^f
МС/МС	тройной квадруполь, ионная ловушка, Q-trap, Q-TOF, Q-Orbitrap	мониторинг отдельной или нескольких реакций, массовое разрешение для выделения иона-предшественника, равное разрешению в единицу массы или выше	2 ион-продукта	
Определение точности измерения массы	МС высокого разрешения: TOF или Q-TOF	полное сканирование, ограниченный диапазон m/z, СИМ, фрагментация с селекцией иона-предшественника или без, или сочетание перечисленного	2 иона с точностью измерения массы ≤ 5 ppm ^{a, b, c}	
	Orbitrap или Q-Orbitrap FT-ICR-MS масс-спектрометр секторального типа	объединенная одностадийная МС и МС/МС с массовым разрешением для выделения иона-предшественника, равным разрешению в единицу массы или выше	<u>2 иона:</u> 1 молекулярный ион, (де)протонированная молекула или ион-аддукт с точностью измерения массы ≤ 5 ppm ^{a, c} <u>плюс</u> 1 ион-продукт МС/МС ^d	

a) Предпочтительно включая молекулярный ион, (де)протонированную молекулу или ион-аддукт.

b) Включая по меньшей мере один осколочный ион.

c) < 1 mDa для m/z < 200

d) ≤ 5 ppm

e) В случае отсутствия шумов сигнал должен присутствовать по меньшей мере в 5 последующих сканах.

f) Если точность измерения массы предшественника и его ион-продукта ≤ 5 ppm, допустимое отклонение для отношения ионов опционально.

Таблица 2. Примеры методов определения, подходящих для подтверждающего анализа субстанции

Метод определения	Критерий
ЖХ или ГХ и МС	при условии мониторинга достаточного числа осколочных ионов
ЖХ-ДМД	при условии характерного УФ-спектра
ЖХ с флуоресцентным детектором	в сочетании с другими методами
Двумерная ТСХ-спектрофотометрия	в сочетании с другими методами
ГХ с ЭЗД, АФД, ПФД	только в сочетании с двумя или более методами разделения
ЖХ с очисткой на иммуноафинной колонке	в сочетании с другими методами
ЖХ-УФ/Вид (при одной длине волны)	в сочетании с другими методами

ПРИЛОЖЕНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Аналит: химическое вещество, искомое или определяемое в образце. *Руководство по аналитической терминологии* (CAC/GL 72-2009).

Протектант аналита: соединения, которые сильно взаимодействуют, заполняя активные центры в газохроматографической системе, тем самым снижая взаимодействия аналита с этими активными центрами и обеспечивая снижение размываний границ пика или потерь и таким образом более высокий отклик аналита.

Условия применения метода: аналиты, матрицы и концентрации, в отношении которых удовлетворительно применяется метод анализа *Руководство по аналитической терминологии* (CAC/GL 72-2009).

Коэффициент вариации (CV): часто называется относительным стандартным отклонением (RSD). Показатель прецизионности в количественных исследованиях сопоставляет варибельность групп данных с различными средствами.

Подтверждение: совокупность двух или более анализов, согласующихся друг с другом, из которых как минимум один соответствует критериям идентификации.

Подтверждающий метод: метод, способный представить дополнительную информацию, согласующуюся с предыдущим результатом. В идеале, другая часть пробы анализируется с использованием метода, включающего химический механизм, отличный от того, что использовался в первом анализе, и один из методов соответствует критериям идентификации аналита с приемлемой степенью уверенности на представляющем интерес уровне.

Продукт распада: компонент остатка пестицида, встречающийся в продукте в результате абиотической трансформации пестицида (например, под воздействием тепла, света, влаги, pH и т.д.)

Ложноположительный: результат, неверно указывающий на присутствие аналита или на присутствие аналита в концентрации, превышающей установленную концентрацию (например, СХЛ/МДУ или определяемый уровень).

Ложноотрицательный: результат, неверно указывающий на отсутствие аналита или на присутствие аналита в концентрации, не превышающей установленную концентрацию (например, СХЛ/МДУ или определяемый уровень).

Обогащение: добавление аналитов в целях определения степени извлечения (также известно как "метод добавок").

Идентификация: процесс однозначного определения химической принадлежности всех или любого из компонентов определения остатка.

Активный остаток: остаток, присутствующий в продукте в результате целенаправленного применения пестицида, или потребления пестицида животным, или загрязнения окружающей среды в сельском хозяйстве, в отличие от остатков, присутствующих в результате обогащения проб в лаборатории.

Интерференция: внутренний или внешний отклик, не связанный с аналитом (например, шум), вследствие влияния электронных, химических или иных факторов, связанных с оборудованием, средой, методом или пробой.

Интерферент: химическое вещество или другой фактор, вызывающий интерференцию.

Внутренний стандарт (ВС): химическое вещество, добавленное в известном количестве к пробам и/или стандартам в химическом анализе, включая холостые пробы и калибровочные стандарты. Такая субстанция затем может использоваться для калибровки путем построения графика отношения сигнала аналита к сигналу внутреннего стандарта в виде функции концентрации. Это отношение используется для получения концентраций аналита. Внутренний стандарт должен давать сигнал, во многих отношениях схожий с сигналом аналита, но при этом достаточно отличаться для того, чтобы два сигнала были легко отличимы.

Предел обнаружения (LOD): минимальная концентрация или масса аналита, которая может быть обнаружена (но не определена количественно) в пробе. На практике это, как правило, концентрация аналита, при которой отношение сигнал/шум составляет 3.

Предел количественного определения (LOQ): наименьшая концентрация аналита, которая может быть определена количественно. LOQ обычно определяется как минимальная концентрация аналита в исследуемой пробе, которая может быть определена с удовлетворительной точностью (повторяемостью) и правильностью в заданных условиях испытания. Для целей настоящего документа

за предел количественного определения принята концентрация аналита, при которой среднее отношение сигнал/шум составляет 10. [см. также пункт 26]

Линейность: способность аналитического метода в рамках определенного интервала представить инструментальную реакцию или результаты пропорционально количеству аналита, которое должно быть выявлено в лабораторной пробе. *Руководство по аналитической терминологии* (CAC/GL 72-2009).

Наименьший предел калибровки (LCL): наименьшая концентрация (или масса), которую система определения успешно калибровала в аналитической серии.

Наименьший валидированный уровень (LVL): наименьший валидированный уровень с использованием метода добавок, отвечающий критериям эффективности метода.

Матрица: материал или компонент (например, пищевой продукт), отобранный для исследования остатков пестицидов.

Холостая матрица: образец или часть образца, не содержащая обнаруживаемой концентрации представляющего интерес аналита.

Эффект матрицы: влияние одного или более невыявленных компонентов пробы на измерение концентрации или массы аналита.

Соответствующие матрице стандарты: стандартные растворы, приготовленные с конечными экстрактами холостых матриц, сходных с пробой концентраций.

Метаболит: компонент остатка пестицида, встречающийся в составе продукта в результате биотической трансформации (метаболизма) пестицида в биологической системе (например, растение, животное).

Многоостаточный метод (МОМ): метод, позволяющий определять большое количество соединений, обычно относящихся к различным классам химических соединений.

Прецизионность: степень вариабельности результата измерения вокруг среднего значения.

Количественный метод: метод, позволяющий количественно определять концентрации аналита с правильностью и прецизионностью, соответствующими установленным критериям.

Степень извлечения: измеренное в процентах содержание аналита (аналитов) (согласно определению остатка), исходно добавленного в пробу соответствующей матрицы, которая не содержит аналита в обнаруживаемой концентрации либо не содержит аналита в известной обнаруживаемой концентрации. Эксперименты с извлечением обеспечивают информацию о прецизионности и правильности и соответственно о точности метода.

Относительное стандартное отклонение (RSD): стандартное отклонение, деленное на абсолютное значение среднего арифметического, выраженное в процентах. Относится к прецизионности метода (также известной как коэффициент вариации, CV).

Сходимость: прецизионность (обычно выражаемая в RSD) результатов, полученных при одной и той же методике измерения или методике испытания, на идентичном измеряемом материале, одним и тем же оператором, использующим одну и ту же аппаратуру, в одной и той же лаборатории за короткий промежуток времени. *Руководство по аналитической терминологии* (CAC/GL 72-2009).

Воспроизводимость: прецизионность (обычно выражаемая в RSD) результатов независимого измерения/испытания, полученных при одной и той же методике испытания/измерения в разных испытаниях или на разных измерительных устройствах разными операторами, использующими разное оборудование. *Руководство по аналитической терминологии* (CAC/GL 72-2009).

Определение остатка: совокупность химических соединений, подлежащих анализу, которая может включать исходное соединение, метаболиты, изомеры, продукты реакции и/или продукты распада. Как правило, определение остатка дается регулирующим органом.

Устойчивость: показатель способности аналитической процедуры не испытывать воздействие незначительных, но намеренных вариаций в параметрах метода; представляет собой указание на надежность аналитической процедуры при нормальном использовании. *Руководство по аналитической терминологии* (CAC/GL 72-2009).

Пробоподготовка: включает извлечение анализируемого образца из пробы, его очистку и другие этапы подготовки раствора пробы для анализа.

Скрининговый предел обнаружения (SDL): самый низкий уровень обогащения, который демонстрирует доверительную вероятность в 95%.

Скрининговый метод: метод, который удовлетворяет заранее заданным критериям обнаружения присутствия (или отсутствия) аналита или класса аналитов на минимальном уровне представляющей интерес концентрации или выше.

Специфичность: степень, в которой метод может определять тот или иной аналит (аналиты) в смеси (смесях) или матрице (матрицах) при наличии интерференций с другими компонентами со сходными характеристиками. *Руководство по аналитической терминологии (CAC/GL 72-2009).*

Чувствительность: коэффициент преобразования показателей измерительной системы и соответствующее изменение значения измеряемой величины. *Руководство по аналитической терминологии (CAC/GL 72-2009).*

SIM: селективный ионный мониторинг, или режим селективной регистрации по выбранным ионам. Методика детектирования в масс-спектрометрии.

Метод определения одного остатка: метод определения одного аналита или небольшой группы аналитов со сходными физико-химическими характеристиками.

Метод стандартной добавки: метод стандартной добавки представляет собой один из типов количественного анализа, иногда использующийся в аналитической химии, когда известное количество аналита добавляют непосредственно в аликвоты конечных экстрактов.

TOF: время пролета (time-of-flight) частицы от мишени до детектора. На измерении времени пролета основана методика идентификации элементарных частиц, использующаяся в масс-спектрометрии.

Правильность: степень соответствия среднего значения неограниченного числа повторно измеренных значений величины и эталонного значения величины. *Руководство по аналитической терминологии (CAC/GL 72-2009).*

Неопределенность измерений: параметр, связанный с результатом измерений, характеризующий дисперсию значений, которые могут быть обоснованно приписаны измеряемой величине.