

# CHUẨN HOÁ PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC ĐỊNH TÍNH KIỂM SOÁT TỒN DƯ KHÁNG SINH TRONG THỰC PHẨM CÓ NGUỒN GỐC ĐỘNG VẬT THEO QUI ĐỊNH SỐ 2002/657/EC

Analytical validation of screening methods for the control of antibiotic residues  
in food from animal origin according to the decision 2002/657/EC

Phạm Kim Đăng<sup>1</sup>, Marie-Louise Scippo<sup>2</sup>; Guy Degand<sup>2</sup>;  
Caroline Douny<sup>2</sup>; Guy Maghuin-Rogister<sup>2</sup>

## SUMMARY

To answer the increasing social request in results of analysis in certain fields such as the environment, the agro-alimentary, the pharmaceuticals and the medico-lega domain, it is necessary to be able to guarantee the liability and the traceability of the provided results. The accuracy and the agreement of the results of analyses coming from intra and inter-laboratories comparisons are depending not only of the quality of the laboratory and the qualification of staff, but also of the validation of the methods used. According to the scope of the method of analyses, various parameters have to be validated. To meet the performances criteria of analytic methods (in the field of residues and contaminants in food) described in the European Legislation, the CRL (Community Reference Laboratory) of Fougères (France) wrote guidelines and recommendations to validate screening methods. The objective of this review is to provide to the reader definitions, validation principles and the parameters of performance of analytical methods in general, and recommendations in the case of the validation of a screening method for the control of antibiotic residues in food of animal origin according to the European Commission Decision 2002/657/EC.

**Key words:** Analytical validation, screening method, antibiotic residue.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trước đòi hỏi ngày càng cao về chất lượng và độ an toàn của các sản phẩm có nguồn gốc từ động vật của con người, ngoài việc tăng cường quản lý các công đoạn sản xuất thì việc phân tích kiểm tra, kiểm soát các chất tồn dư có ảnh hưởng đến sức khoẻ cộng đồng là rất cần thiết. Trên thực tế, mặc dù cùng sử dụng một phương pháp, một qui trình nhưng kết quả phân tích của các phòng thí nghiệm, thậm chí trong cùng phòng thí nghiệm lại khác nhau (Jardy, 1997; Vial, 1998). Mục đích của quá trình phân tích nói

chung là tìm hàm lượng thực của chất cần phân tích, nhưng khó khăn lớn nhất là người phân tích thường không biết giá trị đúng của hàm lượng thực. Do đó kết quả phân tích nói chung và phân tích tồn dư nói riêng có chính xác hay không phụ thuộc rất nhiều yếu tố như: điều kiện trang thiết bị phòng thí nghiệm, con người, và đặc biệt là phương pháp có được chuẩn hoá hay không. Để đảm bảo một cách chắc chắn và tin cậy các kết quả phân tích các chất tồn dư nói chung và kháng sinh nói riêng trong các sản phẩm động vật, Cộng đồng Châu Âu đã ra quyết định số 2002/657/EC theo đó đặt ra các tiêu chuẩn của các phương

<sup>1</sup> Khoa Chăn nuôi- Thủy sản, Trường ĐH Nông nghiệp I.

<sup>2</sup> Phòng thí nghiệm phân tích thực phẩm có nguồn gốc động vật, Bộ môn khoa học thực phẩm, Khoa Thú y, Đại học Liège, Vương quốc Bỉ

pháp phân tích tồn dư trong thực phẩm (EEC, 2002). Một phương pháp muốn đưa vào phân tích phải được chuẩn hoá và đạt yêu cầu tối thiểu do quyết định này đề ra. Trong khuôn khổ bài viết này, chúng tôi muốn giới thiệu một số khái niệm, nguyên tắc chuẩn hoá liên quan đến phương pháp sàng lọc (“Screening Method”) và các khuyến cáo khi chuẩn hoá phương pháp định tính.

## 2. CƠ SỞ LÝ THUYẾT VÀ CÁC KHÁI NIỆM LIÊN QUAN

*Chuẩn hoá* (Validation) là sự khẳng định bằng việc kiểm tra và cung cấp những bằng chứng một cách thuyết phục về các yêu cầu đặc biệt thoả mãn một sự mong đợi (ISO/IEC 17025, 2005). Hay nói cách khác phải chứng minh sự tin cậy kết quả phân tích theo một yêu cầu nào đó tùy thuộc lĩnh vực, chất cần phân tích. Để thuyết phục cần phải dựa vào các đại lượng thống kê và các loại sai số trong hoá phân tích.

### 2.1. Các đại lượng thống kê liên quan dùng trong chuẩn hoá phương pháp

- *Giá trị thực ( $\mu$ )*: trong thực tế giá trị thực thường không biết nên thường dùng giá trị trung bình của  $n$  phân tích cùng một mẫu.

$$\left( \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \right) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i$$

Thực tế giá trị thực  $\mu = \bar{x}$  là rất hiếm. Khi chuẩn hoá phương pháp cố gắng tối ưu để giá trị  $\mu$  càng gần  $\bar{x}$  càng tốt.

- *Số phân tán*: biểu diễn độ lệch của kết quả phân tích. Trong hoá phân tích thường dùng giá trị phương sai mẫu ( $s^2$ ) hay độ lệch chuẩn mẫu ( $s$ ) và hệ số biến thiên (CV%).

$$S^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$\text{khi } n \rightarrow \infty \text{ thì } \bar{x} \rightarrow \mu \quad \text{CV\%} = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Trong hoá phân tích giá trị CV <10% (kết quả ít phân tán), 10% < CV < 20% (có thì sử

dụng được, khi CV > 20% (kết quả quá phân tán không nên sử dụng).

- *Độ ngờ*: biểu diễn sự khác biệt của giá trị đo trực tiếp ( $x$ ) và giá trị thực ( $\mu$ ) gồm:

Độ ngờ tuyệt đối =  $|x - \mu|$ . Giá trị lớn nhất của độ ngờ thường bằng 1/4 hay 1/2 độ chia bé nhất trên dụng cụ đo, nếu không xác định thì độ ngờ bằng 1 đơn vị đối với chữ số cuối cùng, chẳng hạn:

12,20 ± 0,06 g (có xác định độ ngờ tuyệt đối)

12,2 ± 0,1 g (không xác định độ ngờ tuyệt đối)

Độ ngờ tương đối là tỷ số giữa độ ngờ tuyệt đối và giá trị đo được, thường biểu thị bằng % hoặc ‰.

- *Sai số*: biểu thị sự khác biệt giữa giá trị thực ( $\mu$ ) và ( $\bar{x}$ ) được xác định trên cơ sở tính toán từ kết quả một chuỗi kết quả phân tích. Bao gồm:

Sai số hệ thống là sai số do nguyên nhân có thể biết được như dụng cụ, hoá chất không chuẩn, chất lượng kỹ thuật viên, hoặc do phương pháp có khiếm khuyết... ảnh hưởng lên độ đúng của phân tích, thường ảnh hưởng cùng chiều. Có thể xác định được nên có thể giảm hoặc loại trừ hay hiệu chỉnh khi xác định được nguyên nhân.

Sai số ngẫu nhiên là sai số không theo qui luật, không xác định, ảnh hưởng đến độ lặp lại của phân tích. Chỉ có thể giảm sai số ngẫu nhiên bằng cách tăng số lần phân tích lặp lại trong hoá phân tích khi  $n = 20-30$  thì sai số ngẫu nhiên có thể chấp nhận được.

- *Độ đúng, độ lặp lại, độ chính xác của phương pháp*

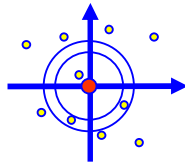
*Độ lặp lại*: biểu diễn sự khác biệt giữa các giá trị xác định  $x_i$  qua nhiều lần phân tích

*Độ đúng*: biểu diễn sự khác biệt giữa các giá trị thực  $\mu$  và giá trị xác định được ( $\bar{x}$ )

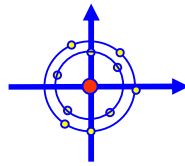
*Độ chính xác*: biểu thị mức độ đúng và mức độ lặp lại

Minh hoạ dưới đây coi gốc toạ độ là giá trị thực, các điểm xung quanh là các kết quả

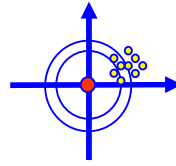
các lần phân tích độc lập cùng một phương pháp.



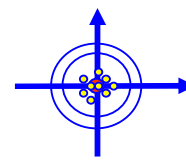
Không đúng,  
lặp lại không tốt



Đúng,  
lặp lại không tốt



Không đúng,  
lặp lại tốt



Đúng,  
lặp lại tốt

## 2.2. Các khái niệm chung

- *Chuẩn hoá* (Validation) là sự khẳng định bằng việc kiểm tra và cung cấp những bằng chứng một cách thuyết phục về các yêu cầu đặc biệt thoả mãn một sự mong đợi (ISO/IEC 17025, 2005).

- *Sự trả lời của phân tích* (Analytical response) là hiện tượng được quan sát sau khi kết thúc qui trình phân tích có mối liên quan với các chất cần phân tích có trong sản phẩm được kiểm tra.

- *Phương pháp sàng lọc* (Screening method) là các phương pháp được sử dụng để phát hiện sự hiện diện của một hoặc một nhóm chất ở một nồng độ quan tâm hay để phân biệt giữa các mẫu đạt và mẫu không đạt yêu cầu vệ sinh. Các phương pháp này thường có khả năng phân tích một lượng mẫu lớn và được sử dụng để sàng lọc một lượng lớn mẫu có tiềm ẩn kết không đạt tiêu chuẩn. Các phương pháp này thường được thiết kế để tránh tối đa kết quả âm tính giả.

- *Sự xác định mẫu trắng* (Sample blank determination) là qui trình phân tích hoàn thiện để áp dụng cho việc thử một phân mẫu được lấy từ mẫu không có chất tồn dư.

- *Phương pháp định tính* (Qualitative method) là phương pháp để nhận dạng một chất dựa vào tính chất lý, hoá hoặc sinh học của chúng.

*Sự trả lời của phương pháp phân tích định tính* (Qualitative analytical response) là hiện tượng quan sát được phân loại theo kiểu cấp

đôi (có/không, +/-, 1/0) hoặc phân loại theo mức độ trả lời của phân tích (-, ±, +; âm tính, nghi ngờ, dương tính). Chẳng hạn thông qua sự xuất hiện vết, sự đổi màu trong ống hay que thử...

*Các dạng phương pháp phân tích định tính:* sắc ký phẳng, phát hiện sự phát triển vi khuẩn (Delvotest®, Premi® Test, Plate Test), hoá miễn dịch (SNAP® test, β-star® test)

- *Phương pháp định lượng* (Quantitative method) là phương pháp để xác định phần nhỏ khối lượng của một chất (mass fraction) và vì thế có thể biểu thị dưới dạng giá trị số của một đơn vị tương ứng.

*Trả lời của phân tích định lượng hoặc bán định lượng* (Quantitative or semi-quantitative analytical response) là hiện tượng được đo bằng tham số liên tục. Chẳng hạn: sự ức chế phát triển của vi khuẩn trong phương pháp khuếch tán thạch (đường kính vòng vô khuẩn), mật độ quang, độ hấp phụ, sự đếm/giây, cộng hưởng từ...

*Các dạng phương pháp:* Plate Test, ELISA, RIA, Biosensor, Receptor Test (Charm II® test). Sự trả lời của phương pháp định lượng hoặc bán định lượng có thể trở thành phương pháp định tính khi sử dụng giá trị ngưỡng giới hạn (cut-off) để phân loại các kết quả dương tính hoặc âm tính

- *Mức hàm lượng quan tâm* (Level of interest) là nồng độ của chất cần phân tích trong một mẫu mà qua giá trị đó xác định mẫu có đạt yêu cầu theo qui định của luật hay không.

### 2.3. Khái niệm về các tham số đánh giá hiệu suất phương pháp

- *Khả năng phát hiện* ( $CC_a$ ) (Detection capability) là lượng chất cần phân tích trong mẫu nhỏ nhất mà phương pháp có thể phát hiện, nhận dạng và/hoặc định lượng được với một xác suất sai số  $\beta$ . Trong trường hợp các chất cấm sử dụng hoàn toàn (không có mức giới hạn tối đa cho phép) thì khả năng phát hiện là nồng độ chất cần phân tích bé nhất mà tại đó một phương pháp có thể phát hiện mẫu bị nhiễm thật sự với độ tin cậy thống kê là  $1 - \beta$ . Trong trường hợp các chất có mức giới hạn tối đa thì khả năng phát hiện là nồng độ chất cần phân tích mà phương pháp có thể phát hiện là giá trị nồng độ giới hạn cho phép ( $LMR = \text{Limit maximum residue}$ ) của chất đó với độ tin cậy thống kê là  $1 - \beta$  (EEC, 2002).

- *Độ đặc hiệu* (Specificity) là khả năng phân biệt của phương pháp giữa chất cần phân tích được đo và các chất khác. Đặc điểm này là một đặc trưng chủ yếu của kỹ thuật phân tích nhưng độ đặc hiệu này có thể thay đổi tùy theo nhóm chất hay sản phẩm cần phân tích.

- *Tính nhạy cảm* (Ruggedness) của một phân tích thay đổi tùy theo điều kiện thực nghiệm có thể được đo tác động của nguyên liệu mẫu, hoá chất, người phân tích, môi trường, điều kiện lưu giữ hoặc điều kiện chuẩn bị mẫu, phương pháp xử lý mẫu hoặc khi có một sự thay đổi nhỏ nào đó. Tất cả các điều kiện thực nghiệm trong thực tế là có giao động (như tính bền vững của hoá chất, thành phần cấu tạo của mẫu, pH, nhiệt độ) bất cứ biến đổi nào tác động đến kết quả phân tích đều phải được chỉ ra.

- *Khả năng áp dụng* (Applicability) có thể là một phần của nghiên cứu tính nhạy cảm của phương pháp, vì trong trường hợp này những thay đổi nhỏ liên quan đến sản phẩm cần phân tích. Chuẩn hoá ban đầu thường được thực hiện cho một cặp sản phẩm và một hoặc các chất cần phân tích. Sau đó khảo sát khả năng áp dụng của cùng một phương pháp để phát hiện cùng một hoặc nhiều chất phân tích trên trong các sản phẩm khác nhau.

- *Độ chính xác* (Precision) là tính chặt chẽ, sự thống nhất giữa các kết quả thu được từ các phân tích độc lập dưới điều kiện qui định trước. Phép đo tính chính xác thường

được thể hiện dưới dạng không chính xác và ước tính độ lệch chuẩn của kết quả. Tính chính xác kém khi độ lệch chuẩn lớn (ISO/IEC 17025, 2005).

- *Khả năng lặp lại* (Repeatability) là sự chính xác trong các điều kiện lặp lại.

*Điều kiện lặp lại* là những điều kiện mà kết quả thu được hoàn toàn độc lập từ cùng một phương pháp, cùng một qui trình phân tích hoàn toàn giống nhau trong cùng một phòng thí nghiệm bởi cùng một kỹ thuật viên và sử dụng cùng trang thiết bị.

- *Khả năng tái sinh* (Reproducibility) là tính chính xác trong các điều kiện tái sinh.

*Điều kiện tái sinh* là những điều kiện mà ở đó kết quả thu được khi phân tích bằng cùng một phương pháp, cùng một qui trình hoàn toàn giống hệt nhau nhưng trong các phòng thí nghiệm với các kỹ thuật viên và sử dụng các trang thiết bị khác nhau.

Khả năng tái sinh trong một phòng thí nghiệm (Within-laboratory reproducibility) là sự chính xác thu được trong cùng một phòng thí nghiệm dưới những điều kiện xác định trước (phương pháp, nguyên vật liệu, kỹ thuật viên, môi trường) trong một khoảng thời gian dài cách biệt khác nhau.

## 3. CÁC NGUYÊN TẮC CHUẨN HOÁ

### 3.1. Các mục đích của phương pháp sàng lọc

Trước khi chuẩn hoá phương pháp sàng lọc, cần xác định rõ phạm vi áp dụng của phương pháp. Phát hiện 1 chất hay một nhóm chất, phạm vi nồng độ và danh sách các sản phẩm phải phát hiện.

Qui trình chuẩn hoá của một phương pháp được bắt đầu bằng một bước chuẩn hoá ban đầu, sau đó thực hiện liên tục các pha để cải thiện sự ảnh hưởng của phương pháp tới các bước chuẩn hoá mới để mở rộng phạm vi của phương pháp. Qui trình này được phối hợp một cách liên tục trong điều kiện đảm bảo chất lượng và hệ thống kiểm soát chất lượng để nâng cao hiểu biết về hiệu suất của phương pháp cũng như những tác động qua lại với sự quản lý phòng thí nghiệm để biểu thị sự tin cậy trong các công đoạn phân tích theo ISO 17025 (ISO/IEC 17025, 2005).

Theo nguyên lý của phương pháp sàng lọc, phạm vi của phương pháp cần được xác định một cách chính xác. Chẳng hạn:

- Sàng lọc phát hiện nitrofurantoin trong mô các loài động vật theo giá trị MRPL (khả năng phát hiện tối thiểu của phương pháp) bằng phương pháp ELISA

- Sàng lọc phát hiện một số  $\beta$ -lactam (chỉ rõ các hợp chất phát hiện) trong mô các loài động vật theo giá trị MRL (giới hạn tồn dư tối đa) bởi Test Receptor

- Sàng lọc phát hiện tồn dư kháng sinh (đường kính vòng vô khuẩn) trong mô các loài động vật.

Cách bố trí thí nghiệm và phân tích thống kê sẽ khác nhau tùy thuộc vào yêu cầu và nguyên lý của các phương pháp định tính hay định lượng.

Một số tham số về hiệu suất của phương pháp có thể được xác định theo cách giống nhau. Vì thế, để giảm thiểu khối lượng công việc và kinh phí mà vẫn đảm bảo tính chính xác thì sự hiểu biết để phối hợp được nhiều thí nghiệm nhất có thể là rất quan trọng (chẳng hạn: kết hợp khảo sát khả năng lặp lại và khả năng tái sinh trong một phòng thí nghiệm với việc khảo sát tính đặc hiệu, sự phân tích các mẫu trắng để xác định khả năng phát hiện và tính đặc hiệu của phương pháp).

Các tham số hiệu suất phương pháp phải được kiểm tra trong quá trình chuẩn hoá một phương pháp sàng lọc:

- Khả năng phát hiện (Detection capability)

- Tính chọn lọc/Tính đặc hiệu (Selectivity/Specificity)

- Độ chính xác (Precision) - đối với phương pháp bán định lượng và định lượng

- Khả năng áp dụng/tính nhạy cảm/tính ổn định (Applicability/Ruggedness/Stability)

### 3.2. Xác định các tham số hiệu suất phương pháp sàng lọc định tính

#### 3.2.1. Khả năng phát hiện

Theo quyết định 2002/657/EC, khả năng phát hiện có thể được nghiên cứu bằng các

mẫu trắng đã được thêm chất chuẩn đúng bằng giá trị giới hạn quyết định (MRPL- giới hạn hiệu suất tối thiểu của phương pháp đối với các chất cấm hoàn toàn, MRL- Giới hạn tồn dư tối đa đối với các chất cho phép sử dụng nhưng có giới hạn). Trong trường hợp này, tại mức nồng độ đó kết quả phân tích thu được số mẫu “false compliant - đạt yêu cầu sai” tối đa là 5% hay  $\leq 5\%$  mẫu được cho là đạt yêu cầu sai (âm tính giả). Hay nói cách khác tối đa 1 mẫu “false compliant” trong 20 mẫu thêm chất chuẩn được phân tích đó. Vì thế, để đảm bảo một cơ sở chắc chắn cho sự xác định này, ít nhất mỗi mức nồng độ phải thực hiện 20 phân tích.

Sự đáp ứng đường chuẩn của phương pháp sàng lọc, cũng có thể được khảo sát bằng cách phân tích mẫu ở nhiều mức nồng độ khác nhau.

- Test đặc hiệu hay test phổ hẹp (Targeted test)

Nếu test đặc hiệu với một hợp chất (như ELISA kits), thì công việc được mô tả trên là dễ dàng áp dụng. Phải tiến hành trên ít nhất 20 khảo sát cho một phân tử, tại ít nhất một mức nồng độ.

Nếu test để phát hiện một nhóm hợp chất (như receptor test), được khuyến cáo xác định khả năng phát hiện chỉ 1 phân tử đại diện cho nhóm (ví dụ như hợp chất được dùng để sản xuất kháng thể). Sau đó xác định giá trị phản ứng chéo (cross-reactivities) giữa hợp chất đó với hợp chất khác của cùng nhóm sẽ cho phép để xác định giá trị khả năng phát hiện của các hợp chất khác.

- Test có phạm vi rộng (Wide range test)

Vấn đề đặt ra đối với các thử nghiệm có phạm vi phát hiện rộng là khó giải quyết hơn. Để xác định được khả năng phát hiện đối cho một danh sách nhiều hợp chất sẽ phải tốn nhiều thời gian, công việc và kinh phí hơn (ví dụ hơn 50 phân tử khác nhau). Hơn nữa, đối với các mẫu dạng cứng như cơ và thận sẽ gặp phải vấn đề với phương pháp vi sinh vật, vì phương pháp này sử dụng một mẫu mô hay cơ nguyên vẹn (không nghiền nhỏ) vì thế không thể thêm chất kháng khuẩn chuẩn vào.

Một thoả thuận có thể chấp nhận được đưa ra là sử dụng “mô hình mô” (“simulated

tissue”). Dùng phần mô đã được băm nhỏ cho chất kháng khuẩn chuẩn vào, rồi đông lạnh. Sau đó lấy một ít mẫu thịt đặt lên đĩa giấy trên thạch của đĩa petri. Nhưng trước khi sử dụng khuyến cáo này cần phải thử và so sánh với kết quả thu được khi thử với mẫu mô nguyên vẹn bị nhiễm tự nhiên. Và lại, cách này có vẻ như không áp dụng được với mẫu thận vì thận khi đông lạnh sẽ có nguy cơ cho nhiều kết quả dương tính giả.

Bởi vậy, vấn đề rất quan trọng đối với các phương pháp này là giảm số phân tử được chuẩn hoá. Đối với phép thử phạm vi rộng, khuyến cáo khi xác định khả năng phát hiện nên thực hiện chuẩn hoá bằng các hợp chất đại diện của nhóm ít nhất nếu có thể.

### 3.2.2. Tính chọn lọc/Tính đặc hiệu (Specificity/Selectivity)

Khuyến cáo nghiên cứu ít nhất trên 20 mẫu trắng khác nhau, 20 mẫu dưới mức nồng độ ngưỡng giới hạn (cut off) và 20 mẫu dương tính (hoặc 20 mẫu gần giá trị tồn dư tối đa). Sự phân tích có thể được thực hiện trong cùng ngày hoặc khác ngày bởi cùng một kỹ thuật viên hoặc các kỹ thuật viên khác nhau để đưa vào mô hình thiết kế bố trí một nghiên cứu.

Khả năng áp dụng của phương pháp có thể được kiểm tra trong công đoạn phân tích 20 mẫu trắng và 20 mẫu dương tính của các loài khác nhau (lợn, bò, cừu).

Bảng và các công thức dưới đây cho phép xác định độ chính xác của phương pháp sàng lọc định tính.

Kết quả phân tích	Dương tính thật True Positive (N <sup>+</sup> )	Âm tính thật True Negative (N <sup>-</sup> )
Dương tính (Positive)	Dương tính theo thoả thuận Positive agreement (PA)	Dương tính giả False Positive (FP)
Âm tính (Negative)	Âm tính giả False Negative (FN)	Âm tính theo thoả thuận Negative Agreement (NA)

Trong trường hợp này, độ chính xác của phương pháp được xác định bằng sự thống nhất giữa bản chất thực của mẫu (dương tính hay âm tính thật) và kết quả dương hay âm tính thu được khi phân tích bằng phương pháp chuẩn hoá.

Đối với phương pháp vi sinh vật phải phát hiện được các kháng sinh tại mức nồng độ bằng giới hạn nồng độ tối đa cho phép (MRL) hay một dương tính thật được xác định khi mẫu chứa một lượng kháng sinh ít nhất bằng MRL.

$$\text{Độ chính xác (accuracy)} = \frac{PA + NA}{N} \times 100\% \text{ Trong đó } N = N^+ + N^-$$

$$\text{Độ đặc hiệu (specificity)} = \frac{NA}{N^-} \times 100\%$$

$$\text{Độ nhạy (sensitivity)} = \frac{PA}{N^+} \times 100\%$$

Tương tự, việc phân tích các số liệu từ các nghiên cứu kết hợp cũng có thể được áp dụng (Poster D. McClure, 1990). Mục tiêu là để đánh giá độ mạnh của một phương pháp dưới các hoàn cảnh khác nhau. Công việc phân tích này cũng có thể được thực hiện trong thời gian chuẩn hoá tại một phòng thí nghiệm. Bốn dấu hiệu phản ánh độ mạnh của phương pháp phải được xác định: độ nhạy, độ đặc hiệu, số dương tính giả và âm tính giả.

### 3.2.3. Khả năng áp dụng (Applicability)

Chuẩn hoá ban đầu phải được thực hiện với sản phẩm được chú trọng nhiều nhất trong chương trình kiểm tra tồn dư Quốc Gia. Các sản phẩm khác muốn áp dụng được phải phân tích ít nhất 10 mẫu trắng khác nhau được bổ sung một lượng chất chuẩn cho mỗi sản phẩm mới.

Có hay không ảnh hưởng của các sản phẩm đến kết quả phân tích cũng phải được nghiên cứu. Nếu có những thay đổi nhỏ phải đưa vào phương pháp và phải được thông báo

trong qui trình phân tích. Khuyến cáo là ít nhất phải xác định khả năng phát hiện của phương pháp cho sản phẩm mới này.

Theo quyết định 2002/657/EC khuyến cáo phân tích ít nhất 20 mẫu trắng được bổ sung chất chuẩn để chuẩn hoá ban đầu. Kết quả các phân tích này mang lại độ mạnh thống kê là 0,66 để có 1 kết quả âm tính tại giá trị khả năng phát hiện với khoảng tin cậy là  $\pm 10\%$  đối với sản phẩm chuẩn hoá đầu tiên với một xác suất khoảng 95%. Nếu khả năng phát hiện của phương pháp đối với sản phẩm mới cao hơn thì xác suất bé hơn 95%.

Nếu có một kết quả âm tính thì phải tiếp tục tiến hành phân tích 10 mẫu và khi tất cả 10 phân tích đó cùng cho kết quả dương tính thì có thể coi như phương pháp có thể áp dụng với sản phẩm mới này.

Trong trường hợp thu được 1 kết quả âm tính mới, khả năng phát hiện của phương pháp đối với sản phẩm mới là cao hơn. Khả năng phát hiện của phương pháp đối với một sản phẩm mới sẽ được chọn và được chuẩn hoá lại từ đầu.

#### IV. TỔNG HỢP CÁC KHUYẾN CÁO CHUẨN HOÁ PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC ĐỊNH TÍNH

Để đáp ứng các yêu cầu tối thiểu theo qui định của quyết định 2002/657/EC khi chuẩn hoá một phương pháp cần thực hiện tối thiểu các phân tích sau:

- Mỗi một sản phẩm phải phân tích ít nhất 20 mẫu trắng, 20 mẫu bổ sung chất chuẩn hoặc mẫu nhiễm tự nhiên tại cùng một mức nồng độ trong cùng một điều kiện phòng thí nghiệm.

- Để xác định khả năng áp dụng cho các sản phẩm khác nhau, cần phân tích tối thiểu 10

mẫu trắng và 10 mẫu bổ sung chất chuẩn hoặc mẫu nhiễm tự nhiên cùng một mức nồng độ.

- Tính nhạy cảm của phương pháp có thể được đánh giá thông qua việc phân tích 10 mẫu trắng và 10 mẫu bổ sung chất chuẩn hoặc mẫu nhiễm tự nhiên chứa cùng một mức nồng độ của một phân tử đại diện bằng cách chủ động thay đổi một chút quá trình phân tích như công đoạn chuẩn bị mẫu chẳng hạn.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

EEC, 2002, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221, P. 8-36.

ISO/CEI 17025: 2005 Mai 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

Foster D. McClure (1990) Design and analysis of qualitative collaborative studies: Minimum collaborative program. *J.Assoc. off. Anal. Chem.* Vol. 73 No. 6.

Gaudin V., Maris P., Fuselier R., Ribouchon JL., Cadieu N., Rault A. (2004). Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk, *Food Add. & Contaminants*, 21, 5, 422-433.

Jardy, A.; Vial, J.; Ménier I. *Analysis* 1997, 25, 106-111.

Vial, J.; Ménier, I; Jardy, A.; Anger, P.; Brun, A.; Burbaud, L. (1998). *J. Chromatogr. B*, 708, 131-143.

