

II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 12. august 2002

om gennemførelsesbestemmelser til Rådets direktiv 96/23/EF for så vidt angår analysemetoders ydeevne og fortolkning af resultater

(meddelt under nummer K(2002) 3044)

(EØS-relevant tekst)

(2002/657/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 96/23/EF af 29. april 1996 om de kontrolforanstaltninger, der skal iværksættes for visse stoffer og restkoncentrationer heraf i levende dyr og produkter heraf, og om ophævelse af direktiv 85/358/EØF og 86/469/EØF og beslutning 89/187/EØF og 91/664/EØF⁽¹⁾, særlig artikel 15, stk. 1, andet afsnit, og

ud fra følgende betragtninger:

- (1) Forekomsten af restkoncentrationer i animalske produkter er af betydning for folkesundheden.
- (2) Ifølge Kommissionens beslutning 98/179/EF af 23. februar 1998 om nærmere bestemmelser for officiel prøveudtagning til kontrol af visse stoffer og restkoncentrationer heraf i levende dyr og produkter heraf⁽²⁾ må analysen af prøverne kun foretages af laboratorier, som den kompetente nationale myndighed har godkendt til officiel kontrol af restkoncentrationer.
- (3) Det er nødvendigt at sikre kvaliteten og sammenligneligheden af analyseresultaterne fra laboratorier, der er godkendt til officiel kontrol af restkoncentrationer. Dette bør opnås ved at anvende kvalitetssikringssystemer og navnlig ved at anvende metoder, der er valideret i overensstemmelse med fælles procedurer og kriterier for metodernes ydeevne, og ved at sikre sporbarhed til fælles standarder eller standarder, der er almindelig enighed om.
- (4) Ifølge Rådets direktiv 93/99/EØF af 29. oktober 1993 om supplerende bestemmelser vedrørende offentlig

kontrol med levnedsmidler⁽³⁾ og beslutning 98/179/EF skal officielle laboratorier fra januar 2002 akkrediteres i henhold til ISO 17025 (1). Ifølge beslutning 98/179/EF skal godkendte laboratorier deltage i en eksternt, internationalt anerkendt ordning for kvalitetsstyringsbedømmelse og akkreditering. Godkendte laboratorier skal endvidere bevise deres kompetence ved regelmæssigt og med godt resultat at deltage i præstationsprøvninger, der er anerkendt eller tilrettelagt af de nationale laboratorier eller EF-referencelaboratorierne.

- (5) Et net af EF-referencelaboratorier, nationale referencelaboratorier og nationale kontrollaboratorier er oprettet i henhold til direktiv 96/23/EF for at styrke koordineringen mellem laboratorierne.
- (6) Udviklingen inden for analytisk kemi, siden direktiv 96/23/EF blev vedtaget, har overflødiggjort begrebet rutinemetoder og referencemetoder og erstattet det med en indfaldsvinkel, hvor der fastsættes kriterier for metodernes ydeevne og procedurer vedrørende validering af screenings- og verifikationsmetoder.
- (7) Det er nødvendigt at fastlægge fælles krav til fortolkning af prøvningsresultater fra officielle kontrollaboratorier for at sikre en harmoniseret gennemførelse af direktiv 96/23/EF.
- (8) Det er nødvendigt at fastlægge en procedure for gradvis fastsættelse af minimumsgrænserne for analysemetoders ydeevne (MRPL) for stoffer, som der ikke er fastsat noget tilladt niveau for, navnlig de stoffer, som der ikke er givet tilladelse til at anvende, eller som udtrykkeligt er forbudt i Fællesskabet, for at sikre en harmoniseret gennemførelse af direktiv 96/23/EF.

⁽¹⁾ EFT L 125 af 23.5.1996, s. 10.

⁽²⁾ EFT L 65 af 5.3.1998, s. 31.

⁽³⁾ EFT L 290 af 24.11.1993, s. 14.

- (9) Kommissionens beslutning 90/515/EØF af 26. september 1990 om fastsættelse af referencemetoderne til undersøgelse for restkoncentrationer af tungmetaller og arsen ⁽¹⁾, Kommissionens beslutning 93/256/EØF af 14. april 1993 om metoderne til påvisning af restkoncentrationer af stoffer med hormonal virkning og stoffer med tyreostatisk virkning ⁽²⁾ og Kommissionens beslutning 93/257/EØF af 15. april 1993 om fastsættelse af referencemetoderne og fortegnelsen over nationale referencelaboratorier til påvisning af restkoncentrationer ⁽³⁾, senest ændret ved beslutning 98/536/EF ⁽⁴⁾, er blevet taget op til fornyet overvejelse for at tage hensyn til udviklingen i den videnskabelige og tekniske viden; man har konstateret, at deres anvendelsesområde og bestemmelser ikke længere er up to date, og de bør derfor ophæves ved nærværende beslutning.
- (10) For at metoderne til analyse af officielle prøver kan tilpasses denne beslutning, bør der fastsættes en overgangsperiode.
- (11) De i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den Stående Komité for Fødevarekæden og Dyresundhed —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Formål og anvendelsesområde

I denne beslutning fastsættes bestemmelser om de analysemetoder, der skal anvendes ved analyse af officielle prøver, der udtages i henhold til artikel 15, stk. 1, andet punktum, i direktiv 96/23/EF, og der fastsættes fælles krav til fortolkning af de officielle kontrollaboratoriernes analyseresultater af sådanne prøver.

Denne beslutning gælder ikke for stoffer, som der er fastsat nærmere bestemmelser for i andre EF-forskrifter.

Artikel 2

Definitioner

Ved anvendelsen af denne beslutning gælder definitionerne i direktiv 96/23/EF og i bilaget til denne beslutning.

Artikel 3

Analysemetoder

Medlemsstaterne sikrer, at officielle prøver, der udtages i henhold til direktiv 96/23/EF, analyseres med metoder, der

- a) er beskrevet i prøvningsvejledninger, helst ifølge ISO 78-2 ⁽⁶⁾
- b) overholder del 2 i bilaget
- c) er blevet valideret i overensstemmelse med de procedurer, der er beskrevet i del 3 i bilaget

⁽¹⁾ EFT L 286 af 18.10.1990, s. 33.

⁽²⁾ EFT L 118 af 14.5.1993, s. 64.

⁽³⁾ EFT L 118 af 14.5.1993, s. 75.

⁽⁴⁾ EFT L 251 af 11.9.1998, s. 39.

- d) overholder de relevante minimumsgrænser for metodens ydeevne (MPRL), der fastsættes i henhold til artikel 4.

Artikel 4

Minimumsgrænser for metodens ydeevne

Denne beslutning tages op til revision med henblik på en gradvis fastsættelse af de minimumsgrænser for analysemetodens ydeevne (MRPL), der skal anvendes for stoffer, der ikke er fastsat noget tilladt niveau for.

Artikel 5

Kvalitetskontrol

Medlemsstaterne sikrer kvaliteten af resultaterne af analysen af prøver, der er udtaget i henhold til direktiv 96/23/EF, navnlig ved at overvåge prøvninger og/eller kalibreringsresultater i overensstemmelse med kapitel 5.9 i ISO 17025 (1).

Artikel 6

Fortolkning af resultater

1. Resultatet af en analyse anses for ikke at overholde kravene (ikke-overensstemmende), hvis verifikationsmetodens beslutningsgrænse for analysanden er overskredet.

2. Hvis der er fastsat et tilladt niveau for et givet stof, udgør beslutningsgrænsen den koncentration, for hvilken det med en statistisk sikkerhed på $1 - \alpha$ kan afgøres, at grænsen reelt er overskredet.

3. Hvis der ikke er fastsat et tilladt niveau for et givet stof, udgør beslutningsgrænsen den laveste koncentration, for hvilken en metode med en statistisk sikkerhed på $1 - \alpha$ kan fastslå, at den pågældende analysand forekommer.

4. For stoffer tilhørende gruppe A i bilag I til direktiv 96/23/EF må α -fejlen højst udgøre 1 %. For alle andre stoffer må α -fejlen højst udgøre 5 %.

Artikel 7

Ophævelse

Beslutning 90/515/EØF, 93/256/EØF og 93/257/EØF ophæves.

Artikel 8

Overgangsbestemmelser

For stoffer tilhørende gruppe A i bilag I til direktiv 96/23/EF kan metoder til analyse af officielle prøver, som opfylder kravene i beslutning 90/515/EØF, 93/256/EØF og 93/257/EØF, dog anvendes i to år efter, at nærværende beslutning er trådt i kraft. Metoder, der for øjeblikket anvendes for stoffer tilhørende gruppe B i bilag I til direktiv 96/23/EF, skal være i overensstemmelse med nærværende beslutning senest fem år efter den dato, hvorfra denne beslutning anvendes.

*Artikel 9***Anvendelsesdato**

Denne beslutning anvendes fra 1. september 2002.

*Artikel 10***Adressater**

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 12. august 2002.

På Kommissionens vegne
David BYRNE
Medlem af Kommissionen

BILAG

KRITERIER FOR METODERS YDEEVNE OG ANDRE KRAV TIL SAMT PROCEDURER FOR ANALYSEMETODER**1. DEFINITIONER**

- 1.1. Ved »nøjagtighed« forstås graden af overensstemmelse mellem et prøvningsresultat og den accepterede referenceværdi (2). Den bestemmes ved at bestemme korrekthed og præcision.
- 1.2. Ved »alfa (α)-fejl« forstås sandsynligheden for, at den analyserede prøve er i overensstemmelse med kravene, selv om der er fremkommet en ikke-overensstemmende måling (»falsk ikke-overensstemmende beslutning«).
- 1.3. Ved »analysand« forstås det stof, der skal påvises, identificeres og/eller kvantificeres, samt derivater heraf, der opstår under analysen.
- 1.4. Ved »beta (β)-fejl« forstås sandsynligheden for, at den analyserede prøve reelt ikke er i overensstemmelse med kravene, selv om der er fremkommet en overensstemmende måling (»falsk overensstemmende beslutning«).
- 1.5. Ved »systematisk fejl« forstås forskellen mellem forventningen til prøvningsresultatet og en accepteret referenceværdi (2).
- 1.6. Ved »kalibreringsstandard« forstås måleudstyr, der repræsenterer mængden af det pågældende stof på en måde, der binder dets værdi til et referencegrundlag.
- 1.7. Ved »certificeret referencemateriale (CRM)« forstås et materiale, der har fået tillagt et specificeret indhold af analysand.
- 1.8. Ved »co-chromatografi« forstås en metode, hvor ekstraktet inden chromatografi deles i to dele. Den ene del chromatograferes uden videre. Den anden del blandes med den standardanalysand, der skal måles. Så chromatograferes blandingen. Mængden af tilsat standardanalysand skal svare til den skønnede mængde analysand i ekstraktet. Metoden tager sigte på at forbedre identifikationen af en analysand, når man anvender chromatografiske metoder, navnlig hvis der ikke kan anvendes nogen egnet intern standard.
- 1.9. Ved »metodeafprøvning« forstås en analyse af den samme prøve med samme metode med henblik på at bestemme karakteristika for metodens ydeevne. Prøvningen omfatter såvel tilfældige målefejl som systematiske laboratoriefejl.
- 1.10. Ved »verifikationsmetode« forstås metoder, der giver fuldstændig eller supplerende information, så stoffet kan identificeres entydigt og om nødvendigt kvantificeres på det relevante niveau.
- 1.11. Ved »beslutningsgrænse (CC α)« forstås en grænse, hvorfra det kan konkluderes med en fejlsandsynlighed på α , at en prøve ikke er i overensstemmelse med kravene.
- 1.12. Ved »detektionsevne (CC β)« forstås det mindste indhold af stoffet, som kan påvises, identificeres og/eller bestemmes kvantitativt i en prøve med en fejlsandsynlighed på β . Når det drejer sig om stoffer, der ikke er fastsat et tilladt niveau for, udgør detektionsevnen den laveste koncentration, for hvilken en metode kan påvise reelt forurenede prøver med en statistisk sikkerhed på $1 - \beta$. Når det drejer sig om stoffer, som der er fastsat et tilladt niveau for, udgør detektionsevnen den koncentration, for hvilken metoden kan påvise koncentrationer på det tilladte niveau med en statistisk sikkerhed på $1 - \beta$.
- 1.13. Ved »prøvemateriale med tilsætning (af analysand)« forstås en prøve, hvortil der er tilsat en kendt mængde af den analysand, der skal påvises.
- 1.14. Ved »laboratoriesammenligning« forstås tilrettelæggelse, udførelse og evaluering af analyser af den samme prøve foretaget af to eller flere laboratorier i overensstemmelse med forud fastsatte betingelser med henblik på at bestemme analysernes ydeevne. Afhængigt af formålet kan den klassificeres som metodeafprøvning eller præstationsprøvning.
- 1.15. Ved »intern standard (IS)« forstås et stof, der ikke er indeholdt i prøven, og som har fysiske-kemiske egenskaber, der i så høj grad som muligt svarer til egenskaberne hos den analysand, der skal identificeres, og den tilsættes alle prøver og alle kalibreringsstandarder.
- 1.16. Ved »laboratorieprøve« forstås en prøve, der er tilberedt med henblik på at blive sendt til laboratoriet for at blive kontrolleret eller undersøgt.
- 1.17. Ved »det relevante niveau« forstås den koncentration af stof eller analysand i en prøve, der er af betydning for at bestemme, om lovgivningen overholdes.
- 1.18. Ved »minimumsgrænse for metodens ydeevne (MRPL)« forstås mindsteindholdet af en analysand i en prøve, som skal påvises og verificeres. Den har til formål at harmonisere metodernes analyseevne for de stoffer, der ikke er fastsat noget tilladt niveau for.

- 1.19. Ved »karakteristika for metodens ydeevne« forstås den funktionelle kvalitet, der kan tilskrives en analysemetode. Det kan f.eks. være specificitet, nøjagtighed, korrekthed, præcision, repeterbarhed, reproducerbarhed, genfindelse, detektionsevne og robusthed.
- 1.20. Ved »kriterier for metodens ydeevne« forstås krav til karakteristika for metodens ydeevne, ifølge hvilket det kan konkluderes, at analysemetoden er egnet til formålet og genererer pålidelige resultater.
- 1.21. Ved »tilladt niveau« forstås maksimalgrænseværdi for restkoncentrationer, grænseværdi eller anden maksimumstolerance for stoffer, som er fastsat andre steder i EF-forskrifterne.
- 1.22. Ved »præcision« forstås graden af overensstemmelse mellem uafhængige prøvningsresultater fremkommet under forud fastsatte betingelser. Målingen af præcisionen udtrykkes normalt som manglende præcision og beregnes normalt som en standardafvigelse fra prøvningsresultatet. Mindre præcision bestemmes ved en større standardafvigelse (2).
- 1.23. Ved »præstationsprøvning« forstås en analyse af den samme prøve, hvor laboratorierne selv kan vælge metoder, forudsat at metoderne anvendes under rutinebetingelser. Prøvningen skal gennemføres i overensstemmelse med ISO-vejledning 43-1 (3) og 43-2 (4) og kan anvendes til at vurdere metodernes reproducerbarhed.
- 1.24. Ved »kvalitativ metode« forstås en analysemetode, der identificerer et stof på grundlag af dets kemiske, biologiske eller fysiske egenskaber.
- 1.25. Ved »kvantitativ metode« forstås en analysemetode, der bestemmer mængden eller massefraktionen af et stof, så det kan udtrykkes som en numerisk værdi i relevante enheder.
- 1.26. Ved »bestemmelse af reagensblind« forstås en komplet analyse foretaget uden analyseprøven eller med anvendelse af en tilsvarende mængde egnet opløsningsmiddel i stedet for analyseprøven.
- 1.27. Ved »genfindelse« forstås andelen af den korrekte koncentration i et stof, der er genfundet under analyseproceduren. Den bestemmes under valideringen, hvis der ikke er noget certificeret referencemateriale til rådighed.
- 1.28. Ved »referencemateriale« forstås et materiale, hvoraf en eller flere egenskaber er blevet verificeret ved hjælp af en valideret metode, således at det kan anvendes til kalibrering af et apparat eller efterprøvning af en målemetode.
- 1.29. Ved »repeterbarhed« forstås præcision under repeterbarhedsbetingelser (2).
- 1.30. Ved »repeterbarhedsbetingelser« forstås betingelser, hvor der opnås uafhængige prøvningsresultater med den samme metode på identiske prøvningssemner på det samme laboratorium af den samme person med det samme udstyr (2).
- 1.31. Ved »reproducerbarhed« forstås præcision under reproducerbarhedsbetingelser (2) (4).
- 1.32. Ved »reproducerbarhedsbetingelser« forstås betingelser, hvor der opnås uafhængige prøvningsresultater med den samme metode på identiske prøvningssemner på forskellige laboratorier af forskellige personer med forskelligt udstyr (2)(4).
- 1.33. Ved »robusthed« forstås en analysemetodes følsomhed over for ændringer af forsøgsbetingelserne, som kan udtrykkes som en liste over prøvematerialer, analysander, opbevaringsbetingelser, miljøbetingelser og/eller prøveforbehandlingsbetingelser, der ikke hindrer, at metoden kan anvendes som foreskrevet eller med nærmere angivne mindre tilpasninger. For alle forsøgsbetingelser, som kan variere i praksis (f.eks. reagensernes stabilitet, prøvens sammensætning, pH, temperatur), bør alle udsving, som kan påvirke analyseresultaterne, angives.
- 1.34. Ved »blindprøvebestemmelse« forstås en komplet analyse af en analyseprøve, der er undtaget af en prøve, som ikke indeholder analysand.
- 1.35. Ved »screeningsmetode« forstås metoder, der anvendes til at påvise tilstedeværelsen af et stof eller en klasse af stoffer på det relevante niveau. Disse metoder har en høj produktivitet og anvendes til at undersøge store mængder prøver for eventuelle ikke-overensstemmende resultater. De skal især forhindre falsk overensstemmende resultater.
- 1.36. Ved »enkelt-laboratorieundersøgelse (validering på ét laboratorium)« forstås en analyseprøvning, der kun inddrager ét laboratorium, ved anvendelse af én metode til at analysere samme eller forskellige prøvningsmaterialer under forskellige betingelser over tidsintervaller med en længde, der begrundes.
- 1.37. Ved »specificitet« forstås en metodes evne til at skelne mellem den analysand, der måles, og andre stoffer. Denne egenskab afhænger først og fremmest af den beskrevne måleteknik, men kan variere alt efter forbindelse eller matrix.

- 1.38. Ved »standardaddition« forstås en procedure, hvor den klargjorte prøve deles i to (eller flere) analyseprøver. Den ene analyseprøve analyseres uden videre, og der tilsættes kendte mængder af standardanalysanden til de øvrige analyseprøver inden analysen. Mængden af tilsat standardanalysand skal være to til fem gange større end den skønnede mængde analysand i prøven. Denne procedure tager sigte på at bestemme indholdet af en analysand i en prøve under hensyntagen til genfindelsen ved analysen.
- 1.39. Ved »standardanalysand« forstås en analysand med kendt og certificeret indhold og renhed, der anvendes som referencemateriale i analysen.
- 1.40. Ved »stof« forstås et stof af særlig eller bestemt kemisk sammensætning og dets metabolitter.
- 1.41. Ved »analyseprøve« forstås den mængde stof, der udtages af den klargjorte prøve, og som analyseres eller observeres.
- 1.42. Ved »klargjort prøve« forstås en prøve, der tilberedes på grundlag af laboratorieprøven, og hvoraf der udtages analyseprøver.
- 1.43. Ved »korrekthed« forstås graden af overensstemmelse mellem den gennemsnitsværdi, der er fremkommet ved en lang række prøvningsresultater, og en accepteret referenceværdi. Korrekthed udtrykkes normalt som systematisk fejl (2).
- 1.44. Ved »enheder« forstås de enheder, der er beskrevet i ISO 31 (20) og i direktiv 71/354/EØF (19).
- 1.45. Ved »validering« forstås verifikation — ved hjælp af undersøgelse og tilvejebringelse af faktiske kendsgerninger — af, at de særlige krav til et specifikt anvendelsesformål er opfyldt (1).
- 1.46. Ved »intern reproducerbarhed« forstås præcision opnået på samme laboratorium under forud fastsatte betingelser (f.eks. vedrørende metode, prøvningsmaterialer, personer og miljøforhold) over tidsintervaller med en længde, der begrundes.

2. KRITERIER FOR METODENS YDEEVNE OG ANDRE KRAV TIL ANALYSEMETODER

Andre analysemetoder eller kombinationer af metoder end dem, der beskrives i det følgende, må kun anvendes til screening eller verifikation, hvis det kan godtgøres, at de opfylder de relevante krav i denne beslutning.

2.1. GENERELLE KRAV

2.1.1. Håndtering af prøver

Prøver udtages, håndteres og tilberedes således, at der er størst mulig chance for at påvise stoffet. Der skal være procedurer for prøvehåndtering, der hindrer muligheden for kontaminering ved et uheld eller for tab af analysander.

2.1.2. Prøvnings ydeevne

2.1.2.1. Genfindelse

Genfindelsen under prøveanalysen bestemmes i hver batch af prøver, hvis der anvendes en fast genfindelseskorrrektionsfaktor. Hvis genfindelsen ligger inden for den givne grænse, kan den faste korrrektionsfaktor anvendes. I modsat fald anvendes genfindelsesfaktoren for den specifikke batch, medmindre den specifikke genfindelsesfaktor for analysanden i prøven skal anvendes. I så fald anvendes proceduren med standardaddition (jf. punkt 3.5) eller en intern standard til den kvantitative bestemmelse af en analysand i en prøve.

2.1.2.2. Specificitet

En metode skal kunne skelne mellem analysanden og de øvrige stoffer under forsøgsbetingelserne. Der skal foreligge et skøn over, i hvilket omfang dette er muligt. Der skal anvendes strategier til imødegåelse af eventuel interferens med stoffer, når den beskrevne målemetode anvendes, f.eks. det pågældende reststofs homologe og analoge stoffer samt metabolitter. Det er af største betydning, at interferens fra matrixkomponenter undersøges.

2.2. SCREENINGSMETODER

Analyseteknikker må kun anvendes til screening i overensstemmelse med direktiv 96/23/EF, hvis det kan godtgøres på en dokumenteret, sporbar måde, at de er validerede og har en falsk overensstemmende andel på < 5 % (β -fejl) på det relevante niveau. Hvis der er mistanke om et ikke-overensstemmende resultat, skal resultatet verificeres ved en verifikationsmetode.

2.3. VERIFIKATIONSMETODER FOR ORGANISKE RESTKONCENTRATIONER OG KONTAMINANTER

Verifikationsmetoder for organiske restkoncentrationer og kontaminanter skal så vidt muligt give information om analysandens kemiske struktur. Metoder, der udelukkende er baseret på chromatografisk analyse uden anvendelse af spektrometrisk detektion, er derfor ikke i sig selv egnede som verifikationsmetode. Hvis en enkelt teknik mangler tilstrækkelig specificitet, skal den ønskede specificitet imidlertid opnås ved hjælp af analysemetoder, der består af egnede kombinationer af oprensning, chromatografisk separation og spektrometrisk detektion.

Følgende metoder eller kombinationer af metoder anses for at kunne anvendes til identifikation af organiske restkoncentrationer og kontaminanter for de angivne grupper af stoffer:

Tabel 1

Egnede verifikationsmetoder for organiske restkoncentrationer og kontaminanter

Måleteknik	Stoffer i bilag I til direktiv 96/23/EF	Begrænsninger
LC eller GC med massespektrometri	Gruppe A og B	Kun efter en online- eller en offline-chromatografisk separation Kun hvis der anvendes full scan-teknikker eller anvendes mindst 3 (gruppe B) eller 4 (gruppe A) identifikationspoint for teknikker, der ikke registrerer full scan-spektre
LC eller GC med IR-spektrometri	Gruppe A og B	Specifikke krav til IR-spektrometriabsorption skal opfyldes
LC-full-scan DAD	Gruppe B	Specifikke krav til UV-spektrometriabsorption skal opfyldes
LC-fluorescens	Gruppe B	Kun for molekyler med naturlig fluorescens og for molekyler med fluorescens, der skyldes enten transformering eller derivatisering
2-D TLC — full-scan UV/VIS	Gruppe B	Det er obligatorisk at anvende todimensional HPTLC og co-chromatografi
GC-elektroncapturedetektion	Gruppe B	Kun hvis der anvendes to kolonner med forskellig polaritet
LC-immunogram	Gruppe B	Kun hvis der anvendes mindst to forskellige chromatografiske systemer eller yderligere en uafhængig detektionsmetode
LC-UV/VIS (én bølgelængde)	Gruppe B	Kun hvis der anvendes mindst to forskellige chromatografiske systemer eller yderligere en uafhængig detektionsmetode

2.3.1. Fælles kriterier for metodens ydeevne og andre krav

Verifikationsmetoder skal give information om analysandens kemiske struktur. Hvis mere end en forbindelse giver samme reaktion, kan metoden ikke skelne mellem disse forbindelser. Metoder, der udelukkende er baseret på chromatografisk analyse uden anvendelse af spektrometrisk detektion, er ikke i sig selv egnede som verifikationsmetode.

I begyndelsen af ekstraktionen tilsættes analyseprøven en egnet intern standard, hvis en sådan anvendes ifølge metoden. Afhængigt af hvad der er til rådighed, anvendes der enten isotopmærkede varianter af analysanden, som er særligt egnede til massespektrometrisk detektion, eller forbindelser, der strukturelt ligger tæt på analysanden.

Hvis der ikke kan anvendes en egnet intern standard, verificeres identifikationen af analysanden ved co-chromatografi. I så fald må der kun fremkomme én top, og forøgelsen af tophøjden (eller arealet) er lig med mængden af tilsat analysand. I forbindelse med gaschromatografi (GC) eller væskechromatografi (LC) skal bredden i halv højde være inden for området af 90 til 110 % af den oprindelige bredde, og retentionstiderne skal være identiske inden for en margen på 5 %. I forbindelse med tyndtlagschromatografi-metoder (TLC) må kun den plet, der antages at tilhøre analysanden, blive kraftigere; der må ikke fremkomme en ny plet, og udseendet må ikke ændres.

Referencemateriale eller materialer med tilsætning af analysand på eller nær ved det tilladte niveau eller beslutningsgrænsen (ikke-overensstemmende kontrolprøve) samt overensstemmende kontrolmaterialer og reagensblindprøver bør så vidt muligt gennemgå hele proceduren samtidig med hver enkelt batch af klargjorte prøver, der analyseres. Følgende rækkefølge for indsprøjtning af ekstrakterne i analyseapparatet anvendes: reagensblindprøve, overensstemmende kontrolprøve, prøve(r), der skal verificeres, igen overensstemmende kontrolprøve og endelig ikke-overensstemmende kontrolprøve. Hvis der afviges fra denne rækkefølge, skal det begrundes.

2.3.2. Supplerende kriterier for metodens ydeevne og andre krav til kvantitative analysemetoder

2.3.2.1. Kvantitative metoders korrekthed

Ved gentagne analyser af et certificeret referencemateriale er de vejledende intervaller for den ved forsøg bestemte gennemsnitlige massefraktions afvigelse korrigeret for genfindelse fra den certificerede værdi, som følger:

Tabel 2

Kvantitative metoders minimumskorrekthed

Massefraktion	Interval
≤ 1 µg/kg	- 50 til + 20 %
> 1-10 µg/kg	- 30 til + 10 %
≥ 10 µg/kg	- 20 til + 10 %

Hvis der ikke er sådanne CRM til rådighed, kan det accepteres, at målingernes korrekthed vurderes ved hjælp af genfindelse af tilsatte kendte mængder af analysanden/analyserne til matrixblindprøven. Data efter korrektion med den gennemsnitlige genfindelse kan kun accepteres, hvis de falder inden for intervallerne i tabel 2.

2.3.2.2. Kvantitative metoders præcision

Den sammenlignende variationskoefficient (CV) mellem laboratorier for gentagne analyser af et referencemateriale eller materiale med tilsætning af analysand må under reproducerbarhedsbetingelser ikke overstige det niveau, der er beregnet efter Horwitz-ligningen:

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

hvor C er massefraktionen udtrykt som en potens af 10 (f.eks. 1 mg/g = 10⁻³). Se eksempler i tabel 3.

Tabel 3

Eksempler på reproducerbarheds-CV for kvantitative metoder ved bestemte massefraktioner af analysand

Massefraktion	Reproducerbarheds-CV (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) For massefraktioner lavere end 100 µg/kg giver Horwitz-ligningen uacceptabelt høje værdier. Derfor skal CV for koncentrationer lavere end 100 µg/kg være så lav som muligt.

For analyser, der gennemføres under reproducerbarhedsbetingelser, udgør den interne CV typisk mellem halvdelen og to tredjedele af ovennævnte værdier. For analyser, der gennemføres under interne reproducerbarhedsbetingelser, må den interne laboratorie-CV ikke være større end reproducerbarheds-CV'en.

For stoffer, der er fastsat et tilladt niveau for, skal metoden opnå en intern laboratoriereproducerbarhed, der ikke er større end den modsvarende reproducerbarheds-CV ved en koncentration på 0,5 gange grænsen.

2.3.3. Kriterier for metodens ydeevne og andre krav til massespektrometrisk detektion

Massespektrometriske metoder kan kun bruges som verifikationsmetoder efter en online- eller en offline-chromatografisk separation.

2.3.3.1. Chromatografisk separation

For GC-MS-procedurer skal den gaschromatografiske separation udføres ved anvendelse af kapillarkolonner. For LC-MS-procedurer skal den chromatografiske separation udføres ved anvendelse af egnede LC-kolonner. Mindste acceptable retentionstid for den undersøgte analysand er i alle tilfælde to gange retentionstiden svarende til kolonnens dødvolumen. Retentionstiden (eller den relative retentionstid) for analysanden i analyseprøven skal stemme overens med kalibreringsstandardens inden for et nærmere specificeret tidsinterval. Retentionstidsintervallet skal stå i rimeligt forhold til chromatografisystemets opløsningsevne. Forholdet mellem analysandens chromatografiske retentionstid og den interne standard, dvs. analysandens relative retentionstid, skal svare til kalibreringsopløsningens med en margen på $\pm 0,5\%$ for GC og $\pm 2,5\%$ for LC.

2.3.3.2. Massespektrometrisk detektion

Massespektrometrisk detektion skal udføres ved hjælp af MS-teknikker, såsom helmassespektre (full scan) eller måling af udvalgte ioner (SIM), samt MS-MSⁿ-teknikker, såsom måling af udvalgte reaktioner (SRM), eller andre egnede MS eller MS-MSⁿ-teknikker i kombination med relevante ioniseringsformer. Ved højt opløsende massespektrometri (HRMS) skal opløsningsevnen typisk være større end 10 000 for hele masseintervallet ved 10 % af tophøjderne.

Full scan: Hvis massespektrometrisk detektion udføres ved registrering af full scan-spektre, skal alle målte diagnostiske ioner (molekylarionen, karakteristiske addukter af molekylarionen, karakteristiske fragmentioner og isotopioner) forekomme med en relativ intensitet på over 10 % i kalibreringsopløsningens referencspektrum.

SIM: Hvis massespektrometrisk detektion udføres ved fragmentografi, skal molekylarionen så vidt muligt være en af de udvalgte diagnostiske ioner (molekylarionen, karakteristiske addukter af molekylarionen, karakteristiske fragmentioner og alle deres isotopioner). De udvalgte diagnostiske ioner må ikke udelukkende hidrøre fra samme del af molekylet. Signal-støj-forholdet for hver diagnostisk ion skal være $\geq 3:1$.

Full scan og SIM: De påviste ioners relative intensiteter udtrykt som en procentdel af den mest intensive ions eller transitions intensitet skal svare til intensiteterne i kalibreringsstandard (enten fra kalibreringsstandardopløsningen eller prøver med tilsætning) i sammenlignelige koncentrationer målt under samme betingelser og inden for følgende tolerancegrænser:

Tabel 4

Maksimalt tilladte tolerancegrænser for relative ionintensiteter ved anvendelse af massespektrometriske metoder

Relativ intensitet (% af basistop)	El-GC-MS (relativ)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativ)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20-50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10-20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Fortolkning af massespektrumdata: De diagnostiske ioners og/eller prækursor-/produkt-ionpars relative intensiteter skal identificeres ved at sammenligne spektre eller ved at integrere signaler fra enkeltmassesporene. Når baggrundskorrektion anvendes, skal den anvendes på samme måde for hele batchen (jf. punkt 2.3.1, afsnit 4), og der skal oplyses klart herom.

Full scan: Hvis full scan-spektre registreres i én massespektrometri, skal der forekomme mindst fire ioner med en relativ intensitet på $\geq 10\%$ af basistoppen. Molekylarionen skal medtages, hvis den forekommer i referencspektret med en relativ intensitet på $\geq 10\%$. Mindst fire ioner skal ligge inden for de maksimalt tilladte tolerancegrænser for relative ionintensiteter (tabel 5). Bibliotekssøgning med edb kan anvendes. I så fald skal sammenligningen af massespektrumdata i de klargjorte prøver med kalibreringsopløsningens overstige en kritisk faktor for overensstemmelse. Faktoren bestemmes for hver analysand under valideringsprocessen på grundlag af spektre, som nedenstående krav er opfyldt for. Variation i spektrene, som skyldes prøvematrixen og detektorydeevnen, skal efterprøves.

SIM: Hvis massefraktioner måles på andre måder end ved full scan, skal der anvendes et system med identifikationspoint til at fortolke dataene. Til verifikation af forekomsten af stoffer tilhørende gruppe A i bilag I til direktiv 96/23/EF kræves der mindst 4 identifikationspoint. Til verifikation af forekomsten af stoffer tilhørende gruppe B i bilag I til direktiv 96/23/EF kræves der mindst 3 identifikationspoint. Nedenstående tabel viser, hvor mange identifikationspoint hver af de grundlæggende massespektrometriske metoder kan optjene. Der gælder dog følgende, for at de identifikationspoint, der kræves til verifikation, kan optjenes, og for at summen af identifikationspointene kan beregnes:

- Der skal måles mindst ét ionforhold.
- Alle relevante målte ionforhold skal opfylde ovennævnte krav.
- Der kan kombineres højst tre forskellige metoder for at opnå mindsteantallet af identifikationspoint.

Tabel 5

Forholdet mellem klasser af massefraktioner og optjente identifikationspoint

MS-metode	Identifikationspoint optjent pr. ion
Lavtopløsende massespektrometri (LR)	1,0
LR-MS ⁿ prækursor-ion	1,0
LR-MS ⁿ overgangsprodukter	1,5
HRMS	2,0
HR-MS ⁿ prækursor-ion	2,0
HR-MS ⁿ overgangsprodukter	2,5

Bemærkninger:

- Hver ion må kun regnes med én gang.
- GC-MS, der anvender elektronimpaktionisering, anses for en anden metode end GC-MS, der anvender kemisk ionisering.
- Forskellige analysander må kun anvendes til at øge antallet af identifikationspoint, hvis derivaterne har forskellige reaktionsegenskaber.
- Hvis der til analyse af stoffer i gruppe A i bilag I til direktiv 96/23/EF som metode anvendes en af følgende metoder, HPLC kombineret med full scan diodearray-spektrofotometri (DAD) eller HPLC kombineret med fluorescensdetektion eller HPLC kombineret med et immunogram eller todimensional TLC kombineret med spektrometrisk detektion, kan disse metoder højst bidrage med ét identifikationspoint, forudsat at de relevante krav til metoderne er opfyldt.
- Overgangsprodukter omfatter såvel datterprodukter som datterdatterprodukter.

Tabel 6

Eksempler på antallet af identifikationspoint, der optjenes for forskellige metoder og kombinationer heraf (n = et helt tal)

Metode(r)	Antal ioner	Identifikationspoint
GC-MS (EI eller CI)	N	n
GC-MS (EI og CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI eller CI) 2 derivater	2 (derivat A) + 2 (derivat B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prækursor og 2 døtre	4
LC-MS-MS	1 prækursor og 2 døtre	4
GC-MS-MS	2 prækursor-ioner, hver med 1 datter	5
LC-MS-MS	2 prækursor-ioner, hver med 1 datter	5
LC-MS-MS-MS	1 prækursor, 1 datter og 2 datterdøtre	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS og LC-MS	2 + 2	4
GC-MS og HRMS	2 + 1	4

2.3.4. Kriterier for metodens ydeevne og andre krav til chromatografi kombineret med infrarød detektion

Egnede toppe: Egnede toppe er absorptionsmaksima i kalibreringsstandardens IR-spektrum, der opfylder følgende krav.

2.3.4.1. Infrarød detektion

Absorptionsmaksimum: Det skal ligge i bølgetalsområdet 4 000-500 cm^{-1} .

Absorptionens intensitet: Den må ikke være mindre end

a) en specifik molær absorptionskoefficient på 40 i forhold til toppens basislinje, eller

b) en relativ absorptions på 12,5 % af absorptions af den mest intense top i området 4 000-500 cm^{-1} ,

når begge måles i forhold til nullinjen, og 5 % af absorptions af den mest intense top i området 4 000-500 cm^{-1} , når begge måles i forhold til deres basislinje.

NB: Skønt egnede toppe i henhold til litra a) kan foretrækkes af teoretiske grunde, er toppene i henhold til litra b) lettere at bestemme i praksis.

Antallet af toppe i analysandens IR-spektrum, hvis frekvenser svarer til en egnet top i kalibreringsstandardens spektrum, bestemmes inden for en margen på $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4.2. Fortolkning af IR-spektrumdata

Der skal forekomme absorption i alle områder af analysandens spektrum, som svarer til en egnet top i kalibreringsstandardens referencespektrum. Der kræves mindst seks egnede toppe i kalibreringsstandardens IR-spektrum. Hvis der er mindre end seks egnede toppe (7), kan det pågældende spektrum ikke anvendes som referencespektrum. »Overensstemmelsen«, dvs. procentdelen af egnede toppe i analysandens IR-spektrum, skal være mindst 50. Hvis en egnet top ikke har en nøjagtig modsvarende top i analysandens spektrum, skal det pågældende område i dette spektrum være foreneligt med, at der kunne være en modsvarende top. Proceduren kan kun anvendes på absorptionstoppe i prøvens spektrum med en intensitet på mindst tre gange støjen mellem toppene.

2.3.5. Kriterier for metodens ydeevne og andre krav til bestemmelse af en analysand ved hjælp af LC i kombination med andre detektionsmetoder

2.3.5.1. Chromatografisk separation

Der anvendes en intern standard, hvis der findes et egnet materiale til dette formål. Det skal helst være en beslægtet standard med en retentionstid, der ligger tæt på analysandens. Analysanden skal elueres ved den retentionstid, der er typisk for den tilsvarende kalibreringsstandard under de samme forsøgsbetingelser. Mindste acceptable retentionstid for en analysand er to gange retentionstiden svarende til kolonnens dødvolume. Forholdet mellem analysandens retentionstid og den interne standard, dvs. analysandens relative retentionstid, skal være den samme som kalibreringsstandardens med en margen på $\pm 2,5 \%$ i den givne matrix.

2.3.5.2. Full scan UV/VIS-detektion

Kriterierne for LC-metodernes ydeevne skal opfyldes.

Absorptionsmaksima i analysandens spektrum skal være på de samme bølgelængder som kalibreringsstandardens med en afvigelsesmargen, der afhænger af detektionssystemets opløsning. Ved diodearray-detektion ligger denne typisk inden for $\pm 2 \text{ nm}$. Analysandens spektrum over 220 nm må for de dele af de to spektre, hvor den relative absorptions er $\geq 10 \%$, ikke være synligt forskelligt fra kalibreringsstandardens. Dette krav er opfyldt, når de samme maksima er til stede, samtidig med at forskellen mellem de to spektre ikke på noget punkt er større end 10 % af kalibreringsstandardens absorptions. Hvis bibliotekssøgning med edb og overensstemmelsesprøvning anvendes, skal sammenligningen af spektrumsdata i de klargjorte prøver med kalibreringsopløsningens overstige en kritisk faktor for overensstemmelse. Faktoren bestemmes for hver analysand under valideringsprocessen på grundlag af spektre, som ovenstående krav er opfyldt for. Variation i spektrene, som skyldes prøvematrixen og detektordeevnen, skal efterprøves.

2.3.5.3. Kriterier for fluorimetrisk detektions ydeevne

Kriterierne for LC-metodernes ydeevne skal opfyldes.

Dette gælder for molekyler med naturlig fluorescens og for molekyler med fluorescens, der skyldes enten transformering eller derivatisering. Eksitations- og emissionsbølgelængderne i kombination med de chromatografiske betingelser skal udvælges, så forekomsten af interfererende komponenter i blindprøveekstrakter minimeres.

Det nærmeste top-maksimum i chromatogrammet skal være adskilt fra den top, der tilskrives analysanden, med mindst én hel topbredde på 10 % af analysandens maksimale højde.

2.3.5.4. Kriterier for ydeevnen ved bestemmelse af en analysand ved hjælp af LC-immunogram

LC-immunogram er ikke i sig selv egnet som verifikationsmetode.

De relevante kriterier for LC-metoder skal opfyldes.

De foruddefinerede kvalitetskontrolparametre, f.eks. ikke-specifik binding, kontrolprøvernes relative binding og blindprøvens absorptionsværdi, skal ligge inden for de grænser, der blev opnået ved valideringen af assayet.

Immunogrammet skal være sammensat af mindst fem fraktioner.

Hver fraktion skal være mindre end det halve af topbredden.

Den fraktion, der har det største indhold af analysanden, skal være den samme i prøven under mistanke, i den ikke-overensstemmende kontrolprøve og i standarden.

2.3.5.5. Bestemmelse af en analysand ved hjælp af LC i kombination med UV/VIS-detektion (én bølgelængde)

LC i kombination med UV/VIS-detektion (én bølgelængde) er ikke i sig selv egnet som verifikationsmetode.

Det nærmeste top-maksimum i chromatogrammet skal være adskilt fra den top, der tilskrives analysanden, med mindst én hel topbredde på 10 % af analysandens maksimale højde.

2.3.6. **Kriterier for metodens ydeevne og andre krav til bestemmelse af en analysand ved hjælp af 2-D TLC kombineret med full scan UV/VIS-spektrometrisk detektion**

Det er obligatorisk at anvende todimensional HPTLC og co-chromatografi.

Analysandens RF-værdier skal stemme overens med standardens RF-værdier inden for en margen på $\pm 5\%$.

Analysandens udseende må ikke kunne skelnes fra standardens.

For pletter af samme farve skal centrum af den nærmeste stofplet være adskilt fra analysandens plet med mindst halvdelen af summen af pletternes diameter.

Analysandens spektrum må ikke være synligt forskelligt fra standardens, jf. beskrivelsen af full scan UV/VIS-detektion.

Hvis bibliotekssøgning med edb og overensstemmelsesprøvning anvendes, skal sammenligningen af spektrumsdata i de klargjorte prøver med kalibreringsopløsningens overstige en kritisk faktor for overensstemmelse. Faktoren bestemmes for hver analysand under valideringsprocessen på grundlag af spektre, som ovenstående krav er opfyldt for. Variation i spektrene, som skyldes prøvematrixen og detektorydeevnen, skal efterprøves.

2.3.7. **Kriterier for metodens ydeevne og andre krav til bestemmelse af en analysand ved hjælp af GC i kombination med elektroncapturedetektion (ECD)**

Der anvendes en intern standard, hvis der findes et egnet materiale til dette formål. Det skal helst være et beslægtet stof med en retentionstid, der ligger tæt på analysandens. Analysanden skal elueres ved en retentionstid, der er typisk for den tilsvarende kalibreringsstandard under de samme forsøgsbetingelser. Mindste acceptable retentionstid for en analysand er to gange retentionstiden svarende til kolonnens dødvolumen. Forholdet mellem analysandens retentionstid og den interne standard, dvs. analysandens relative retentionstid, skal være den samme som kalibreringsstandardens med en margen på $\pm 0,5\%$ i den givne matrix. Det nærmeste top-maksimum i chromatogrammet skal være adskilt fra den top, der tilskrives analysanden, med mindst én hel topbredde på 10 % af analysandens maksimale højde. Til indsamling af yderligere oplysninger kan co-chromatografi anvendes.

2.4. VERIFIKATIONSMETODER VEDRØRENDE GRUNDSTOFFER

Verifikationsanalyser vedrørende kemiske grundstoffer skal baseres på entydig identifikation samt nøjagtig og præcis kvantitativ bestemmelse ved hjælp af fysiske-kemiske egenskaber, der entydigt kendetegner det pågældende kemiske grundstof (f.eks. emitteret eller absorberet strålings bølglængde og atommasse, der karakteriserer grundstoffer) på det relevante niveau.

Følgende metoder eller kombinationer af metoder anses for at kunne anvendes til identifikation af kemiske grundstoffer:

Tabel 7

Egnede verifikationsmetoder vedrørende kemiske grundstoffer

Metode	Målt parameter
Differentialpuls anodisk stripping-voltametri	Elektrisk signal
Atomabsorptionsspektrometri	
Flamme	Absorptionsbølglængde
Hydridgenerering	Absorptionsbølglængde
Kold flammeløs	Absorptionsbølglængde
Elektrotermisk atomisering (grafitovn)	Absorptionsbølglængde
Atomemissionspektrometri	
Induktivt koblet plasma	Emissionsbølglængde
Massespektrometri	
Induktivt koblet plasma	Masse/ladning-forhold

2.4.1. Fælles kriterier for metodens ydeevne og andre krav til verifikationsmetoder

Referencemateriale eller materialer med tilsætning af kendte mængder analysand på eller nær ved det maksimalt tilladte niveau eller beslutningsgrænsen (ikke-overensstemmende kontrolprøve) samt overensstemmende kontrolmaterialer og reagensblindprøver bør så vidt muligt gennemgå hele proceduren samtidig med hver enkelt batch af klargjorte prøver, der analyseres. Der anbefales følgende rækkefølge for indsprøjtning af ekstrakterne i analyseapparatet: reagensblindprøve, overensstemmende kontrolprøve, prøve, der skal verificeres, overensstemmende kontrolprøve og endelig ikke-overensstemmende kontrolprøve. Hvis der afviges herfra, skal det begrundes.

De fleste analysemetoder kræver generelt en komplet foraskning af den organiske matrix for at opnå opløsninger forud for bestemmelse af analysanden. Foraskningen kan ske ved at anvende mikrobølgeminereringsmetoder, som minimerer risikoen for tab og/eller kontaminering af den pågældende analysand. Der bør anvendes dekontaminerede teflon-kuvetter af god kvalitet. Hvis der anvendes andre våd- eller tørforaskningsmetoder, skal der foreligge dokumentation for at undgå potentielt tab eller kontaminering. Som et alternativ til foraskning kan separationsprocedurer (f.eks. ekstraktion) i visse situationer anvendes til at separere og/eller koncentrere analysander fra matrixkomponenter og/eller til at koncentrere analysander for at anvende dem i analyseapparatet.

Hvad angår kalibrering, hvad enten den er ekstern eller baseret på metoden med standardaddition, skal man sørge for at holde sig inden for analysemetodens måleområde. Ved ekstern kalibrering skal kalibreringsstandarderne forberedes i en opløsning, der i så høj grad som muligt svarer til den klargjorte prøves sammensætning. Der skal endvidere anvendes baggrundskorrektion som foreskrevet af de specifikke analysevilkår.

2.4.2. Supplerende kriterier for metodens ydeevne og andre krav til kvantitative analysemetoder

2.4.2.1. Kvantitative metoders korrekthed

Ved gentagne analyser af et certificeret referencemateriale for grundstoffer må det ved forsøg bestemte gennemsnitlige indholds afvigelse fra den certificerede værdi ikke overskride grænsen $\pm 10\%$. Hvis der ikke er sådanne CRM til rådighed, kan det accepteres, at målingernes korrekthed vurderes ved hjælp af genfindelse af tilsatte kendte mængder af grundstoffet til blindprøven. NB: Det tilsatte grundstof er i modsætning til analysanden ikke kemisk bundet i den reelle matrix, og de resultater, der fås ved denne fremgangsmåde, er derfor ikke så brugbare som dem, der fås ved anvendelse af CRM. Genfindelsesdata kan kun anvendes, hvis de ligger inden for $\pm 10\%$ af målværdien.

2.4.2.2. Kvantitative metoders præcision

Ved gentagne analyser af en prøve, der gennemføres under interne reproducerbarhedsbetingelser, må gennemsnittets interne variationskoefficient (CV) ikke overskride følgende værdier:

Tabel 8

CV'er for kvantitative metoder ved bestemte massefraktioner af grundstof

Massefraktion	CV (%)
≥ 10-100 µg/kg	20
> 100-1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. Specifikke krav til differentialpuls anodisk stripping voltametri (DPASV)

Det er af største betydning, at det organiske stof i prøver destrueres fuldstændigt, før der foretages bestemmelser ved DPASV. Der må ikke findes nogen brede signaler i voltamogrammerne som følge af tilstedeværelsen af organiske stoffer. Tophøjderne ved DPASV kan blive påvirket af uorganiske matrixkomponenter. Derfor skal der foretages kvantitativ bestemmelse ved hjælp af metoden med standardaddition. Metodebeskrivelsen skal indeholde eksempler på typiske voltamogrammer af en prøveopløsning.

2.4.4. Specifikke krav til atomabsorptionsspektrometri (AAS)

Denne metode anvendes generelt til enkeltgrundstoffer, og den kræver derfor optimering af forsøgsopstillingen afhængigt af det pågældende grundstof, der skal bestemmes kvantitativt. Om muligt skal resultaterne efterprøves kvalitativt og kvantitativt ved hjælp af alternative absorptionslinjer (ideelt skal der vælges to forskellige linjer). Kalibreringsstandarder skal tilberedes i en opløsningsmatrix, der svarer så nøje som muligt til matrixen i måleopløsninger af prøven (f.eks. med hensyn til syrekonzentration eller modifikatorsammensætning). For at minimere blindværdier skal alle reagenser være af den størst mulige renhed. Afhængigt af metoden til at forstøve og/eller atomisere prøven kan man skelne mellem forskellige typer AAS.

2.4.4.1. Specifikke krav til AAS med flamme

Apparatindstillingen skal optimeres for hvert grundstof. Navnlig skal gassammensætningen og flow-rates tjekkes. For at undgå interferens, der skyldes baggrundsabsorption, skal der anvendes en kontinuumkildekorrektor. Ved ukendte matrixer skal det efterprøves, om der er behov for baggrundskorrektion.

2.4.4.2. Specifikke krav til AAS med grafitovn

Kontaminering i laboratoriet påvirker ofte nøjagtigheden, når der arbejdes ved ultrasopniveauer i grafitovnen. Derfor bør der anvendes reagenser af høj renhed, afioniseret vand og inert plastic til håndtering af prøve og standard. Apparatindstillingen for hvert grundstof skal optimeres. Navnlig skal forbehandlings- og atomiseringsbetingelser (temperatur og tid) samt matrixmodifikationen tjekkes.

Hvis man arbejder under isoterme atomiseringsbetingelser (f.eks. grafitrør med indbygget L'vov-plattform (8) opvarmet ved gennemstrømning), vil det reducere matrixens påvirkning af atomiseringen af analysanden. I kombination med matrixmodifikation og Zeeman-baggrundskorrektion (9) kan der foretages kvantitativ bestemmelse ved hjælp af en kalibreringskurve baseret på måling af vandige standardopløsninger.

2.4.5. Specifikke krav til hydridgenereringsatomabsorptionsspektrometri

Organiske forbindelser, der indeholder grundstoffer som arsen, bismut, germanium, bly, antimon, selen, tin og tellurium, kan være meget stabile og kræve oxidativ dekomponering, for at man kan opnå korrekte resultater for det samlede grundstofindhold. Derfor anbefales mikrobølge- eller højtryksforskning under kraftige oxidative betingelser. Man skal være meget omhyggelig med den komplette og reproducerbare konvertering af grundstofferne til de tilsvarende hydridler.

Dannelsen af arsenhydrid i saltsyreopløsning med NaBH₄ afhænger af arsenets oxidationstrin (As III: hurtig dannelse, As V: mere langvarig dannelse). For at undgå tab af følsomhed vedrørende bestemmelse af As V med flowinjektion som følge af den korte reaktionstid i dette system skal As V reduceres til As III efter den oxidative dekomponering. Kaliumiodid/ascorbinsyre eller cystein er egnet til det formål. Blindprøver, kalibreringsopløsninger og prøveopløsninger skal behandles på samme måde. Hvis man arbejder med et batchsystem, kan begge arsen-specier bestemmes, uden at nøjagtigheden påvirkes. På grund af den forsinkede dannelse af As V-hydrid skal kalibrering udføres ved integrering af toparealer. Apparatindstillingen skal optimeres. Det gasflow, der overfører hydridet til atomisatoren, er særlig vigtigt og skal efterprøves.

2.4.6. Specifikke krav til kold flammeløs atomabsorptionsspektrometri

Kold flammeløs spektrometri anvendes kun til kviksølv. På grund af fordampning og adsorptionstab af frit kviksølv skal man være særdeles omhyggelig under hele analysen. Man skal med omhu undgå kontaminering på grund af reagenser eller miljø.

Organiske forbindelser, der indeholder kviksølv, kræver oxidativ dekomponering, for at korrekte resultater for det samlede kviksølvindhold kan opnås. Til dekomponeringen skal man anvende forseglede systemer med mikrobølge- eller højtryksforaskning. Man skal være særligt omhyggelig med at rense udstyr, der har været i kontakt med kviksølv.

Der er fordele ved at arbejde med flowinjektion. Ved forholdsvis lave beslutningsgrænser anbefales adsorption af frit kviksølv på guld-/platin-adsorber efterfulgt af termisk desorption. Det skal undgås, at adsorberer eller cellen kommer i kontakt med vand, da det vil forstyrre målingen.

2.4.7. Specifikke krav til induktivt koblet plasma-atomemissionsspektrometri (ICP-AES)

Induktivt koblet plasma-atomemissionsspektrometri (10) er en metode, der gør det muligt at måle flere forskellige grundstoffer samtidig. For at anvende ICP-AES skal prøverne først foraskes til dekomponerede organiske matrixer. Man skal anvende forseglede systemer med mikrobølge- eller højtryksforaskning. Apparatkalibrering og valg af grundstof eller bølgelængde er afgørende for en ICP-AES-analyses effektivitet. For at kalibrere apparatet er det ved lineære kalibreringskurver normalt nødvendigt at måle kalibreringsopløsninger af kun fire koncentrationer, fordi ICP-AES-kalibreringskurver generelt er lineære over fire til seks forskellige koncentrationer. Kalibrering af ICP-AES-systemet skal normalt udføres med en standard med flere grundstoffer, som skal forbehandles i en opløsning, som indeholder samme syrekonzentration som den opløsning, der skal måles. Grundstofkoncentrationerne skal efterprøves med hensyn til den lineære kurve.

Valget af bølgelængder til måling af emissionen fra analysanden skal være relevant for koncentrationerne af de grundstoffer, der skal bestemmes. Hvis analysandkoncentrationen falder uden for en emissionslinjes måleområde, skal der anvendes en anden emissionslinje. I første omgang skal den mest følsomme emissionslinje (uden interferens) vælges, dernæst en mindre følsom linje. Hvis man arbejder på eller nær ved detektionsgrænsen, er den mest følsomme linje for den pågældende analysand normalt det bedste valg. Spektral interferens og baggrundsinterferens forårsager store problemer for ICP-AES. Mulige interferenser er f.eks. simpel baggrundsfor skydning, hældende baggrundsfor skydning, direkte spektral overlapning og kompleks baggrundsfor skydning. Hver af disse interferenser har sine egne årsager og afhjælpningsmuligheder. Afhængigt af matrixerne skal der anvendes interferenskorrektion og optimering af parametre. Nogle interferenser kan undgås ved fortynding eller ved tilpasning af matrixerne. Ved hver analyseret batch af analyserede klargjorte prøver skal referencemateriale eller materiale med tilsætning af analysand samt blindmateriale behandles på samme måde som de klargjorte prøver. Standarden skal efterprøves for evt. skred efter ti prøver. Alle reagenser og plasmagas skal være af den størst mulige renhed.

2.4.8. Specifikke krav til induktivt koblet massespektrometri (ICP-MS)(11)

Ved bestemmelse af sporstoffer af middelstor atommasse, f.eks. chrom, kobber og nikkel, kan der forekomme kraftig interferens fra andre isobar- og polyatomarioner. Det kan kun imødegås, hvis der kan anvendes en opløsningsevne på mindst 7 000-8 000. Problemerne i forbindelse med MS-metoder omfatter også apparatskred, matrixeffekter og molekylarioninterferens ($m/z < 80$). Der kræves flere interne standarder, som dækker det samme masseinterval som de grundstoffer, der skal bestemmes, for at korrigere for apparatskred og matrixeffekter.

Det organiske stof i prøver dekomponeres fuldstændigt, før der foretages målinger med ICP-MS. Som ved AAS skal flygtige grundstoffer, f.eks. jod, efter foraskning i forseglede kuvetter overføres til et stabilt oxidationstrin. De værste interferensresultater skyldes molekylarionkombination af argon (plasmagas), hydrogen, carbon, nitrogen og oxygen (opløsningssyrer, urenheder i plasmagas og indblandede atmosfæriske luftarter) samt prøvematrixen. For at undgå interferens skal der anvendes komplet foraskning, baggrundsmålinger, relevant valg af analysemasse, evt. kombineret med mindre hyppig forekomst (lavere detektionsgrænse), og af opløsningssyrer, f.eks. salpetersyre.

For de grundstoffer, der skal bestemmes, skal interferens imødegås ved hjælp af relevant valg af specifikke analysemasser, herunder verifikation af isotopforhold. Instrumentreaktion vedrørende Fano-faktorer skal efterprøves for hver måling ved hjælp af interne standarder.

3. VALIDERING

Validering skal godtgøre, at analysemetoden er i overensstemmelse med de krav, der gælder for de relevante karakteristika for metodens ydeevne.

Forskellige kontrolformål forudsætter forskellige kategorier af metoder. Følgende tabel viser, hvilke karakteristika for metodens ydeevne der skal verificeres for hvilke typer metoder.

Tabel 9

Klassificering af analysemetoder efter de karakteristika, der skal bestemmes

		Detektionsgrænse CC β	Beslutningsgrænse CC α	Korrektthed/ genfindelse	Præcision	Selektivitet/ specificitet	Anvendelsesområde/ robusthed/ stabilitet
Kvalitative metoder	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvalitative metoder	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = screeningsmetoder; C = verifikationsmetoder; + = obligatorisk bestemmelse.

3.1. VALIDERINGSPROCEDURER

I dette kapitel findes der eksempler på og/eller referencer til procedurer for validering af analysemetoder. Der kan anvendes andre procedurer at vise, at analysemetoden er i overensstemmelse med kriterierne for karakteristika for metodens ydeevne, forudsat at de giver samme informationsniveau og -kvalitet.

Validering kan endvidere ske ved at gennemføre en laboratoriesammenligning, f.eks. som fastlagt af Codex Alimentarius, ISO eller IUPAC (12), eller ifølge alternative metoder, f.eks. enkeltlaboratorieundersøgelser eller validering på ét laboratorium (13)(14). I dette afsnit fokuseres der på enkeltlaboratorieundersøgelser (eller validering på ét laboratorium) ved hjælp af en trinvis fremgangsmåde. Fremgangsmåden omfatter:

- 1) en række fælles karakteristika for metodens ydeevne, der er uafhængige af den anvendte valideringsmodel
- 2) mere specifikke modelafhængige procedurer, jf. tabel 10.

Tabel 10

Modelafhængige og modeluafhængige resultatparametre

Validering		
Modeluafhængige resultatparametre	Modelafhængige resultatparametre	
Fælles karakteristika for metodens ydeevne (3.1.1)	Konventionel valideringsprocedure (3.1.2)	Procedure med validering på ét laboratorium (3.1.3)
Specificitet	Genfindelse	Genfindelse
Korrektthed	Repeterbarhed	Repeterbarhed
Robusthed (mindre ændringer)	Intern reproducerbarhed	Intern reproducerbarhed
Stabilitet	Reproducerbarhed	Reproducerbarhed
	Beslutningsgrænse (CC α)	Beslutningsgrænse (CC α)
	Detektionsevne (CC β)	Detektionsevne (CC β)
	Kalibreringskurver	Kalibreringskurver
	Robusthed (større ændringer)	Robusthed

3.1.1. Modelafhængige karakteristika for metodens ydeevne

Uanset hvilken valideringsprocedure der vælges, skal nedenstående karakteristika for metodens ydeevne bestemmes. For at minimere arbejdsbyrden kan der anvendes en omhyggeligt udformet og statistisk velfunderet procedure til at kombinere forsøg, der er gennemført med henblik på at bestemme forskellige parametre.

3.1.1.1. Specificitet

For analysemetoder er det vigtigt, at de kan skelne mellem analysanden og nærtbeslægtede stoffer (isomerer, metabolitter, nedbrydningsprodukter, endogene stoffer, matrixkomponenter osv.). Det er nødvendigt med to procedurer til at efterprøve for interferens.

Derfor skal der vælges potentielt interfererende stoffer, og relevante blindprøver skal analyseres for at påvise forekomsten af mulige interferenser og for at vurdere virkningen af interferenserne.

- Der vælges en række kemisk beslægtede forbindelser (metabolitter, derivater osv.) eller stoffer, der kan forventes at forekomme i kombination med den pågældende forbindelse, som måske forekommer i prøverne.
- Et passende antal repræsentative blindprøver analyseres ($n \geq 20$), og der tjekkes for eventuelle interferenser (signaler, toppe, ionspor) i det pågældende område, hvor analysanden forventes at eluere.
- Repræsentative blindprøver skal dernæst spikes til en relevant koncentration med stoffer, der kan forventes at interferere med identifikationen og/eller den kvantitative bestemmelse af analysanden.
- Efter analysen undersøges det, om
 - forekomsten kan føre til en falsk identifikation
 - identifikationen af analysanden hindres af forekomsten af en eller flere interferenser, eller
 - den kvantitative bestemmelse påvirkes i betydelig grad.

3.1.1.2. Korrekthed

Det beskrives i dette afsnit, hvordan korrekthed (der er et element i nøjagtigheden) bestemmes. Korrekthed kan kun fastlægges ved hjælp af certificeret referencemateriale (CRM). Et CRM kan altid anvendes, hvis det er til rådighed. Proceduren er nærmere beskrevet i ISO 5725-4 (5). Et eksempel:

- Seks replikater af det pågældende CRM analyseres i overensstemmelse med metodens prøvningsvejledning.
- Koncentrationen af den analysand, der forekommer i alle replikatprøverne, bestemmes.
- Der foretages en beregning af gennemsnit, standardafvigelse og variationskoefficient (%) i de pågældende koncentrationer.
- Korrektheden beregnes ved at dividere den påviste gennemsnitskoncentration med den certificerede værdi (målt som koncentration) og gange med 100 for at udtrykke resultatet som en procentdel:

korrekthed (%) = påvist gennemsnitskoncentration korrigeret for genfindelse $\times 100$ /certificeret værdi.

Hvis der ikke er et CRM til rådighed, kan genfindelse — i stedet for korrektheden — bestemmes som beskrevet i punkt 4.1.2.1.

3.1.1.3. Anvendelsesområde/robusthed (mindre ændringer)

Ved sådanne prøvninger indfører laboratoriet forsætligt mindre, forventelige variationer, og virkningerne observeres.

Der skal gennemføres forundersøgelser ved at udvælge faktorer fra forbehandlingen af prøver, rensningen og analysen, som evt. kan påvirke måleresultaterne. Det kan være faktorer som person, reagensernes kilde og alder, opløsningsmidler, standarder og prøveekstrakter, opvarmningstrin, temperatur, pH-værdi og mange andre faktorer, der kan forekomme i laboratoriet. Faktorerne bør modificeres i et omfang, der stemmer overens med afvigelse, der normalt forekommer i laboratorier.

- Mulige faktorer, der kan påvirke resultaterne, identificeres.
- De enkelte faktorer modificeres en smule.

- Der gennemføres en robusthedstest med anvendelse af Youden-proceduren (15) (16). (Andre godkendte metoder kan anvendes på dette punkt. Youden-proceduren minimerer dog den krævede tid og indsats). Youden-proceduren er en fraktionsfaktormodel. Interaktioner mellem de forskellige faktorer kan ikke påvises.
- Hvis det konstateres, at en faktor påvirker måleresultaterne betydeligt, gennemføres yderligere forsøg for at afgøre grænserne for, hvornår faktoren kan accepteres.
- Faktorer, der påvirker resultaterne betydeligt, bør klart angives i metodeprotokollen.

Grundidéen er ikke at undersøge en forandring ad gangen, men at indføre flere variationer samtidig. Eksempel: Lad A, B, C, D, E, F, G stå for de nominelle værdier af syv forskellige faktorer, der kan påvirke resultaterne, hvis deres nominelle værdier ændres en smule. Lad deres alternative værdier være betegnet ved de tilsvarende små bogstaver, a, b, c, d, e, f og g. Det giver 2^7 eller 128 forskellige mulige kombinationer.

Der kan vælges otte kombinationer, hvor der er ligevægt mellem store og små bogstaver (tabel 11). Der skal da foretages otte bestemmelser, hvor der anvendes en kombination af de valgte faktorer (A-G). Resultaterne af bestemmelserne er vist i tabel 11 som S-Z.

Tabel 11

Forsøgsmodel for prøvning af robusthed (mindre ændringer)

Faktorværdi F	Kombination af bestemmelser							
	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
Observeret resultat R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Angående beregninger: Se eksempler på prøvning af robusthed i punkt 3.3.

3.1.1.4. Stabilitet

Man har observeret, at utilstrækkelig stabilitet hos analysanden eller matrixkomponenterne i prøven under opbevaring eller analyse kan medføre betydelige afvigelser mellem analyseresultaterne. Endvidere bør kalibreringsstandardens stabilitet efterprøves. Almindeligvis er karakteristika for en analysands stabilitet under diverse opbevaringsforhold kendte. Måling af opbevaringsforhold skal udgøre en del af det normale laboratorieakkrediteringssystem. Hvis de ikke er kendte, gives i det følgende et eksempel på, hvordan stabiliteten kan bestemmes.

Analysandens stabilitet i opløsning

- Friske stamopløsninger til opbevaring af analysanden/analyserne laves, og de fortyndes som angivet i prøvningsvejledningen til tilstrækkelige delprøver (f.eks. 40) af hver udvalgt koncentration (omkring minimumsgrænserne for metodens ydeevne for stoffer, der ikke er fastsat et tilladt niveau for, eller omkring det tilladte niveau for andre stoffer). Begge analysandopløsninger, der anvendes til tilsætning og i den endelige analyseopløsning, laves, og det samme gælder evt. andre opløsninger, der måtte være af interesse (f.eks. derivatiserede standarder).
- Analysandindhold i den nylavede opløsning måles i overensstemmelse med prøvningsvejledningen.
- Passende mængder kommes i egnede beholdere, der mærkes og opbevares ifølge planen:

Tabel 12

Plan for bestemmelse af en analysands stabilitet i opløsning

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Mørke	10 delprøver	10 delprøver	10 delprøver
Lys			10 delprøver

- Der kan vælges en opbevaringstid på 1, 2, 3 og 4 uger eller om nødvendigt længere, f.eks. indtil de første nedbrydningsstegn kan observeres ved identifikation og/eller kvantitativ bestemmelse. Maksimal opbevaringstid og optimale opbevaringsforhold registreres.
- Beregningen af koncentrationen af analysanden/analyserne i hver delprøve bør foretages ved at lade den på analysetidspunktet nylavede analysandopløsning være 100 %.

$$\text{Resterende analysand (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fresh}}$$

C_i = koncentration på det givne tidspunkt

C_{fresh} = koncentration i nylavet opløsning.

Analysandens/analysernes stabilitet i matrix

- Om muligt anvendes naturlige prøver. Hvis der ikke er naturligt materiale til rådighed, anvendes matrix tilsat analysanden.
- Hvis der er naturligt materiale til rådighed, bestemmes koncentrationen i materialet, mens materialet endnu er nyt. Yderligere delprøver af materialet kan udtages efter 1, 2, 4 og 20 uger, og koncentrationerne bestemmes. Vævet opbevares ved - 20 °C eller derunder, hvis det kræves.
- Hvis der ikke er naturligt materiale til rådighed, tages noget blindmateriale, der homogeniseres. Materialet deles i fem delprøver. Hver delprøve tilsættes analysanden, som helst skal laves i en lille mængde i vandig opløsning. Den ene delprøve analyseres straks. De resterende delprøver opbevares ved - 20 °C eller derunder, hvis det kræves, og de analyseres efter 1, 2, 4 og 20 uger.

3.1.1.5. Kalibreringskurver

Hvis kalibreringskurver anvendes til kvantitativ bestemmelse, gælder følgende:

- Der bør anvendes mindst fem niveauer (inklusive nul) til kurven.
- Kurvens måleområde beskrives.
- Kurvens matematiske formel og dataenes goodness-of-fit til kurven beskrives.
- Acceptområder for kurvens parametre beskrives.

Hvis det er nødvendigt med seriel kalibrering baseret på en standardopløsning, skal der angives acceptable områder for de af kalibreringskurvens parametre, der kan variere fra serie til serie.

3.1.2. Konventionelle valideringsprocedurer

Beregning af parametrene ifølge konventionelle metoder forudsætter, at der gennemføres en række enkeltforsøg. Hvert enkelt karakteristiskum for metodens ydeevne skal bestemmes for alle større forandringer (jf. punktet om anvendelsesområde/robusthed). Ved multianalysandmetoder kan flere analyser analyseres samtidig, hvis blot man forinden udelukker evt. relevante interferenser. Adskillige karakteristika for metodens ydeevne kan bestemmes på lignende måde. For at minimere arbejdsbyrden anbefales det derfor, at forsøg i så høj grad som muligt kombineres (f.eks. repeterbarhed og intern reproducerbarhed med specificitet, analyse af blindprøver for at bestemme beslutningsgrænsen og test for specificitet).

3.1.2.1. Genfindelse

Hvis der ikke er CRM til rådighed, skal genfindelsen bestemmes ved forsøg, hvor der anvendes matrixblindprøve tilsat analysanden, f.eks. ifølge følgende fremgangsmåde:

- 18 delprøver af blindmateriale vælges og opdeles i tre grupper a seks delprøver, som hver tilsættes henholdsvis 1, 1½ og 2 gange minimumsgrænsen for metodens ydeevne eller ½, 1 og 1½ gange det tilladte niveau.
- Prøverne analyseres, og koncentrationen i de enkelte prøver beregnes.

- Ved hjælp af nedenstående ligning beregnes genfindelsen for hver enkelt prøve.
- Den gennemsnitlige genfindelse og CV fra de seks resultater fra hver gruppe beregnes.
- % genfindelse = $100 \times \text{målt indhold/tilsætningsniveau}$.

Denne konventionelle metode til bestemmelse af genfindelse er en variant af metoden med standardaddition (jf. punkt 3.5), hvis

- prøven betragtes som en blindprøve i stedet for en prøve, der skal analyseres
- det antages, at indhold⁽¹⁾ og genfindelse⁽²⁾ er ens for de to analyseprøver
- de klargjorte prøvers masse er ens, og analyseprøveekstrakterne har samme rumfylde
- mængden af den kalibreringsstandard, der tilsættes den anden analyseprøve (med tilsætning), betegnes x_{ADD} ($x_{ADD} = \rho_A \cdot V_A$)
- x_1 er den målte værdi for blindprøven, og x_2 er den målte værdi for den anden analyseprøve (med tilsætning),
- da er % genfindelse = $100 (x_2 - x_1)/x_{ADD}$.

Hvis en af disse betingelser ikke (eller formodes ikke at) skulle opfyldes, skal man gennemføre hele proceduren til bestemmelse af genfindelsen ved hjælp af metoden med standardaddition (jf. punkt 3.5).

3.1.2.2. Repeterbarhed

- Der laves en række identiske matrixprøver, som tilsættes analysanden, så koncentrationerne kommer op på 1, 1½ og 2 gange minimumsgrænsen for metodens ydeevne eller ½, 1 og 1½ gange det tilladte niveau.
- På hvert niveau gennemføres analysen med mindst seks replikater.
- Prøverne analyseres.
- Den påviste koncentration i hver prøve beregnes.
- Der foretages en beregning af gennemsnitskoncentration, standardafvigelse og variationskoefficient (%) i prøverne med tilsætning.
- Ovenstående trin gentages ved mindst to andre lejligheder.
- Gennemsnitskoncentrationer og CV for alle prøver med tilsætning beregnes.

3.1.2.3. Intern reproducerbarhed

- Der laves en række prøver af specificeret prøvemateriale (identiske eller forskellige matrixer), som tilsættes analysanden/analyserne, så koncentrationerne kommer op på 1, 1½ og 2 gange minimumsgrænsen eller ½, 1 og 1½ gange det tilladte niveau.
- På hvert niveau gennemføres analysen med mindst seks replikater.
- Ovenstående trin gentages ved mindst to andre lejligheder med forskellige personer og forskellige miljøbetingelser, f.eks. forskellige batcher af reagenser, opløsningsmidler osv., forskellige rumtemperaturer, forskellige apparater osv. om muligt.
- Prøverne analyseres.
- Den påviste koncentration i hver prøve beregnes.
- Der foretages en beregning af gennemsnitskoncentration, standardafvigelse og variationskoefficient (%) i prøverne med tilsætning.

3.1.2.4. Reproducerbarhed

Hvis reproducerbarhed skal verificeres, bør laboratorierne deltage i metodeafprøvninger i overensstemmelse med ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. Beslutningsgrænse (CCa)

Beslutningsgrænsen fastlægges i overensstemmelse med kravene til identifikation eller til identifikation plus kvantitativ bestemmelse, jf. »Kriterier for metodens ydeevne og andre krav til analysemetoder« (del 2).

⁽¹⁾ »Indhold«: Den massefraktion af prøvens indhold af analysand, som forekommer i det endelige ekstrakt.

⁽²⁾ »Genfindelse« (her): Den massefraktion af den tilsatte analysand, som forekommer i det endelige ekstrakt. I resten af bilaget antages det, at indhold er lig med genfindelse, og derfor anvendes kun udtrykket »genfindelse«.

For stoffer, der ikke er fastsat et tilladt niveau for, kan CC α fastlægges

- enten ved kalibreringskurveproceduren ifølge ISO 11843 (17) (hvor den betegnes som kritisk værdi af nettotilstandsvariablen). I så fald skal der anvendes blindmateriale, der tilsættes analysand til og over minimumsgrænsen for metodens ydeevne i lige store spring. Prøverne analyseres. Efter identifikation plottes signalet mod den tilsatte koncentration. Beslutningsgrænsen er lig med den modsvarende koncentration ved y-skæringspunktet plus 2,33 gange skæringspunktets interne reproducerbarheds standardafvigelse. Dette gælder kun for kvantitative assays ($\alpha = 1\%$)
- eller ved analyse af mindst 20 blindmaterialer pr. matrix med henblik på at kunne beregne signal-støj-forholdet i det tidsinterval, hvor analysanden forventes. Som beslutningsgrænse kan anvendes tre gange signal-støj-forholdet. Dette gælder for kvantitative og kvalitative assays.

For stoffer, der er fastsat et tilladt niveau for, kan CC α fastlægges

- enten ved kalibreringskurveproceduren ifølge ISO 11843 (17) (hvor den betegnes som kritisk værdi af nettotilstandsvariablen). I så fald skal der anvendes blindmateriale, der tilsættes analysand til omkring det tilladte niveau i lige store spring. Prøverne analyseres. Efter identifikation plottes signalet mod den tilsatte koncentration. Beslutningsgrænsen ($\alpha = 5\%$) er lig med den modsvarende koncentration ved det tilladte niveau plus 1,64 gange den interne reproducerbarheds standardafvigelse
- eller ved analyse af mindst 20 blindmaterialer pr. matrix tilsat analysanden/analysanderne på det tilladte niveau. Beslutningsgrænsen ($\alpha = 5\%$) er lig med koncentrationen ved det tilladte niveau plus 1,64 gange den modsvarende standardafvigelse.

Jf. også artikel 5 og punkt 3.2.

3.1.2.6. Detektionsevne (CC β)

Detektionsevnen bør fastlægges i overensstemmelse med kravene til screening, til identifikation eller til identifikation plus kvantitativ bestemmelse, jf. del 2.

For stoffer, der ikke er fastsat et tilladt niveau for, kan CC β fastlægges

- ved kalibreringskurveproceduren ifølge ISO 11843 (17) (hvor den betegnes som mindste påviselige værdi af nettotilstandsvariablen). I så fald skal der anvendes repræsentativt blindmateriale, der tilsættes analysand til og under minimumsgrænsen for metodens ydeevne i lige store spring. Prøverne analyseres. Efter identifikation plottes signalet mod den tilsatte koncentration. Detektionsevnen ($\beta = 5\%$) er lig med den modsvarende koncentration ved beslutningsgrænsen plus 1,64 gange det gennemsnitlige målte indholds interne reproducerbarheds standardafvigelse
- ved analyse af mindst 20 blindmaterialer pr. matrix tilsat analysanden/analysanderne på beslutningsgrænsen. Prøverne analyseres, og analysanderne identificeres. Detektionsevnen ($\beta = 5\%$) er lig med beslutningsgrænsens værdi plus 1,64 gange det målte indholds interne reproducerbarheds standardafvigelse.
- Hvis der ikke er kvantitative resultater til rådighed, kan detektionsevnen bestemmes ved undersøgelse af blindmateriale med tilsætning på og over beslutningsgrænsen. I så fald er metodens detektionsevne lig med koncentrationsniveauet, hvor der kun rester $\leq 5\%$ falsk overensstemmende resultater. Derfor skal der gennemføres mindst 20 undersøgelser for mindst ét koncentrationsniveau for at sikre et pålideligt grundlag for bestemmelsen.

For stoffer, der er fastsat et tilladt niveau for, kan CC β fastlægges

- enten ved kalibreringskurveproceduren ifølge ISO 11843 (17) (hvor den betegnes som mindste påviselige værdi af nettotilstandsvariablen). I så fald skal der anvendes repræsentativt blindmateriale, der tilsættes analysand til omkring det tilladte niveau i lige store spring. Prøverne analyseres, og analysanden/analysanderne identificeres. Der foretages en beregning af det gennemsnitlige målte indholds standardafvigelse ved beslutningsgrænsen. Detektionsevnen ($\beta = 5\%$) er lig med den modsvarende koncentration ved beslutningsgrænsens værdi plus 1,64 gange den interne reproducerbarheds standardafvigelse
- eller ved analyse af mindst 20 blindmaterialer pr. matrix tilsat analysanden/analysanderne på beslutningsgrænsen. Detektionsevnen ($\beta = 5\%$) er lig med beslutningsgrænsens værdi plus 1,64 gange den modsvarende standardafvigelse.

Jf. også punkt 3.2.

3.1.2.7. Robusthed (større ændringer)

Analysemetoden bør afprøves under forskellige forsøgsbetingelser, f.eks. med forskellige specier, forskellige matrixer eller forskellige prøveudtagningsforhold. Det bør være større ændringer, der indføres. Betydningen af ændringerne kan vurderes, f.eks. ved hjælp af Youden-proceduren (15) (16). Alle karakteristika for metodens ydeevne bør bestemmes for alle større ændringer, for hvilke det er godtgjort, at de har betydelig virkning på assayets resultater.

3.1.3. Validering ifølge alternative modeller

Hvis der anvendes alternative valideringsprocedurer, skal den tilgrundliggende model og fremgangsmåde samt de respektive forudsætninger, antagelser og formler beskrives i valideringsprotokollen, eller der skal i det mindste opgives referencer vedrørende deres tilgængelighed. I det følgende gives der et eksempel på en alternativ procedure. Hvis man f.eks. anvender modellen med validering på ét laboratorium, bestemmes karakteristika for metodens ydeevne på en måde, der gør det muligt at validere under hensyntagen til større ændringer inden for samme valideringsprocedure. Der skal derfor udarbejdes en forsøgsplan for valideringen.

3.1.3.1. Forsøgsplan

Der skal udarbejdes en forsøgsplan under hensyntagen til, hvor mange forskellige specier og faktorer undersøgelsen omfatter. Første trin i den samlede valideringsprocedure skal derfor være, at man betragter de prøvepopulationer, der fremover vil blive analyseret i laboratoriet, med henblik på at udvælge de vigtigste specier og de faktorer, der evt. kan påvirke måleresultaterne. Dernæst skal koncentrationsintervallet vælges under hensyntagen til formålet afhængigt af det relevante niveau.

Eksempel

- Flere analysander kan undersøges på én gang med den analysemetode, der valideres.
- Der er blevet identificeret to varianter (A og B) af hovedfaktoren. Hovedfaktorer danner det grundlag, som faktorniveauerne kombineres ud fra. Hovedfaktorerne kan omfatte faktorer som specie og matrix. I dette eksempel var hovedfaktoren varieret på to niveauer, dvs. to forskellige specier (specie A og B) blev undersøgt. Generelt er det muligt at variere hovedfaktorerne på mere end to niveauer, hvilket blot øger antallet af analyser, der skal gennemføres.
- De udvalgte faktorer skal varieres på to niveauer (angivet som enten + eller -).

Tabel 13

Eksempler på faktorer, der anses for vigtige for en valideringsprocedure

Dyrets køn	(faktor 1)
Race	(faktor 2)
Transportforhold	(faktor 3)
Opbevaringsforhold	(faktor 4)
Prøvens friskhed	(faktor 5)
Opfedningsvilkår	(faktor 6)
Forskellige personer med forskelligt erfaringsniveau	(faktor 7)

Tabel 14

Mulig forsøgsplan for ovenstående eksempel

Specie	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Prøve-nummer
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Specie	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Prøve-nummer
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Da hver prøve (hver kombination af faktorniveau) skal tilsættes fire forskellige koncentrationer omkring det relevante niveau, og da der skal analyseres én blindprøve for hvert niveau, skal der gennemføres $5 \times 16 = 80$ analyser i hele valideringsforsøget.

Af disse 80 målinger kan man beregne følgende (13) (14):

Genfindelse

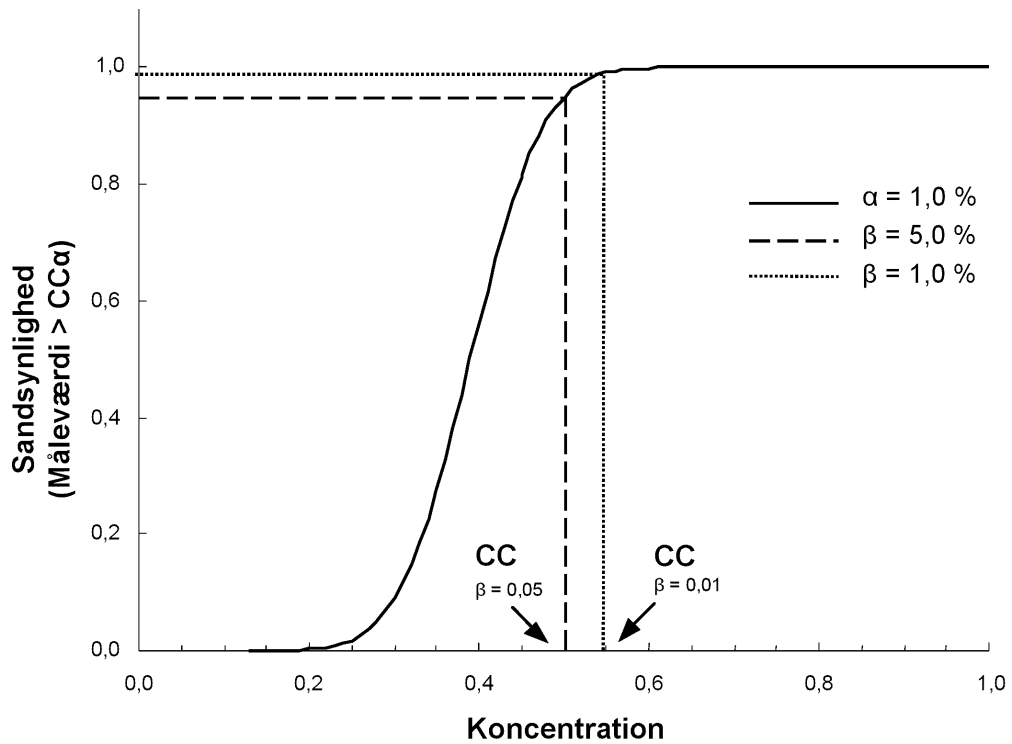
- repeterbarhed pr. koncentrationsniveau (s_{ii})
- intern reproducerbarhed pr. koncentrationsniveau (s_{iR})
- beslutningsgrænse ($CC\alpha$)
- detektionsevne ($CC\beta$)
- effektkurve (β -fejl-ratio versus koncentration, jf. punkt 3.1.3.2)
- robusthed ved større ændringer; robusthed ved mindre ændringer kan bestemmes ifølge punkt 3.1.1.3
- 16 prøverelaterede kalibreringskurver
- en generel kalibreringskurve
- den generelle kalibreringskurves forventningsinterval
- afvigelser, der kan tilskrives matrix (s_{mat})
- afvigelser, der kan tilskrives kørsler (s_{run})
- de enkelte faktorerers betydning for måleresultaterne.

Med disse karakteristika kan niveauet for metodens ydeevne vurderes under ét, da ikke blot de enkelte faktorerers påvirkning, men også de relevante kombinationer af faktorerne undersøges. Ved hjælp af denne forsøgsplan kan man afgøre, om en af de udvalgte faktorer skal udelukkes fra den generelle kalibreringskurve, fordi den afviger betydeligt fra de andre faktorerers standardafvigelser.

3.1.3.2. Effektkurve

Effektkurven giver oplysninger om metodens detektionsevne inden for det valgte koncentrationsinterval. Den relaterer til risikoen for β -fejl ved anvendelse af den metode, der undersøges. Med effektkurven kan man beregne detektionsevnen for de respektive metodekategorier (screening, verifikation) eller -typer (kvalitative eller kvantitative) for en given β -fejl (f.eks. 5 %).

Figur 1
Effektkurve



Figur 1 viser et eksempel på grafisk fremstilling af en analysemetodes detektionsevne (CC β). Ved den viste metode resterer der en risiko på 5 % for at træffe en falsk beslutning ved en koncentration på 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ved en koncentration på 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ falder risikoen for at træffe en falsk negativ beslutning til 1 %.

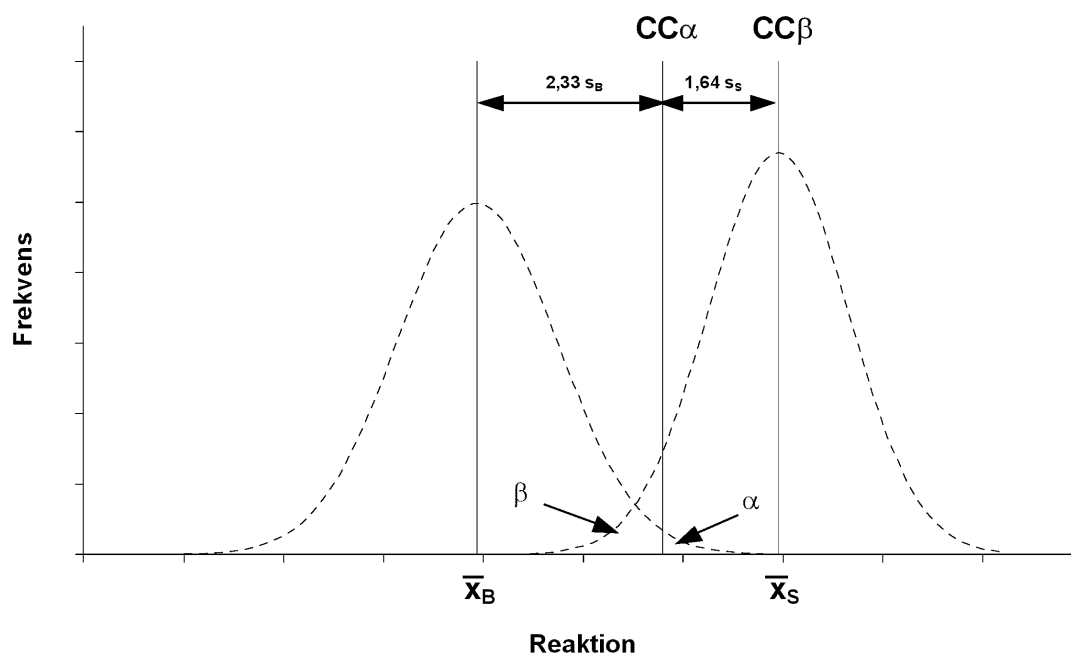
3.1.3.3. Reproducerbarhed

Bestemmelse af en metodes reproducerbarhed ved enkeltlaboratorieundersøgelser (validering på ét laboratorium) forudsætter gentagen deltagelse i en præstationsprøvning i overensstemmelse med ISO-retningslinje 43-1 (3) og 43-2 (4). Laboratorierne kan selv vælge metode, forudsat at metoden anvendes under rutinebetingelser. Laboratoriets standardafvigelse kan anvendes til at bedømme metodens reproducerbarhed.

3.2. GRAFISK FREMSTILLING AF DE FORSKELLIGE ANALYSEGRÆNSER

Figur 2

Stoffer, der ikke er fastsat noget tilladt niveau for



\bar{X}_B blindprøvens gennemsnitlige koncentration

\bar{X}_S den kontaminede prøves gennemsnitlige reaktionsværdi

s_B blindprøvens standardafvigelse (bestemt under interne reproducerbarhedsbetingelser)

s_S den kontaminede prøves standardafvigelse (bestemt under interne reproducerbarhedsbetingelser)

α andel af falsk ikke-overensstemmende resultater

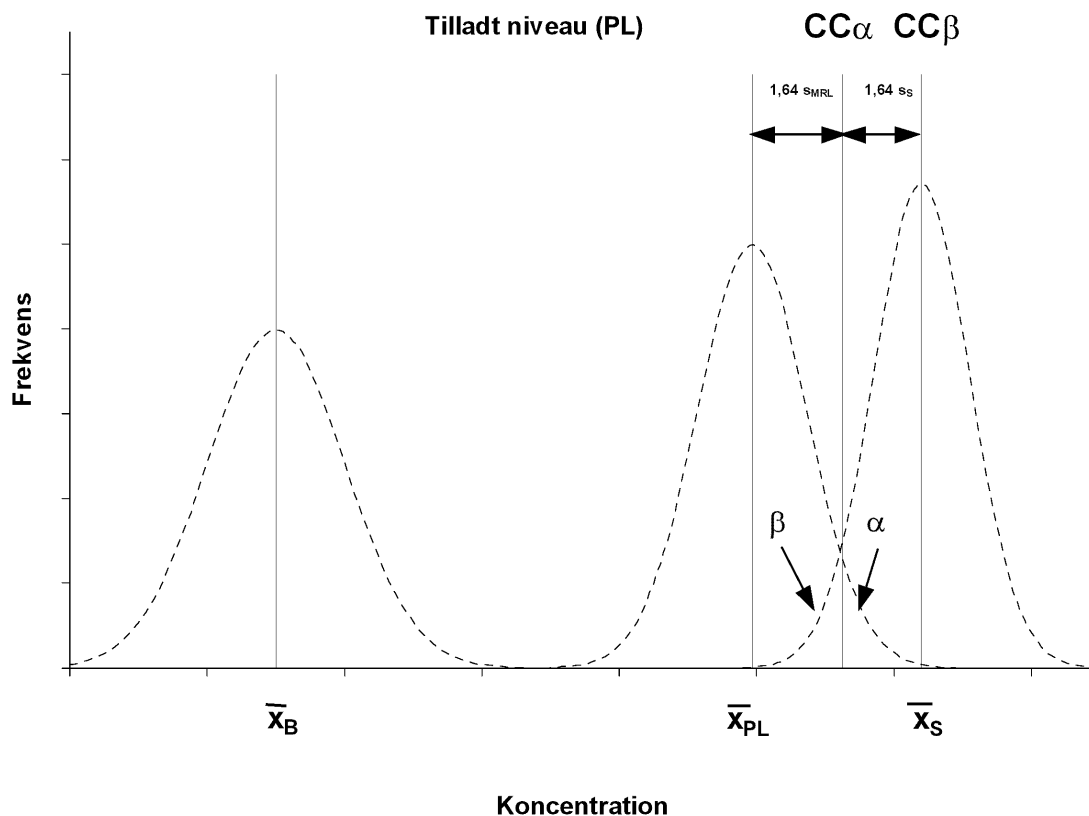
β andel af falsk overensstemmende resultater

CC_α reaktion ved en given α -fejl og 50 % β -fejl

CC_β reaktion ved en meget lille α -fejl og en given β -fejl.

Figur 3

Stoffer, der er fastsat et tilladt niveau for



\bar{x}_B blindprøvens gennemsnitlige koncentration

\bar{x}_{PL} den gennemsnitlige koncentration for prøve, der indeholder analysanden på det tilladte niveau

\bar{x}_S den kontaminede prøves gennemsnitlige koncentration

s_{MRL} standardafvigelse for prøve, der indeholder analysanden på det tilladte niveau (bestemt under interne reproducerbarhedsbetingelser)

s_S den kontaminede prøves standardafvigelse (bestemt under interne reproducerbarhedsbetingelser)

α andel af falsk ikke-overensstemmende resultater

β andel af falsk overensstemmende resultater

CC α reaktion ved en given α -fejl og 50 % β -fejl

CC β reaktion ved en meget lille α -fejl og en given β -fejl.

3.3. EKSEMPEL PÅ BEREGNING AF ROBUSTHED VED MINDRE ÆNDRINGER IFØLGE YOUTEN-PROCEDUREN (16)

Sammenligning af gennemsnit (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Gennemsnittene af de store bogstaver (A_A til A_G) sammenlignes med gennemsnittene af de tilsvarende små bogstaver (A_a to A_g). Hvis en faktor har en virkning, vil differensen blive betydeligt større end de øvrige faktorerers differenser.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	En robust metode bør ikke kunne påvirkes af forskelle, der næsten med sikkerhed forekommer mellem laboratorier.
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	Hvis der ikke er nogen markante differenser, fås den mest realistiske måling af tilfældigt forekommende fejl af de syv differenser.
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Differenser (D)	Kvadrater af differenserne (D_i^2)
$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	$D_a^2 = \text{værdi a}$
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	$D_b^2 = \text{værdi b}$
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	$D_c^2 = \text{værdi c}$
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	$D_d^2 = \text{værdi d}$
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	$D_e^2 = \text{værdi e}$
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	$D_f^2 = \text{værdi f}$
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	$D_g^2 = \text{værdi g}$

Standardafvigelse for differenserne $D_i(s_{D_i})$

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

Hvis s_{D_i} er betydeligt større end standardafvigelsen for metoden udført under interne reproducerbarhedsbetingelser, jf. ovenfor, er det en på forhånd givet konklusion, at alle faktorer tilsammen påvirker resultatet, også selv om faktorerne hvis for sig udviser en betydelig påvirkning, og at metoden ikke er tilstrækkelig robust over for de pågældende ændringer.

3.4. EKSEMPLER PÅ BEREGNING I FORBINDELSE MED PROCEDURER MED VALIDERING PÅ ÉT LABORATORIUM

Eksempler og beregninger i forbindelse med protokollen for validering på ét laboratorium som beskrevet under validering efter alternative modeller (punkt 3.1.3) (13) (14).

3.5. EKSEMPLER I FORBINDELSE MED METODEN MED STANDARDADDITION

En klargjort prøve med indholdet T af analysanden opdeles i analyseprøverne 1 og 2 med en masse på henholdsvis m_1 og m_2 . Analyseprøve 2 tilsættes mængden V_A af en opløsning med analysandkoncentrationen ρ_A . Der fås to ekstrakter af analyseprøverne med de respektive mængder V_1 og V_2 efter metodens ekstraktions- og purifikationsstrin. Genfindelsen af analysanden antages at være rc. For begge ekstrakter gennemføres et assay med en målemetode med følsomheden b, der giver en analysereaktion på henholdsvis x_1 og x_2 .

Hvis det antages, at rc og b er ens for analysanden i den naturlige prøve og i prøven med tilsætning, kan indholdet T beregnes som:

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

Ved metoden kan genfindelsen rc bestemmes. Foruden nævnte assay tilsættes en del af ekstraktet af analyseprøve 1 (mængde V_3) en kendt mængde $\rho_{B \cdot B}$ af analysanden, og der gennemføres et assay. Analysereaktionen er x_3 , og genfindelsen er:

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

Endvidere kan følsomheden b beregnes som:

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

Alle betingelser for anvendelse og nærmere detaljer er beskrevet (18).

4. ANVENDTE FORKORTELSER

AAS	atomabsorptionsspektrometri
AES	atomemissionsspektrometri
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists International
B	bundet fraktion (immunoassays)
CI	kemisk ionisering
CRM	certificeret referencemateriale
CV	variationskoefficient
2 D	todimensional
DAD	diodearray-detektion
DPASV	differentialpuls anodisk stripping-voltametri
ECD	elektroncapturedetektion
EI	elektronimpaktionisering
GC	gaschromatografi
HPLC	high performance-væskechromatografi
HPTLC	high performance-tyndtlagschromatografi
HRMS	højtopløsende massespektrometri
ICP-AES	induktivt koblet plasma-atomemissionsspektrometri
ICP-MS	induktivt koblet plasma-massespektrometri
IR	infrarød
ISO	Den Internationale Standardiseringsorganisation
LC	væskechromatografi
LR(MS)	lavtopløsende massespektrometri
MRPL	minimumsgrænse for metodens ydeevne
MS	massespektrometri
m/z	masse/ladning-forhold
RF	migration i forhold til opløsningsmiddelfronten (TLC)
RSDL	laboratoriets relative standardafvigelse
SIM	måling af udvalgte ioner
TLC	tyndtlagschromatografi
UV	ultraviolet lys
VIS	synligt lys.

5. HENVISNINGER

- (1) ISO 17025:1999 Generelle krav til prøvnings- og kalibreringslaboratoriets kompetence
- (2) ISO 3534-1:1993 Statistical Methods for quality control — Vol. 1: Vocabulary and symbols
- (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 Nøjagtighed (korrekthed og præcision) af målemetoder og resultater — Del 1: Generelle principper og definitioner; ISO 5725-2 — Del 2: Grundlæggende metode til bestemmelse af repeterbarhed og reproducerbarhed for en standardiseret målemetode — Del 4: Grundlæggende metoder til bestemmelse af en standardiseret målemetodes korrekthed

- (6) ISO 78-2:1999 Chemistry — Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis
 - (7) W.G. de Ruig and J.M. Weseman: »A new approach to confirmation by infrared spectrometry«. *J. Chemometrics* 4 (1990) 61-77.
 - (8) Se f.eks. 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«. *Analytical Chemistry* 54(7):1032-1037 (90353)
 - (9) C. Minoia, S. Caroli (eds.): »Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology«. Pergamon Press (Oxford), 1992, s. xxvi og 675
 - (10) A. Montaser, D. W. Golightly (eds.): »Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry«. VCH Publishers, Inc. (New York), 1992
 - (11) G. Holland, S. D. Tanner (eds.): »Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications«. The Royal Society of Chemistry, 1997, s. 329
 - (12) IUPAC (1995): »Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies«. *Pure & Applied Chem.* 67, 331
 - (13) Jülicher, B., Gowik, P. and 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. and 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) W.J. Youden; Steiner, E.H.: »Statistical Manual of the AOAC — Association of Official Analytical Chemists«. AOAC-I, Washington DC, 1975, s. 35 ff.
 - (17) ISO 11843:1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions — Part 2: Methodology in the linear calibration case
 - (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: »Yield or recovery: a world of difference«. Proceedings 8th Euro Food Chem. Vienna, Austria, September 18-20 (1995), Federation of European Chemical Societies, Event 206, ISBN 3-900554-17X, s. 2-9.
 - (19) Rådets direktiv 71/354/EØF af 18. oktober 1971 om tilnærmelse af medlemsstaternes lovgivning om enhederne for mål og vægt (EFT L 243 af 29.10.1971, s. 29)
 - (20) ISO 31-0:1992 Fysiske størrelser, måleenheder og symboler — Del 0: Almindelige principper.
-