

31993D0256

L 118/64

ÚŘEDNÍ VĚSTNÍK EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ

14.5.1993

ROZHODNUTÍ KOMISE

ze dne 14. dubna 1993,

kterým se stanoví metody zjišťování reziduí látek s hormonálním účinkem a látek s tyreostatickým účinkem

(93/256/EHS)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

vzhledem k tomu, že přijaté analytické postupy musí být dostatečně citlivé k zjištění přítomnosti reziduí látek, které mají hormonální nebo tyreostatický účinek;

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského hospodářského společenství,

vzhledem k tomu, že odběr vzorků představuje podstatnou součást analytické metody; že je tedy vhodné stanovit pravidla týkající se odběru vzorků;

s ohledem na směrnici Rady 85/358/EHS ze dne 16. července 1985, kterou se doplňuje směrnice 81/602/EHS o zákazu některých látek s hormonálním účinkem a látek s tyreostatickým účinkem⁽¹⁾, naposledy pozměněnou směrnicí 88/146/EHS⁽²⁾, a zejména na čl. 5 odst. 2 uvedené směrnice,

vzhledem k tomu, že pro účely tohoto rozhodnutí je třeba brát v úvahu kritéria uvedená v bodu 1 přílohy směrnice Rady 85/591/EHS ze dne 20. prosince 1985 o zavedení metod Společenství pro odběr vzorků a analýzu pro sledování potravin určených k lidské spotřebě⁽³⁾;

vzhledem k tomu, že z důvodu větší jasnosti a zohlednění vývoje vědeckých a technických poznatků je třeba zrušit rozhodnutí Komise 87/410/EHS⁽⁴⁾;

vzhledem k tomu, že vyšetření na rezidua musí být – podle čl. 8 odst. 1 směrnice Rady 64/433/EHS ze dne 26. června 1964 o hygienických otázkách obchodu s čerstvým masem uvnitř Společenství⁽⁵⁾, naposledy pozměněné směrnicí 92/5/EHS⁽⁶⁾, a podle čl. 11 odst. 4 druhého pododstavce směrnice Rady 85/397/EHS ze dne 5. srpna 1985 o hygienických a veterinárních otázkách obchodu s tepelně ošetřeným mlékem uvnitř Společenství⁽⁷⁾, naposledy pozměněné směrnicí 89/662/EHS⁽⁸⁾ – provedena podle schválených a vědecky uznaných metod, zejména podle metod, které jsou uvedeny ve směrnicích Společenství nebo v jiných mezinárodních normách;

vzhledem k tomu, že opatření tohoto rozhodnutím jsou v souladu se stanoviskem Stálého veterinárního výboru,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

vzhledem k tomu, že stanovení metod analýzy vzorků zahrnuje definování analytických postupů, které se mají používat, zásad, které se mají dodržovat při odběru vzorků, a kritérií, která se týkají provádění analýz;

Článek 1

Postupy rutinní analýzy vzorků schválené pro zjišťování reziduí látek s hormonálním účinkem a látek s tyreostatickým účinkem jsou tyto:

⁽¹⁾ Úř. věst. L 191, 23.7.1985, s. 46.

⁽²⁾ Úř. věst. L 70, 16.3.1988, s. 16.

⁽³⁾ Úř. věst. L 121, 29.7.1964, s. 2012/64.

⁽⁴⁾ Úř. věst. L 57, 2.3.1992, s. 1.

⁽⁵⁾ Úř. věst. L 226, 24.8.1985, s. 13.

⁽⁶⁾ Úř. věst. L 395, 30.12.1989, s. 13.

⁽⁷⁾ Úř. věst. L 372, 31.12.1985, s. 50.

⁽⁸⁾ Úř. věst. L 223, 11.8.1987, s. 18.

- imunologická analýza,
- tenkovrstevná chromatografie,
- kapalinová chromatografie,
- plynová chromatografie,
- hmotnostní spektrometrie,
- spektrometrie,

jakož i jakékoliv jiné metody, které vyhovují kritériím srovnatelným s kritérii stanovenými v příloze pro předmětné metody.

Článek 2

Odběr vzorků se musí provádět podle těchto pravidel:

1. vzorek musí být reprezentativní a dostatečně veliký pro příslušnou analýzu a pro možné opakování této analýzy i pro provedení všech konfirmačních analýz;
2. vzorky musí být označeny takovým způsobem, aby byla kdykoliv možná jejich identifikace;
3. metody odběru, balení, konzervace, přepravy a skladování vzorků musí zajišťovat jejich neporušenost a nesmí nepříznivě ovlivňovat výsledky vyšetření. Musí se zabránit neoprávněnému přístupu ke vzorkům.

Článek 3

Kritéria, která se vztahují na metody rutinních vyšetření na rezidua látek s hormonálním účinkem a látek s tyreostatickým účinkem, jsou uvedena v příloze.

Článek 4

Toto rozhodnutí se přezkoumá do 1. ledna 1996 se zřetelem na vývoj vědeckých a technických poznatků.

Článek 5

Rozhodnutí 87/410/EHS se zrušuje.

Článek 6

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu dne 14. dubna 1993.

Za Komisi
René STEICHEN
člen Komise

PŘÍLOHA

1. DEFINICE A OBECNÉ POŽADAVKY

1.1 Definice

1.1.1 Rutinní analytické metody

Rutinní analytické metody jsou analytické metody používané členskými státy za účelem zavedení národních plánů kontroly reziduí u jatečných zvířat a v produktech získaných z těchto zvířat, v souladu s ustanoveními směrnice Rady 86/469/EHS (¹). Rutinní analytické metody musí být schváleny referenčními laboratořemi a musí odpovídat kritériím stanoveným v této příloze. Mohou být používány za účelem vyhledávání a/nebo konfirmace:

- metody používané k vyhledávání (screeningové metody) jsou metody zaměřené na zjišťování přítomnosti analytu nebo třídy analytů v předpokládané koncentraci. Představují velkou kapacitu vyšetření vzorků a používají se při třídění velkého počtu vzorků potenciálně pozitivních. Jsou zaměřeny na vyloučení falešně negativních výsledků,
- metody používané ke konfirmaci (konfirmační metody) jsou metody, které musí umožnit jednoznačnou identifikaci analytů v předpokládané koncentraci. Tyto metody jsou zaměřeny na vyloučení falešně pozitivních výsledků a mají pouze nízkou tolerovatelnou pravděpodobnost falešně negativních výsledků.

1.1.2 Analyt

Analyt je složkou analyzovaného vzorku, která má být zjištěna, identifikována a/nebo má být stanoveno její množství. Výraz „analyt“ zahrnuje i případné rozkladné produkty, které vznikají z analytu během analýzy.

Množství analytu může být vyjádřeno jako:

- množství, vyjádřené hmotnostním množstvím (například μg , ng),
nebo
- obsah, vyjádřený jako hmotnostní zlomek (například $\mu\text{g kg}^{-1}$, ng kg^{-1}), hmotnostní koncentrace (například $\mu\text{g l}^{-1}$) nebo koncentrace (například mol l^{-1}).

1.1.3 Vzorky

1.1.3.1 Laboratorní vzorek

Vzorek připravený k odeslání do laboratoře a určený ke zkoušení nebo analýze.

1.1.3.2 Testovací vzorek

Vzorek připravený z laboratorního vzorku, ze kterého má být odebrána část k analýze.

1.1.3.3 Část vzorku určená k analýze

Množství materiálu odebraného z testovacího vzorku (nebo z laboratorního vzorku, je-li zároveň testovacím vzorkem), které je vlastním předmětem analýzy nebo zkoušení.

1.1.4 Analytický standard

Je přesně stanovená substance se známým obsahem analytu, nejvyššího možného stupně čistoty, která je určena k použití při analýze jako referenční látka.

1.1.5 Referenční materiál

Materiál, jehož jedna nebo více charakteristických vlastností byly stanoveny schválenou metodou a který tedy může být používán ke kalibrování přístroje nebo k ověření metody měření.

(¹) Úř. věst. L 275, 26.9.1986, s. 36.

1.1.6 *Slepý pokus*1.1.6.1 *Analýza slepého vzorku*

Jde o úplný analytický postup aplikovaný na analýzu části vzorku, která neobsahuje analyt.

1.1.6.2 *Slepá zkouška reagentie*

Jde o úplný analytický postup aplikovaný bez vzorku určeného k analýze nebo při použití stejného množství vhodného rozpouštědla, místo navážky vzorku určeného k analýze.

1.1.7 *Specifičnost*

Specifičnost je schopnost metody odlišit analyt od jiných látek. Tato charakteristika je v podstatě zásadní charakteristikou použité zkoušky, ale může kolísat podle druhu sloučeniny nebo matrice.

Informace, týkající se specifičnosti, musí přinejmenším brát v úvahu všechny látky (např. shodné látky, obdobné látky, produkty metabolismu příslušného rezidua), které mohou simulovat pozitivní výsledek, je-li použit popsáný způsob zkoušení. Z informací, týkajících se specifičnosti, musí být možno odvodit kvantitativně do jaké míry metoda umožňuje v pokusných podmínkách rozlišení analytu od ostatních látek.

1.1.8 *Správnost*

V tomto rozhodnutí je správností míněna správnost průměru. Definice, která je zde použita, je uvedena v normě ISO 3534-1977 v bodu 2.83 (správnost průměru: stupeň shody mezi skutečnou hodnotou a průměrem získaným mnohonásobným opakováním experimentálního postupu).

Hlavní příčiny omezené správnosti jsou:

- a) náhodné chyby;
- b) systémové chyby.

Při velkém počtu pokusů se správnost průměru blíží systémové chybě. Pro dokumentaci hodnocení nějaké metody musí být uveden počet pokusů.

Míra správnosti je rozdíl mezi průměrnou hodnotou zjištěnou analýzou referenčního materiálu a její skutečnou hodnotou a je vyjádřena v procentech skutečné hodnoty. Při absenci referenčního materiálu mohou být odpovídající parametry získány analýzou fortifikovaného vzorku.

Při absenci jak přesně definované metody, tak ověřeného referenčního materiálu může být obsah analytu ve vzorku definován pomocí výsledků získaných za použití metody vykazující vysoký stupeň specifičnosti, správnosti a přesnosti pro analyt.

1.1.9 *Přesnost*

Značí stupeň shody mezi výsledky získanými opakovaným provedením experimentálního postupu v předepsaných podmínkách (norma ISO 3534-1977 ⁽¹⁾, bod 2.84), zahrnujících opakovatelnost a reprodukovatelnost.

Opakovatelnost:

Stupeň shody mezi výsledky nezávislých analýz, získanými za reprodukovatelných podmínek, to jest, stejnou metodou, se stejným testovacím materiálem, ve stejné laboratoři, stejným analytikem, se stejným přístrojovým vybavením a v krátkých časových intervalech.

Reprodukovatelnost:

Stupeň shody mezi výsledky nezávislých vyšetření získaných za reprodukovatelných podmínek, to jest stejnou metodou, se stejným testovacím materiálem, v různých laboratořích, různými analytiky a s různým přístrojovým vybavením.

V souladu s přílohou směrnice Rady 85/591/EHS ⁽²⁾ hodnoty přesnosti analytických metod, o jejichž přijetí je uvažováno v souladu s ustanoveními uvedené směrnice, mají vycházet z kolaborativních pokusů prováděných přednostně podle normy ISO 5725-1986 ⁽³⁾. K tomu účelu jsou názvy „opakovatelnost“ a „reprodukovatelnost“ definovány normou ISO 5725-1986. Pro realizaci těchto pokusů je vhodné používat materiál ze vzorků, jejichž známý obsah analytu je blízký maximálnímu limitu příslušného rezidua.

⁽¹⁾ Mezinárodní organizace pro standardizaci: Statistika – názvosloví a symboly.

⁽²⁾ Úř. věst. L 372, 31.12.1985, s. 50.

⁽³⁾ Mezinárodní organizace pro standardizaci: Přesnost metod pokusů – stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti pro standardní metodu pokusu pomocí mezilaboratorních testů.

Než bude kolaborativním pokusem stanovena reprodukovatelnost metody, stačí, za účelem předběžného výběru metod dokumentární analýzou, mít k dispozici údaje o opakovatelnosti.

Ukazatelem používaným pro posuzování opakovatelnosti a reprodukovatelnosti je variační koeficient definovaný v normě ISO 3534-1977, bod 2.35 (variační koeficient: poměr mezi směrodatnou odchylkou a absolutní hodnotou aritmetického průměru).

1.1.10 Detekční limit

Nejmenší měřitelný obsah, ze kterého je možné odvodit přítomnost analytu se statistickou významností (nejméně 95 % pro nepovolené látky – viz 1.2.6.1). Detekční limit se může vypočítat různými způsoby:

je možné změřit obsah analytu nejméně 20 slepých reprezentativních vzorcích,

- a) přičemž detekční limit má hodnotu vycházející z průměru měření povýšeného třikrát o směrodatnou odchylku slepých pokusů.

Poznámka 1: Je třeba specifikovat množství testovacího materiálu používaného při analýze.

Poznámka 2: V případě, kde je možno předpokládat, že na výsledky metody mohou mít vliv faktory jako je druh, pohlaví, věk, krmení nebo jiné faktory vycházející ze životního prostředí, je nutné provést nejméně 20 slepých pokusů při testování každé homogenní populace, pro kterou má být metoda použita;

- b) v případě spektrometrických stanovení, při kterých reprezentativní slepá stanovení dávají pouze šum pozadí, detekční limit se vypočítá jako množství odpovídající trojnásobku výše šumu pozadí mezi píky.

1.1.11 Limit stanovení

Je to nejmenší koncentrace analytu, pro kterou byla metoda validována se specifikovanou správností a přesností.

1.1.12 Citlivost

Je míra schopnosti metody rozlišit rozdíly v koncentracích analytů. V tomto rozhodnutí je citlivost definována jako strmost kalibrační křivky v uvažovaném rozsahu.

1.1.13 Praktičnost

Je charakteristika analytické metody, která je závislá na zaměření metody a která je definována ukazateli, jako je pracnost a náklady.

1.1.14 Použitelnost

Značí výčet typů vzorků a/nebo analytů, na které lze metodu použít tak, jak je předložena, nebo s menšími modifikacemi.

1.1.15 Hodnocení výsledků

1.1.15.1 Pozitivní výsledek

Přítomnost analytu ve vzorku je prokázána v souladu s analytickým postupem, jestliže jsou splněna obecná kritéria i kritéria specifikovaná pro jednotlivou detekční metodu.

- a) U látek s nulovou tolerancí je výsledek pozitivní, jestliže je analyt obsažený ve vzorku identifikován bez jakékoliv pochybnosti.
- b) U látek se stanoveným maximálním limitem je výsledek analýzy pozitivní, jestliže množství analytu obsaženého ve vzorku, zjištěné experimentálně (po uplatnění korekcí na výtěžnost), je vyšší než stanovený maximální reziduální limit, berouce v úvahu přijatelnou pravděpodobnost výskytu falešných pozitivních nebo negativních výsledků.

1.1.15.2 Negativní výsledek

Výsledek vyšetření se považuje za negativní v souladu s analytickým postupem, jestliže jsou splněna obecná i specifická kritéria stanovená pro použitou detekční metodu v případě vhodných referenčních materiálů a slepých stanovení a:

- a) v případě látek s nulovou tolerancí, jestliže identita analytu nebyla prokázána bez jakýchkoliv pochybností; nebo

- b) v případě látek se stanoveným maximálním limitem, jestliže množství analytu obsaženého ve vzorku je nižší než hladina specifikovaná ve výše uvedeném bodu 1.1.15.1 b).

Poznámka: V případě a) negativní výsledek nepotvrzuje, že vzorek neobsahuje analyt a v případě b) negativní výsledek nepotvrzuje, že reálný obsah analytu je nižší než stanovený maximální reziduální limit.

1.1.16 *Kochromatografie*

Při této metodě se purifikovaný testovací roztok před chromatografií rozdělí na dvě frakce:

- a) jedna frakce je předmětem chromatografického vyšetření v původním stavu;
- b) do druhé frakce se přidá standardní analyt a tato směs standardního analytu a testovacího roztoku se chromatografuje. Množství přidaného standardního analytu musí být blízké odhadovanému množství analytu obsaženému v testovacím roztoku.

1.1.17 *Imunogram*

V tomto rozhodnutí se pod pojmem „imunogram“ rozumí grafické vyjádření imunochemické odezvy, vzhledem k retenčnímu času nebo objemu eluátu, získanému při chromatografické separaci s imunochemickou detekcí složek extraktu ze vzorku.

1.2 **Obecné požadavky**

1.2.1 *Kritéria*

V souladu s přílohou směrnice 85/591/EHS se níže uvedená kritéria vztahují na zkoušení analytických metod.

1.2.2 *Screeningové metody*

Pro screeningové metody nelze stanovit pevné požadavky. Nejdůležitějším hlediskem při jejich provádění je co nejnížší incidence falešných negativních výsledků.

1.2.2.1 Musí být stanovena specifika.

1.2.2.2 Správnost a přesnost:

Kvantifikace není nezbytná. Podle toho, zda použití látky je zakázáno, nebo povoleno, může být screeningová metoda kvalitativní, nebo kvantitativní. Falešné pozitivní výsledky jsou akceptovatelné, ale falešné negativní výsledky musí být ve sledované hladině omezeny na minimum.

1.2.2.3 Detekční limit:

Detekční limit musí být přiměřený účelu, kterému má sloužit. U látek se stanoveným maximálním reziduálním limitem musí být dostatečně nízký, aby reziduum mohlo být na dané hladině zjištěno. Pro látky, jejichž použití je u jatečných zvířat zakázáno, musí být detekční limit co nejnížší.

1.2.2.4 Praktičnost:

Je žádoucí, aby metoda umožňovala analýzu velkého množství vzorků a aby náklady byly nízké.

1.2.3 *Konfirmační metody*

1.2.3.1 Specifičnost:

Konfirmační metody musí poskytovat co nejvíce jednoznačných informací o chemické struktuře analytu. Pokud více složek dává stejnou odpověď, pak metoda neumožňuje stanovení rozdílů mezi těmito složkami.

Metody založené pouze na chromatografické analýze bez použití molekulární spektrometrické detekce nejsou vhodné jako konfirmační metody.

Pokud jednotlivá technika nemá dostatečnou specifičnost, požadovaná specifičnost může být dosažena pomocí analytického postupu sestávajícího z vhodných kombinací purifikace, chromatografické(ych) separace(í) a spektrometrické detekce nebo imunochemické detekce; například: GC-MS, LC-MS, IAC/GC-MS, GC-IR, LC-IR, LC/IMG.

1.2.3.2 Správnost:

V případě opakování analýz referenčního materiálu se odchylka mezi experimentálně stanoveným průměrem a skutečnou hodnotou (při eventuální aplikaci oprav požadovaných pro výtěžnost) musí nacházet v následujících mezích:

Skutečná hodnota	Rozmezí
$\leq 1 \mu\text{g kg}^{-1}$	-50 % až +20 %
$> 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ až $10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-30 % až +10 %
$> 10 \mu\text{g kg}^{-1}$	-20 % až +10 %

1.2.3.3 Přesnost:

V případě opakování analýz referenčního materiálu za podmínek reprodukovatelnosti jsou charakteristické hodnoty mezilaboratorního variačního koeficientu (CV) – vypočítané v souladu s rovnicí dle Horowitza [$\text{CV}(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)}$, ve které C reprezentuje obsah vyjádřený v mocninách 10] – následující:

Obsah	CV
$1 \mu\text{g kg}^{-1}$	45 %
$10 \mu\text{g kg}^{-1}$	32 %
$100 \mu\text{g kg}^{-1}$	23 %
1 mg kg^{-1}	16 %

Pro analýzy prováděné za reprodukovatelných podmínek se mezilaboratorní CV musí celkově nacházet mezi polovinou a dvěma třetinami výše uvedených hodnot.

1.2.3.4 Detekční limit:

Odpovídající účelu, kterému má sloužit (viz 1.2.6.1).

1.2.3.5 Limit rozlišení:

Odpovídající účelu, kterému má sloužit (viz 1.2.6.2).

1.2.3.6 Citlivost:

Odpovídající účelu, kterému má sloužit

1.2.3.7 Praktičnost:

Rychlost a náklady jsou méně důležité než u screeningových metod.

Pro konfirmační metody je většina aspektů praktičnosti méně důležitá ve srovnání s jinými kritérii definovanými v tomto rozhodnutí. Obecně stačí, aby požadované reagenty a vybavení byly k dispozici.

1.2.4 Kalibrační křivky

Závisí-li použitá metoda na kalibrační křivce, je třeba uvést následující informace:

- matematický vzorec, který popisuje kalibrační křivku,
- přípustná rozmezí, ve kterých mohou parametry kalibrační křivky ode dne ke dni kolísat,
- pracovní zónu kalibrační křivky.

Kdykoliv je to možné, mají být pro kontrolu kvality kalibračních křivek konfirmačních metod používány vhodné vnitřní standardy a referenční materiály a mají být uvedeny detaily o odchylkách proměnných veličin alespoň pro pracovní oblast kalibrační křivky.

1.2.5 Citlivost na interference

1.2.5.1 Pro všechny experimentální podmínky, které se v praxi mohou měnit (například: stabilita reagentů, složení vzorku, pH, teplota), je nutno uvádět všechny změny, které mohou mít vliv na výsledek analýzy. Popis metody musí obsahovat způsoby překonání předpokládaných interferencí. Pokud je to zapotřebí, popíší se alternativní detekční principy, vhodné pro konfirmaci.

- 1.2.5.2 Při kochromatografii musí být získán jen jeden pík, přičemž výška (nebo plocha) píku odpovídá množství přidaného analytu. V případě GC nebo LC šířka píku v polově maximální výšky musí být v rozmezí mezi 90 % a 110 % původní šířky a retenční časy musí být stejné s tolerancí 5 %. Pro metody TLC musí být předpokládána skvrna analytu pouze zesílena; nesmí se objevit nová skvrna a její vzhled se nesmí měnit.
- 1.2.5.3 Je důležité, aby byly sledovány všechny interference, které mohou být vyvolány složkami matrice.
- 1.2.6 *Vztah mezi povolenými hladinami rezidua a analytickými limity*
- 1.2.6.1 Pro látky, jejichž podávání je u jatečných zvířat zakázáno, musí být detekční limit analytické metody dostatečně nízký, aby hladiny reziduí, které se mohou vyskytnout po používání zakázaných látek, byly zjištěny s pravděpodobností nejméně 95 %.
- 1.2.6.2 Pro látky s určeným maximálním limitem rezidua nesmí limit stanovení metody, povýšený třikrát o standardní odchytku, kterou metoda vykazuje pro odpovídající vzorek s maximálním reziduálním limitem přesahovat tento stanovený maximální limit rezidua.
- 1.2.6.3 Pro látky se stanoveným maximálním limitem rezidua musí být metoda validována pro výši limitu, pro polovinu a pro dvojnásobek výše tohoto limitu.

2. KRITÉRIA PRO IDENTIFIKACI A KVANTIFIKACI REZIDUA

2.1 Obecné požadavky

Laboratoře provádějící analýzy za účelem konečné confirmace přítomnosti reziduí organických látek s nízkými molekulárními hmotnostmi musí zajistit, aby kritéria pro hodnocení výsledků byla dodržena v souladu s požadavky uvedenými v této části. Kritéria jsou určena k identifikaci analytu a k zabránění vzniku falešných pozitivních výsledků. K získání přesvědčivých závěrů je nezbytné, aby analytické výsledky splňovaly kritéria formulovaná pro příslušný analytický postup.

2.2 Obecné poznámky k analytické metodě

2.2.1 Příprava vzorku

Vzorek musí být získán, ošetřován a zpracován takovým způsobem, aby možnosti zjištění analytu, pokud je přítomen, byly co největší.

2.2.2 Citlivost na interference

Musí být k dispozici informace uvedené v bodu 1.2.5 (Citlivost na interference).

2.2.3 Obecná kritéria týkající se postupu

2.2.3.1 Musí být známy informace o specifčnosti (1.1.7), detekčním limitu (1.1.10) a limitu stanovení (1.1.11) metody použitelné pro analyt obsažený ve vyšetřovaném vzorku.

Poznámka: Tyto informace mohou být získány z experimentálních údajů a/nebo z teoretických úvah.

2.2.3.2 Aby mohl být získán pozitivní výsledek, nesmí se fyzikální a chemické vlastnosti analytu v průběhu analýzy lišit od odpovídajícího standardního analytu přidaného do daného vzorku.

2.2.3.3 Pozitivní nebo negativní výsledek analýzy platí pouze v mezích specifčnosti, detekčního limitu a limitu stanovitelnosti metody pro analyt a analyzovaný vzorek.

2.2.3.4 Referenční nebo fortifikovaný materiál, obsahující známé množství analytu, musí být analyzován stejnou metodou a současně s každou skupinou analyzovaných vzorků. Alternativně může být přidán do analyzovaných vzorků vnitřní standard.

2.2.4 Kritéria pro fyzikální a/nebo chemické zvýšení koncentrace, purifikaci, extrakci a separaci

2.2.4.1 Analyt musí být ve frakci odpovídající standardnímu analytu v odpovídajícím vzorku, a to za stejných experimentálních podmínek.

2.2.4.2 Hodnoty retenčního času standardů, kontrolních vzorků a testovaných vzorků musí být uvedeny současně s konečným výsledkem, ať pozitivním, nebo negativním.

- 2.2.5 *Kritéria pro stanovení množství*
- 2.2.5.1 Výťažnost musí být stanovena a specifikována pro všechna kvantitativní měření.
- 2.2.5.2 Vnitrolaboratorní variabilita výťažnosti musí být co nejmenší.
- 2.2.5.3 Musí být jasně uvedeno, zdali konečné výsledky byly, nebo nebyly korigovány ve vztahu k výťažnosti. Pokud byly korigovány, musí být uvedena použitá korekční metoda.
- 2.3 **Kritéria pro analytické metody, které mohou být použity ke konfirmačním účelům pouze v kombinaci s jinými metodami**
- 2.3.1 *Požadavky na jakost pro stanovení analytu metodou IA*
- 2.3.1.1 Je nutné specifikovat pracovní zónu kalibrační křivky, která musí obecně pokrývat interval nejméně 10 jednotek koncentrace (jeden řád).
- 2.3.1.2 Je požadováno, aby bylo k dispozici nejméně šest kalibračních bodů, rozmístěných přiměřeně po celé délce kalibrační křivky.
- 2.3.1.3 Odpovídající kvalitativní kontrolní parametry musí být v souladu se shora uvedenými parametry; například: NSB a parametry kalibrační křivky.
- 2.3.1.4 Kontrolní vzorky musí být zařazeny do každého pokusu. Hladiny koncentrací: nulová, z nižší, střední a vyšší části pracovního rozsahu. Výsledky těchto pokusů se musí shodovat s výsledky předcházejících pokusů.
- Všechny přibližné hodnoty týkající se kontrolních a testovacích vzorků musí být uvedeny současně s konečným výsledkem, pozitivním, nebo negativním.
- 2.3.2 *Kritéria pro stanovení analytu metodou GC nebo LC s nespecifickou detekcí*
- 2.3.2.1 Analyt musí být eluován v retenčním čase, který je charakteristický pro odpovídající analytický standard, za stejných experimentálních podmínek.
- 2.3.2.2 Maximum nejbližšího píku na chromatogramu musí být odděleno od píku analytu vzdáleností nejméně rovnou celkové šířce v 10 % maximální výšky.
- 2.3.2.3 K získání dalších informací lze využít kochromatografie a chromatografie za použití nejméně dvou kolon s rozdílnou polaritou.
- 2.3.3 *Kritéria pro stanovení analytu metodou TLC*
- 2.3.3.1 Hodnota (nebo hodnoty) R_f analytu musí odpovídat charakteristické hodnotě (nebo charakteristickým hodnotám) R_f analytického standardu. Tento požadavek je splněn, jestliže se hodnota (nebo hodnoty) R_f analytu nacházejí v rozmezí ± 3 % hodnoty (nebo hodnot) R_f analytického standardu za stejných experimentálních podmínek.
- 2.3.3.2 Analyt nesmí být vzhledově rozlišitelný od analytického standardu.
- 2.3.3.3 Střed skvrny, která je nejbližší skvrně náležející k analytu, musí být od této skvrny oddělen na vzdálenost odpovídající nejméně polovině součtu průměrů skvrn.
- 2.3.3.4 Kochromatografie a/nebo dvojrozměrná TLC může být použita k získání doplňkových informací.
- 2.4 **Kritéria pro analytické metody, které mohou být použity ke konfirmačním účelům**
- 2.4.1 *Kritéria pro stanovení analytu metodou LC/IA nebo LC/IMG*
- 2.4.1.1 Pro metodu LC/IMG má být pík analytu v IMG složen nejméně z pěti frakcí pro metodu LC.
- 2.4.1.2 Kritéria uvedená v bodech 2.2.4.1 a 2.2.4.2 musí být dodržena.
- 2.4.1.3 *Reagencie*
- Původ a vlastnosti protilátek a ostatních reagentů musí být specifikovány.
- 2.4.1.4 *Kalibrační křivka*
- Pokud metoda je závislá na kalibrační křivce, musí být stanoveny údaje uvedené v bodu 1.2.4 (kalibrační křivka).
- Požadavky na jakost pro metodu IA (2.3.1.1 až 2.3.1.4) musí být splněny.

- 2.4.1.5 Jestliže metoda prováděná za účelem konfirmace není používána v kombinaci s jinými metodami, musí být provedeny dvě různé separace LC nebo dva imunogramy s použitím protilátek, které mají rozdílnou specifickou specifičnost.
- 2.4.2 *Kritéria pro stanovení analytu metodou LC-SP*
- 2.4.2.1 Kritéria uvedená v bodech 2.3.2.1 a 2.3.2.2 musí být splněna.
- 2.4.2.2 Vlnová délka maximální absorpce analytu ve spektru musí být identická s vlnovou délkou pro analytický standard, s šířkou pásma zjištěnou detekčním systémem. Pro detekci metodou diodového pole je tato hodnota typicky v rozmezí ± 2 nm.
- 2.4.2.3 Spektrum analytu nad 220 nm nesmí být viditelně rozdílné od spektra analytického standardu v těchto částech obou spekter s relativní absorpční rovň 10 % nebo vyšší. Toto kritérium je splněno, když jsou přítomna stejná maxima a když při rozdílu mezi dvěma spektry není zjištěn žádný bod v rozmezí vyšším než 10 % absorpce analytického standardu.
- 2.4.2.4 Jestliže metoda prováděná za účelem konfirmace není používána v kombinaci s jinými metodami, musí být povinně provedena kochromatografie ve fázi LC. Viz bod 1.2.5.2, kde jsou uvedeny požadavky, které musí být splněny při kochromatografii.
- 2.4.3 *Kritéria pro stanovení analytu metodou TLC-SP*
- 2.4.3.1 Metoda musí splňovat kritéria stanovená pro TLC (body 2.3.3.1 až 2.3.3.3).
- 2.4.3.2 Absorpční maxima spektra analytu musí mít stejnou vlnovou délku jako analytický standard v rozmezí stanoveném daným detekčním systémem.
- 2.4.3.3 Spektrum analytu nesmí být viditelně rozdílné od spektra analytického standardu.
- 2.4.3.4 Jestliže metoda prováděná za účelem konfirmace není používána v kombinaci s jinými metodami, musí být povinně provedena kochromatografie ve fázi TLC. Viz bod 1.2.5.2, kde jsou uvedeny požadavky, které musí být dodržovány při kochromatografii.
- 2.4.4 *Kritéria pro stanovení analytu metodou GC-MS*
- 2.4.4.1 Kritéria, která se vztahují na metodu GC
- 2.4.4.1.1 Musí být splněna kritéria uvedená v bodech 2.3.2.1 a 2.3.2.2.
- 2.4.4.1.2 Pokud je k dispozici vhodný materiál, musí se použít jako vnitřní standard. Přednostně to má být analyt značený stabilním izotopem nebo, pokud to není možné, podobný standard, který má retenční čas blízký retenčnímu času analytu.
- 2.4.4.1.3 Poměr mezi retenčním časem analytu u metody GC a retenčním časem vnitřního standardu, tj. relativní retenční čas analytu, musí být stejný jako u analytického standardu ve vhodné matici, v rozmezí $\pm 0,5$ %.
- 2.4.4.1.4 Jestliže je metoda prováděna za účelem konfirmace a jestliže není používán žádný vnitřní standard, musí být identifikace analytu potvrzena kochromatografií.
- 2.4.4.2 Kritéria, která se vztahují na metodu LRMS
- 2.4.4.2.1 Pro účely screeningu je třeba měřit přinejmenším intenzitu diagnostického iontu, kterého je nejvíce.
- 2.4.4.2.2 Pro konfirmační účely je nutné, aby byla měřena intenzita nejméně čtyř diagnostických iontů. Jestliže při používané metodě analyt neposkytne 4 diagnostické ionty, provádí se jeho identifikace na základě výsledku nejméně dvou nezávislých metod GC-LRMS založených na různých derivatizacích a nebo technikách ionizace, přičemž každá z nich dá dva nebo tři diagnostické ionty.
- Molekulárním iontem musí být přednostně některý z vybraných diagnostických iontů.
- 2.4.4.2.3 Relativní přebytky všech diagnostických iontů pocházejících z analytu musí být rovnocenné těmto iontům z analytického standardu, přednostně v rozpětí ± 10 % (mód IE) nebo v rozpětí ± 20 % (mód IC).
- 2.4.5 *Kritéria pro identifikaci analytu metodou IR*
- 2.4.5.1 Definice adekvátních píků
- Adekvátní píky jsou absorpční maxima v infračerveném spektru standardního analytu splňující následující podmínky.
- 2.4.5.1.1 Maximum absorpce je v rozmezí vlnových délek od 1 800 do 500 cm^{-1} .

- 2.4.5.1.2 Intenzita absorpce není menší než:
- a) specifická molární absorpce 40 vzhledem k nulové absorpenci a specifická molární absorpce 20 vzhledem k základní linii píku,
nebo
 - b) relativní absorpce 12,5 % absorpce nejintenzivnějšího píku v oblasti 1 800–500 cm^{-1} , když obě jsou měřeny ve vztahu k nulové absorpenci, 5 % absorpce nejintenzivnějšího píku v oblasti 1 800–500 cm^{-1} , když obě jsou měřeny vzhledem k základní linii jejich píku.
- Poznámka:* Ačkoliv adekvátní píky podle písmena a) jsou preferovány z teoretického hlediska, píky podle písmena b) je možno snadněji stanovit v praxi.
- 2.4.5.2 Stanoví se počet píků v infračerveném spektru analytu, jejichž frekvence odpovídají adekvátnímu píku ve spektru analytického standardu, v rozmezí přibližně $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.
- 2.4.5.3 Kritéria, která se vztahují na metodu IR
- 2.4.5.3.1 Absorpce musí být zřejmá ve všech oblastech spektra analytu, které odpovídá adekvátnímu píku v referenčním spektru standardního analytu.
- 2.4.5.3.2 Je požadováno nejméně 6 adekvátních píků v infračerveném spektru standardního analytu. Jestliže je méně než 6 adekvátních píků, potom příslušné infračervené spektrum nesmí být použito jako referenční spektrum.
- 2.4.5.3.3 „Výsledek“, tj. počet procent odpovídajících píků nalezených v infračerveném spektru analytu, musí být nejméně 50 %.
- 2.4.5.3.4 Jestliže není přesná shoda pro adekvátní pík, musí být vhodná oblast spektra analytu shodná s píkem stejné úrovně.
- 2.4.5.3.5 Postup je použitelný pouze pro absorpční píky ve spektru vzorku, které mají intenzitu nejméně třikrát vyšší než je šum pozadí.
- 2.5 **Jiné analytické metody**
- Jiné analytické metody nebo kombinace analytických metod, než těch, které jsou uvedeny v bodech 2.3 a 2.4 (například: LC-MS, MS-MS, GC-IR), mohou být používány k screeningovým nebo konfirmačním účelům, pokud odpovídají srovnatelným kritériím umožňujícím nepochybnou identifikaci analytu ve zjišťované oblasti koncentrace.

DODATEK

Seznam zkratk a symbolů

CI	= chemická ionizace
EI	= elektronová ionizace
g	= gram (gramy)
GC	= plynová chromatografie
IA	= imunologická analýza
IAC	= imuno-afinitní chromatografie
IMG	= imunogram
IR	= infračervená spektrometrie
kg	= kilogram (kilogramy) (10^3 g)
l	= litr (litry)
LC	= kapalinová chromatografie
LRMS	= nízkorozlišovací hmotnostní spektrometrie
mg	= miligram (miligramy) (10^{-3} g)
MS	= hmotnostní spektrometrie
ng	= nanogram (nanogramy) (10^{-9} g)
NSB	= nespecifická vazba
Rf	= vzdálenost skvrny ve vztahu k čelu rozpouštědla
SP	= spektrometrie, například detektorem diodového pole
TLC	= tenkovrstevná chromatografie
μg	= mikrogram (mikrogramy) (10^{-6} g)
/	= samostatné párové techniky
-	= spojené párové techniky, například například LC/GC-MS = samostatná LC následovaná GC ve spojení s MS