32002D0657

ROZHODNUTÍ KOMISE

ze dne 14. srpna 2002,

kterým se provádí směrnice Rady 96/23/ES, pokud jde o provádění analytických metod a interpretaci výsledků

(oznámeno pod číslem K(2002) 3044)

(Text s významem pro EHP)

(2002/657/ES)

KOMISE EVROPSKÝCH SPOLEČENSTVÍ,

s ohledem na Smlouvu o založení Evropského společenství,

s ohledem na směrnici Rady 96/23/ES ze dne 29. dubna 1996 o kontrolních opatřeních u některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech a o zrušení směrnic 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS [1], a zejména na čl. 15 odst. 1 druhý pododstavec uvedené směrnice,

vzhledem k těmto důvodům:

(1) Přítomnost reziduí v produktech živočišného původu je problémem z hlediska ochrany veřejného zdraví.

(2) V rozhodnutí 98/179/ES ze dne 23. února 1998, kterým se stanoví prováděcí pravidla pro úřední odběr vzorků pro zjišťování některých látek a jejich reziduí v živých zvířatech a živočišných produktech [2], se stanoví, že analýzy vzorků provádějí výhradně laboratoře, které jsou příslušným vnitrostátním orgánem schváleny pro úřední kontrolu reziduí.

(3) Je nezbytné zajistit jakost a porovnatelnost analytických výsledků získávaných laboratořemi, které jsou schváleny pro úřední kontrolu reziduí. Tohoto cíle by mělo být dosaženo uplatňováním systémů zabezpečování jakosti, zejména používáním metod, které jsou validovány obecnými postupy a na základě pracovních kritérií, a dále zajištěním návaznosti na všeobecně přijaté standardy.

(4) Ve směrnici Rady 93/99/EHS ze dne 29. října 1993 o doplňujících opatřeních týkajících se úředního dozoru nad potravinami a v rozhodnutí 98/179/ES [3] se požaduje, aby byly od ledna 2002 laboratoře pro úřední kontrolu akreditovány podle normy ISO 17025. Podle rozhodnutí 98/179/ES se vyžaduje, aby se akreditované laboratoře účastnily mezinárodně uznávaných externích programů hodnocení řízení jakosti a akreditačních programů. Akreditované laboratoře musí kromě toho prokázat svou odbornou způsobilost pravidelnou a úspěšnou účastí v odpovídajících programech zkoušení odborné způsobilosti, které jsou uznávány nebo organizovány národními referenčními laboratořemi nebo referenčními laboratořemi Společenství.

(5) Pro zlepšení koordinace vyvíjí v souladu se směrnicí 96/23/ES činnost síť referenčních laboratoří Společenství, národních referenčních laboratoří a národních kontrolních laboratoří.

(6) Vzhledem k pokroku, ke kterému došlo v analytické chemii od přijetí směrnice 96/23/ES, byla koncepce rutinních a referenčních metod nahrazena přístupem, který je založen na vymezení pracovních kritérií a postupů validace pro screeningové a potvrzovací metody.

(7) S cílem zajistit harmonizované provádění směrnice 96/23/ES je nezbytné stanovit společná kritéria pro interpretaci výsledků zkoušek získaných úředními laboratořemi.

(8) S cílem zajistit harmonizované provádění směrnice 96/23/ES je nezbytné, aby byly postupně stanoveny minimální požadované pracovní limity (MPPL) analytických metod pro stanovení látek, pro něž nejsou stanoveny žádné nejvyšší přípustné hodnoty, a zejména pro stanovení látek, jejichž používání není na úrovni Společenství povoleno, nebo je výslovně zakázáno.

[1] Úř. věst. L 125, 23.5.1996, s. 10.
[2] Úř. věst. L 65, 5.3.1998, s. 31.
[3] Úř. věst. L 290, 24.11.1993, s. 14.

(9) Rozhodnutí Komise 90/515/EHS ze dne 26. září 1990, kterým se stanoví referenční metody detekce reziduí těžkých kovů a arsenu [1], rozhodnutí Komise 93/256/EHS ze dne 14. května 1993, kterým se stanoví metody detekce reziduí látek s hormonálním nebo thyrostatickým účinkem [2], a rozhodnutí Komise 93/257/EHS ze dne 15. dubna 1993, kterým se stanoví referenční metody a seznam národních referenčních laboratoří pro detekci reziduí [3], naposledy pozměněné rozhodnutím 98/536/ES [4], již byla přezkoumána s cílem zohlednit vývoj vědeckých a technických znalostí a bylo zjištěno, že oblast jejich působnosti a jejich znění zastaraly, a uvedená rozhodnutí by tedy měla být tímto rozhodnutím zrušena.

(10) Mělo by být stanoveno přechodné období s cílem umožnit přizpůsobení metod analýzy úředních vzorků ustanovením tohoto rozhodnutí.

(11) Opatření tohoto rozhodnutí jsou v souladu se stanoviskem Stálého výboru pro potravinový řetězec a zdraví zvířat,

PŘIJALA TOTO ROZHODNUTÍ:

Článek 1

Předmět a oblast působnosti

Tímto rozhodnutím se stanoví pravidla pro analytické metody, které mají být použity pro zkoušení úředních vzorků odebraných podle čl. 15 odst. 1 druhé věty směrnice 96/23/ES, a specifikují se společná kritéria pro interpretaci výsledků analýz, které na těchto vzorcích provedou úřední kontrolní laboratoře.

Toto rozhodnutí se nevztahuje na látky, pro něž jsou v jiných předpisech Společenství stanovena zvláštní pravidla.

Článek 2

Definice

Pro účely tohoto rozhodnutí jsou použitelné definice uvedené ve směrnici 96/23/ES a v příloze tohoto rozhodnutí.

Článek 3

Analytické metody

Členské státy zajistí, aby byly úřední vzorky odebrané podle směrnice 96/23/ES analyzovány metodami, které

a) jsou zdokumentovány v pokynech pro zkoušky, přednostně podle normy ISO 78-2 (6);

b) jsou v souladu s částí 2 přílohy tohoto rozhodnutí;

c) byly validovány postupy popsanými v části 3 přílohy;

d) jsou v souladu s příslušnými minimálními požadovanými pracovními limity (MPPL) stanovenými podle článku 4.

Článek 4

Minimální požadované pracovní limity

Toto rozhodnutí bude přezkoumáváno za účelem postupného stanovení minimálních požadovaných pracovních limitů (MPPL) analytických metod, které mají být použity pro stanovení látek, pro něž nejsou stanoveny žádné nejvyšší přípustné hodnoty.

Článek 5

Řízení jakosti

Členské státy zajistí, aby byla zabezpečena jakost výsledků analýz vzorků odebraných podle směrnice 96/23/ES, a to zejména monitorováním výsledků zkoušek a/nebo kalibrací podle kapitoly 5.9 normy ISO 17025 (1).

Článek 6

Interpretace výsledků

1. Výsledek analýzy se považuje za pozitivní, je-li při použití potvrzovací metody u analytu překročena rozhodovací mez.

2. Je-li pro látku stanovena nejvyšší přípustná hodnota, je rozhodovací mezí koncentrace, při jejímž překročení lze se statistickou spolehlivostí 1 – α konstatovat, že byla skutečně překročena nejvyšší přípustná hodnota.

3. Není-li pro látku stanovena nejvyšší přípustná hodnota, je rozhodovací mezí nejnižší koncentrace analytu, při jejímž dosažení lze se statistickou spolehlivostí 1 – α konstatovat, že je analyt přítomen.

4. V případě látek uvedených ve skupině A v příloze I směrnice 96/23/ES musí být chyba α nejvýše 1 %. V případě všech ostatních látek musí být chyba α nejvýše 5 %.

Článek 7

Zrušení

Zrušují se rozhodnutí 90/515/EHS, 93/256/EHS a 93/257/EHS.

Článek 8

Přechodná ustanovení

Metody pro analýzu úředních vzorků látek uvedených ve skupině A v příloze I směrnice 96/23/ES, které splňují kritéria stanovená v nařízeních 90/515/EHS, 93/256/EHS a 93/257/EHS, mohou být používány nejdéle dva roky po vstupu tohoto rozhodnutí v platnost. Metody, které jsou v současné době používány pro stanovení látek uvedených ve skupině B v příloze I směrnice 96/23/ES, musí být uvedeny do souladu s tímto rozhodnutím nejpozději do pěti let ode dne zahájení používání tohoto rozhodnutí.

[1] Úř. věst. L 286, 18.10.1990, s. 33.
[2] Úř. věst. L 118, 14.5.1993, s. 64.
[3] Úř. věst. L 118, 14.5.1993, s. 75.
[4] Úř. věst. L 251, 11.9.1998, s. 39.

Článek 9

Použitelnost

Toto rozhodnutí se použije ode dne 1. září 2002.

Článek 10

Určení

Toto rozhodnutí je určeno členským státům.

V Bruselu dne 14. srpna 2002.

Za Komisi
David BYRNE
člen Komise

PŘÍLOHA

PRACOVNÍ KRITÉRIA, DALŠÍ POŽADAVKY A POSTUPY PRO ANALYTICKÉ METODY

1. DEFINICE

1.1 Správností se rozumí těsnost souhlasu mezi výsledkem zkoušky a přijatou referenční hodnotou (2). Je určena pravdivostí a přesností.

1.2 Chybou alfa (α) se rozumí pravděpodobnost, že zkoušený vzorek nesplňuje požadavky, ačkoli byla naměřena nevyhovující hodnota (falešně pozitivní výsledek).

1.3 Analytem se rozumí látka, která má být detekována, identifikována nebo kvantitativně stanovena, a její deriváty, které vzniknou v průběhu analýzy.

1.4 Chybou beta (β) se rozumí pravděpodobnost, že zkoušený vzorek ve skutečnosti nesplňuje požadavky, ačkoli byla naměřena vyhovující hodnota (falešně negativní výsledek).

1.5 Vychýlením se rozumí rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušky a přijatou referenční hodnotou (2).

1.6 Kalibračním standardem se rozumí prostředek pro měření, který reprezentuje určité množství určované látky navázané na referenční stav.

1.7 Certifikovaným referenčním materiálem (CRM) se rozumí materiál, který má určitý deklarovaný obsah analytu.

1.8 Simultánní chromatografií se rozumí postup, při němž je extrakt před chromatografií rozdělen na dvě části. U první části se provede chromatografická analýza. Druhá část se smísí se standardem analytu, který má být měřen. U této části se rovněž provede chromatografická analýza. Přidané množství standardu analytu se musí blížit odhadovanému množství analytu v extraktu. Tato metoda je vhodná pro zlepšení identifikace analytu při použití chromatografických metod, zejména nelze-li použít vhodný vnitřní standard.

1.9 Kolaborativní studií se rozumí analýza téhož vzorku toutéž metodou za účelem stanovení pracovních charakteristik metody. Touto studií jsou zachyceny chyby měření a systematická chyba laboratoře.

1.10 Potvrzovacími metodami se rozumějí metody, které poskytují úplnou nebo doplňující informaci pro jednoznačnou identifikaci látky a podle potřeby její kvantitativní stanovení na sledované koncentrační úrovni.

1.11 Rozhodovací mezí (CCα) se rozumí mez, při jejímž dosažení a překročení lze konstatovat, že vzorek s pravděpodobností α nesplňuje požadavky.

1.12 Detekční schopností (CCß) se rozumí nejmenší množství látky, které může být s nejistotou ß ve vzorku detekováno, identifikováno a/nebo kvantitativně stanoveno. V případě látek, pro něž není stanovena nejvyšší přípustná hodnota, je detekční schopností nejnižší koncentrace, při níž lze metodou identifikovat skutečně kontaminované vzorky se statistickou spolehlivostí 1 – ß. V případě látek, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota, se detekční schopností rozumí koncentrace, při jejímž dosažení lze metodou detekovat nejvyšší přípustné koncentrace s pravděpodobností 1 – β.

1.13 Uměle obohaceným vzorkem se rozumí vzorek obohacený o známé množství analytu, který má být detekován.

1.14 Mezilaboratorní (srovnávací) studií se rozumí zorganizování, provedení a vyhodnocení testu, jehož účelem je zjistit na tomtéž vzorku schopnost dvou a více laboratoří provádět za předem stanovených podmínek zkoušku. Podle účelu lze studie rozdělit na kolaborativní studie a studie odborné způsobilosti.

1.15 Vnitřním standardem (IS) se rozumí látka, která není obsažena ve vzorku, jejíž fyzikálně-chemické vlastnosti se co nejvíce podobají vlastnostem analytu, který má být detekován, a která se přidává do každého vzorku a do každého kalibračního standardu.

1.16 Laboratorním vzorkem se rozumí vzorek připravený pro odeslání do laboratoře, u něhož se předpokládá, že bude zkoumán nebo zkoušen.

1.17 Sledovanou úrovní se rozumí koncentrace látky nebo analytu ve vzorku, která je významná pro rozhodování o tom, zda jsou splněny požadavky právních předpisů.

1.18 Minimálním požadovaným pracovním limitem (MPPL) se rozumí nejmenší obsah analytu ve vzorku, přičemž analyt musí být při nejmenším detekován a prokázán. Má umožnit harmonizaci pracovních analytických charakteristik metod pro látky, pro něž není stanovena nejvyšší přípustná hodnota.

1.19 Pracovní charakteristikou se rozumí funkční kvalita, kterou lze analytické metodě přisoudit. Může jí být například specifičnost, správnost, pravdivost, přesnost, opakovatelnost, reprodukovatelnost, výtěžnost, detekční schopnost a robustnost.

1.20 Pracovními kritérii se rozumějí požadavky na pracovní charakteristiky, podle nichž lze rozhodnout, zda je analytická metoda vhodná k danému účelu a zda poskytuje spolehlivé výsledky.

1.21 Nejvyššími přípustnými hodnotami se rozumějí maximální limity reziduí, maximální koncentrační úrovně nebo maximální tolerance pro látky, které jsou stanoveny v jiných právních předpisech Společenství.

1.22 Přesností se rozumí těsnost souhlasu mezi nezávislými výsledky zkoušky získanými za (předem) stanovených podmínek. Přesnost je obvykle vyjádřena mírou nepřesnosti a vypočte se jako směrodatná odchylka výsledků zkoušky. Menší přesnost je vyjádřena větší směrodatnou odchylkou (2).

1.23 Studií odborné způsobilosti se rozumí provedení analýzy téhož vzorku, přičemž laboratoře mohou použít vlastní metody, pokud se tyto metody rutinně používají. Studie musí být provedena podle pokynů ISO 43-1 (3) a 43-2 (4) a lze ji použít k posouzení reprodukovatelnosti metod.

1.24 Kvalitativní metodou se rozumí analytická metoda, kterou se provede identifikace látky na základě jejích chemických, biologických nebo fyzikálních vlastností.

1.25 Kvantitativní metodou se rozumí analytická metoda, kterou se stanoví množství nebo hmotnostní poměr látky tak, že je lze vyjádřit číselně ve vhodných jednotkách.

1.26 Slepým stanovením s činidly se rozumí provedení celého postupu analýzy bez zkušebního podílu nebo s použitím ekvivalentního množství vhodného rozpouštědla namísto zkušebního podílu.

1.27 Výtěžností se rozumí procentuální podíl skutečné koncentrace látky, který bylo možné postihnout během analytického postupu. Není-li k dispozici certifikovaný referenční materiál, stanoví se výtěžnost při validaci.

1.28 Referenčním materiálem se rozumí materiál, u něhož bylo validovanou metodou potvrzeno, že lze jednu nebo více jeho vlastností použít ke kalibraci přístroje nebo k ověření metody měření.

1.29 Opakovatelností se rozumí přesnost za podmínek opakovatelnosti (2).

1.30 Podmínkami opakovatelnosti se rozumějí podmínky, za nichž jsou nezávislé výsledky zkoušky získány toutéž metodou, na téže zkoušené položce, tímtéž pracovníkem při použití téhož zařízení (2).

1.31 Reprodukovatelností se rozumí přesnost za podmínek reprodukovatelnosti (2, 4).

1.32 Podmínkami reprodukovatelnosti se rozumějí podmínky, za nichž jsou výsledky zkoušky získány toutéž metodou, na téže zkoušené položce v různých laboratořích při použití různého zařízení (2, 4).

1.33 Robustností se rozumí citlivost analytické metody na změny experimentálních podmínek a může být vyjádřena výčtem materiálů vzorku, analytů, podmínek skladování, podmínek prostředí a podmínek přípravy vzorku, za nichž lze metodu použít tak, jak je popsána, nebo s malými úpravami. U experimentálních podmínek, které by mohly v praxi kolísat (např. stabilita reakčních činidel, složení vzorku, pH, teplota) by měly být uvedeny změny, které by mohly mít vliv na analytický výsledek.

1.34 Stanovením se slepým vzorkem se rozumí provedení celého postupu analýzy se zkušebním podílem odebraným ze vzorku, který neobsahuje analyt.

1.35 Screeningovou metodou se rozumí metoda sloužící k detekování přítomnosti látky nebo třídy látek na sledované koncentrační úrovni. Tyto metody mají vysokou kapacitu, pokud jde o množství vzorků, a jsou používány k vytřídění potenciálně pozitivních vzorků z velkého množství vzorků. Jsou speciálně vyvinuty tak, aby neposkytovaly falešně negativní výsledky.

1.36 Vnitrolaboratorní validací (*in-house validation*) se rozumí analytická studie prováděná po určitou odůvodněnou dobu v rámci jedné laboratoře pro určitou metodu analýzy na tomtéž zkušebním materiálu nebo na různých zkušebních materiálech za různých podmínek.

1.37 Specifičností se rozumí schopnost metody rozlišit mezi měřeným analytem a jinými látkami. Tato charakteristika závisí převážně na popsané technice měření, může se však měnit v závislosti na typu sloučeniny nebo na matrici.

1.38 Standardním přídavkem se rozumí postup, při němž se zkušební vzorek rozdělí na dva zkušební podíly (nebo více). Jeden podíl se analyzuje jako takový a ke druhému zkušebnímu podílu se před analýzou přidá známé množství standardu daného analytu. Přidané množství standardu analytu musí být dvojnásobkem až pětinásobkem odhadnutého množství analytu ve vzorku. Účelem toho postupu je stanovit obsah analytu ve vzorku, přičemž se zohlední výtěžnost analytického postupu.

1.39 Standardem analytu se rozumí analyt se známým a certifikovaným obsahem a čistotou určený k použití jako referenční látka při analýze.

1.40 Látkou se rozumí sloučenina určitého nebo přesného chemického složení a její metabolity.

1.41 Zkušebním podílem se rozumí množství materiálu odebrané ze zkušebního vzorku a určené ke zkoušení nebo vyšetření.

1.42 Zkušebním vzorkem se rozumí vzorek připravený z laboratorního vzorku a určený k odebrání zkušebního podílu.

1.43 Pravdivostí se rozumí těsnost souhlasu mezi průměrnou hodnotou získanou z velkého počtu výsledků měření s přijatou referenční hodnotou. Pravdivost se obvykle vyjadřuje vychýlením (2).

1.44 Jednotkou se rozumějí jednotky popsané v normě ISO 31 (20) a ve směrnici 71/354/ES (19).

1.45 Validací se rozumí proces, při němž se zkoumáním a následným poskytnutím objektivního důkazu potvrdí, že jsou splněny specifikované požadavky zamýšleného použití (1).

1.46 Vnitrolaboratorní reprodukovatelností se rozumí přesnost dosažená v rámci téže laboratoře za (předem) stanovených podmínek (které se týkají např. metody, zkoušených materiálů, pracovníků a vnějších podmínek) během určitého odůvodněného časového intervalu.

2. PRACOVNÍ KRITÉRIA A JINÉ POŽADAVKY NA ANALYTICKÉ METODY

Analytické metody nebo kombinace metod jiných než těch, které jsou níže popsány, mohou být pro účely screeningu nebo potvrzení použity pouze tehdy, pokud prokazatelně splňují příslušné požadavky stanovené v tomto rozhodnutí.

2.1 OBECNÉ POŽADAVKY

2.1.1 **Zacházení se vzorky**

Způsob získání vzorků, zacházení s nimi a jejich zpracování musí zachovat co největší možnost pro detekování látky. Při zacházení se vzorkem musí být vyloučena možnost kontaminace nebo ztráty analytů.

2.1.2 **Provádění zkoušek**

2.1.2.1 *Výtěžnost*

Při analýze vzorků musí být u každé dávky vzorků zjištěna výtěžnost, pokud se nepoužije pevně stanovená hodnota výtěžnosti. Pokud leží výtěžnost v předem určených mezích, může být použit pevně stanovený korekční faktor. V opačném případě se použije výtěžnost zjištěná pro danou dávku, pokud však není třeba použít výtěžnost, která je specifická pro daný analyt ve vzorku; v takovém případě se pro kvantitativní stanovení analytu ve vzorku použije metoda standardního přídavku (viz bod 3.5) nebo vnitřní standard.

2.1.2.2 *Specifičnost*

Metodou musí být možné za experimentálních podmínek rozlišit mezi měřeným analytem a jinými látkami. Musí být uvedeno, do jaké míry je to možné. Při používání popsaných technik měření musí být využito všech způsobů, jak zamezit předpokládanému rušení jinými látkami, např. homology, analogickými látkami, produkty metabolismu sledovaného rezidua. Nanejvýš důležité je prozkoumání rušivých vlivů složek matrice.

2.2 SCREENINGOVÉ METODY

V souladu se směrnicí 96/23/ES mohou být pro účely screeningu použity pouze analytické postupy, u nichž lze zpětně na dokumentech prokázat, že jsou validovány a že je u nich pravděpodobnost falešně negativního výsledku na sledované úrovni menší než 5 % (chyba α). Při podezření lze pozitivní výsledek potvrdit potvrzovací metodou.

2.3 POTVRZOVACÍ METODY PRO ORGANICKÁ REZIDUA A KONTAMINUJÍCÍ LÁTKY

Potvrzovací metody pro organická rezidua nebo kontaminující látky musí poskytovat informace o chemické struktuře analytu. Proto metody založené pouze na chromatografické analýze bez použití spektrometrické detekce nejsou samy o sobě vhodné jako potvrzovací metody. Není-li však jediná technika dostatečně specifická, je třeba požadované specifičnosti dosáhnout analytickými postupy, které se skládají z vhodných kombinací čištění, chromatografických separací a spektrometrické detekce.

Následující metody nebo kombinace metod jsou považovány za vhodné pro identifikaci organických reziduí nebo kontaminujících látek patřících do uvedených skupin látek:

Tabulka 1

Vhodné potvrzovací metody pro organická rezidua a kontaminující látky

Měřicí technika	Látky z přílohy 1 směrnice 96/23/ES	Omezení
LC nebo GC s hmotnostně spektrometrickou detekcí	Skupiny A a B	Pouze po provedení on-line nebo off-line chromatografické separace Pouze při metodě snímání celého spektra (*full-scan*), nebo jsou-li při postupech, které nevyužívají snímání celého spektra, použity alespoň 3 (skupina B) nebo 4 (skupina A) identifikační body
LC nebo GC s infračervenou spektrometrickou detekcí	Skupiny A a B	Musí být splněny specifické požadavky na absorpci při použití infračervené spektrometrie
LC-full-scan-DAD	Skupina B	Musí být splněny specifické požadavky na absorpci při použití UV-spektrometrie
LC fluorescenční detekce	Skupina B	Pouze pro molekuly, které vykazují přirozenou fluorescenci, a pro molekuly, které vykazují fluorescenci po transformaci nebo derivatizaci
2D-TLC-full-scan UV/VIS	Skupina B	Dvourozměrná HPTLC a simultánní chromatografie jsou povinnými metodami
GS-detektor elektronového záchytu	Skupina B	Pouze při použití dvou kolon o různé polaritě
LC-imunogram	Skupina B	Pouze při použití alespoň dvou různých chromatografických systémů nebo druhé nezávislé metody detekce
LC-UV/VIS (jedna vlnová délka)	Skupina B	Pouze při použití alespoň dvou různých chromatografických systémů nebo druhé nezávislé metody detekce

2.3.1 **Obecná pracovní kritéria a požadavky**

Potvrzovací metody musí poskytovat informace o chemické struktuře analytu. Pokud se daná odezva vyskytuje u více látek, není tato metoda schopna tyto sloučeniny rozlišit. Metody založené pouze na chromatografické analýze bez použití spektrometrické detekce nejsou samy o sobě vhodné jako potvrzovací metody.

Pokud se v rámci metody používá vhodný vnitřní standard, musí být přidán ke zkušebnímu podílu před zahájením extrakčního postupu. Podle dostupnosti by měl být použit buď analyt značený stabilními isotopy, který je vhodný zejména pro detekci hmotnostním detektorem, nebo sloučeniny, které mají podobnou strukturu jako takový analyt.

Nelze-li použít vhodný vnitřní standard, provede se identifikace analytu simultánní chromatografií. V tomto případě se získá jeden pík, přičemž zvětšení výšky (nebo plochy) píku odpovídá množství přidaného analytu. U plynové chromatografie (GC) nebo kapalinové chromatografie (LC) nesmí šířka píku v polovině výšky kolísat o více než 10 % a retenční časy se nesmí lišit o více než 5 %. U metod založených na chromatografii na tenké vrstvě (TLC) musí být viditelné pouze skvrny, které podle předpokladu patří analytu; nesmějí se objevovat nové skvrny a intenzita skvrn se nesmí měnit.

Referenční materiály nebo obohacené materiály obsahující známé množství analytu na úrovni nejvyšší přípustné hodnoty, nebo rozhodovací meze nebo blízko těchto hodnot (pozitivní kontrolní vzorek), a rovněž negativní kontrolní vzorky a činidla pro slepé stanovení by měly být podrobeny celému postupu současně s každou dávkou zkušebních vzorků, které mají být analyzovány. Pořadí nástřiku extraktů do analytické aparatury musí být následující: slepé stanovení s činidly, negativní kontrolní vzorek, vzorek, který má být potvrzen (vzorky, které mají být potvrzeny), opět negativní kontrolní vzorek a nakonec pozitivní kontrolní vzorek. Každá odchylka od tohoto pořadí musí být zdůvodněna.

2.3.2 **Další pracovní kritéria a jiné požadavky na kvantitativní metody analýzy**

2.3.2.1 *Pravdivost kvantitativních metod*

Při opakovaných analýzách certifikovaného referenčního materiálu musí být dosaženo následujících doporučených hodnot rozpětí odchylky experimentálně stanovené střední hodnoty hmotnostního zlomku korigovaného na výtěžnost od certifikované hodnoty:

Tabulka 2

Minimální pravdivost kvantitativních metod

Hmotnostní zlomek	Rozpětí
≤ 1 µg/kg	od – 50 % do + 20 %
> 1 µg/kg až 10 µg/kg	od – 30 % do + 10 %
≥ 10 µg/kg	od – 20 % do + 10 %

Nejsou-li takové certifikované referenční materiály k dispozici, je přijatelné zjistit pravdivost měření z výtěžnosti analýzy přídavku známého množství analytu (analytů) ke slepé matrici. Údaje korigované na střední výtěžnost jsou přijatelné pouze tehdy, nacházejí-li se v rozpětí uvedeném v tabulce 2.

2.3.2.2 *Přesnost kvantitativních metod*

Vnitrolaboratorní variační koeficient (CV) pro opakovanou analýzu referenčního nebo obohaceného materiálu za podmínek reprodukovatelnosti nesmí překročit hodnotu vypočtenou z Horwitzovy rovnice. Rovnice zní takto:

$$CV = 2^{(1 - 0{,}5 \log)}$$

kde *C* je hmotnostní zlomek vyjádřený jako mocnina deseti (např. 1 mg/g = 10^{-3}). Příklady jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Příklady variačních koeficientů reprodukovatelnosti kvantitativních metod pro rozmezí hmotnostních zlomků analytů

Hmotnostní zlomek	Variační koeficient reprodukovatelnosti, CV (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) V případě hmotnostních zlomků menších než 100 µg/kg dává použití Horwitzovy rovnice nepřijatelně vysoké výsledky. Variační koeficienty pro koncentrace nižší než 100 µg/kg tedy musí být co nejmenší.

V případě analýz prováděných za podmínek opakovatelnosti by se měl variační koeficient zpravidla nacházet v rozmezí od jedné poloviny do dvou třetin výše uvedených hodnot. V případě analýz prováděných za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti nesmí být vnitrolaboratorní variační koeficient větší než variační koeficient reprodukovatelnosti.

V případě látek, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota, musí být při použití metody dosaženo hodnoty vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti, která není vyšší než hodnota reprodukovatelnosti odpovídající variačnímu koeficientu pro koncentraci na úrovni jedné poloviny nejvyšší přípustné hodnoty.

2.3.3 **Pracovní kritéria a další požadavky na detekci hmotnostním spektrometrem**

Jako potvrzovací metody přicházejí hmotnostně spektrometrické metody v úvahu pouze v provedení on-line nebo off-line chromatografické separace.

2.3.3.1 *Chromatografická separace*

Při postupech založených na kombinaci plynové chromatografie a hmotností spektrometrie GC-MS se separace plynovou chromatografií provede na kapilárních kolonách. Při postupech založených na kombinaci kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie LC-MS se chromatografická separace provede na vhodných kolonách pro LC. V každém případě je minimálním přijatelným retenčním časem pro vyšetřovaný analyt dvojnásobek retenčního času, který odpovídá mrtvému objemu kolony. Retenční čas (nebo relativní retenční čas) analytu ve zkušebním podílu musí v rámci stanoveného rozmezí odpovídat retenčnímu času (relativnímu retenčnímu času) kalibračního standardu. Rozmezí retenčního času musí odpovídat rozlišovací schopnosti chromatografického systému. Poměr chromatografického retenčního času analytu a vnitřního standardu, tj. relativní retenční čas analytu, musí odpovídat relativnímu retenčnímu času kalibračního roztoku s tolerancí ± 0,5 % u GC a ± 2,5 % u LC.

2.3.3.2 *Hmotnostně spektrometrická detekce*

Při detekci hmotnostním spektrometrem se použijí například techniky snímání celého spektra (*full-scan*) nebo sledování vybraných iontů (*selected ion monitoring*) (SIM) a rovněž techniky založené na tandemové hmotnostní spektrometrii MS-MS^n, např. *selected reaction monitoring* (SRM), nebo vhodné techniky MS nebo MS-MS^n v kombinaci s vhodnými ionizačními technikami. V případě hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (*high-resolution mass spectrometry*) (HRMS) musí být rozlišení obecně lepší než 10 000 v celém rozsahu hmotností při 10 % sedle.

Snímání celého spektra (full-scan): Provádí-li se při hmotnostní spektrometrii snímání celého spektra, musí být přítomny všechny měřené diagnostické ionty (molekulový iont, charakteristické adukty molekulárního iontu, charakteristické iontové fragmenty a isotopové ionty), které mají v referenčním spektru kalibračního standardu relativní intenzitu vyšší než 10 %.

Sledování vybraných iontů (SIM): Provádí-li se hmotnostně spektrometrické stanovení fragmentografií, musí být molekulárním iontem přednostně jeden z vybraných diagnostických iontů (molekulární iont, charakteristické adukty molekulárních iontů, charakteristické iontové fragmenty a isotopové ionty). Není třeba, aby vybrané diagnostické ionty pocházely výhradně z téže části molekuly. Poměr signál-šum musí být pro každý diagnostický iont 3:1.

Full-scan a SIM: Relativní intenzity detekovaných iontů vyjádřené v procentech intenzity nejintenzivnějšího iontu nebo přesmyku musí v rámci níže uvedených tolerancí odpovídat relativním intenzitám kalibračního standardu z kalibračních vzorků nebo z uměle obohacených vzorků, a to při srovnatelných koncentracích a za týchž podmínek měření:

Tabulka 4

Nejvyšší přípustné tolerance pro relativní intenzity iontů u několika hmotnostně spektrometrických technik

Relativní intenzita (% základního píku)	EI-GC-MS (relativně)	CI-GC-MS, GC-MS^n, LC-MS, LC-MS^n (relativně)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % až 50 %	± 10 %	± 25 %
> 10 % až 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Vyhodnocení hmotnostního spektra: Relativní intenzity diagnostických iontů a/nebo iontových párů prekurzor/produkt musí být stanoveny porovnáním spektra nebo integrováním signálů jednotlivých iontů. Je-li prováděna korekce na pozadí, musí být prováděna jednotně v celé dávce (viz bod 2.3.1, odstavec 4) a musí být jednoznačně uvedena.

Full-scan: Zaznamenává-li se při spektrometrii jednotlivých iontů celé spektrum, musí být přítomny alespoň čtyři ionty s relativní intenzitou 10 % základního píku. Jsou-li v referenčním spektru přítomny molekulární ionty s intenzitou 10 %, musí být zahrnuty. Alespoň u čtyř iontů musí relativní intenzity ležet v mezích nejvyšších přípustných tolerancí (tabulka 5). Vyhledávání může být provedeno pomocí digitální knihovny. V tomto případě musí být při porovnávání hmotnostního spektra zkoušených vzorků a spektra kalibračního roztoku překročen faktor kritické shody. Tento faktor musí být pro každý analyt stanoven při procesu validace, a to na základě spektra, pro něž jsou splněna níže uvedená kritéria. Musí být prozkoumána proměnlivost spektra způsobená matricí vzorku a pracovními charakteristikami detektoru.

SIM: Měří-li se hmotnostní fragmenty jinými technikami než snímáním celého spektra, musí být k vyhodnocení dat použit systém identifikačních bodů. Pro potvrzení látek uvedených ve skupině A v příloze I směrnice 96/23/ES se požadují nejméně 4 identifikační body. Pro potvrzení látek uvedených ve skupině B v příloze I směrnice 96/23/ES se požadují nejméně 3 identifikační body. V níže uvedené tabulce je uveden počet identifikačních bodů, kterých lze u každé ze základních hmotnostně spektrometrických technik dosáhnout. Při bližším určení identifikačních bodů, které jsou nezbytné pro potvrzení, a výpočtu celkového počtu identifikačních bodů však musí být splněny tyto podmínky:

a) musí být proměřen alespoň jeden iontový poměr,

b) všechny relevantní proměřené iontové poměry musí splnit výše uvedená kritéria, a

c) pro účely získání minimálního počtu identifikačních bodů mohou být kombinovány maximálně tři samostatné techniky.

Tabulka 5

Vztah mezi typem fragmentace a dosaženým počtem identifikačních bodů

Hmotnostně spektrometrická technika	Dosažený počet identifikačních bodů na iont
Hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením (LR)	1,0
LC-MS^n prekurzorový iont	1,0
LC-MS^n přechodný produkt	1,5
HRMS	2,0
HR-MS^n prekurzorový iont	2,0
HR-MS^n přechodný produkt	2,5

Poznámky:

(1) Každý iont může být počítán pouze jednou.
(2) GC-MS s elektronovou ionizací a GC-MS s chemickou ionizací se považují za odlišné techniky.
(3) Různé analyty lze použít ke zvýšení počtu identifikačních bodů pouze tehdy, pokud deriváty využívají různé reakční chemismy.
(4) Následujícími technikami lze pro látky ze skupiny A v příloze I směrnice 96/23/ES získat při dodržení příslušných kritérií pro tyto techniky nejvýše jeden identifikační bod: HPLC kombinovaná s *full-scan* spektrometrií a s detekcí diodovým polem (DAD); HPLC kombinovaná s fluorescenčním detektorem; kombinace HPLC-imunogram; dvourozměrná TLC kombinovaná se spektrometrickou detekcí.
(5) Přechodné produkty zahrnují jak dceřiné produkty, tak produkty dalších generací.

Tabulka 6

Příklady počtu identifikačních bodů získaných pro soubor technik a jejich kombinace (*n* je celé číslo)

Technika (techniky)	Počet iontů	Identifikační body
GC-MS (EI nebo CI)	N	N
GC-MS (EI a CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI nebo CI) 2 deriváty	2 (derivát A) + 2 (derivát B)	4
LC-MS	N	N
GC-MS-MS	1 prekurzor a 2 dceřiné	4
LC-MS-MS	1 prekurzor a 2 dceřiné	4
GC-MS-MS	2 prekurzorové ionty, každý s 1 dceřiným	5
LC-MS-MS	2 prekurzorové ionty, každý s 1 dceřiným	5
LC-MS-MS-MS	1 prekurzorový,1 dceřiný a 2 z další generace	5,5
HRMS	N	2n
GC-MS a LC-MS	2 + 2	4
GC-MS a HRMS	2 + 1	4

2.3.4 **Pracovní kritéria a jiné požadavky na chromatografii kombinovanou s infračerveným detektorem**

Adekvátní pásy: Adekvátními pásy jsou absorpční maxima v infračerveném spektru kalibračního standardu, která splňují následující požadavky.

2.3.4.1 *Infračervená detekce*

Absorpční maximum: Musí se nacházet v rozmezí od 4 000 do 500 cm^{-1}.

Intenzita absorpce: Nesmí být

a) v případě specifické molární absorbance (vzhledem k základně pásu) menší než 40 %, nebo

b) v případě relativní absorbance menší než 12,5 % absorbance nejintenzivnějšího píku v oblasti od 4 000 do 500 cm^{-1},

v obou případech měřeno vzhledem k nulové absorbanci, a dále menší než 5 % absorbance nejintenzivnějšího píku v oblasti od 4 000 do 500 cm^{-1}, v obou případech měřeno vzhledem k základně píku.

Poznámka:

Ačkoli lze adekvátní pásy podle písm. a) z teoretického hlediska upřednostnit, lze pásy podle písm. b) v praxi snadněji stanovit.

V infračerveném spektru analytu se měří pásy, jejichž vlnočty odpovídají adekvátnímu pásu ve spektru kalibračního standardu s tolerancí ± 1 cm^{-1}.

2.3.4.2 *Hodnocení infračerveného spektra*

K absorpci musí docházet ve všech oblastech spektra analytu, které odpovídají adekvátnímu pásu v referenčním spektru kalibračního standardu. Je nutné, aby ve spektru kalibračního standardu bylo nejméně šest adekvátních pásů. Je-li ve spektru méně než šest adekvátních pásů (7), nelze dotyčné spektrum použít jako referenční spektrum. „Skóre“, tj. procentuální podíl adekvátních pásů nalezených v infračerveném spektru analytu, musí být alespoň 50. Není-li přesná shoda adekvátních pásů možná, nesmí příslušná oblast spektra analytu vylučovat přítomnost shodných pásů. Postup je použitelný pouze pro píky ve spektru vzorku s intenzitou alespoň trojnásobnou oproti šumu mezi dvěma pásy.

2.3.5 **Pracovní kritéria a jiné požadavky na stanovení analytu kombinací kapalinové chromatografie a dalších detekčních technik**

2.3.5.1 *Chromatografická separace*

Vnitřní standard se použije vždy, když k tomuto účelu existuje vhodný materiál. Má jím být přednostně standard příbuzné látky s retenčním časem blízkým retenčnímu času analytu. Retenční čas analytu musí být typický pro odpovídající kalibrační standard za týchž experimentálních podmínek. Minimální přijatelný retenční čas pro analyt musí být dvojnásobkem retenčního času odpovídajícího mrtvému objemu kolony. Poměr retenčního času analytu a vnitřního standardu, tj. relativní retenční čas analytu, se musí s tolerancí ± 2,5 % rovnat relativnímu retenčnímu času kalibračního standardu ve vhodné matrici.

2.3.5.2 *Full-scan-UV/VIS detekce*

Musí být splněna pracovní kritéria pro metody založené na LC.

Absorpční maxima ve spektru analytu musí mít v rámci tolerance dané rozlišovací schopností detekčního systému tytéž vlnové délky jako maxima kalibračního standardu. V případě detekce diodovým polem je rozlišovací schopnost obvykle ± 2 nm. Spektrum analytu v oblasti nad 220 nm se nesmí v oblasti s relativní absorbancí 10 % vizuálně lišit od spektra kalibračního standardu. Kritérium je splněno, existují-li stejná maxima, a dále není-li rozdíl mezi oběma spektry u žádného bodu větší 10 % absorbance kalibračního standardu. Je-li vyhledávání a porovnávání prováděno pomocí digitální knihovny, musí být při srovnávání spektrálních dat zkoušených vzorků a spektra kalibračního roztoku překročen faktor kritické shody. Tento faktor musí být pro každý analyt stanoven při procesu validace, a to na základě spektra, pro něž jsou splněna výše uvedená kritéria. Musí být prozkoumána proměnlivost spektra způsobená matricí vzorku a pracovními charakteristikami detektoru.

2.3.5.3 *Pracovní kritéria pro fluorimetrickou detekci*

Musí být splněna pracovní kritéria pro metody založené na LC.

Tato metoda je použitelná pro molekuly, které vykazují přirozenou fluorescenci, a pro molekuly, které vykazují fluorescenci po transformaci nebo derivatizaci. Výběr excitačních a emisních vlnových délek v kombinaci s chromatografickými podmínkami musí být proveden tak, aby se minimalizoval výskyt rušivých sloučenin v extraktu slepého vzorku.

Nejbližší maximum píku v chromatogramu musí být od stanovaného píku analytu vzdáleno alespoň o jednu šířku píku analytu v 10 % výšky.

2.3.5.4 *Pracovní kritéria pro stanovení analytu LC-imunogramem*

Metoda založená na kombinaci LC-imunogram není sama o sobě vhodná pro použití jako potvrzovací metoda.

Musí být splněna příslušná kritéria pro metody založené na LC.

Předem stanovené parametry řízení jakosti, např. nespecifické vazby, relativní vazby kontrolních vzorků, hodnota absorbance slepého vzorku se musí nacházet v mezích dosažených při validaci zkušební metody.

Imunogram musí být sestaven alespoň z pěti částí.

Každá frakce musí být menší než polovina výšky píku.

Frakce s maximálním obsahem analytu musí být totožná pro podezřelý vzorek, pozitivní kontrolní vzorek i standard.

2.3.5.5 *Stanovení analytu pomocí LC s UV/VIS detekcí (jedna vlnová délka)*

LC s UV/VIS detekcí (jedna vlnová délka) není sama o sobě vhodná jako potvrzovací metoda.

Nejbližší maximum píku v chromatogramu musí být od stanovovaného píku analytu vzdáleno alespoň o jednu šířku píku analytu v 10 % výšky.

2.3.6 **Pracovní kritéria a jiné požadavky na stanovení analytu dvourozměrnou TLC kombinovanou s *full-scan*-UV/VIS spektrometrickou detekcí**

Dvourozměrná HPTLC a simultánní chromatografie jsou povinnými metodami.

Hodnoty *RF* analytu musí být v rámci tolerance ± 5 % ve shodě s hodnotami *RF* standardů.

Vizuální podoba skvrny analytu se nesmí lišit od podoby skvrny standardu.

V případě stejně zabarvených skvrn musí být vzdálenost středu skvrny analytu od středu nejbližší skvrny rovna alespoň polovině součtu průměrů skvrn.

Spektrum analytu se nesmí vizuálně lišit od spektra standardu, jak je popsáno u požadavků na *full-scan*-UV/VIS detekci.

Je-li vyhledávání a porovnávání prováděno pomocí digitální knihovny, musí být při srovnávání spektrálních dat zkoušených vzorků a spektra kalibračního roztoku překročen faktor kritické shody. Tento faktor musí být pro každý analyt stanoven při procesu validace, a to na základě spekter, pro něž jsou splněna výše uvedená kritéria. Musí být prozkoumána proměnlivost spekter způsobená matricí vzorku a pracovními charakteristikami detektoru.

2.3.7 **Pracovní kritéria a požadavky na stanovení analytu GC v kombinaci s detektorem elektronového záchytu (ECD)**

Vnitřní standard se použije vždy, když k tomuto účelu existuje vhodný materiál. Má jím být přednostně příbuzná látka s retenčním časem blízkým retenčnímu času analytu. Retenční čas analytu musí být typický pro odpovídající kalibrační standard za týchž experimentálních podmínek. Minimální přijatelný retenční čas pro analyt musí být dvojnásobkem retenčního času odpovídajícího mrtvému objemu kolony. Poměr retenčního času analytu a vnitřního standardu, tj. relativní retenční čas analytu, se musí s tolerancí ± 0,5 % rovnat relativnímu retenčnímu času kalibračního standardu ve vhodné matrici. Nejbližší maximum píku v chromatogramu musí být od stanovovaného píku analytu vzdáleno alespoň o jednu šířku píku analytu v 10 % výšky. Další informace mohou být zjištěny simultánní chromatografií.

2.4 POTVRZOVACÍ METODY PRO CHEMICKÉ PRVKY

Potvrzovací metody analýzy pro chemické prvky musí být založeny na jednoznačné identifikaci a správné a přesné kvantifikaci prostřednictvím fyzikálně-chemických vlastností, které jsou na sledované úrovni jedinečné pro daný chemický prvek (např. na základě vlnové délky emitovaného nebo absorbovaného záření, která je charakteristická pro prvek, na základě atomové hmotnosti).

Následující metody nebo kombinace metod jsou považovány za vhodné pro identifikaci chemických prvků:

Tabulka 7

Vhodné potvrzovací metody pro chemické prvky

Technika	Měřený parametr
Diferenční pulsní anodická rozpouštěcí voltametrie	Elektrický signál
Atomová absorpční spektrometrie	
Plamenová	Absorpční vlnová délka
Generování hydridů	Absorpční vlnová délka
Studené páry	Absorpční vlnová délka
Elektrotermická atomizace (grafitová pícka)	Absorpční vlnová délka
Atomová emisní spektrometrie	
Indukčně vázané plasma	Emisní vlnová délka
Hmotnostní spektrometrie	
Indukčně vázané plasma	Poměr hmotnost/náboj

2.4.1 **Společná pracovní kritéria a jiné požadavky na potvrzovací metody**

Referenční materiály nebo obohacené materiály obsahující známé množství analytu na úrovni nejvyšší přípustné hodnoty nebo rozhodovací meze, nebo blízko těchto hodnot (pozitivní kontrolní vzorek), a rovněž negativní kontrolní vzorky a činidla pro slepé stanovení by měly být podrobeny celému postupu současně s každou dávkou zkušebních vzorků, které mají být analyzovány. Doporučené pořadí nástřiku extraktů do analytické aparatury musí být následující: slepé stanovení s činidly, negativní kontrolní vzorek, vzorek, který má být potvrzen, negativní kontrolní vzorek a nakonec pozitivní kontrolní vzorek. Každá odchylka od tohoto pořadí musí být zdůvodněna.

U většiny analytických technik se zpravidla vyžaduje úplné rozložení organické matrice, aby bylo možné před stanovením připravit roztok analytu. Toho lze dosáhnout mikrovlnou mineralizací, při níž je minimalizováno riziko ztrát určovaného analytu nebo riziko kontaminace. Musí být použity kvalitní dekontaminované teflonové nádoby. Jsou-li použity jiné metody suchého nebo mokrého rozkladu, musí být předloženy dokumentované důkazy o tom, že jsou případné ztráty nebo kontaminace vyloučeny. Za určitých podmínek lze jako alternativu k rozkladu zvolit pro oddělení analytů od složek matrice a/nebo zkoncentrování analytů před jejich zavedením do analytické zařízení separační postupy (např. extrakci).

Při kalibraci, ať již externí, nebo založené na metodě vnitřního standardu, je třeba dbát na to, aby nebyl překročen stanovený pracovní rozsah analýzy. V případě externí kalibrace se požaduje, aby byly kalibrační standardy připraveny v roztoku, který svým složení co nejvíce odpovídá složení roztoku vzorku. Pokud to vyžadují specifické analytické okolnosti, musí být rovněž provedena korekce na pozadí.

2.4.2 **Další pracovní kritéria a jiné požadavky na kvantitativní metody analýzy**

2.4.2.1 *Pravdivost kvantitativních metod*

Při opakovaných analýzách certifikovaného referenčního materiálu chemických prvků nesmí odchylka experimentálně stanovené střední hodnoty obsahu od certifikované hodnoty překročit ± 10 %. Nejsou-li certifikované referenční materiály k dispozici, je přijatelné zjistit pravdivost měření z výtěžnosti analýzy neznámých vzorků s přídavkem známého množství prvku. Je třeba věnovat pozornost skutečnosti, že na rozdíl od analytu není přidaný prvek v reálné matrici chemicky vázán a takto získané výsledky mají menší validitu než výsledky získané pomocí certifikovaných referenčních materiálů (CRM). Hodnoty výtěžnosti jsou přijatelné pouze tehdy, nacházejí-li se v intervalu ± 10 % kolem cílové hodnoty.

2.4.2.2 *Přesnost kvantitativních metod*

Vnitrolaboratorní variační koeficient (CV) střední hodnoty pro opakovanou analýzu vzorku za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti nesmí překročit následující hodnoty:

Tabulka 8

Variační koeficienty pro rozmezí hmotnostních zlomků chemického prvku

Hmotnostní zlomek	Variační koeficient, CV (%)
≤ 10 µg/kg až 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg až 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3 **Specifické požadavky na diferenční pulsní anodickou rozpouštěcí voltametrii (DPASV)**

Před stanoveními DPASV je nejdůležitější, aby byly ve vzorcích zcela rozloženy organické látky. Na voltamogramech nesmí být patrné žádné rozšíření signálu způsobené přítomností organického materiálu. Anorganické složky matrice mohou mít při DPASV vliv na výšku píků. Kvantitativní stanovení tedy musí být prováděno metodou standardního přídavku. Příklady typických voltamogramů roztoku vzorku musí být přiloženy k metodě.

2.4.4 **Specifické požadavky na atomovou absorpční spektrometrii (AAS)**

Tato technika je v zásadě metodou pro stanovení jednoho prvku, a vyžaduje tedy optimalizaci experimentálního nastavení v závislosti na chemickém prvku, který má být kvantitativně stanoven. Výsledky musí být pokud možno kvalitativně a kvantitativně kontrolovány podle dalších absorpčních čar (v ideálním případě by měly být vybrány dvě různé čáry). Kalibrační standardy musí být připraveny v roztoku, jehož složení co nejvíce odpovídá roztoku měřeného vzorku (např. pokud jde o koncentraci kyseliny nebo složení modifikátoru). Všechna reakční činidla musí mít nejvyšší čistotu, aby se minimalizovaly hodnoty slepého stanovení. V závislosti na zvoleném režimu vypaření a atomizace se rozlišují různé typy AAS.

2.4.4.1 *Specifické požadavky na plamenovou AAS*

Nastavení přístroje musí být pro každý prvek optimalizováno. Kontrolovány musí být zejména složení a průtok plynu. Pro vyloučení rušivého vlivu absorpce pozadí musí být použita korekce pomocí kontinuálního zdroje záření. U neznámých matric je třeba ověřit, zda není nutná korekce na pozadí.

2.4.4.2 *Specifické požadavky na AAS s grafitovou pícko*u

Správnost stanovení stopových množství s použitím grafitové pícky často ovlivňuje kontaminace v laboratoři. Pro zpracování vzorku a standardu by tedy měla být použita reakční činidla o vysoké čistotě, deionizovaná voda a zařízení z inertního plastu. Nastavení přístroje musí být pro každý prvek optimalizováno. Zejména musí být kontrolovány podmínky předběžného zpracování a podmínky atomizace (teplota, čas) a úprava matrice.

Vliv matrice na atomizaci analytu se sníží při práci za isotermních podmínek atomizace (např. s příčně vyhřívanou grafitovou pícko*u* se zabudovanou platformou podle Lvova (8)). Kombinace úpravy matrice a korekce pozadí Zeemanovým efektem (9) umožňuje, aby bylo kvantitativní stanovení prováděno pomocí kalibrační křivky získané z měření vodných standardních roztoků.

2.4.5 **Specifické požadavky na AAS s generací hydridů**

Organické sloučeniny obsahující arsen, bismut, germanium, olovo, antimon, selen, cín a tellur apod. mohou být velmi stabilní a mají-li být pro celkový obsah prvků získány správné výsledky, je třeba provést oxidativní rozklad. Doporučuje se proto mikrovlnná mineralizace nebo vysokotlaké zpopelnění za silně oxidativních podmínek. Největší pozornost musí být věnována úplné a reprodukovatelné konverzi prvků na jejich hydridy.

Tvorba hydridu arsenu v roztoku kyseliny chlorovodíkové s $NaBH_4$ závisí na oxidačním stavu arsenu (As^{III}: rychlá tvorba, As^{V}: pomalejší tvorba hydridu). Aby se při průtokové technice nástřiku zamezilo ztrátě citlivosti stanovení As^{V} způsobené krátkým reakčním časem v tomto systému, musí být As^{V} po oxidativním rozkladu redukován na As^{III}. Vhodnými činidly k tomuto účelu jsou jodid draselný/askorbová kyselina nebo cystein. Slepé vzorky, kalibrační roztoky a roztoky vzorku musí být zpracovávány stejným způsobem. Dávkový způsob stanovení dovoluje stanovit obě formy arsenu stanoveny bez ovlivnění správnosti stanovení. V důsledku zpožděné tvorby hydridu arsenu (As^{V}) musí být kalibrace provedena integrací plochy píku. Nastavení přístroje musí být optimalizováno. Průtok plynu, kterým se zavádí hydrid do atomizátoru, je zvláště důležitý a musí být kontrolován.

2.4.6 **Specifické požadavky na AAS se studenými parami**

Studené páry se používají pouze v případě rtuti. Kvůli ztrátám elementární rtuti v důsledku těkání a adsorpce je nezbytné při analýze pracovat velmi pečlivě. Musí být vyloučena kontaminace reakčních činidel a pracovního prostředí.

Mají-li být v případě organických sloučenin rtuti získány správné výsledky, je nezbytné provést oxidativní rozklad. K rozkladu je třeba použít hermeticky uzavřený systém s mikrovlnnou mineralizací nebo vysokotlakým zpopelněním. Zvláštní pozornost je třeba věnovat čištění zařízení, které bylo v kontaktu se rtutí.

Výhodná je práce s průtokovou technikou nástřiku. Při nízkých rozhodovacích mezích se doporučuje zkoncentrování elementární rtuti na adsorpční Au/Pt síťce a následná termální desorpce. Kontakt adsorbéru nebo měřicí cely s vlhkostí má rušivý vliv na měření a nesmí k němu dojít.

2.4.7 **Specifické požadavky na atomovou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plasmatem (ICP-AES)**

Atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem (10) je víceprvkovou metodou, která umožňuje současné stanovení různých prvků. Před použitím ICP-AES musí být provedena mineralizace, aby se rozložily organické matrice vzorků. Musí být použita mikrovlnná mineralizace nebo vysokotlaké zpopelnění. Smysluplná analýza ICP-AES vyžaduje kalibraci přístroje a výběr prvku nebo vlnové délky. V případě lineárních kalibračních křivek obvykle stačí pro účely kalibrace přístroje proměřit pouze kalibrační roztoky o čtyřech koncentracích, protože kalibrační křivky ICP-AES jsou lineární pro koncentrace v rozsahu čtyř až šesti řádů. Kalibrace systému ICP-AES se obvykle provádí pomocí standardu obsahujícího více chemických prvků, který musí být připraven ve formě roztoku o téže koncentraci kyseliny jako měřený roztok. Sestrojení lineární kalibrační křivky vyžaduje, aby byly koncentrace prvků ověřeny.

Výběr vlnových délek pro měření emise analytů se řídí koncentracemi prvků, které mají být stanoveny. Pokud se koncentrace analytu nachází mimo pracovní oblast pro danou emisní čáru, použije se jiná emisní čára. Nejdříve se zvolí nejintenzivnější emisní čára (nerušená), a poté méně intenzivní čára. Při práci v blízkosti meze detekce je zpravidla nejvhodnější nejcitlivější čára příslušného analytu. Spektrální rušivé vlivy a rušivé vlivy z pozadí působí při ICP-AES největší obtíže. Možnými rušivými vlivy jsou např. jednoduchý posun pozadí, vzestupný posun pozadí, přímý spektrální překryv a složitý posun pozadí. Každý z těchto rušivých vlivů má své vlastní příčiny a způsoby odstranění. V závislosti na matrici se použijí korekce na rušení a optimalizace pracovních parametrů. Některým rušivým vlivům lze zamezit zředěním nebo úpravou matricí. S každou dávkou zkušebních vzorků se při analýze stejným způsobem jako analytické vzorky zpracují referenční a uměle obohacený materiál obsahující známá množství analytu (analytů) a dále slepý vzorek. Kontrola posunu se musí provést standardem např. po proměření 10 vzorků. Všechna reakční činidla a plasmový plyn musí mít nejvyšší čistotu.

2.4.8 **Specifické požadavky na hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plasmatem (ICP-MS (11))**

Stanovení stopových prvků s atomovými hmotnostmi jako např. chromu, mědi a niklu, může být silně rušeno jinými isobarickými a víceatomovými ionty. Tomu se lze vyhnout pouze při rozlišovací schopnosti alespoň 7 000 – 8 000. Mezi obtíže spojené s technikami MS patří drift přístroje, matricové jevy a rušivé vlivy molekulárních iontů ($m/z < 80$). Pro korekci driftu přístroje a matricových jevů je třeba provést vícenásobnou vnitřní standardizaci pokrývající stejný rozsah hmotností, jako má rozsah prvků, které mají být stanoveny.

Před měřením ICP-MS je nezbytné provést úplný rozklad organických látek. Jako u AAS se těkavé prvky, např. jod, převedou po mineralizaci v hermeticky uzavřené nádobě do stabilního oxidačního stavu. Nejsilněji ruší kombinace molekulárních iontů argonu (plasmový plyn), vodíku, uhlíku, dusíku a kyslíku (rozpouštěcí kyseliny, nečistoty plasmového plynu, a průvodní atmosférické plyny) a matrice vzorku. Těmto rušivým vlivům je třeba zamezit úplnou demineralizací, měřením pozadí, vhodnou volbou analytických hmotností, jejímž důsledkem může být nižší výtěžek (horší mez detekce), a volbou kyseliny použité pro rozpouštění, např. kyseliny dusičné.

U prvků, které mají být stanoveny, se rušivé vlivy vyloučí vhodnou volbou specifických analytických hmotností včetně konfirmace poměrů isotopů. Odezva přístroje při zohlednění Fano-faktorů musí být pro každé měření zkontrolována vnitřními standardy.

3. **VALIDACE**

Validace musí prokázat, že analytická metoda splňuje požadavky na příslušné pracovní charakteristiky.

Různé účely kontroly vyžadují různé kategorie metod. V následující tabulce jsou stanoveny pracovní charakteristiky, které mají být ověřeny, a příslušné typy metod.

Tabulka 9

Klasifikace analytických metod podle pracovních charakteristik, které mají být stanoveny

		Mez detekce CCß	Rozhodovací mez CC α	Pravdivost/ výtěžnost	Přesnost	Selektivita/ specifičnost	Použitelnost/ robustnost/ stabilita
Kvalitativní metody	S	+	–	–	–	+	+
	C	+	+	–	–	+	+
Kvantitativní metody	S	+	–	–	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = screeningové metody; C = potvrzovací metody; + = stanovení je povinné.

3.1 VALIDAČNÍ POSTUPY

V této kapitole jsou uvedeny příklady validačních postupů pro analytické metody a/nebo odkazy na tyto postupy. Jiné postupy prokazování, že analytická metoda splňuje pracovní požadavky pracovní charakteristiky, mohou být použity, pokud jimi lze dosáhnout stejné úrovně a kvality informací.

Validace může být provedena formou vnitrolaboratorní studie podle *Codex Alimentarius*, ISO nebo IUPAC (12) nebo alternativními metodami, např. vnitrolaboratorní validací (13, 14). Tato část je zaměřena na vnitrolaboratorní validaci (*in-house validation*) modulovým přístupem. Tento přístup je založen na

1. řadě obecných pracovních charakteristik nezávislých na použitém validačním modelu a

2. specifičtějších modelově nezávislých postupech (viz tabulka 10).

Tabulka 10

Modelově nezávislé a modelově závislé pracovní parametry

Validace		
Modelově nezávislé pracovní parametry	Modelově závislé pracovní parametry	
Obecné pracovní charakteristiky (3.1.1)	Konvenční validační přístup (3.1.2)	Vnitrolaboratorní validace (3.1.3)
Specifičnost	Výtěžnost	Výtěžnost
Pravdivost	Opakovatelnost	Opakovatelnost
Robustnost: malé změny	Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost	Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost
Stabilita	Reprodukovatelnost	Reprodukovatelnost
	Rozhodovací mez (CCα)	Rozhodovací mez (CCα)
	Detekční schopnost (CCβ)	Detekční schopnost (CCβ)
	Kalibrační křivky	Kalibrační křivky
	Robustnost: větší změny	Robustnost

3.1.1 **Modelově nezávislé pracovní charakteristiky**

Bez ohledu na zvolený validační přístup musí být stanoveny níže uvedené pracovní charakteristiky. Ve snaze minimalizovat rozsah prací lze experimenty zaměřené na stanovení různých parametrů kombinovat pečlivě připraveným a statisticky podloženým způsobem.

3.1.1.1 *Specifičnost*

U analytických metod je důležitá míra, v jaké lze od sebe rozlišit analyt a blízce příbuzné látky (isomery, metabolity, produkty rozkladu, endogenní látky, složky matrice atd.). Pro kontrolu rušivých vlivů je třeba provést dva kroky.

Vyberou se látky, které mohou rušit, a analyzují se příslušné slepé vzorky s cílem zjistit přítomnost rušivých vlivů a odhadnout jejich účinek:

— vybere se řada chemicky příbuzných sloučeniny (metabolity, deriváty atd.) nebo jiné látky, které se mohou společně se určovanou sloučeninou vyskytovat ve vzorcích;

— analyzuje se vhodný počet reprezentativních slepých vzorků (n 20) a v oblasti, v níž podle očekávání dochází k eluci cílového analytu, se zkoumají jakékoliv rušivé vlivy (signály, píky, stopy iontů);

— kromě toho se reprezentativní slepé vzorky uměle obohatí na relevantní úroveň látkami, které mohou mít rušivý vliv na identifikaci a/nebo kvantitativní stanovení analytu;

— po analýze se vyšetří, zda

  — jejich přítomnost může vést k falešné identifikaci, nebo

  — identifikaci cílového analytu brání přítomnost jednoho nebo více rušivých vlivů, nebo

  — kvantitativní stanovení je podstatným způsobem ovlivněno.

3.1.1.2 *Pravdivost*

V tomto odstavci je popsáno stanovení pravdivosti (jedné složky správnosti). Pravdivost lze stanovit pouze pomocí certifikovaného referenčního materiálu (CRM). Je-li CRM k dispozici, musí být použit. Postup je podrobně popsán v normě ISO 5725-4 (5). Níže je uveden příklad:

— podle zkušebního postupu dané metody se šestkrát analyzuje vzorek CRM,

— stanoví se koncentrace analytu přítomného v každém z šesti vzorků CRM,

— pro tyto koncentrace se vypočte průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient (%),

— pravdivost vyjádřená v procentech se vypočte jako poměr zjištěné průměrné koncentrace a certifikované hodnoty (vyjádřené jako koncentrace) vynásobený 100.

Pravdivost (%) = průměrná koncentrace korigovaná na výtěžnost × 100/certifikovaná hodnota.

Není-li k dispozici CRM, lze namísto pravdivosti stanovit postupem popsaným v bodě 3.1.2.1 výtěžnost.

3.1.1.3 *Použitelnost/robustnost (malé změny)*

V těchto studiích laboratoř záměrně provede nepatrné změny, které lze předpokládat, a pozorují se jejich důsledky.

Musí být provedeny předběžné studie faktorů, které se vyskytují při přípravě vzorku, čištění a analýze a které mohou mít vliv na výsledky měření. Takovými faktory může být osoba analytika, zdroj a stáří reakčních činidel, rozpouštědel, standardů a extraktů vzorků, rychlost zahřívání, teplota, pH a mnoho dalších faktorů, které se mohou vyskytnout v laboratoři. Tyto faktory se změní v rozsahu, jaký lze řádově očekávat mezi laboratořemi.

— Identifikují se možné faktory, které by mohly mít vliv na výsledky.

— Každý faktor se nepatrně změní.

— Provede se test robustnosti podle Youdena (15, 16). (Zde mohou být použity i jiné metody. Youdenova metoda omezuje potřebný čas a množství práce na minimum). Youdenův test je krácený faktoriální pokus. Vzájemné působení mezi různými faktory nelze stanovit.

— Zjistí-li se, že faktor významně ovlivňuje výsledky měření, provedou se další experimenty za účelem nalezení přijatelných mezí pro tento faktor.

— Faktory, které významně ovlivňují výsledky se jasně uvedou v popisu metody.

V zásadě by se však neměla studovat jedna změna za druhou, ale mělo by být provedeno několik změn najednou. Například písmeny A, B, C, D, E, F, G se označí nominální hodnoty sedmi různých faktorů, které mohou mít vliv na výsledek, dojde-li k jejich nepatrné změně. Jejich alternativní hodnoty se označí odpovídajícími malými písmeny a, b, c, d, e, f a g. Existuje 2^7, tj. 128 různých možných kombinací těchto faktorů.

Z těchto kombinací je možné zvolit osm kombinací, v nichž jsou rovnoměrně zastoupena velká a malá písmena (tabulka 11). Musí být provedeno osm stanovení, v nichž bude uplatněna kombinace zvolených faktorů (A-G). Výsledky stanovení jsou v níže uvedené tabulce 11 označeny jako S – Z.

Tabulka 11

Experimentální uspořádání studie robustnosti (nepatrné změny)

Hodnota faktoru F	Číslo kombinace (stanovení)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Pozorovaný výsledek R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Výpočet je uveden v příkladu testu robustnosti v bodě 3.3.

3.1.1.4 *Stabilita*

Bylo zjištěno, že nedostatečná stabilita analytu nebo složek matrice ve vzorku po dobu skladování nebo analýzy vzorku může vést k významným odchylkám ve výsledcích analýzy. Kromě toho by měla být kontrolována stabilita kalibračních standardů v roztocích. Stabilita analytu za různých podmínek skladování je obvykle dobře popsána. Monitorování podmínek skladování je součástí normálního laboratorního akreditačního systému. Není-li stabilita známa, lze ji stanovit podle níže uvedených příkladů.

Stabilita analytu v roztoku:

— Připraví se čerstvé zásobní roztoky analytu (analytů) a zředí se podle pokynů pro zkoušku tak, aby se připravil dostatečný počet alikvotů (např. 40) každé vybrané koncentrace (na úrovni minimálního požadovaného pracovního limitu u látek, pro něž nebyla stanovena žádná nejvyšší přípustná hodnota, nebo na úrovni nejvyšší přípustné hodnoty u ostatních látek). Připraví se jak roztoky analytu používaného pro umělé obohacení a pro konečný analytický roztok, tak jakékoliv další zájmové roztoky (např. odvozené standardy).

— Podle pokynů pro zkoušku se změří obsah v čerstvě připraveném roztoku.

— Příslušné objemy se rozdělí do vhodných nádob, označí se a uloží se podle následujícího schématu:

Tabulka 12

Schéma pro stanovení stability analytu v roztoku

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
V temnu Na světle	10 alikvotů	10 alikvotů	10 alikvotů 10 alikvotů

— Délka doby uložení může být jeden, dva, tři a čtyři týdny, nebo podle potřeby delší, dokud se při identifikaci nebo kvantitativním stanovení nezjistí první známky degradace. Musí být zaznamenána maximální doba uložení a optimální podmínky uložení.

— Vypočte se koncentrace analytu (analytů) v každém alikvotu, přičemž se za 100 % považuje čerstvě připravený roztok analytu v okamžiku analýzy.

Zbylé množství analytu (%) = $C_i \times 100/C_{čerstvý}$

C_i = koncentrace v určitém časovém okamžiku

$C_{čerstvý}$ = koncentrace čerstvě připraveného roztoku

Stabilita analytu (analytů) v matrici

— Kdykoli je to možné, použijí se přirozeně kontaminované vzorky. Není-li k dispozici přirozeně kontaminovaný materiál, použije se uměle obohacená matrice.

— Je-li k dispozici přirozeně kontaminovaný materiál, stanoví se koncentrace v čerstvě získaném materiálu. Další alikvoty se odeberou po jednom, dvou, čtyřech a 20 týdnech a stanoví se koncentrace. Tkáně musí být uchovávány alespoň při -20 °C nebo při nižší teplotě.

— Není-li k dispozici přirozeně kontaminovaný materiál, zhomogenizuje se materiál neobsahující analyt. Materiál se rozdělí na pět alikvotů. Každý z alikvotů se uměle obohatí o analyt připravený přednostně jako vodný roztok o malém objemu. Jeden alikvot se ihned analyzuje. Ostatní alikvoty se uloží při -20 °C nebo podle potřeby při nižší teplotě a analyzují se po jednom, dvou, čtyřech a 20 týdnech.

3.1.1.5 *Kalibrační křivky*

Použijí-li se kalibrační křivky:

— musí být sestrojeny alespoň z pěti hodnot (včetně nulové hodnoty),

— uvede se rozsah platnosti křivky,

— uvede se matematická rovnice křivky a shoda proložení dat,

— uvedou se odhadnutá rozpětí parametrů křivky.Má-li být provedena sériová kalibrace standardním roztokem, musí být pro parametry kalibrační křivky, které se mohou pro různé série lišit, uvedena odhadnutá rozpětí.

3.1.2 **Konvenční validační postupy**

Výpočet parametrů konvenčními metodami vyžaduje, aby bylo provedeno několik samostatných experimentů. Každá pracovní charakteristika musí být stanovena pro každou větší změnu (viz výše uvedená použitelnost/robustnost). V případě metod pro více analytů může být stanoveno několik analytů současně, pokud byly předem vyloučeny možné rušivé vlivy. Řadu pracovních charakteristik lze stanovit podobným způsobem. Proto se v zájmu minimalizace rozsahu prací doporučuje, aby byly v nejvyšší možné míře experimenty kombinovány (např. opakovatelnost a vnitrolaboratorní reprodukovatelnost se specifičností, analýza slepých vzorků pro stanovení rozhodovací meze a testování specifičnosti).

3.1.2.1 *Výtěžnost*

Není-li k dispozici CRM, stanoví se výtěžnost pomocí experimentů s uměle obohacenou slepou matricí, a to např. tímto postupem:

— z 18 alikvotů slepého materiálu se vždy šest alikvotů uměle obohatí na 1, 1,5 a 2násobek minimálního požadovaného pracovního limitu nebo na 0,5, 1 a 1,5násobek nejvyšší přípustné hodnoty,

— vzorky se analyzují a vypočítají se koncentrace v každém vzorku,

— podle níže uvedené rovnice se vypočítají výtěžnosti pro každý vzorek,

— ze šesti výsledků pro každou úroveň se vypočte průměrná výtěžnost a variační koeficient,

— výtěžnost (%) = 100 × naměřený obsah/úroveň obohacení vzorku.

Tato konvenční metoda stanovení výtěžnosti je variantou metody standardního přídavku popsané v bodě 3.5, pokud

— se na vzorek pohlíží jako na slepý vzorek, a nikoliv jako na vzorek, který má být analyzován,

— výtěžek ([1]) a výtěžnost ([2]) jsou pro oba zkušební podíly blízké,

— zkušební vzorky mají stejnou hmotnost a zkušební podíly mají stejný objem,

— množství kalibračního standardu, které se přidá do druhého (uměle obohaceného) zkušebního podílu, se označí $x_{ADD} \cdot (x_{ADD} = \rho_A \cdot V_A)$,

— x_1 je naměřená hodnota pro slepý vzorek a $x2$ je naměřená hodnota pro druhý (uměle obohacený) zkušební podíl,

— potom výtěžnost (%) = $100\ (x_2 - x_1)/x_{ADD}$.

Není-li výše uvedených podmínek dosaženo (nebo není-li jich pravděpodobně dosaženo), musí být proveden celý postup stanovení výtěžnosti metodou standardního přídavku, jak je popsána v bodě 3.5.

3.1.2.2 *Opakovatelnost*

— Připraví se sada vzorků identické matrice uměle obohacené analytem na koncentraci odpovídající 1, 1,5 a 2násobku minimálního požadovaného pracovního limitu nebo 0,5, 1 a 1,5násobku nejvyšší přípustné hodnoty.

— Pro každou koncentraci se analýza opakuje alespoň šestkrát.

— Vzorky se analyzují.

— Vypočte se koncentrace stanovená při každém opakování.

— Pro obohacené vzorky se vypočte průměrná koncentrace, směrodatná odchylka a variační koeficient (%).

— Tento postup se opakuje alespoň při dvou příležitostech.

— Vypočítají se celkové průměrné koncentrace a variační koeficienty pro obohacené vzorky.

3.1.2.3 *Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost*

— Připraví se sada vzorků specifikovaného zkušebního materiálu (identické nebo různé matrice) uměle obohaceného analytem (analyty) na koncentrace odpovídající 1, 1,5 a 2násobku minimálního požadovaného pracovního limitu nebo 0,5, 1 a 1,5násobku nejvyšší přípustné hodnoty.

— Pro každou koncentraci se analýza opakuje alespoň šestkrát.

— Tento postup se pokud možno opakuje alespoň při dvou dalších příležitostech s různými pracovníky a za různých podmínek prostředí, např. s různými šaržemi reakčních činidel, rozpouštědel atd., při různých laboratorních teplotách, s různými přístroji.

— Vzorky se analyzují.

— Vypočte se koncentrace stanovená v každém vzorku.

— Pro obohacené vzorky se vypočte průměrná koncentrace, směrodatná odchylka a variační koeficient (%).

3.1.2.4 *Reprodukovatelnost*

Pokud musí být ověřena reprodukovatelnost, měly by se laboratoře účastnit kolaborativních studií podle normy ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5 *Rozhodovací mez (CCα)*

Rozhodovací mez musí být stanovena podle požadavků na identifikaci nebo na identifikaci a kvantitativní stanovení, jak jsou stanoveny v oddíle „Pracovní kritéria a jiné požadavky na analytické metody“ (část 2).

([1]) Výtěžek: podíl množství analytu obsaženého ve vzorku, který je přítomen v konečném extraktu.
([2]) Výtěžnost (zde): podíl množství analytu přidaného do vzorku, který je přítomen v konečném extraktu. V dalším textu tohoto dokumentu se předpokládá, že se výtěžek a výtěžnost sobě rovnají, a používá se tedy pouze termín výtěžnost.

Pro látky, pro něž nebyla stanovena žádná nejvyšší přípustná hodnota, lze CCα stanovit:

— buď postupem kalibrační křivky podle normy ISO 11843 (17) (zde jako kritická hodnota redukované koncentrace). V tomto případě se použije slepý vzorek analyzovaného materiálu, který se uměle obohatí stoupající řadou ekvidistantních koncentrací počínaje příslušným minimálním požadovaným pracovním limitem. Vzorky se analyzují. Po identifikaci se sestrojí křivka závislosti signálu na přidané koncentraci. Rozhodovací mezí je koncentrace, která odpovídá signálu rovnajícímu se hodnotě průsečíku křivky s osou y zvýšené o 2,33násobek směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti této hodnoty. Tento postup je použitelný pouze pro kvantitativní stanovení (α = 1 %),

— nebo analýzou alespoň 20 slepých vzorků na jednu matrici, aby bylo možné vypočítat poměr signál/šum v blízkosti rozhodovací meze. Trojnásobek poměru signál/šum lze použít jako rozhodovací mez. Tento postup je použitelný pro kvantitativní a kvalitativní stanovení.

Pro látky, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota, lze CCα lze stanovit:

— buď postupem kalibrační křivky podle normy ISO 11843 (17) (zde jako kritická hodnota redukované koncentrace). V tomto případě se použije slepý vzorek, který se uměle obohatí stoupající řadou ekvidistantních koncentrací počínaje nejvyšší přípustnou hodnotou. Vzorky se analyzují. Po identifikaci se sestrojí křivka závislosti signálu na přidané koncentraci. Rozhodovací mezí je koncentrace, která odpovídá nejvyšší přípustné hodnotě zvýšené o 1,64násobek standardní směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti (α = 5 %),

— nebo analýzou alespoň 20 slepých vzorků na jednu matrici, uměle obohacených analytem (analyty) na nejvyšší přípustnou hodnotu. Rozhodovací mezí je koncentrace, která odpovídá nejvyšší přípustné hodnotě zvýšené o 1,64násobek příslušné směrodatné odchylky (α = 5 %).

Viz také článek 5 a bod 3.2.

3.1.2.6 *Detekční schopnost (CCβ)*

Detekční schopnost by měla být stanovena podle požadavků na screening, identifikaci nebo na identifikaci a kvantitativní stanovení (viz část 2).

Pro látky, pro něž nebyla stanovena žádná přípustná hodnota, lze CCβ stanovit:

— postupem kalibrační křivky podle normy ISO 11843 (17) (zde jako minimální detekovatelná redukovaná koncentrace). V tomto případě se použije reprezentativní slepý vzorek, který se uměle obohatí klesající řadou ekvidistantních koncentrací počínaje minimálním požadovaným pracovním limitem. Vzorky se analyzují. Po identifikaci se sestrojí křivka závislosti signálu na přidané koncentraci. Detekční schopností je koncentrace, která odpovídá rozhodovací mezi zvýšené o 1,64násobek směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti průměrné hodnoty obsahu na rozhodovací mezi (ß = 5 %),

— analýzou alespoň 20 slepých vzorků na jednu matrici, uměle obohacených analytem (analyty) na rozhodovací mez. Vzorek se analyzuje se a identifikují se analyty. Detekční schopností je hodnota rozhodovací meze zvýšená o 1,64násobek směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti naměřené průměrné hodnoty obsahu (β = 5 %),

— nejsou-li k dispozici kvantitativní výsledky, lze detekční schopnost stanovit měřením vzorku uměle obohaceného na rozhodovací mez a nad tuto úroveň. V tomto případě se detekční schopnost metody rovná koncentraci, při níž zůstává pouze 5 % falešně pozitivních výsledků. Proto musí být pro jednu koncentraci provedeno alespoň 20 vyšetření, aby byl zajištěn spolehlivý základ pro toto stanovení.

Pro látky, pro něž byla stanovena přípustná hodnota, lze CCβ stanovit:

— buď postupem kalibrační křivky podle normy ISO 11843 (17) (zde jako minimální detekovatelná redukovaná koncentrace). V tomto případě se použije reprezentativní slepý vzorek, který se uměle obohatí řadou ekvidistantních koncentrací okolo přípustné hodnoty. Vzorek se analyzuje a identifikuje se analyt (identifikují se analyty). Vypočítá se směrodatná odchylka naměřeného průměrného obsahu na rozhodovací mezi. Detekční schopností je koncentrace odpovídající hodnotě rozhodovací meze zvýšené o 1,64násobek směrodatné odchylky vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti (ß = 5 %),

— nebo analýzou alespoň 20 slepých vzorků na jednu matrici, uměle obohacených analytem (analyty) na rozhodovací mez. Detekční schopností je hodnota rozhodovací meze zvýšená o 1,64násobek příslušné směrodatné odchylky (ß = 5 %).

Viz také bod 3.2.

3.1.2.7 *Robustnost (větší změny)*

Analytická metoda by měla být testována za různých experimentálních podmínek, které by měly zahrnovat různé druhy, různé matrice nebo různé podmínky odběru vzorků. Provedené změny by měly být většího charakteru. Významnost těchto změn může být posouzena například testem podle Youdena (15, 16). Každá pracovní charakteristika by měla být stanovena pro všechny větší změny, u nichž se ukázalo, že mají významný vliv na provedení stanovení.

3.1.3 **Validace podle alternativních modelů**

Použijí-li se alternativní validační postupy, musí být ve zprávě o validaci uveden výchozí model a strategie s příslušnými podmínkami, předpoklady a vzorci, nebo musí být alespoň uvedeny odkazy na dostupné literární zdroje. Příklad alternativního postupu je uveden níže. Použije-li se například vnitrolaboratorní validační model, stanoví se pracovní charakteristiky tak, aby bylo v rámci téhož validačního postupu možné validovat metodu na větší změny. To vyžaduje navrhnout plán validačních experimentů.

3.1.3.1 *Plán experimentů*

Plán experimentů musí být navržen s ohledem na počet různých druhů a na různé zkoumané faktory. Prvním krokem celého postupu validace musí tedy být úvaha o typu souborů vzorků, které budou v budoucnu v laboratoři analyzovány, aby byly vybrány nejdůležitější druhy. Následně musí být podle sledované úrovně koncentrace zvolen rozsah koncentrací.

Příklad:

— analytickou metodou, která má být validována, lze současně stanovit několik analytů,

— byly identifikovány dvě varianty hlavního faktoru (A a B). U hlavních faktorů se kombinují jejich úrovně. Hlavními faktory mohou být například druh nebo matrice. V tomto příkladě se měnily dvě úrovně hlavního faktoru, tj. byly uvažovány dva různé druhy (druhy A a B). Obecně je možné měnit více než dvě úrovně hlavních faktorů, zvýší se tím pouze počet analýz, které mají být provedeny,

— vybrané faktory jsou měněny na dvou úrovních (označeny jako + nebo –).

Tabulka 13

Příklady faktorů, které jsou považovány za důležité pro postup validace

Pohlaví pokusného zvířete	(faktor 1)
Rasa	(faktor 2)
Podmínky přepravy	(faktor 3)
Podmínky skladování	(faktor 4)
Stáří vzorku	(faktor 5)
Podmínky krmení	(faktor 6)
Různí analytici s odlišnou zkušeností	(faktor 7).

Tabulka 14

Možný plán experimentů pro výše uvedený příklad

Druh	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Číslo vzorku
A	+	+	+	+	–	+	–	1
A	+	+	–	–	+	–	–	2
A	+	–	+	–	–	–	+	3
A	+	–	–	+	+	+	+	4
A	–	+	+	–	+	+	+	5
A	–	+	–	+	–	–	+	6
A	–	–	+	+	+	–	–	7
A	–	–	–	–	–	+	–	8

Druh	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Číslo vzorku
B	+	+	+	+	+	–	+	9
B	+	+	–	–	–	+	+	10
B	+	–	+	–	+	+	–	11
B	+	–	–	+	–	–	–	12
B	–	+	+	–	–	–	–	13
B	–	+	–	+	+	+	–	14
B	–	–	+	+	–	+	+	15
B	–	–	–	–	+	–	+	16

Každý vzorek (každá kombinace úrovní faktorů) musí být uměle obohacen na čtyři různé koncentrace v oblasti sledované úrovně, pro každý vzorek musí být analyzován jeden slepý vzorek, tzn. že pro celý validační experiment musí být provedeno 5 × 16 = 80 analýz.

Z těchto 80 výsledků měření lze vypočítat následující charakteristiky (13, 14).

Získané charakteristiky

— opakovatelnost pro každou koncentraci (sir),

— vnitrolaboratorní reprodukovatelnost pro každou koncentraci(siR),

— rozhodovací mez (CCα),

— detekční schopnost (CCβ),

— graf silofunkce (závislost velikosti chyby β na koncentraci) (viz 3.1.3.2),

— robustnost vůči k větším změnám; robustnost vůči menším změnám lze stanovit podle bodu 3.1.1.3,

— 16 kalibračních křivek vztahujících se ke kombinacím stavů,

— jedna společná kalibrační křivka,

— predikční interval společné kalibrační křivky,

— směrodatné odchylky stanovené maticovým výpočtem (smat),

— směrodatné odchylky stanovené iteračně (srun),

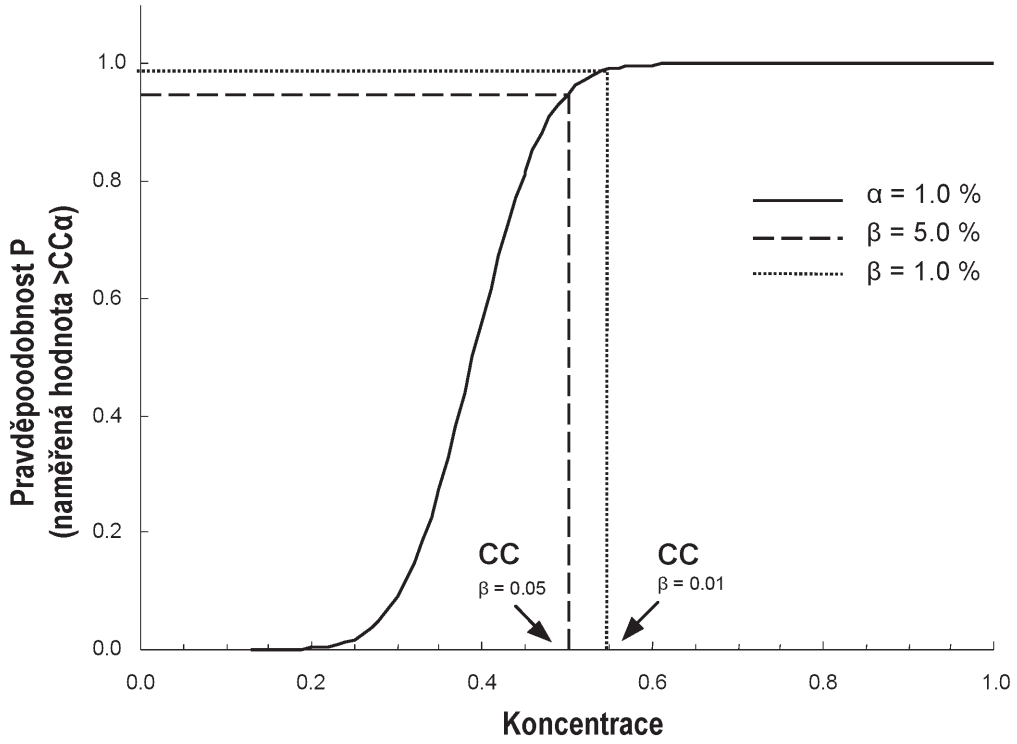
— vliv jednotlivých faktorů na výsledky měření.

Tyto pracovní charakteristiky umožní zevrubné zhodnocení pracovní úrovně metody, protože není zkoumán pouze vliv jednotlivých faktorů, ale také relevantní kombinace těchto faktorů. Pomocí tohoto rozvržení experimentů lze rozhodnout, zda by měl být ten či onen vybraný faktor vyloučen ze společné kalibrační křivky, protože se významně odchyluje od směrodatných odchylek ostatních faktorů.

3.1.3.2 *Graf silofunkce*

Graf silofunkce poskytuje informace o detekční schopnosti metody ve zvoleném rozsahu koncentrací. Vypovídá o pravděpodobnosti chyby ß při použití zkoumané metody. Graf silofunkce umožňuje vypočítat detekční schopnosti pro příslušné kategorie metod (screening, potvrzování) nebo typy metod (kvalitativní nebo kvantitativní) při určité chybě ß (např. 5 %).

Obrázek 1
Graf silofunkce



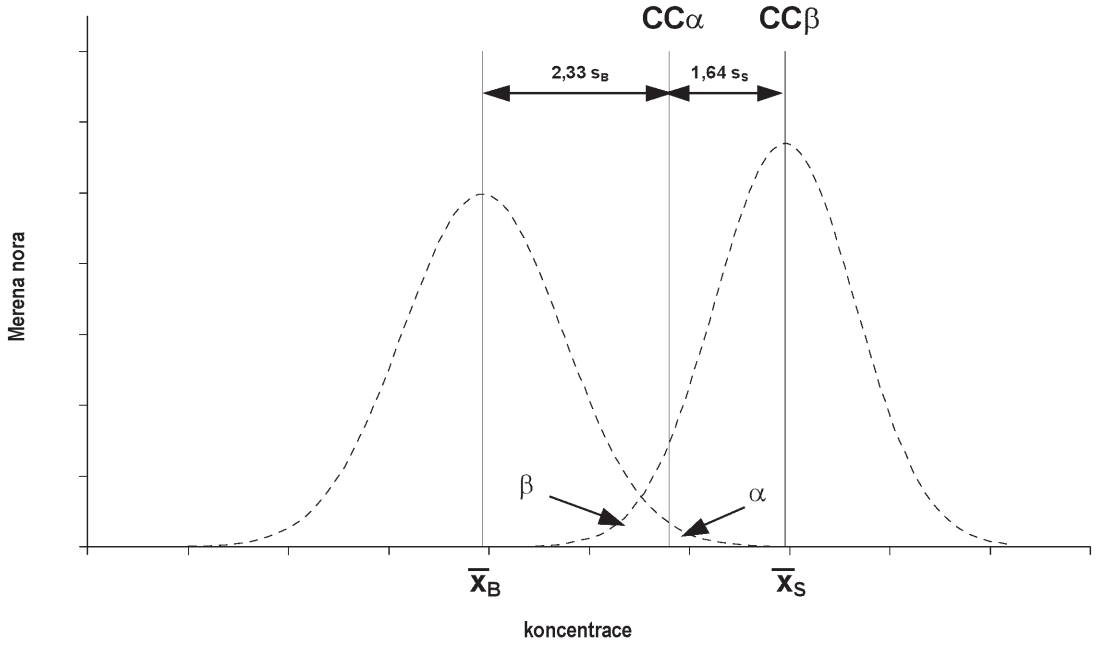
Na obrázku 1 je uveden příklad grafického stanovení detekční schopnosti (CCß) analytické metody. U této metody je při koncentraci 0,50 µg/kg pravděpodobnost falešně negativního výsledku 5 %. Při koncentraci 0,55 µg/kg klesá pravděpodobnost falešně negativního výsledku na 1 %.

3.1.3.3 *Reprodukovatelnost*

Pro stanovení reprodukovatelnosti metody postupem vnitrolaboratorní validace je nezbytná účast na zkoušení odborné způsobilosti podle pokynů ISO 43-1 (3) a 43-2 (4). Laboratoře mohou použít vlastní metody, pokud se tyto metody rutinně používají. Reprodukovatelnost metody lze vyjádřit směrodatnou odchylkou laboratoře.

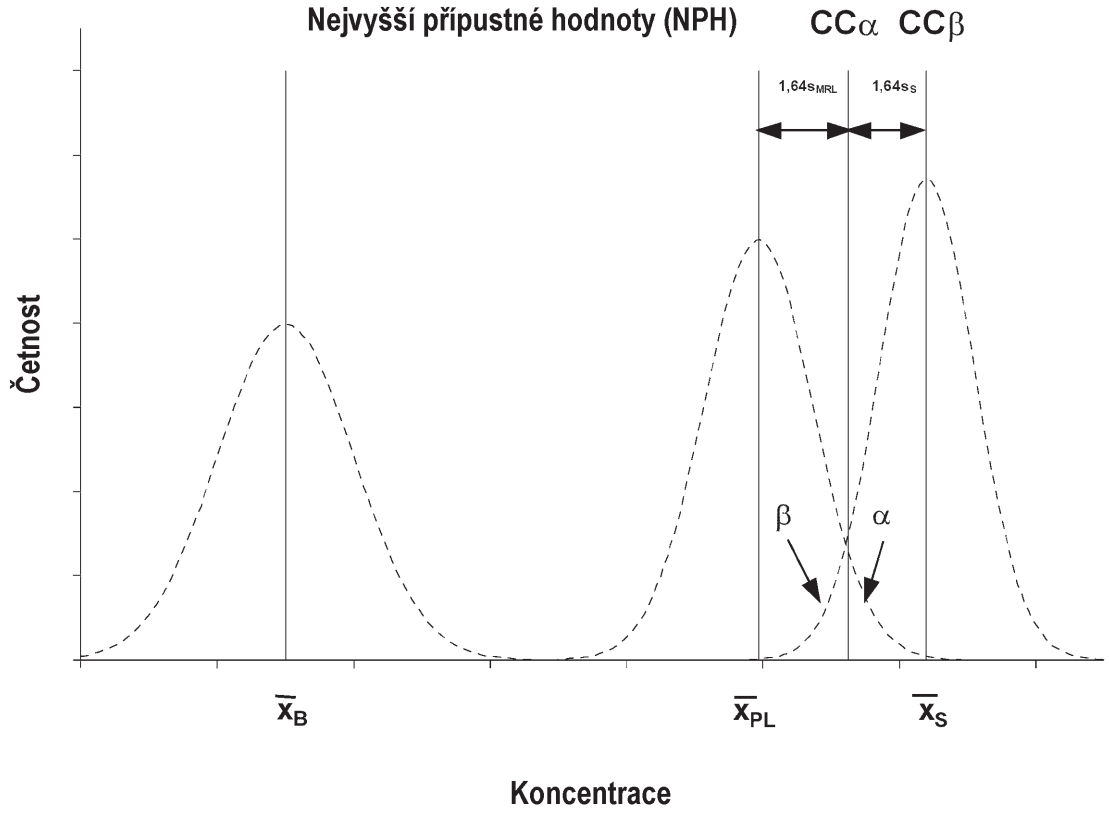
3.2 GRAFICKÉ VYJÁDŘENÍ RŮZNÝCH ANALYTICKÝCH MEZÍ

Obrázek 2
Látky, pro něž není stanovena žádná nejvyšší přípustná hodnota



$\overline{X}_S$	Střední hodnota odezvy kontaminovaného vzorku
S_B	Směrodatná odchylka slepého vzorku (stanovení za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti)
S_S	Směrodatná odchylka kontaminovaného vzorku (za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti)
α	Pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku
β	Pravděpodobnost falešně negativního výsledku
CCα	Odezva při zvolené chybě α; na této úrovni je chyba β 50 %
CCβ	Odezva při zvolené malé chybě β; na této úrovni je chyba α velmi malá

Obrázek 3
Látky, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota



$\bar{X}_B$	Střední hodnota koncentrace ve slepém vzorku
$\bar{X}_{PL}$	Střední hodnota koncentrace ve vzorku obsahujícím analyt na úrovni nejvyšší přípustné hodnoty
$\bar{X}_S$	Střední koncentrace kontaminovaného vzorku
S_{PL}	Směrodatná odchylka vzorku obsahujícího obsahujícím analyt na úrovni nejvyšší přípustné hodnoty (stanovení za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti)
S_S	Směrodatná odchylka kontaminovaného vzorku (za podmínek vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti)
α	Pravděpodobnost falešně pozitivního výsledku
β	Pravděpodobnost falešně negativního výsledku
CCα	Odezva při zvolené chybě α; na této úrovni je chyba β 50 %
CCβ	Odezva při zvolené malé chybě β; na této úrovni je chyba α velmi malá

3.3 PŘÍKLAD VÝPOČTU ROBUSTNOSTI VŮČI MALÝM ZMĚNÁM PODLE YOUDENA (16)

Porovnání průměrů (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$
$A_B = \Sigma(B_i)/4$
$A_C = \Sigma(C_i)/4$
$A_D = \Sigma(D_i)/4$
$A_E = \Sigma(E_i)/4$
$A_F = \Sigma(E_i)/4$
$A_G = \Sigma(G_i)/4$
$A_a = \Sigma(a_i)/4$
$A_b = \Sigma(b_i)/4$
$A_c = \Sigma(c_i)/4$
$A_d = \Sigma(d_i)/4$
$A_e = \Sigma(e_i)/4$
$A_f = \Sigma(f_i)/4$
$A_g = \Sigma(g_i)/4$

Průměry označené velkými písmeny (A_A až A_G) se porovnají s průměry označenými odpovídajícími malými písmeny (A_a až A_g). Pokud má faktor vliv, bude rozdíl významně větší než rozdíly pro ostatní faktory.

Na robustní metodu by neměly mít vliv změny, které lze téměř s určitostí mezi laboratořemi pozorovat.

Pokud se neobjevuje významný rozdíl, je nejrealističtější míra náhodné chyby dána sedmi rozdíly.

Rozdíl D_i

$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$

Druhé mocniny rozdílů (D_i^2)

D_a^2 = hodnota a
D_b^2 = hodnota b
D_c^2 = hodnota c
D_d^2 = hodnota d
D_e^2 = hodnota e
D_f^2 = hodnota f
D_g^2 = hodnota g

Směrodatná odchylka rozdílů Di (SDi):

$$S_{Di} = \sqrt{2*\Sigma(D_i^2/7)}$$

Je-li SDi významně větší než směrodatná odchylka metody za podmínek reprodukovatelnosti (viz výše), vyplývá z toho, že všechny faktory současně mají vliv na výsledek, třebaže žádný faktor samostatně nevykazuje významný vliv, a metoda tedy není dostatečně robustní vůči zvoleným změnám.

3.4 PŘÍKLADY VÝPOČTU PRO POSTUP VNITROLABORATORNÍ VALIDACE

Příklady a výpočty pro model vnitrolaboratorní validace, jak je popsán v oddíle o validaci podle alternativních modelů (3.1.3) (13, 14).

3.5 PŘÍKLADY PRO METODU STANDARDNÍHO PŘÍDAVKU

Zkušební vzorek s obsahem analytu *T* se rozdělí na dva zkušební podíly 1 a 2 o hmotnostech m_1 a m_2. Zkušební podíl 2 se uměle obohatí roztokem analytu o objemu V_A a koncentraci ρ_A. Po provedení extrakce a přečištění, které jsou součástí metody, vzniknou dva zkušební podíly o objemech V_1 a V_2. Předpokládaná výtěžnost analytu je *rc*. Oba extrakty se analyzují měřicí metodou s citlivostí *b* a jejich analytické odezvy se označí x_1 a x_2.

Za předpokladu, že jsou hodnoty *rc* a *b* pro analyt jak u nativního vzorku, tak u uměle obohaceného vzorku stejné, lze obsah *T* vypočítat takto:

$$T = x_1 \cdot V_1 \cdot \rho_A \cdot V_A/(x_2 \cdot V_2 \cdot m_1 - V_1 \cdot m_2)$$

Metoda umožňuje stanovit výtěžnost *rc*. Kromě výše popsaného stanovení se část extraktu zkušebního podílu 1 (objem V_3) uměle obohatí známým množstvím analytu $\rho_B \cdot V_B$ a provede se analýza. Analytický výsledek se označí x_3 a výtěžnost je:

$$rc = x_2 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot \rho_B \cdot V_B/\left[x_3 \cdot V_1 \cdot V_3\left(T \cdot m_2 + \rho_A \cdot V_A\right) - x_2 \cdot V_2 \cdot T \cdot m_1(V_3 - V_B)\right]$$

Kromě toho je možné vypočítat citlivost *b* jako:

$$b = x_1 \cdot V_1/rc \cdot T \cdot m_1$$

Všechny podmínky a podrobnosti jsou popsány v literatuře (18).

4. **POUŽITÉ ZKRATKY**

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AES	atomová emisní spektrometrie
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists INTERNATIONAL (Mezinárodní sdružení úředních chemiků)
B	vázaná frakce (imunotesty)
CI	chemická ionizace
CRM	certifikovaný referenční materiál
CV	variační koeficient
2 D	označení dvourozměrnosti metody
DAD	detekce diodovým polem
DPASV	diferenční pulsní anodická rozpouštěcí voltametrie
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová (impaktní) ionizace
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	vysokoúčinná chromatografie na tenké vrstvě, vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
ICP-AES	atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plasmatem
IR	zkratka pro infračervený obor spektra
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
LC	kapalinová chromatografie
LR(MS)	hmotnostní spektrometrie s nízkým rozlišením
MRPL	požadovaná mez detekce
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnost/náboj
R_F	relativní vzdálenost vzhledem k čelu rozpouštědla (u TLC)
RSDL	relativní směrodatné odchylky laboratoře
SIM	záznam vybraných iontů
TLC	chromatografie na tenké vrstvě, tenkovrstvá chromatografie
UV	zkratka pro ultrafialový obor spektra
VIS	zkratka pro viditelný obor spektra

5. **LITERATURA**

(1) ISO 17025: 1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories.

(2) ISO 3534-1: 1993 Statistika – Slovník a značky. Část 1: Pravděpodobnost a obecné statistické termíny.

(3) ISO Guide 43-1: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.

(4) ISO Guide 43-2: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.

(5) ISO 5725: 1994 Přesnost (správnost a shodnost) metod a výsledků měření. Část 1: Obecné zásady a definice; ISO 5725-2 Část 2: Základní metoda pro stanovení opakovatelnosti a reprodukovatelnosti normalizované metody měření; Část 4: Základní metody pro stanovení správnosti normalizované metody měření.

(6) ISO 78-2: 1999 Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis.

(7) de Ruig, W. G, Weseman J. M. „A new approach to confirmation by infrared spectrometry“, *J. Chemometrics*, 4 (1990), 61 – 77.

(8) Viz např. May T. W., Brumbaugh W. G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: *Anal. Chem.*, 54 (7): 1032 – 1037 (90353).

(9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, Minoia C., Caroli S. (ed.), Pergamon Press (Oxford), 1992, xxvi + 675.

(10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, Montaser A., Golighty D. W. (ed.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.

(11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, Holland G., Tanner S. D. (ed.), The Royal Society of Chemistry, 1997, 329.

(12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure Appl. Chem.*, 67, 331.

(13) Jülicher, B., Gowik, P., Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173.

(14) Gowik, P., Jülicher, B., Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221.

(15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.

(16) Youden, W. J., Steiner, E. H.: Statistical Manual of the AOAC-Association of Official Analytical Chemists, AOAC-I, Washington DC: 1975, 35.

(17) ISO 11843: 1997 Detekční schopnost – Část 1: Termíny a definice, Část 2: Metodologie v případě lineární kalibrace

(18) Stephany, R. W., van Ginkel L. A.: Yield or recovery: a world of difference. Proceedings Eight Euro Food Chem, Vídeň, Rakousko, 18. – 20. září (1995). Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, 2-9.

(19) Směrnice 71/354/EHS ze dne 18. října 1971 o sbližování právních předpisů členských států týkajících se jednotek měření (Úř. věst. L 243, 29.10.1971, s. 29).

(20) ISO 31-0: 1992 Veličiny a jednotky. Část 0: Všeobecné zásady