

## II

(Nicht veröffentlichungsbedürftige Rechtsakte)

## KOMMISSION

## ENTSCHEIDUNG DER KOMMISSION

vom 12. August 2002

## zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen

(Bekannt gegeben unter Aktenzeichen K(2002) 3044)

(Text von Bedeutung für den EWR)

(2002/657/EG)

DIE KOMMISSION DER EUROPÄISCHEN GEMEINSCHAFTEN —

gestützt auf den Vertrag zur Gründung der Europäischen Gemeinschaft,

gestützt auf die Richtlinie 96/23/EG des Rates vom 29. April 1996 über Maßnahmen zur Kontrolle bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen und zur Aufhebung der Richtlinien 85/358/EWG und 86/469/EWG und der Entscheidungen 89/187/EWG und 91/664/EWG<sup>(1)</sup>, insbesondere auf Artikel 15 Absatz 1 Satz 2,

in Erwägung nachstehender Gründe:

- (1) Das Vorhandensein von Rückständen in Erzeugnissen tierischen Ursprungs ist ein Problem des Schutzes der öffentlichen Gesundheit.
- (2) Die Entscheidung 98/179/EG der Kommission vom 23. Februar 1998 zur Festlegung von Einzelheiten betreffend die amtliche Probenahme für die Kontrolle bestimmter Stoffe und ihrer Rückstände in lebenden Tieren und tierischen Erzeugnissen<sup>(2)</sup> sieht vor, dass die Analyse der Proben ausschließlich von Laboratorien durchzuführen ist, die von der zuständigen einzelstaatlichen Behörde für die amtliche Rückstandskontrolle zugelassen worden sind.
- (3) Es ist notwendig, die Qualität und die Vergleichbarkeit der Analyseergebnisse sicherzustellen, die von den für die amtliche Rückstandskontrolle zugelassenen Laboratorien gewonnen werden. Dies muss erreicht werden durch die Anwendung von Qualitätssicherungssystemen und speziell durch die Anwendung von Methoden, die nach allgemeinen Verfahren und Leistungskriterien validiert sind, sowie durch die Rückverfolgbarkeit auf allgemeine Normen oder gemeinschaftlich vereinbarte Normen.

- (4) Gemäß der Richtlinie 93/99/EWG des Rates vom 29. Oktober 1993 über zusätzliche Maßnahmen betreffend die amtliche Kontrolle von Nahrungsmitteln<sup>(3)</sup> und der Entscheidung 98/179/EG müssen amtliche Kontrolllaboratorien ab Januar 2002 gemäß ISO 17025 (1) akkreditiert sein. Gemäß der Entscheidung 98/179/EG müssen zugelassene Laboratorien an einem international anerkannten externen Programm zur Bewertung der Qualitätskontrolle und zur Akkreditierung teilnehmen. Außerdem müssen die zugelassenen Laboratorien ihre Kompetenz durch regelmäßige und erfolgreiche Teilnahme an entsprechenden Eignungsprüfungen nachweisen, die von den einzelstaatlichen oder gemeinschaftlichen Referenzlaboratorien anerkannt oder organisiert werden.
- (5) Ein Netzwerk von gemeinschaftlichen Referenzlaboratorien, einzelstaatlichen Referenzlaboratorien und einzelstaatlichen Kontrolllaboratorien ist gemäß Richtlinie 96/23/EG tätig, um die Koordination zu verbessern.
- (6) Aufgrund von Fortschritten in der chemischen Analytik seit der Verabschiedung der Richtlinie 96/23/EG ist an die Stelle des Konzepts der Routinemethoden und Referenzmethoden der Kriterienansatz getreten, bei dem Leistungskriterien und Verfahren für die Validierung von Screening- und Bestätigungsmethoden festgelegt werden.
- (7) Es müssen gemeinsame Kriterien für die Auswertung der Testergebnisse von amtlichen Kontrolllaboratorien bestimmt werden, um eine harmonisierte Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG sicherzustellen.
- (8) Es müssen nach und nach Mindestleistungsgrenzen (MRPL) von Analysemethoden für Stoffe festgelegt werden, für die kein zulässiger Grenzwert festgesetzt worden ist, und insbesondere für diejenigen Stoffe, deren Anwendung in der Gemeinschaft nicht zugelassen oder ausdrücklich verboten ist, um eine harmonisierte Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG sicherzustellen.

<sup>(1)</sup> ABl. L 125 vom 23.5.1996, S. 10.<sup>(2)</sup> ABl. L 65 vom 5.3.1998, S. 31.<sup>(3)</sup> ABl. L 290 vom 24.11.1993, S. 14.

- (9) Die Entscheidung 90/515/EWG der Kommission vom 26. September 1990 zur Festlegung der Referenzmethoden zum Nachweis von Schwermetall- und Arsenrückständen <sup>(1)</sup>, die Entscheidung 93/256/EWG vom 14. April 1993 zur Festlegung der Methoden zum Rückstandsnachweis von Stoffen mit hormonaler bzw. thyreostatischer Wirkung <sup>(2)</sup> und die Entscheidung 93/257/EWG der Kommission vom 15. April 1993 zur Festlegung der Referenzmethoden und des Verzeichnisses der nationalen Referenzlaboratorien für Rückstandsuntersuchungen <sup>(3)</sup>, zuletzt geändert durch die Entscheidung 98/536/EG <sup>(4)</sup>, sind überprüft worden, um dem wissenschaftlich-technischen Fortschritt Rechnung zu tragen, haben sich in ihrem Geltungsbereich und ihren Bestimmungen als veraltet erwiesen und sollten demgemäß mit dieser Entscheidung aufgehoben werden.
- (10) Damit Methoden für die Analyse von amtlichen Proben an die Bestimmungen dieser Entscheidung angepasst werden können, sollte ein Übergangszeitraum festgesetzt werden.
- (11) Die in dieser Entscheidung vorgesehenen Maßnahmen entsprechen der Stellungnahme des Ständigen Ausschusses für die Lebensmittelkette und Tiergesundheit —

HAT FOLGENDE ENTSCHEIDUNG ERLASSEN:

#### Artikel 1

##### Gegenstand und Geltungsbereich

Diese Entscheidung legt Regeln für die Analysemethoden fest, die bei der Analyse von amtlichen Proben, die gemäß Artikel 15 Absatz 1 Satz 2 der Richtlinie 96/23/EWG entnommen werden, zu verwenden sind und bestimmt gemeinsame Kriterien für die Auswertung von Analysenergebnissen amtlicher Kontrolllaboratorien für solche Proben.

Diese Entscheidung gilt nicht für Stoffe, für die in anderen gemeinschaftlichen Rechtsvorschriften speziellere Regelungen festgelegt worden sind.

#### Artikel 2

##### Begriffsbestimmungen

Für diese Entscheidung gelten die Begriffsbestimmungen in der Richtlinie 96/23/EG sowie im Anhang dieser Entscheidung.

#### Artikel 3

##### Analysemethoden

Die Mitgliedstaaten stellen sicher, dass amtliche Proben, die gemäß der Richtlinie 96/23/EG entnommen werden, mit Methoden analysiert werden, die:

- in Testvorschriften dokumentiert sind, vorzugsweise gemäß ISO 78-2 (6);
- Teil 2 des Anhangs dieser Entscheidung entsprechen;
- gemäß den in Teil 3 des Anhangs beschriebenen Verfahren validiert worden sind;

<sup>(1)</sup> ABL L 286 vom 18.10.1990, S. 33.

<sup>(2)</sup> ABL L 118 vom 14.5.1993, S. 64.

<sup>(3)</sup> ABL L 118 vom 14.5.1993, S. 75.

<sup>(4)</sup> ABL L 251 vom 11.9.1998, S. 39.

- d) die geforderten Mindestleistungsgrenzen (MRPL) erfüllen, die gemäß Artikel 4 festzusetzen sind.

#### Artikel 4

##### Geforderte Mindestleistungsgrenzen

Die vorliegende Entscheidung wird überprüft werden, um nach und nach die geforderten Mindestleistungsgrenzen (MRPL) für Analysemethoden festzulegen, die für Stoffe zu verwenden sind, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist.

#### Artikel 5

##### Qualitätskontrolle

Die Mitgliedstaaten stellen die Qualität der Analysenergebnisse von Proben sicher, die gemäß Richtlinie 96/23/EG entnommen wurden, insbesondere durch die Überwachung der Tests bzw. der Kalibrierungsergebnisse gemäß Kapitel 5.9 der ISO 17025 (1).

#### Artikel 6

##### Auswertung der Ergebnisse

(1) Das Ergebnis einer Analyse gilt als positiv, wenn die Entscheidungsgrenze der Bestätigungsmethode für den Analyten überschritten ist.

(2) Wenn ein zulässiger Grenzwert für einen Stoff festgelegt worden ist, ist die Entscheidungsgrenze die Konzentration, über der mit einer statistischen Sicherheit von  $1 - \alpha$  festgestellt werden kann, dass der zulässige Grenzwert tatsächlich überschritten worden ist.

(3) Wenn kein zulässiger Grenzwert für einen Stoff festgelegt worden ist, ist die Entscheidungsgrenze die niedrigste Konzentration, bei der eine Methode mit einer statistischen Sicherheit von  $1 - \alpha$  unterscheiden kann, ob der betreffende Analyt vorhanden ist.

(4) Bei Stoffen, die in Gruppe A des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG aufgelistet sind, muss der  $\alpha$ -Fehler kleiner oder gleich 1 % sein. Bei allen anderen Stoffen muss der  $\alpha$ -Fehler kleiner oder gleich 5 % sein.

#### Artikel 7

##### Aufhebung

Die Entscheidungen 90/515/EWG, 93/256/EWG und 93/257/EWG werden aufgehoben.

#### Artikel 8

##### Übergangsbestimmungen

Die Methoden zur Analyse von amtlichen Proben auf Stoffe in Gruppe A des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG, welche die Kriterien erfüllen, die in den Entscheidungen 90/515/EWG, 93/256/EWG und 93/257/EWG festgelegt sind, können noch für die Dauer von bis zu zwei Jahren nach Inkrafttreten dieser Entscheidung verwendet werden. Methoden, die gegenwärtig für Stoffe in Gruppe B des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG eingesetzt werden, müssen spätestens fünf Jahre nach dem Datum der Gültigkeit dieser Entscheidung den Festlegungen in dieser Entscheidung entsprechen.

*Artikel 9***Datum der Gültigkeit**

Diese Entscheidung gilt ab 1. September 2002.

*Artikel 10***Adressaten**

Diese Entscheidung ist an alle Mitgliedstaaten gerichtet.

Brüssel, den 12. August 2002

*Für die Kommission*  
David BYRNE  
*Mitglied der Kommission*

---

## ANHANG

## LEISTUNGSKRITERIEN, SONSTIGE ANFORDERUNGEN UND VERFAHREN FÜR ANALYSEMETHODEN

## 1. BEGRIFFSBESTIMMUNGEN

- 1.1. Genauigkeit ist der Grad der Übereinstimmung zwischen einem Testergebnis und dem akzeptierten Referenzwert (2). Sie wird bestimmt, indem Richtigkeit und Präzision ermittelt werden.
- 1.2. Alpha-Fehler ist die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Probe negativ ist, obwohl eine positive Messung erhalten wurde („falsch positives Ergebnis“).
- 1.3. Ein Analyt ist der Stoff, der nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden muss, sowie die während seiner Analyse auftretenden Derivate.
- 1.4. Beta-Fehler ist die Wahrscheinlichkeit, dass die untersuchte Probe tatsächlich positiv ist, obwohl eine negative Messung erhalten wurde („falsch negatives Ergebnis“).
- 1.5. Bias ist der Unterschied zwischen der Erwartung des Testergebnisses und einem akzeptierten Referenzwert (2).
- 1.6. Ein Kalibrierstandard ist ein Hilfsmittel für Messungen, das die Menge des interessierenden Stoffs in einer Weise darstellt, die seinen Wert mit einer Referenzbasis in Beziehung setzt.
- 1.7. Zertifiziertes Referenzmaterial (CRM) ist ein Material, dem ein bestimmter Analytgehalt zugeordnet worden ist.
- 1.8. Co-Chromatografie ist ein Verfahren, bei dem der Extrakt vor dem (den) chromatografischen Schritt(en) in zwei Teile aufgeteilt wird. Der eine Teil wird normal chromatografiert. Der zweite Teil wird mit dem zu messenden Standardanalyten gemischt. Dieses Gemisch wird dann ebenfalls chromatografiert. Die Menge an zugesetztem Standardanalyt muss etwa gleich groß wie die geschätzte Menge des Analyten im Extrakt sein. Diese Methode soll die Identifizierung eines Analyten verbessern, wenn chromatografische Methoden verwendet werden, besonders wenn kein geeigneter interner Standard verwendet werden kann.
- 1.9. Bei einer Methodenvergleichsstudie wird dieselbe Probe mit derselben Methode analysiert, um die Leistungsmerkmale der Methode zu bestimmen. Die Studie umfasst zufällige Messabweichungen und die systematische Abweichung (Bias) der beteiligten Laboratorien.
- 1.10. Eine Bestätigungsmethode ist eine Methode, die vollständige oder ergänzende Daten liefert, um einen Stoff eindeutig zu identifizieren und, falls erforderlich, in der interessierenden Konzentration zu quantifizieren.
- 1.11. Die Entscheidungsgrenze ( $CC\alpha$ ) ist der Grenzwert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\alpha$  bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist.
- 1.12. Das Nachweisvermögen ( $CC\beta$ ) ist der kleinste Gehalt des Stoffs, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\beta$  in einer Probe nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann. Im Fall von Stoffen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, ist das Nachweisvermögen die niedrigste Konzentration, bei der eine Methode in der Lage ist, tatsächlich verunreinigte Proben mit einer statistischen Sicherheit von  $1 - \beta$  nachzuweisen. Im Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert bedeutet dies, dass das Nachweisvermögen die Konzentration ist, bei der die Methode zulässige Grenzkonzentrationen mit einer statistischen Sicherheit von  $1 - \beta$  nachzuweisen vermag.
- 1.13. Dotiertes Probenmaterial ist eine Probe, die mit einer bekannten Menge des nachzuweisenden Analyten angereichert ist.
- 1.14. Eine Laborvergleichsuntersuchung ist die Organisation, Durchführung und Auswertung von Tests mit derselben Probe durch zwei oder mehr Laboratorien unter Einhaltung vorgegebener Bedingungen zur Bestimmung der analytischen Leistungsfähigkeit. Je nach Zweck lässt sich die Untersuchung als Methodenvergleichsstudie oder als Laboreignungsprüfung klassifizieren.
- 1.15. Ein interner Standard (IS) ist ein nicht in der Probe enthaltener Stoff mit chemisch-physikalischen Eigenschaften, die denen des zu identifizierenden Analyten möglichst ähnlich sind, und der jeder Probe sowie jedem Kalibrierstandard zugesetzt wird.
- 1.16. Eine Laborprobe ist eine zum Einsenden an ein Labor vorbereitete Probe, die untersucht bzw. analysiert werden soll.
- 1.17. Die interessierende Konzentration ist die Konzentration des Stoffs oder Analyten in einer Probe, die wesentlich ist, um die Einhaltung der Rechtsvorschriften zu bestimmen.
- 1.18. Die geforderte Mindestleistungsgrenze (Minimum Required Performance Limit, MRPL) ist der Mindestgehalt eines Analyten in einer Probe, der mindestens nachgewiesen und bestätigt werden muss. Er soll die analytische Leistungsfähigkeit von Methoden für Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, harmonisieren.

- 1.19. Ein Leistungsmerkmal bezeichnet eine funktionelle Qualität, die einer Analysemethode zugeschrieben werden kann. Dies kann zum Beispiel die Spezifität, Genauigkeit, Richtigkeit, Präzision, Wiederholpräzision, Reproduzierbarkeit, Wiederfindung, Nachweisvermögen oder Robustheit sein.
- 1.20. Leistungskriterien sind Anforderungen an ein Leistungsmerkmal, nach denen beurteilt werden kann, ob die Analysemethode für den Zweck geeignet ist und zuverlässige Ergebnisse liefert.
- 1.21. Ein zulässiger Grenzwert ist eine Rückstandshöchstmenge, eine maximale Konzentration oder eine sonstige maximale Toleranz für Stoffe, die an anderer Stelle in gemeinschaftlichen Rechtsvorschriften festgelegt ist.
- 1.22. Präzision ist der Grad der Übereinstimmung zwischen unabhängigen Testergebnissen, die unter festgesetzten (vorgegebenen) Bedingungen erzielt werden. Das Präzisionsmaß wird normalerweise als Unpräzision ausgedrückt und als Standardabweichung des Testergebnisses berechnet. Eine geringere Präzision ist durch eine größere Standardabweichung gekennzeichnet (2).
- 1.23. In einer Laboreignungsprüfung analysieren verschiedene Laboratorien dieselbe Probe, wobei die Laboratorien ihre eigenen Methoden wählen können, sofern diese Methoden unter Routinebedingungen eingesetzt werden. Die Prüfung muss gemäß ISO-Leitfaden 43-1 (3) und 43-2 (4) durchgeführt und kann zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit von Methoden herangezogen werden.
- 1.24. Eine qualitative Methode ist eine Analysemethode, die eine Substanz aufgrund ihrer chemischen, biologischen oder physikalischen Eigenschaften identifiziert.
- 1.25. Eine quantitative Methode ist eine Analysemethode, welche die Menge bzw. den Massenanteil eines Stoffs als Zahlenwert in geeigneten Einheiten bestimmt.
- 1.26. Eine Reagenzleerwertbestimmung ist die Durchführung des vollständigen Analyseverfahrens ohne Verwendung der Analysenprobe oder unter Verwendung der gleichen Menge eines geeigneten Lösungsmittels anstelle der Analysenprobe.
- 1.27. Die Wiederfindung ist der Prozentsatz der wahren Konzentration eines Stoffs, der beim Analysenverfahren wieder gefunden wird. Sie wird bei der Validierung bestimmt, wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht.
- 1.28. Ein Referenzmaterial ist ein Material, dessen Eigenschaft(en) mit einer validierten Methode bestätigt wurde(n), so dass es zur Kalibrierung eines Gerätes oder zur Überprüfung einer Messmethode verwendet werden kann.
- 1.29. Die Wiederholpräzision ist die Präzision unter Wiederholbedingungen (2).
- 1.30. Wiederholbedingungen sind Bedingungen, unter denen voneinander unabhängige Testergebnisse mit derselben Methode, identischem Testmaterial, in demselben Labor, durch denselben Untersucher und mit derselben Ausrüstung erzielt werden (2).
- 1.31. Die Reproduzierbarkeit (Vergleichspräzision) ist die Präzision unter Reproduzierbarkeitsbedingungen (2) (4).
- 1.32. Reproduzierbarkeitsbedingungen sind Bedingungen, unter denen Testergebnisse mit derselben Methode, identischem Testmaterial, in verschiedenen Laboratorien, durch verschiedene Untersucher und mit unterschiedlicher Ausrüstung erzielt werden (2) (4).
- 1.33. Robustheit ist die Anfälligkeit einer Analysemethode gegenüber Änderungen in den Versuchsbedingungen und kann ausgedrückt werden als eine Liste der Probematerialien, Analyte, Lagerungsbedingungen, Umgebungs- und/oder Probenvorbereitungsbedingungen, unter welchen die Methode wie beschrieben oder mit vorgeschriebenen geringfügigen Änderungen angewendet werden kann. Für alle Versuchsbedingungen, die in der Praxis möglicherweise schwanken können (beispielsweise Stabilität der Reagenzien, Zusammensetzung der Probe, pH-Werte, Temperatur), ist anzugeben, welche Schwankungen das Analysenergebnis beeinflussen können.
- 1.34. Eine Probenleerwertbestimmung ist die Durchführung des vollständigen Analyseverfahrens mit einer Analysenprobe, die den Analyten nicht enthält.
- 1.35. Screeningmethoden sind Methoden, die zum Nachweis des Vorhandenseins eines Stoffs oder einer Klasse von Stoffen in der interessierenden Konzentration verwendet werden. Diese Methoden ermöglichen einen hohen Probendurchsatz und werden eingesetzt, um eine große Anzahl von Proben auf mögliche positive Ergebnisse zu sichten. Sie sind speziell dafür ausgelegt, falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.
- 1.36. Eine laborinterne Validierungsstudie ist eine analytische Studie in einem Laboratorium unter Verwendung einer Methode zur Analyse desselben oder verschiedener Testmaterialien unter unterschiedlichen Bedingungen und über begründete lange Zeiträume.
- 1.37. Die Spezifität ist die Fähigkeit einer Methode, zwischen dem gemessenen Analyten und anderen Stoffen zu unterscheiden. Dieses Merkmal hängt vor allem vom beschriebenen Messverfahren ab, kann jedoch je nach Substanzklasse oder Matrix schwanken.

- 1.38. Die Standardaddition ist ein Verfahren, bei dem die Untersuchungsprobe in zwei (oder mehr) Analysenproben aufgeteilt wird. Eine Analysenprobe wird als solche analysiert, und den anderen Analysenproben werden vor der Analyse bekannte Mengen des Standardanalyten zugesetzt. Die Menge des zugesetzten Standardanalyten muss zwischen dem Zweifachen und dem Fünffachen der geschätzten Menge des Analyten in der Probe liegen. Dieses Verfahren dient dazu, den Gehalt eines Analyten in einer Probe unter Berücksichtigung der Wiederfindung des Analysenverfahrens zu bestimmen.
- 1.39. Ein Standardanalyt ist ein Analyt mit bekanntem und zertifiziertem Gehalt und Reinheit, der bei einer Analyse als Referenz verwendet wird.
- 1.40. Ein Stoff ist eine Substanz von bestimmter chemischer Struktur und ihre Metabolite.
- 1.41. Die Analysenprobe ist die Menge an Probenmaterial, die von der Untersuchungsprobe genommen wird, mit der die Analyse oder Beobachtung durchgeführt wird.
- 1.42. Eine Untersuchungsprobe ist eine aus der Laborprobe hergestellte Probe, von der Analysenproben genommen werden.
- 1.43. Die Richtigkeit ist der Grad der Übereinstimmung zwischen dem aus einer großen Serie von Testergebnissen ermittelten Mittelwert und einem akzeptierten Referenzwert. Die Richtigkeit wird normalerweise als systematische Abweichung (Bias) angegeben (2).
- 1.44. Einheiten sind die in ISO 31 (20) und in der Richtlinie 71/354/EWG beschriebenen Einheiten (19).
- 1.45. Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und die Erbringung eines effektiven Nachweises, dass die jeweiligen Anforderungen eines bestimmten Verwendungszwecks erfüllt sind (1).
- 1.46. Die laborinterne Reproduzierbarkeit ist die in ein und demselben Labor unter festgesetzten (vorgegebenen) Bedingungen (betreffend z. B. die Methode, Testmaterialien, Untersucher, Umgebung) über begründete lange Zeiträume erzielte Präzision.

## 2. LEISTUNGSKRITERIEN UND SONSTIGE ANFORDERUNGEN FÜR ANALYSEMETHODEN

Analysemethoden oder Kombinationen von Methoden, die im Folgenden nicht beschrieben werden, dürfen nur dann für Screening- oder Bestätigungszwecke verwendet werden, wenn belegt werden kann, dass sie die einschlägigen Anforderungen, die in dieser Entscheidung festgelegt werden, erfüllen.

### 2.1. ALLGEMEINE ANFORDERUNGEN

#### 2.1.1. **Probenhandhabung**

Die Proben müssen so gewonnen, gehandhabt und aufbereitet werden, dass die größtmögliche Aussicht auf einen Nachweis des Stoffs besteht. Die Verfahren der Probenhandhabung müssen die Möglichkeit einer versehentlichen Verunreinigung oder eines Analytverlusts ausschließen.

#### 2.1.2. **Testdurchführung**

##### 2.1.2.1. *Wiederfindung*

Bei der Analyse von Proben muss die Wiederfindung in jeder Probencharge bestimmt werden, wenn ein fester Wiederfindungskorrekturfaktor verwendet wird. Wenn die Wiederfindung innerhalb der vorgegebenen Grenzen liegt, kann der feste Korrekturfaktor verwendet werden. Ansonsten muss der für die betreffende Charge ermittelte Wiederfindungsfaktor verwendet werden, es sei denn der spezifische Wiederfindungsfaktor des Analyten in der Probe ist anzuwenden. In diesem Fall muss das Standardadditionsverfahren (siehe 3.5) oder ein interner Standard für die quantitative Bestimmung eines Analyten in einer Probe verwendet werden.

##### 2.1.2.2. *Spezifität*

Eine Methode muss in der Lage sein, unter den Versuchsbedingungen zwischen dem Analyten und den anderen Stoffen zu unterscheiden. Eine Schätzung, bis zu welchem Grad dies möglich ist, muss vorgelegt werden. Es sind Strategien zur Vermeidung vorhersehbarer Störungen durch andere Substanzen bei Verwendung des beschriebenen Verfahrens, z. B. Homologa, Analoga, Stoffwechselprodukte des interessierenden Rückstands, zu ergreifen. Es ist überaus wichtig, dass eventuelle Störungen durch Matrixbestandteile untersucht werden.

### 2.2. SCREENINGMETHODEN

Nur diejenigen Analyseverfahren, für die zurückverfolgbar belegt werden kann, dass sie validiert sind und bei der interessierenden Konzentration eine falsch negative Rate von < 5 % ( $\beta$ -Fehler) aufweisen, dürfen für Screeningzwecke gemäß der Richtlinie 96/23/EWG eingesetzt werden. Bei Verdacht auf ein positives Ergebnis muss dieses Ergebnis durch eine Bestätigungsmethode bestätigt werden.

## 2.3. BESTÄTIGUNGSMETHODEN FÜR ORGANISCHE RÜCKSTÄNDE UND KONTAMINANTEN

Bestätigungsmethoden für organische Rückstände oder Kontaminanten müssen Aufschluss über die chemische Struktur des Analyten liefern. Folglich sind Methoden, die sich ausschließlich auf die chromatografische Analyse ohne zusätzlichen spektrometrischen Nachweis stützen, für sich allein nicht als Bestätigungsmethoden geeignet. Wenn jedoch eine Technik allein nicht spezifisch genug ist, muss die gewünschte Spezifität mit Analyseverfahren erreicht werden, die aus einer geeigneten Kombination von Clean-up, chromatografischer Trennung und spektrometrischer Detektion bestehen.

Die folgenden Methoden oder Methodenkombinationen gelten als geeignet für die Identifizierung von organischen Rückständen oder Kontaminanten der angegebenen Stoffgruppen:

Tabelle 1

## Geeignete Bestätigungsmethoden für organische Rückstände oder Kontaminanten

Messverfahren	Stoffe in Anhang I 96/23/EG	Einschränkungen
LC oder GC mit massenspektrometrischer Detektion	Gruppen A und B	Nur nach chromatografischer Online- oder Offline-Trennung Nur wenn Full-Scan-Verfahren verwendet werden oder mindestens 3 (Gruppe B) oder 4 (Gruppe A) Identifizierungspunkte bei Verfahren verwendet werden, die nicht die vollen Massenspektren aufzeichnen
LC oder GC mit IR-spektrometrischer Detektion	Gruppen A und B	Spezifische Anforderungen an die Absorption bei der IR-Spektrometrie müssen erfüllt sein
LC-Full-Scan-DAD	Gruppe B	Spezifische Anforderungen an die Absorption bei der UV-Spektrometrie müssen erfüllt sein
LC — Fluoreszenz	Gruppe B	Nur für Moleküle, die eine natürliche Fluoreszenz zeigen, und Moleküle, die eine Fluoreszenz nach Transformation oder Derivatisierung zeigen
2D-TLC — Full-Scan-UV/VIS	Gruppe B	Zweidimensionale HPTLC und Co-Chromatografie sind obligatorisch
GC-Elektroneneinfangdetektion	Gruppe B	Nur, wenn zwei Säulen mit unterschiedlicher Polarität verwendet werden
LC-Immunogramm	Gruppe B	Nur, wenn mindestens zwei verschiedene Chromatographiesysteme oder eine zweite unabhängige Nachweismethode verwendet werden
LC-UV/VIS (eine Wellenlänge)	Gruppe B	Nur, wenn mindestens zwei verschiedene Chromatographiesysteme oder eine zweite unabhängige Nachweismethode verwendet werden

## 2.3.1. Gemeinsame Leistungskriterien und Anforderungen

Bestätigungsmethoden sollen Aufschluss über die chemische Struktur des Analyten geben. Wenn mehrere Verbindungen das gleiche Signal liefern, kann die Methode nicht zwischen diesen Verbindungen unterscheiden. Methoden, die sich ausschließlich auf die Chromatografie ohne zusätzlichen spektrometrischen Nachweis stützen, sind allein nicht als Bestätigungsmethoden geeignet.

Bei Verwendung eines geeigneten internen Standards in einer Methode muss dieser am Anfang des Extraktionsverfahrens der Analysenprobe zugesetzt werden. Je nach Verfügbarkeit werden entweder stabile isopenmarkierte Formen des Analyten, die besonders für die massenspektrometrische Detektion geeignet sind, oder Verbindungen, die mit dem Analyten strukturell verwandt sind, verwendet.

Wenn kein geeigneter interner Standard verwendet werden kann, muss die Identifizierung des Analyten durch Co-Chromatografie bestätigt werden. In diesem Fall darf nur ein Peak gewonnen werden, wobei die verstärkte Peakhöhe (oder -fläche) der Menge des zugefügten Analyten entspricht. Bei der Gaschromatografie (GC) oder Flüssigchromatografie (LC) muss sich die Peakbreite bei der Hälfte der maximalen Höhe im Bereich von 90-110 % der Originalbreite bewegen, und die Retentionszeiten müssen mit einer Toleranz von 5 % identisch sein. Bei Dünnschichtchromatografie-(TLC-)Methoden muss sich nur der vermutlich durch den Analyten bedingte Fleck verstärken. Es darf kein neuer Fleck erscheinen, und auch das Erscheinungsbild darf sich nicht verändern.

Referenzmaterial oder dotiertes Material, das bekannte Analytmengen an oder nahe der zulässigen Grenze oder der Entscheidungsgrenze (positive Kontrollprobe) enthält, sowie negatives Kontrollmaterial und Reagenzleerwerte sollten vorzugsweise während des gesamten Verfahrens parallel zu jeder Serie von Untersuchungsproben analysiert werden. Die empfohlene Reihenfolge für die Injektion der Extrakte in das Analysengerät ist: Reagenzleerwert, negative Kontrollprobe, zu bestätigende Probe(n), erneute negative Kontrollprobe und schließlich die positive Kontrollprobe. Abweichungen von dieser Reihenfolge müssen begründet werden.

### 2.3.2. Zusätzliche Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für quantitative Analysemethoden

#### 2.3.2.1. Richtigkeit von quantitativen Methoden

Bei wiederholten Analysen eines zertifizierten Referenzmaterials gelten folgende Richtbereiche für die Abweichung des experimentell bestimmten wiederfindungskorrigierten mittleren Masseanteils vom zertifizierten Wert:

**Tabelle 2**

#### Mindestwerte der Richtigkeit von quantitativen Methoden

Massenanteil	Bereich
≤ 1 µg/kg	– 50 % bis + 20 %
> 1 µg/kg bis 10 µg/kg	– 30 % bis + 10 %
≥ 10 µg/kg	– 20 % bis + 10 %

Wenn keine solchen zertifizierten Referenzmaterialien zur Verfügung stehen, ist die Bestimmung der Richtigkeit der Messungen durch Wiederfindung von zugesetzten bekannten Mengen des Analyten (bzw. der Analyte) zu einer Leerwertmatrix akzeptabel. Mit der mittleren Wiederfindung korrigierte Daten sind nur dann akzeptabel, wenn sie innerhalb der Bereiche in Tabelle 2 liegen.

#### 2.3.2.2. Präzision von quantitativen Methoden

Bei wiederholter Analyse eines Referenzmaterials oder dotierten Materials darf der Variationskoeffizient (CV) zwischen Laboratorien unter Reproduzierbarkeitsbedingungen den mit der Horwitz-Gleichung berechneten Wert nicht überschreiten. Diese Gleichung lautet:

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

Dabei ist C der Massenanteil, ausgedrückt als Zehnerpotenz (Exponent) (z. B. 1 mg/g = 10<sup>-3</sup>). Tabelle 3 zeigt Beispiele.

**Tabelle 3**

#### Beispiele für Reproduzierbarkeits-CVs für quantitative Methoden bei einem Bereich von Massenanteilen des Analyten

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

(\*) Für Massenanteile von weniger als 100 µg/kg liefert die Horwitz-Gleichung inakzeptabel hohe Werte. Deshalb müssen die Variationskoeffizienten (CVs) für Konzentrationen unter 100 µg/kg möglichst klein sein.

Bei Analysen unter Wiederholbedingungen sollte der laborinterne Variationskoeffizient typischerweise zwischen der Hälfte und zwei Dritteln der obigen Werte liegen. Bei Analysen unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen darf der laborinterne Variationskoeffizient nicht größer als der Reproduzierbarkeits-CV sein.

Bei Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert muss die Methode eine laborinterne Reproduzierbarkeit erreichen, die nicht größer als der Reproduzierbarkeits-CV bei einer Konzentration von 0,5 × der zulässige Grenzwert ist.



### 2.3.3. Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für den massenspektrometrischen Nachweis

Massenspektrometrische Methoden kommen nur nach chromatografischer Online- oder Offline-Trennung als Bestätigungsmethoden in Betracht.

#### 2.3.3.1. Chromatografische Trennung

Bei GC-MS-Verfahren muss die gaschromatografische Trennung mit Kapillarsäulen durchgeführt werden. Bei LC-MS-Verfahren muss die chromatografische Trennung mit geeigneten LC-Säulen durchgeführt werden. In jedem Fall beträgt die akzeptable Mindestretentionszeit für den untersuchten Analyten das Doppelte der Retentionszeit für das Totvolumen der Säule. Die Retentionszeit (bzw. relative Retentionszeit) des Analyten in der Analysenprobe muss derjenigen des Kalibrierstandards innerhalb eines vorgegebenen Retentionszeitfensters entsprechen. Das Retentionszeitfenster muss dem Auflösungsvermögen des Chromatografiesystems entsprechen. Das Verhältnis der chromatografischen Retentionszeit des Analyten zu der des internen Standards, d. h. die relative Retentionszeit des Analyten, muss derjenigen der Kalibrierlösung entsprechen, bei einer Toleranz von  $\pm 0,5\%$  für die GC und  $\pm 2,5\%$  für die LC.

#### 2.3.3.2. Massenspektrometrischer Nachweis

Der massenspektrometrische Nachweis muss mit MS-Verfahren wie beispielsweise der Aufzeichnung von vollen Massenspektren (Full Scan) oder der Einzelmassenregistrierung (SIM) sowie MS-MS<sup>n</sup>-Verfahren wie dem Selected Reaction Monitoring (SRM) oder anderen geeigneten MS- oder MS-MS<sup>n</sup>-Verfahren in Kombination mit entsprechenden Ionisierungsarten durchgeführt werden. Bei der hochauflösenden Massenspektrometrie (HRMS) muss die Auflösung für den gesamten Massenbereich bei 10 % Tal typischerweise größer als 10 000 sein.

Full-Scan: Wenn die massenspektrometrische Bestimmung durch die Aufzeichnung von vollständigen Spektren erfolgt, ist das Vorhandensein aller gemessenen diagnostischen Ionen (Molekül-Ion, charakteristische Addukte des Molekül-Ions, charakteristische Fragment-Ionen und Isotopen-Ionen) mit einer relativen Intensität von mehr als 10 % im Referenzspektrum des Kalibrierstandards obligatorisch.

SIM: Erfolgt die massenspektrometrische Bestimmung mittels Fragmentografie, muss das Molekül-Ion vorzugsweise eines der ausgewählten diagnostischen Ionen sein (Molekül-Ion, charakteristische Addukte des Molekül-Ions, charakteristische Fragment-Ionen und alle ihre Isotopen-Ionen). Die gewählten diagnostischen Ionen sollten nicht ausschließlich aus demselben Teil des Moleküls stammen. Das Signal-Rausch-Verhältnis für jedes diagnostische Ion muss  $\geq 3:1$  sein.

Full-Scan und SIM: Die relativen Intensitäten der nachgewiesenen Ionen, ausgedrückt in Prozent der Intensität des intensivsten Ions oder Übergangs, müssen denjenigen des Kalibrierstandards entsprechen, und zwar entweder aus Kalibrierstandardlösungen oder aus dotierten Proben in vergleichbaren Konzentrationen, gemessen unter den gleichen Bedingungen innerhalb der folgenden Toleranzen:

**Tabelle 4**

#### Zulässige Höchsttoleranzen für relative Ionenintensitäten bei einer Reihe von massenspektrometrischen Verfahren

Relative Intensität (% des Basispeaks)	EI-GC-MS (relativ)	CI-GC-MS, GC-MS <sup>a</sup> LC-MS, LC-MS <sup>a</sup> (relativ)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 %-50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 %-20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Auswertung von Massenspektren: Die relativen Intensitäten der diagnostischen Ionen und/oder Vorläufer-/Produkt-Ionenpaare müssen durch Vergleich von Spektren oder durch Integration der Signale der Einzelmassen ermittelt werden. Wenn eine Hintergrundkorrektur angewandt wird, muss diese gleichmäßig über die gesamte Probenserie angewandt (siehe 2.3.1, Absatz 4) und eindeutig angegeben werden.

Full-Scan: Wenn vollständige Spektren in einer Einzelmassenspektrometrie aufgezeichnet werden, müssen mindestens vier Ionen mit einer relativen Intensität von  $\geq 10\%$  des Basispeaks vorhanden sein. Das Molekül-Ion sollte eingeschlossen sein, wenn es im Referenzspektrum mit einer relativen Intensität von  $\geq 10\%$  vorhanden ist. Mindestens vier Ionen müssen innerhalb der zulässigen Höchsttoleranzen für relative Ionenintensitäten liegen (Tabelle 5). Eine computergestützte Bibliothekssuche kann durchgeführt werden. In diesem Fall muss das Ergebnis des Vergleichs der Massenspektren der Untersuchungsproben mit dem der Kalibrierlösung einen kritischen Abgleichfaktor überschreiten. Dieser Faktor wird bei der Validierung für jeden Analyten auf der Basis von Spektren bestimmt, für welche die unten beschriebenen Kriterien erfüllt sind. Schwankungen in den Spektren, die durch die Probenmatrix und die Leistungsfähigkeit des Detektors verursacht werden können, müssen überprüft werden.

SIM: Wenn Massenfragmente nicht mit Full-Scan-Verfahren gemessen werden, muss ein System von Identifizierungspunkten zur Auswertung der Daten verwendet werden. Zur Bestätigung von Stoffen in Gruppe A des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG werden mindestens 4 Identifizierungspunkte benötigt. Zur Bestätigung von Stoffen in Gruppe B von Anhang I der Richtlinie 96/23/EG werden mindestens 3 Identifizierungspunkte benötigt. Die folgende Tabelle zeigt die Anzahl der Identifizierungspunkte, die jedes der massenspektrometrischen Basisverfahren liefern kann. Damit jedoch die für die Bestätigung erforderlichen Identifizierungspunkte vergeben und die Summe der Identifizierungspunkte berechnet werden kann, müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

- Mindestens ein Ionenverhältnis muss gemessen werden und
- alle relevanten gemessenen Ionenverhältnisse müssen die oben beschriebenen Kriterien erfüllen und
- maximal drei separate Verfahren können kombiniert werden, um die Mindestanzahl an Identifizierungspunkten zu erhalten.

Tabelle 5

**Zusammenhang zwischen einer Reihe von Massenfragment-Klassen und erzielten Identifizierungspunkten**

MS-Verfahren	Erzielte Identifizierungspunkte pro Ion
Niedrig auflösende Massenspektrometrie (LR-MS)	1,0
LR-MS <sup>n</sup> Vorläufer-Ion	1,0
LR-MS <sup>n</sup> Übergangsprodukte	1,5
HRMS	2,0
HR- MS <sup>n</sup> Vorläufer-Ion	2,0
HR-MS <sup>n</sup> Übergangsprodukte	2,5

*Anmerkungen:*

- Jedes Ion kann nur einmal gezählt werden.
- Die GC-MS mit Elektronenstoßionisierung gilt als ein anderes Verfahren als die GC-MS mit chemischer Ionisierung.
- Verschiedene Analyte können nur dann verwendet werden, um die Anzahl der Identifizierungspunkte zu erhöhen, wenn die Derivate verschiedene Reagenzien verwenden.
- Wenn für Stoffe in Gruppe A des Anhangs I der Richtlinie 96/23/EG die folgenden Verfahren bei der Analyse verwendet werden, können diese maximal einen Identifizierungspunkt liefern, sofern die einschlägigen Kriterien für diese Verfahren erfüllt sind: HPLC gekoppelt mit Full-Scan-Diodenarray-Spektrofotometrie (DAD), HPLC gekoppelt mit Fluoreszenzdetektion, HPLC gekoppelt mit einem Immunogramm oder zweidimensionale TLC gekoppelt mit spektrometrischem Nachweis.
- Übergangsprodukte schließen sowohl Tochter- als auch Enkeltochter-Produkte ein.

Tabelle 6

**Beispiele für die Anzahl der Identifizierungspunkte für eine Reihe von Verfahren und deren Kombinationen (n = ganze Zahl)**

Verfahren	Anzahl der Ionen	Identifizierungspunkte
GC-MS (EI oder CI)	N	n
GC-MS (EI und CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI oder CI) 2 Derivate	2 (Derivat A) + 2 (Derivat B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 Vorläufer und 2 Töchter	4
LC-MS-MS	1 Vorläufer und 2 Töchter	4
GC-MS-MS	2 Vorläufer-Ionen mit je 1 Tochter	5
LC-MS-MS	2 Vorläufer-Ionen mit je 1 Tochter	5
LC-MS-MS-MS	1 Vorläufer, 1 Tochter und 2 Enkeltochter	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS und LC-MS	2 + 2	4
GC-MS und HRMS	2 + 1	4

### 2.3.4. Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für die Chromatografie gekoppelt mit Infrarotdetektion

Adäquate Peaks: Adäquate Peaks sind Absorptionsmaxima im Infrarotspektrum eines Kalibrierstandards, welche die folgenden Anforderungen erfüllen.

#### 2.3.4.1. Infrarotdetektion

Absorptionsmaximum: Muss im Wellenzahlbereich von 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$  liegen.

Absorptionsintensität: Darf nicht kleiner sein als

- a) ein spezifisches molares Absorptionsmaß von 40 bezogen auf das Grundrauschen; oder
- b) eine relative Absorption von 12,5 % der Absorption des intensivsten Peaks im Bereich von 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$ , wenn beide bezogen auf Nullabsorption gemessen werden, und von 5 % der Absorption des intensivsten Peaks im Bereich von 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$ , wenn beide bezogen auf ihr Grundrauschen gemessen werden.

Hinweis: Obwohl adäquate Peaks gemäß Buchstabe a) theoretisch vorzuziehen wären, sind in der Praxis die Peaks entsprechend Buchstabe b) leichter zu bestimmen.

Es wird die Anzahl der Peaks im Infrarotspektrum des Analyten ermittelt, deren Frequenzen denen eines adäquaten Peaks im Spektrum des Kalibrierstandards mit einer Toleranz von  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$  entsprechen.

#### 2.3.4.2. Auswertung von Infrarotspektren

Eine Absorption muss in allen Bereichen des Analytspektrums auftreten, die einem adäquaten Peak im Referenzspektrum des Kalibrierstandards entsprechen. Mindestens sechs adäquate Peaks im Infrarotspektrum des Kalibrierstandards sind erforderlich. Wenn weniger als sechs adäquate Peaks vorhanden sind (7), kann das betreffende Spektrum nicht als Referenzspektrum verwendet werden. Der „Score“, d. h. der Anteil der adäquaten Peaks, der im Infrarotspektrum des Analyten gefunden wird, muss mindestens 50 betragen. Wo eine genaue Bestimmung des adäquaten Peaks nicht möglich ist, darf der entsprechende Bereich des Analytspektrums das Vorhandensein eines passenden Peaks nicht ausschließen. Das Verfahren ist nur für Absorptions-Peaks im Probenspektrum anwendbar, deren Intensität mindestens das Dreifache des Rauschens zwischen zwei Peaks beträgt.

### 2.3.5. Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für die Bestimmung eines Analyten mittels LC mit anderen Detektionsverfahren

#### 2.3.5.1. Chromatografische Trennung

Ein interner Standard muss verwendet werden, wenn ein für diesen Zweck geeignetes Material zur Verfügung steht. Es muss vorzugsweise ein verwandter Standard mit einer Retentionszeit nahe der des Analyten sein. Der Analyt muss bei der Retentionszeit eluieren, die für den entsprechenden Kalibrierstandard unter den gleichen Versuchsbedingungen typisch ist. Die akzeptable Mindestretentionszeit für einen Analyten muss das Zweifache der Retentionszeit des Totvolumens der Säule betragen. Das Verhältnis der Retentionszeit des Analyten zu der des internen Standards, d. h. die relative Retentionszeit des Analyten, muss mit einer Toleranz von  $\pm 2,5 \%$  mit der des Kalibrierstandards in der entsprechenden Matrix identisch sein.

#### 2.3.5.2. Full-Scan-UV-Detektion

Die Leistungskriterien für LC-Methoden müssen erfüllt sein.

Die Absorptionsmaxima im Spektrum des Analyten müssen mit einer Toleranz, die durch das Auflösungsvermögen des Detektionssystems bestimmt wird, bei denselben Wellenlängen wie die des Kalibrierstandards liegen. Bei der Dioden-Array-Detektion beträgt das Auflösungsvermögen typischerweise  $\pm 2 \text{ nm}$ . Das Analytspektrum oberhalb von 220 nm darf sich im Bereich mit einem relativen Absorptionsvermögen von  $\geq 10 \%$  optisch nicht vom Spektrum des Kalibrierstandards unterscheiden. Dieses Kriterium ist erfüllt, wenn zum einen die gleichen Maxima vorliegen und zum anderen der Unterschied zwischen den beiden Spektren an keinem Punkt mehr als 10 % des Absorptionsvermögens des Kalibrierstandards beträgt. Wenn eine computergestützte Bibliothekssuche und Anpassung durchgeführt wird, muss das Ergebnis des Vergleichs der Spektren der Untersuchungsproben mit dem der Kalibrierlösung einen kritischen Abgleichfaktor überschreiten. Dieser Faktor wird bei der Validierung für jeden Analyten auf der Basis von Spektren bestimmt, für welche die oben beschriebenen Kriterien erfüllt sind. Schwankungen in den Spektren, die durch die Probenmatrix und die Leistungsfähigkeit des Detektors verursacht werden können, müssen überprüft werden.

### 2.3.5.3. Leistungskriterien für die fluorometrische Detektion

Die Leistungskriterien für LC-Methoden müssen erfüllt sein.

Dies betrifft Moleküle, die eine natürliche Fluoreszenz aufweisen, und Moleküle, die nach Transformation oder Derivatisierung eine Fluoreszenz zeigen. Die Anregungs- und Emissionswellenlängen müssen in Verbindung mit den chromatografischen Bedingungen so gewählt werden, dass das Auftreten von störenden Bestandteilen in Leerwertprobenextrakten auf ein Mindestmaß reduziert wird.

Das nächstgelegene Peakmaximum im Chromatogramm muss bei 10 % der maximalen Höhe des Analytpeaks mindestens eine volle Peakbreite vom festgestellten Peak des Analyten getrennt sein.

### 2.3.5.4. Leistungskriterien für die Bestimmung eines Analyten mit einem LC-Immunogramm

Ein LC-Immunogramm ist für sich allein nicht als Bestätigungsmethode geeignet.

Die einschlägigen Kriterien für LC-Methoden müssen erfüllt sein.

Die vorgegebenen Qualitätskontrollparameter, z. B. unspezifische Bindung, relative Bindung der Kontrollproben und der Absorptionswert der Leerwertbestimmung, müssen innerhalb der bei der Validierung des Assays ermittelten Grenzwerte liegen.

Das Immunogramm muss durch mindestens fünf Fraktionen zustande kommen.

Jede Fraktion muss kleiner als die Hälfte der Peakbreite sein.

Die Fraktion mit dem höchsten Gehalt des Analyten muss für die Testprobe, die positive Kontrollprobe und den Standard die gleiche sein.

### 2.3.5.5. Bestimmung eines Analyten mittels LC mit UV/VIS-Detektion (eine Wellenlänge)

Die LC mit UV/VIS-Detektion (eine Wellenlänge) ist für sich allein nicht als Bestätigungsmethode geeignet.

Das nächstgelegene Peakmaximum im Chromatogramm muss bei 10 % der maximalen Höhe des Analytpeaks mindestens eine volle Peakbreite vom festgestellten Peak des Analyten getrennt sein.

### 2.3.6. **Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für die Bestimmung eines Analyten mittels 2D-TLC gekoppelt mit Full-Scan-UV/VIS-spektrometrischer Detektion**

Die zweidimensionale HPTLC und die Co-Chromatografie sind obligatorisch.

Die RF-Werte des Analyten müssen mit den RF-Werten der Standards innerhalb einer Toleranz von  $\pm 5\%$  übereinstimmen.

Das Erscheinungsbild des Analyten darf sich von dem des Standards nicht unterscheiden.

Bei Flecken der gleichen Farbe muss das Zentrum des Flecks, der dem Zentrum des Flecks des Analyten am nächsten liegt, von diesem mindestens die Hälfte der Summe der Fleckdurchmesser entfernt sein.

Das Spektrum des Analyten darf sich, wie für die Full-Scan-UV/VIS-Detektion beschrieben, in seinem Erscheinungsbild nicht vom Spektrum des Standards unterscheiden.

Wenn eine computergestützte Bibliothekssuche und Anpassung durchgeführt wird, muss das Ergebnis des Vergleichs der Spektren der Untersuchungsproben mit dem der Kalibrierlösung einen kritischen Abgleichfaktor überschreiten. Dieser Faktor wird bei der Validierung für jeden Analyten auf der Basis von Spektren bestimmt, für welche die oben beschriebenen Kriterien erfüllt sind. Schwankungen in den Spektren, die durch die Probenmatrix und die Leistungsfähigkeit des Detektors verursacht werden können, müssen überprüft werden.

### 2.3.7. **Leistungskriterien und Anforderungen für die Bestimmung eines Analyten mittels GC in Kombination mit der Elektroneneinfangdetektion (ECD)**

Ein interner Standard muss verwendet werden, wenn ein für diesen Zweck geeignetes Material zur Verfügung steht. Es muss vorzugsweise ein verwandter Standard mit einer Retentionszeit nahe der des Analyten sein. Der Analyt muss bei der Retentionszeit eluieren, die für den entsprechenden Kalibrierstandard unter den gleichen Versuchsbedingungen typisch ist. Die akzeptable Mindestretentionszeit für einen Analyten muss das Zweifache der Retentionszeit des Totvolumens der Säule betragen. Das Verhältnis der Retentionszeit des Analyten zu der des internen Standards, d. h. die relative Retentionszeit des Analyten, muss mit einer Toleranz von  $\pm 0,5\%$  mit der des Kalibrierstandards in der entsprechenden Matrix identisch sein. Das nächstgelegene Peakmaximum im Chromatogramm muss bei 10 % der maximalen Höhe des Analytpeaks mindestens eine volle Peakbreite vom festgestellten Peak des Analyten getrennt sein. Zusätzliche Informationen können durch Co-Chromatografie gewonnen werden.

## 2.4. BESTÄTIGUNGSMETHODEN FÜR ELEMENTE

Bestätigungsanalysen für chemische Elemente müssen auf der eindeutigen Identifizierung und der genauen und präzisen Quantifizierung mit Hilfe von chemisch-physikalischen Eigenschaften beruhen, die für das betreffende chemische Element in der interessierenden Konzentration einzigartig sind (z. B. elementcharakteristische Wellenlänge der emittierten oder absorbierten Strahlung, Atommasse).

Die folgenden Methoden oder Methodenkombinationen gelten als geeignet für die Identifizierung von chemischen Elementen:

Tabelle 7

## Geeignete Bestätigungsmethoden für chemische Elemente

Verfahren	Messparameter
Differentielle anodische Stripping-Pulsvoltammetrie	Elektrisches Signal
Atomabsorptionsspektrometrie	
Flamme	Absorptionswellenlänge
Hydridzerzeugung	Absorptionswellenlänge
Kaldampf	Absorptionswellenlänge
Elektrothermische Atomisierung (Graphitofen)	Absorptionswellenlänge
Atomemissionsspektrometrie	
Induktiv gekoppeltes Plasma	Emissionswellenlänge
Massenspektrometrie	
Induktiv gekoppeltes Plasma	Masse-Ladungs-Verhältnis

## 2.4.1. Gemeinsame Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für Bestätigungsmethoden

Referenzmaterial oder dotiertes Material, das bekannte Analytmengen an oder nahe der zulässigen Höchstmenge oder der Entscheidungsgrenze (positive Kontrollprobe) enthält, sowie negatives Kontrollmaterial und Reagenzleerwerte sollten vorzugsweise während des gesamten Verfahrens parallel zu jeder Serie von Untersuchungsproben analysiert werden. Die empfohlene Reihenfolge für die Injektion der Extrakte in das Analysengerät ist: Reagenzleerwert, negative Kontrollprobe, zu bestätigende Probe, negative Kontrollprobe und schließlich die positive Kontrollprobe. Jede Abweichung von dieser Reihenfolge muss begründet werden.

Im Allgemeinen muss bei den meisten Analyseverfahren die organische Matrix vollständig aufgeschlossen werden, um vor der Bestimmung des Analyten Lösungen zu erhalten. Dazu können Mikrowellen-Mineralisationsverfahren verwendet werden, die das Risiko eines Verlustes und/oder einer Verunreinigung der interessierenden Analyte auf ein Mindestmaß reduzieren. Dekontaminierte Teflongefäße von guter Qualität müssen verwendet werden. Wenn andere Nass- oder Trockenaufschlussmethoden herangezogen werden, sollten dokumentierte Belege vorliegen, die potentielle Analytverluste oder -verunreinigungen ausschließen. Als Alternative zum Aufschluss können unter Umständen Trennverfahren (beispielsweise die Extraktion) gewählt werden, um Analyte von Matrixbestandteilen zu trennen und/oder Analyte zu konzentrieren, bevor sie dem Analysengerät zugeführt werden.

Bei der Kalibrierung, sei es extern oder anhand der Methode der Standardaddition, ist sorgfältig darauf zu achten, dass der für die Analyse festgelegte Arbeitsbereich nicht überschritten wird. Bei der externen Kalibrierung müssen die Kalibrierstandards unbedingt in einer Lösung hergestellt werden, die der Zusammensetzung der Probenlösung möglichst genau entspricht. Eine Hintergrundkorrektur muss ebenfalls angewandt werden, falls aufgrund der speziellen Gegebenheiten der Analyse erforderlich.

## 2.4.2. Zusätzliche Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für quantitative Analysemethoden

## 2.4.2.1. Richtigkeit von quantitativen Methoden

Bei wiederholten Analysen eines zertifizierten Referenzmaterials auf Elemente darf die Abweichung des experimentell bestimmten mittleren Gehalts vom zertifizierten Wert nicht außerhalb der Toleranzgrenze von  $\pm 10\%$  liegen. Wenn keine solchen zertifizierten Referenzmaterialien zur Verfügung stehen, ist die Bestimmung der Richtigkeit der Messungen durch Wiederfindung von zugesetzten bekannten Mengen des Elements zu den unbekanntem Proben akzeptabel. Es ist darauf hinzuweisen, dass das zugegebene Element nicht wie der Analyt in der realen Matrix chemisch gebunden ist und dass deshalb die mit dieser Methode erzielten Ergebnisse weniger valide als die mit zertifizierten Referenzmaterialien gewonnenen Ergebnisse sind. Wiederfindungsdaten sind nur dann akzeptabel, wenn sie innerhalb eines Toleranzbereichs von  $\pm 10\%$  um den Zielwert liegen.

#### 2.4.2.2. Präzision von quantitativen Methoden

Bei wiederholter Analyse einer Probe unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen darf der laborinterne Variationskoeffizient (CV) des Mittelwerts die folgenden Werte nicht überschreiten:

**Tabelle 8**

**CVs für quantitative Methoden bei einer Reihe von Elementmassenanteilen**

Massenanteil	CV (%)
≥ 10 µg/kg bis 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg bis 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

#### 2.4.3. Spezifische Anforderungen für die differenzielle anodische Stripping-Pulsvoltammetrie (DPASV)

Vor einer DPASV-Bestimmung ist eine vollständige Zerstörung von organischen Stoffen von größter Bedeutung. Im Voltammogramm dürfen keine breiten Signale wegen des Vorhandenseins von organischen Stoffen auftreten. Anorganische Matrixbestandteile können die Peakhöhen bei der DPASV beeinflussen. Deshalb muss die Quantifizierung mit der Methode der Standardaddition erfolgen. Beispiele von typischen Voltammogrammen einer Probenlösung müssen der Methode beigefügt werden.

#### 2.4.4. Spezifische Anforderungen für die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS)

Dieses Verfahren ist grundsätzlich ein Einelementverfahren und erfordert deshalb eine Optimierung der Analysenbedingungen in Abhängigkeit von dem zu quantifizierenden Element. Die Ergebnisse müssen nach Möglichkeit qualitativ und quantitativ anhand von alternativen Absorptionslinien kontrolliert werden (im Idealfall sollten zwei verschiedene Linien gewählt werden). Kalibrierstandards müssen in einer Lösungsmatrix hergestellt werden, die derjenigen der Probenmesslösung möglichst genau entspricht (z. B. in der Säurekonzentration oder der Zusammensetzung des Modifikators). Um Leerwerte auf ein Mindestmaß zu reduzieren, müssen alle Reagenzien von höchstmöglicher Reinheit sein. Je nach gewählter Methode der Verdampfung bzw. Atomisierung der Probe lassen sich verschiedene Arten der AAS unterscheiden.

##### 2.4.4.1. Spezifische Anforderungen für die Flammen-AAS

Die empfohlenen Geräteeinstellungen müssen für jedes Element optimiert werden. Vor allem die Gaszusammensetzung und die Fließgeschwindigkeiten müssen überprüft werden. Ein Kontinuumsstrahler-Korrektursystem muss verwendet werden, um Störungen durch die Hintergrundabsorption zu vermeiden. Bei unbekanntem Matrices muss überprüft werden, ob eine Hintergrundkorrektur erforderlich ist.

##### 2.4.4.2. Spezifische Anforderungen für die Graphitrohrföfen-AAS

Eine Verunreinigung im Labor beeinflusst häufig die Genauigkeit bei Analysen im Ultraspurenbereich im Graphitrohrföfen. Deshalb sollten hochreine Reagenzien, deionisiertes Wasser und inerte Kunststoffgeräte zur Handhabung der Proben und Reagenzien verwendet werden. Die empfohlenen Geräteeinstellungen müssen für jedes Element optimiert werden. Vor allem die Vorbehandlungs- und Atomisierungsbedingungen (Temperatur, Zeit) und die Matrixmodifikation müssen überprüft werden.

Das Arbeiten unter isothermischen Atomisierungsbedingungen (z. B. im quergeheizten Graphitrohrföfen mit integrierter Lvov-Plattform (8)) verringert den Einfluss der Matrix auf die Atomisierung des Analyten. In Verbindung mit der Matrixmodifikation und der Zeeman-Hintergrundkorrektur (9) ist eine Quantifizierung anhand einer Kalibrierkurve möglich, die auf der Messung von wässrigen Standardlösungen basiert.

#### 2.4.5. Spezifische Anforderungen für die Atomabsorptionsspektrometrie mit Hydridherzeugung

Organische Verbindungen, die Elemente wie Arsen, Wismut, Germanium, Blei, Antimon, Selen, Zinn und Tellur enthalten, können sehr stabil sein und müssen oxidativ zerlegt werden, damit korrekte Ergebnisse für den Gesamtelementgehalt gewonnen werden. Deshalb wird ein Mikrowellenaufschluss oder eine Hochdruckveraschung unter starken oxidativen Bedingungen empfohlen. Dabei sollte äußerst sorgfältig auf die vollständige und reproduzierbare Umwandlung der Elemente in ihre entsprechenden Hydride geachtet werden.

Die Bildung von Arsenhydrid in Salzsäurelösung mit  $\text{NaBH}_4$  hängt vom Oxidationszustand von Arsen ab (As III: schnelle Bildung, As V: längere Bildungszeit). Um eine Empfindlichkeitseinbuße bei der Bestimmung von As V mit der Fließinjektionstechnik aufgrund der kurzen Reaktionszeit in diesem System zu vermeiden, muss As V nach der oxidativen Zerlegung zu As III reduziert werden. Hierfür sind Kaliumiodid/Ascorbinsäure oder Cystein geeignet. Leerwert-, Kalibrier- und Probenlösungen müssen in der gleichen Weise behandelt werden. Der Einsatz eines Chargensystems ermöglicht die Bestimmung beider Arsenspezies, ohne dass die Genauigkeit beeinträchtigt wird. Aufgrund der verzögerten Bildung von As-V-Hydrid muss die Kalibrierung durch Peakflächenintegration erfolgen. Die empfohlenen Geräteeinstellungen müssen optimiert werden. Vor allem der Gasfluss, der das Hydrid in den Atomisator befördert, muss überprüft werden.

#### 2.4.6. Spezifische Anforderungen für die Kaltdampf-Atomabsorptionsspektrometrie

Kaltdampf wird nur für die Bestimmung von Quecksilber verwendet. Aufgrund von Verflüchtigungs- und Adsorptionsverlusten von elementarem Quecksilber ist während der gesamten Analyse besondere Sorgfalt geboten. Eine Verunreinigung durch Reagenzien oder die Umgebung muss sorgfältig vermieden werden.

Organische Verbindungen, die Quecksilber enthalten, müssen oxidativ zerlegt werden, damit korrekte Ergebnisse für den Gesamtquecksilbergehalt erzielt werden. Zur Zerlegung werden geschlossene Systeme mit Mikrowellenaufschluss oder Hochdruckveraschung empfohlen. Besondere Sorgfalt ist bei der Reinigung der Geräte geboten, die mit Quecksilber in Kontakt kamen.

Der Einsatz der Fließinjektionstechnik ist von Vorteil. Bei niedrigeren Entscheidungsgrenzen empfiehlt sich eine Adsorption von elementarem Quecksilber an Gold-/Platinabsorber mit anschließender thermischer Desorption. Ein Kontakt des Adsorbers oder der Küvette mit Feuchtigkeit stört die Messung und muss deshalb vermieden werden.

#### 2.4.7. Spezifische Anforderungen für die Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-AES)

Die Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (10) ist eine Multielementmethode zur gleichzeitigen Messung verschiedener Elemente. Für die ICP-AES müssen die Proben zunächst aufgeschlossen werden, um organische Matrices zu ersetzen. Hierfür müssen geschlossene Systeme mit Mikrowellenaufschluss oder Hochdruckveraschung verwendet werden. Für eine aussagefähige ICP-AES-Analyse spielen die Gerätekalibrierung und die Element- bzw. Wellenlängenwahl eine wesentliche Rolle. Bei der Gerätekalibrierung müssen im Fall von linearen Kalibrierkurven normalerweise Kalibrierlösungen mit nur vier Konzentrationen gemessen werden, weil ICP-AES-Kalibrierkurven im Allgemeinen über vier bis sechs Konzentrationsgrößenordnungen linear sind. Die Kalibrierung des ICP-AES-Systems sollte normalerweise mit einem Multielementstandard durchgeführt werden, der in einer Lösung hergestellt werden muss, welche die gleiche Säurekonzentration wie die Messlösung enthält. Für die lineare Kurve müssen die Elementkonzentrationen überprüft werden.

Die Wahl der Wellenlängen zur Messung der Emission der Analyte richtet sich nach den Konzentrationen der zu bestimmenden Analyte. Wenn die Analytkonzentration außerhalb des Arbeitsbereichs einer Emissionslinie liegt, muss eine andere Emissionslinie verwendet werden. Zunächst muss die empfindlichste Emissionslinie (nicht gestört) gewählt werden, dann eine weniger empfindliche Linie. Bei Analysen an oder nahe der Nachweisgrenze ist die empfindlichste Linie für den betreffenden Analyten normalerweise am besten geeignet. Spektrale Störungen und Hintergrundstörungen bereiten bei der ICP-AES die größten Schwierigkeiten. Mögliche Störungen sind z. B. die einfache Hintergrundverschiebung, die ansteigende Hintergrundverschiebung, die direkte spektrale Überlappung und die komplexe Hintergrundverschiebung. Für jede dieser Störungen gibt es bestimmte Ursachen und Abhilfemaßnahmen. Je nach den Matrices muss sowohl eine Korrektur der Störungen als auch eine Optimierung der Betriebsparameter vorgenommen werden. Einige Störungen lassen sich durch Verdünnung oder Anpassung der Matrices vermeiden. Mit jeder Serie von Untersuchungsproben müssen Referenzmaterialien und dotierte Materialien mit bekannten Analytmengen sowie Leerwertmaterial in der gleichen Weise wie die Untersuchungsproben analysiert werden. Zur Prüfung auf eine Drift muss der Standard z. B. nach 10 Proben überprüft werden. Alle Reagenzien sowie das Plasmagas müssen von höchstmöglicher Reinheit sein.

#### 2.4.8. Spezifische Anforderungen für die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) (11)

Die Bestimmung von Spurenelementen mit durchschnittlicher Atommasse, wie zum Beispiel Chrom, Kupfer und Nickel, kann starken Störungen durch andere isobare und mehratomige Ionen unterliegen. Diese lassen sich nur vermeiden, wenn ein Auflösungsvermögen von mindestens 7 000-8 000 gegeben ist. Schwierigkeiten bei den MS-Verfahren sind die instrumentelle Drift, Matrixeffekte und Molekülionen-Störungen ( $m/z < 80$ ). Zur Korrektur der instrumentellen Drift und der Matrixeffekte ist eine mehrfache interne Standardisierung erforderlich, die denselben Massenbereich wie die zu bestimmenden Elemente abdeckt.

Vor den ICP-MS-Messungen ist eine vollständige Zersetzung von organischen Stoffen in den Proben erforderlich. Wie bei der AAS müssen flüchtige Elemente wie z. B. Iod nach Aufschluss in geschlossenen Gefäßen in einen stabilen Oxidationszustand überführt werden. Sehr starke Störungen kommen durch Molekülion-Kombinationen von Argon (Plasmagas), Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff und Sauerstoff (Auflösungssäuren, Verunreinigungen des Plasmagases und mitgeschleppte Luftgase) und der Probenmatrix zustande. Zur Vermeidung von Störungen sind ein vollständiger Aufschluss, Hintergrundmessungen, eine entsprechende Wahl von analytischen Massen, die mitunter in geringerer Häufigkeit vorkommen (schlechtere Nachweisgrenze), und von Auflösungssäuren, beispielsweise Salpetersäure, erforderlich.

Für die zu bestimmenden Elemente sind Störungen durch entsprechende Wahl von spezifischen analytischen Massen einschließlich der Bestätigung von Isotopenverhältnissen auszuschließen. Das Geräteverhalten unter Berücksichtigung von Fano-Faktoren muss für jede Messung mit Hilfe von internen Standards überprüft werden.

3. VALIDIERUNG

Die Validierung muss nachweisen, dass die Analyse­methode die für die einschlägigen Leistungsmerkmale gültigen Kriterien erfüllt.

Unterschiedliche Kontrollzwecke erfordern verschiedene Kategorien von Methoden. Aus der folgenden Tabelle geht hervor, welche Leistungsmerkmale für welchen Methodentyp verifiziert werden müssen.

Tabelle 9

**Klassifikation von Analysenmethoden nach den Leistungsmerkmalen, die bestimmt werden müssen**

		Nachweisgrenze CC $\beta$	Entscheidungs- grenze CC $\alpha$	Richtigkeit/ Wiederfindung	Präzision	Selektivität/ Spezifität	Anwendbarkeit/ Robustheit/ Stabilität
Qualitative Methoden	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Quantitative Methoden	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = Screeningmethoden; C = Bestätigungsmethoden; + = Bestimmung ist obligatorisch.

3.1. VALIDIERUNGSVERFAHREN

Dieses Kapitel enthält Beispiele für bzw. Verweise auf Validierungsverfahren für Analysenmethoden. Andere Ansätze zum Nachweis, dass die Analyse­methode die Leistungskriterien für Leistungsmerkmale erfüllt, können verwendet werden, sofern sie denselben Informationsgehalt liefern.

Die Validierung kann auch vorgenommen werden, indem eine Laborvergleich­untersuchung gemäß Codex Alimentarius, ISO oder IUPAC (12) durchgeführt wird, oder mit alternativen Methoden, wie zum Beispiel laborinternen Validierungsstudien (13) (14). Dieses Kapitel konzentriert sich auf die laborinterne Validierung mit einem modularen Ansatz. Dieser Ansatz umfasst:

1. eine Reihe von allgemeinen Leistungsmerkmalen, die vom verwendeten Validierungsmodell unabhängig sind, und
2. spezifischere modellabhängige Verfahren (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10

**Modellunabhängige und modellabhängige Leistungsparameter**

Validierung		
Modellunabhängige Leistungsparameter	Modellabhängige Leistungsparameter	
Allgemeine Leistungsmerkmale (3.1.1)	Herkömmlicher Validierungsansatz (3.1.2)	Laborinterner Validierungsansatz (3.1.3)
Spezifität	Wiederfindung	Wiederfindung
Richtigkeit	Wiederholpräzision	Wiederholpräzision
Robustheit: geringfügige Änderungen	Laborinterne Reproduzierbarkeit	Laborinterne Reproduzierbarkeit
Stabilität	Reproduzierbarkeit	Reproduzierbarkeit
	Entscheidungsgrenze (CC $\alpha$ )	Entscheidungsgrenze (CC $\alpha$ )
	Nachweisvermögen (CC $\beta$ )	Nachweisvermögen (CC $\beta$ )
	Kalibrierkurven	Kalibrierkurve
	Robustheit: größere Änderungen	Robustheit



### 3.1.1. Modellunabhängige Leistungsmerkmale

Unabhängig vom gewählten Validierungsansatz müssen die folgenden Leistungsmerkmale bestimmt werden. Um den Arbeitsaufwand auf ein Mindestmaß zu reduzieren, können die durchgeführten Untersuchungen sorgfältig durchdacht und statistisch fundiert kombiniert werden, um verschiedene Parameter zu bestimmen.

#### 3.1.1.1. Spezifität

Für Analysemethoden ist das Unterscheidungsvermögen zwischen dem Analyten und eng verwandten Stoffen (Isomeren, Metaboliten, Abbauprodukten, endogenen Stoffen, Matrixbestandteilen usw.) wichtig. Zwei Ansätze sind zur Prüfung auf Störungen notwendig.

Deshalb müssen potenziell störende Substanzen ausgewählt und geeignete Leerwertproben analysiert werden, um das Vorhandensein möglicher Störungen nachzuweisen und die Auswirkung dieser Störungen abzuschätzen:

- eine Reihe von chemisch verwandten Verbindungen (Metabolite, Derivate usw.) oder andere Substanzen auswählen, die möglicherweise zusammen mit der interessierenden Verbindung, die in den Proben vorhanden sein kann, vorkommen;
- eine geeignete Anzahl an repräsentativen Leerwertproben ( $n \geq 20$ ) analysieren und in dem interessierenden Bereich, in dem die Elution des Zielanalyten zu erwarten ist, auf Störungen (Signale, Peaks, Ionenspuren) untersuchen;
- zusätzlich müssen repräsentative Leerwertproben in einer entsprechenden Konzentration mit Substanzen, welche die Identifizierung bzw. die Quantifizierung stören könnten, dotiert werden;
- nach der Analyse ist zu untersuchen, ob:
  - das Vorhandensein zu einer falschen Identifizierung führen kann,
  - die Identifizierung des Zielanalyten durch das Vorhandensein von einer oder mehreren Störungen beeinträchtigt wird oder
  - die Quantifizierung nennenswert beeinflusst wird.

#### 3.1.1.2. Richtigkeit

In diesem Abschnitt wird die Bestimmung der Richtigkeit (eine Komponente der Genauigkeit) beschrieben. Die Richtigkeit kann nur mit Hilfe eines zertifizierten Referenzmaterials (CRM) bestimmt werden. Ein CRM muss verwendet werden, wenn es zur Verfügung steht. Das Verfahren ist im Einzelnen in ISO 5725-4 beschrieben (5). Im Folgenden ist ein Beispiel aufgeführt:

- 6 Bestimmungen des CRM gemäß der Testvorschrift für die Methode analysieren;
- die Konzentration des Analyten in jeder der Bestimmungen ermitteln;
- den Mittelwert, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten (%) für diese Konzentrationen berechnen;
- die Richtigkeit berechnen, indem die gemessene mittlere Konzentration durch den zertifizierten Wert (gemessen als Konzentration) dividiert und mit 100 multipliziert und das Ergebnis als Prozentwert angegeben wird.

Richtigkeit (%) = mittlere wiederfindungskorrigierte gemessene Konzentration  $\times$  100/zertifizierter Wert.

Wenn kein CRM zur Verfügung steht, kann anstelle der Richtigkeit die Wiederfindung bestimmt werden, wie unter 4.1.2.1 weiter unten beschrieben.

#### 3.1.1.3. Anwendbarkeit/Robustheit (kleinere Änderungen)

In solchen Studien werden gezielt geringfügige vertretbare Veränderungen durch das Labor vorgenommen und ihre Folgen beobachtet.

Vor den Untersuchungen müssen Faktoren der Probenvorbereitung, des Clean-up und der Analyse bestimmt werden, welche die Messergebnisse beeinflussen können. Solche Faktoren können der Analytiker, die Quelle und das Alter der Reagenzien, Lösungsmittel, Standards und Probenextrakte, die Heizrate, die Temperatur, der pH-Wert sowie viele weitere Faktoren sein, die im Labor vorkommen können. Diese Faktoren sollten in einer Größenordnung verändert werden, die den normalerweise zwischen Laboratorien feststellbaren Abweichungen entspricht.

- Mögliche Faktoren ermitteln, welche die Ergebnisse beeinflussen können;
- jeden Faktor leicht variieren;

- einen Robustheitstest nach der Methode von Youden durchführen (15) (16). (Hier können auch andere zulässige Methoden verwendet werden. Die Methode nach Youden beschränkt jedoch den erforderlichen Zeit- und Arbeitsaufwand auf ein Minimum.) Die Methode nach Youden ist ein gebrochenes Faktormodell. Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Faktoren können nicht festgestellt werden;
- wenn sich herausstellt, dass ein Faktor die Messergebnisse wesentlich beeinflusst, sind weitere Untersuchungen durchzuführen, um die Akzeptanzgrenzen dieses Faktors zu bestimmen;
- Faktoren, welche die Ergebnisse wesentlich beeinflussen, sollten in der Methodenvorschrift deutlich angegeben werden.

Grundsätzlich sollte aber nicht eine Veränderung nach der anderen untersucht werden, sondern es sollten mehrere Veränderungen gleichzeitig ins Spiel gebracht werden. So seien beispielsweise A, B, C, D, E, F, G die Nennwerte für sieben verschiedene Faktoren, welche die Ergebnisse beeinflussen könnten, wenn ihre Nennwerte leicht verändert werden. Ihre alternativen Werte seien die entsprechenden Kleinbuchstaben a, b, c, d, e, f und g. Dies ergibt 2<sup>(7)</sup> oder 128 verschiedene mögliche Kombinationen.

Es ist nun möglich, daraus acht Kombinationen auszuwählen, in denen Groß- und Kleinbuchstaben ausgewogen verteilt sind (Tabelle 11). Acht Bestimmungen müssen durchgeführt werden, die eine Kombination der gewählten Faktoren (A-G) verwenden. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in Tabelle 11 als S-Z angegeben.

**Tabelle 11**

**Versuchsordnung für Robustheitsstudien (geringfügige Änderungen)**

Faktorwert F	Bestimmungen							
	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
Ergebnis R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Berechnungen siehe Beispiele für Robustheitstests in Abschnitt 3.3.

**3.1.1.4. Stabilität**

Es ist beobachtet worden, dass eine unzureichende Stabilität des Analyten oder von Matrixbestandteilen in der Probe während der Lagerung oder Analyse zu erheblichen Abweichungen im Analysenergebnis führen kann. Des Weiteren sollte die Stabilität des Kalibrierstandards in Lösung überprüft werden. Normalerweise ist die Analytstabilität unter verschiedenen Lagerungsbedingungen gut charakterisiert. Die Überwachung der Lagerungsbedingungen ist Bestandteil des normalen Laborakkreditierungssystems. Wenn die Stabilität nicht bekannt ist, kann sie entsprechend den folgenden Beispielen bestimmt werden.

**Stabilität des Analyten in Lösung**

- Frische Stammlösungen des (der) Analyte(n) herstellen und gemäß den Angaben in der Testvorschrift verdünnen, um genügend Aliquots (z. B. 40) jeder gewählten Konzentration (im Bereich der geforderten Mindestleistungsgrenze bei Stoffen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, oder im Bereich des zulässigen Grenzwerts bei anderen Stoffen) zu erhalten. Sowohl Lösungen des für die Dotierung und in der endgültigen Analyselösung verwendeten Analyten als auch sonstige interessierende Lösungen (z. B. derivatisierte Standards) herstellen;
- den Analytgehalt in der frisch hergestellten Lösung gemäß der Testvorschrift messen;
- entsprechende Volumina in geeignete Behältnisse pipettieren, etikettieren und nach folgendem Schema lagern:

Tabelle 12

## Lagerungsschema für die Bestimmung der Analytstabilität in Lösung

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Dunkel	10 Aliquots	10 Aliquots	10 Aliquots
Hell			10 Aliquots

- Als Lagerungszeiten können 1, 2, 3 und 4 Wochen gewählt werden oder länger, falls erforderlich, z. B. bis die ersten Zerfallserscheinungen bei der Identifizierung bzw. Quantifizierung zu beobachten sind. Die maximale Lagerungszeit und die optimalen Lagerungsbedingungen müssen dokumentiert werden.
- Die Konzentration des (der) Analyte(n) in jedem Aliquot sollte berechnet werden, indem die zum Zeitpunkt der Analyse frisch hergestellte Lösung des Analyten als 100 % angenommen wird.

$$\text{Restanalyt (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{frisch}}$$

$C_i$  = Konzentration zum Zeitpunkt

$C_{\text{frisch}}$  = Konzentration der frischen Lösung

## Stabilität des Analyten in Matrix

- Nach Möglichkeit sollten eingesandte Proben verwendet werden. Wenn kein eingesandtes Material verfügbar ist, sollte mit dem Analyten dotierte Matrix verwendet werden.
- Wenn eingesandtes Material zur Verfügung steht, sollte die Konzentration in diesem Material bestimmt werden, solange das Material noch frisch ist. Die Konzentration in weiteren Aliquots des Materials könnte nach 1, 2, 4 und 20 Wochen bestimmt werden. Das Gewebe sollte bei mindestens minus 20 °C gelagert werden, falls erforderlich, auch bei niedrigeren Temperaturen.
- Wenn kein eingesandtes Material verfügbar ist, sollte etwas Leerwertmaterial homogenisiert werden. Das Material in 5 Aliquots aufteilen. Jedes Aliquot mit dem Analyten dotieren, der vorzugsweise in einer geringen Menge wässriger Lösung zubereitet werden sollte. Ein Aliquot sofort analysieren. Die restlichen Aliquots bei mindestens minus 20 °C oder, falls erforderlich, auch bei niedrigeren Temperaturen lagern und nach 1, 2, 4 und 20 Wochen analysieren.

## 3.1.1.5. Kalibrierkurven

Wenn Kalibrierkurven zur Quantifizierung verwendet werden, gilt Folgendes:

- Mindestens fünf Konzentrationsstufen (einschließlich null) sollten zur Erstellung der Kurve verwendet werden.
- Der Messbereich der Kurve sollte beschrieben werden.
- Die mathematische Formel der Kurve und die Anpassungsgüte der Daten an die Kurve sollten beschrieben werden.
- Akzeptanzbereiche für die Parameter der Kurve sollten beschrieben werden.

Wenn eine serielle Kalibrierung auf der Basis einer Standardlösung erforderlich ist, müssen zulässige Bereiche für die Parameter der Kalibrierkurve, die von Serie zu Serie schwanken können, angegeben werden.

## 3.1.2. Herkömmliche Validierungsverfahren

Für die Berechnung der Parameter gemäß den herkömmlichen Methoden müssen mehrere Einzeluntersuchungen durchgeführt werden. Jedes Leistungsmerkmal muss für jede größere Änderung bestimmt werden (siehe unter Anwendbarkeit/Robustheit weiter oben). Bei Multianalytmethoden können mehrere Analyte gleichzeitig analysiert werden, sofern mögliche relevante Störungen zuvor ausgeschlossen werden. Mehrere Leistungsmerkmale können auf ähnliche Weise bestimmt werden. So empfiehlt es sich, zur Reduzierung des Aufwands die Untersuchungen soweit wie möglich zu kombinieren (z. B. Wiederholpräzision und laborinterne Reproduzierbarkeit mit der Spezifität, die Analyse von Leerwertproben zur Bestimmung der Entscheidungsgrenze und die Prüfung auf Spezifität).

## 3.1.2.1. Wiederfindung

Wenn kein zertifiziertes Referenzmaterial (CRM) zur Verfügung steht, muss die Wiederfindung durch Untersuchungen mit dotierter Leerwertmatrix bestimmt werden, z. B. nach folgendem Plan:

- 18 Aliquots eines Leerwertmaterials nehmen und je 6 Aliquots auf das 1-, 1,5- und 2fache der geforderten Mindestleistungsgrenze oder das 0,5-, 1- und 1,5fache des zulässigen Grenzwerts dotieren;
- die Proben analysieren und die Konzentration in jeder Probe berechnen;

- mit der unten angegebenen Gleichung die Wiederfindung für jede Probe berechnen;
- die mittlere Wiederfindung und den Variationskoeffizienten (CV) aus den 6 Ergebnissen jeder Konzentration berechnen;
- % Wiederfindung = 100 x gemessener Gehalt/Dotierung.

Diese herkömmliche Methode der Bestimmung der Wiederfindung ist eine Variante der im Abschnitt 3.5 beschriebenen Standardadditionsmethode, wenn

- die Probe als Leerwertprobe und nicht als zu analysierende Probe betrachtet wird,
- angenommen wird, dass Ausbeute <sup>(1)</sup> und Wiederfindung <sup>(2)</sup> für die beiden Analysenproben vergleichbar sind,
- die Untersuchungsproben die gleichen Massen haben und die Analysenprobe die gleichen Volumina extrahiert,
- die Menge des Kalibrierstandards, der zur zweiten (dotierten) Analysenprobe gegeben wird, xADD ist ( $xADD = \rho A.VA$ ),
- x1 der gemessene Wert für die Leerwertprobe und x2 der gemessene Wert für die zweite (dotierte) Analysenprobe ist,
- dann gilt: % Wiederfindung = 100 (x2 - x1)/xADD.

Wenn eine der oben genannten Bedingungen nicht (oder vermutlich nicht) herzustellen ist, muss das im Abschnitt 3.5 beschriebene vollständige Verfahren zur Bestimmung der Wiederfindung mit der Methode der Standardaddition durchgeführt werden.

#### 3.1.2.2. Wiederholpräzision

- Einen Satz von Proben mit identischer Matrix, dotiert mit dem Analyten zu Konzentrationen entsprechend dem 1-, 1,5- und 2fachen der geforderten Mindestleistungsgrenze oder dem 0,5-, 1- und 1,5fachen des zulässigen Grenzwerts, herstellen.
- In jeder Konzentration sollte die Analyse mit mindestens sechs Bestimmungen durchgeführt werden.
- Die Proben analysieren.
- Die in jeder Probe gefundene Konzentration berechnen.
- Die mittlere Konzentration, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten (%) der dotierten Proben ermitteln.
- Diese Schritte mindestens zwei weitere Male wiederholen.
- Die mittleren Konzentrationen und CVs der dotierten Proben insgesamt berechnen.

#### 3.1.2.3. Laborinterne Reproduzierbarkeit

- Einen Satz von Proben mit spezifiziertem Prüfmaterial (identische oder verschiedene Matrices), dotiert mit dem(den) Analyten zu Konzentrationen entsprechend dem 1-, 1,5- und 2fachen der geforderten Mindestleistungsgrenze oder dem 0,5-, 1- und 1,5fachen des zulässigen Grenzwerts, herstellen.
- In jeder Konzentration sollte die Analyse mit mindestens sechs Bestimmungen durchgeführt werden.
- Diese Schritte mindestens zwei weitere Male möglichst mit anderen Analytikern und anderen Umgebungsbedingungen, beispielsweise anderen Chargen von Reagenzien, Lösungsmitteln usw., anderen Raumtemperaturen, anderen Geräten usw., wiederholen.
- Die Proben analysieren.
- Die in jeder Probe gefundene Konzentration berechnen.
- Die mittlere Konzentration, die Standardabweichung und den Variationskoeffizienten (%) der dotierten Proben berechnen.

#### 3.1.2.4. Reproduzierbarkeit

Wenn die Reproduzierbarkeit verifiziert werden muss, sollten die Laboratorien an Methodenvergleichsstudien gemäß ISO 5725-2 teilnehmen (5).

#### 3.1.2.5. Entscheidungsgrenze (CCa)

Die Entscheidungsgrenze muss gemäß den Anforderungen für die Identifizierung oder die Identifizierung plus Quantifizierung, die unter „Leistungskriterien und sonstige Anforderungen für Analysemethoden“ (Teil 2) definiert sind, festgelegt werden.

<sup>(1)</sup> Ausbeute: der Massenanteil des in der Probe enthaltenen Analyten, der im Endextrakt vorhanden ist.

<sup>(2)</sup> Wiederfindung (hier): der Massenanteil des der Probe zugesetzten Analyten, der im Endextrakt vorhanden ist. Im weiteren Verlauf des Dokuments wird vorausgesetzt, dass Ausbeute und Wiederfindung gleich sind, weshalb nur der Begriff „Wiederfindung“ verwendet wird.

Im Fall von Stoffen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, kann die Entscheidungsgrenze CC $\alpha$  wie folgt bestimmt werden:

- Entweder durch das Verfahren der Kalibrierkurve gemäß ISO 11843 (17) (hier als kritischer Wert der Nettokonzentration des Analyten bezeichnet). In diesem Fall muss Leerwertmaterial verwendet werden, das in gleichmäßigen Schritten in der Konzentration der geforderten Mindestleistungsgrenze und höheren Konzentrationen dotiert ist. Die Proben analysieren. Nach der Identifizierung das Signal gegen die zugesetzte Konzentration auftragen. Die entsprechende Konzentration am y-Abschnitt plus das 2,33fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des Achsenabschnitts ist gleich der Entscheidungsgrenze. Dieses Verfahren ist nur auf quantitative Bestimmungen anwendbar ( $\alpha = 1\%$ ).
- Oder durch Analysieren von mindestens 20 Leerwertproben pro Matrix, um das Signal-Rausch-Verhältnis im Zeitfenster, in dem der Analyt zu erwarten ist, zu berechnen. Das Dreifache des Signal-Rausch-Verhältnisses kann als Entscheidungsgrenze verwendet werden. Dieses Verfahren ist auf quantitative und qualitative Bestimmungen anwendbar.

Im Fall von Stoffen mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert kann die Entscheidungsgrenze CC $\alpha$  wie folgt bestimmt werden:

- Entweder durch das Verfahren der Kalibrierkurve gemäß ISO 11843 (17) (hier als kritischer Wert der Nettokonzentration des Analyten bezeichnet). In diesem Fall muss Leerwertmaterial verwendet werden, das in gleichmäßigen Schritten in Konzentrationen um den zulässigen Grenzwert dotiert ist. Die Proben analysieren. Nach der Identifizierung das Signal gegen die zugesetzte Konzentration auftragen. Die entsprechende Konzentration am zulässigen Grenzwert plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit ist gleich der Entscheidungsgrenze ( $\alpha = 5\%$ );
- oder durch Analysieren von mindestens 20 Leerwertproben pro Matrix, dotiert mit dem(den) Analyten in der Konzentration des zulässigen Grenzwerts. Die Konzentration am zulässigen Grenzwert plus das 1,64fache der entsprechenden Standardabweichung ist gleich der Entscheidungsgrenze ( $\alpha = 5\%$ ).

Siehe auch Artikel 5 und Abschnitt 3.2.

#### 3.1.2.6. Nachweisvermögen (CC $\beta$ )

Das Nachweisvermögen sollte gemäß den festgelegten Anforderungen für das Screening, die Identifizierung oder die Identifizierung plus Quantifizierung (siehe Teil 2) bestimmt werden.

Im Fall von Stoffen, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, kann das Nachweisvermögen CC $\beta$  wie folgt bestimmt werden:

- Durch das Verfahren der Kalibrierkurve gemäß ISO 11843 (17) (hier als kleinster nachweisbarer Wert der Nettokonzentration des Analyten bezeichnet). In diesem Fall muss Leerwertmaterial verwendet werden, das in gleichmäßigen Schritten in der Konzentration der geforderten Mindestleistungsgrenze und niedrigeren Konzentrationen dotiert ist. Die Proben analysieren. Nach der Identifizierung das Signal gegen die zugesetzte Konzentration auftragen. Die entsprechende Konzentration an der Entscheidungsgrenze plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des mittleren gemessenen Gehalts an der Entscheidungsgrenze ist gleich dem Nachweisvermögen ( $\beta = 5\%$ ).
- Durch Analysieren von mindestens 20 Leerwertproben pro Matrix, dotiert mit dem(den) Analyten in der Konzentration der Entscheidungsgrenze. Die Proben analysieren und die Analyte identifizieren. Der Wert der Entscheidungsgrenze plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit des gemessenen Gehalts ist gleich dem Nachweisvermögen ( $\beta = 5\%$ ).
- Wenn keine quantitativen Ergebnisse vorliegen, kann das Nachweisvermögen durch Analysieren von Leerwertmaterial bestimmt werden, das in der Konzentration der Entscheidungsgrenze und höheren Konzentrationen dotiert ist. In diesem Fall ist die Konzentration, bei der nur  $\leq 5\%$  falsch negative Ergebnisse verbleiben, gleich dem Nachweisvermögen der Methode. Deshalb müssen mindestens 20 Analysen für mindestens eine Konzentrationsstufe durchgeführt werden, um eine zuverlässige Basis für diese Bestimmung sicherzustellen.

Im Fall von Stoffen, für die ein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist, kann das Nachweisvermögen CC $\beta$  wie folgt bestimmt werden:

- Entweder durch das Verfahren der Kalibrierkurve gemäß ISO 11843 (17) (hier als kleinster nachweisbarer Wert der Nettokonzentration des Analyten bezeichnet). In diesem Fall muss repräsentatives Leerwertmaterial verwendet werden, das in gleichmäßigen Schritten in Konzentrationen um den zulässigen Grenzwert dotiert ist. Die Proben analysieren und den (die) Analyte(n) identifizieren. Die Standardabweichung des mittleren gemessenen Gehalts an der Entscheidungsgrenze berechnen. Die entsprechende Konzentration am Wert der Entscheidungsgrenze plus das 1,64fache der Standardabweichung der laborinternen Reproduzierbarkeit ist gleich dem Nachweisvermögen ( $\beta = 5\%$ ).
- Oder durch Analysieren von mindestens 20 Leerwertproben pro Matrix, dotiert mit dem (den) Analyten in der Konzentration der Entscheidungsgrenze. Der Wert der Entscheidungsgrenze plus das 1,64fache der entsprechenden Standardabweichung ist gleich dem Nachweisvermögen ( $\beta = 5\%$ ).

Siehe auch Abschnitt 3.2.

3.1.2.7. *Robustheit (größere Änderungen)*

Die Analysenmethode sollte unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen, unter anderem zum Beispiel verschiedene Spezies, verschiedene Matrices oder verschiedene Probenahmebedingungen, geprüft werden. Die vorgenommenen Änderungen sollten wesentlich sein. Die Bedeutung dieser Änderungen kann beispielsweise mit der Methode von Youden beurteilt werden (15) (16). Jedes Leistungsmerkmal sollte für alle größeren Änderungen bestimmt werden, die nachweislich einen wesentlichen Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Tests haben.

3.1.3. **Validierung nach alternativen Modellen**

Wenn alternative Validierungsverfahren praktiziert werden, müssen das zugrunde liegende Modell und die Validierungsstrategie sowie die jeweiligen Voraussetzungen, Annahmen und Formeln im Validierungsplan dargelegt oder zumindest muss auf die entsprechenden Quellen verwiesen werden. Im Folgenden wird ein Beispiel für einen alternativen Validierungsansatz gegeben. Wenn z. B. das Modell der laborinternen Validierung angewandt wird, werden die Leistungsmerkmale so bestimmt, dass im Rahmen desselben Validierungsverfahrens eine Validierung für größere Änderungen möglich ist. Hierzu muss ein Versuchsplan für die Validierung erstellt werden.

3.1.3.1. *Versuchsplan*

Ein Versuchsplan muss erstellt werden, der die Anzahl der verschiedenen Tierarten und der verschiedenen untersuchten Faktoren berücksichtigt. Deshalb muss im ersten Schritt des Validierungsverfahrens geprüft werden, welche Probenpopulationen künftig im Laboratorium analysiert werden, um die wichtigsten Tierarten und jene Faktoren auswählen zu können, welche die Messergebnisse beeinflussen können. Anschließend muss der Konzentrationsbereich zweckbezogen entsprechend dem interessierenden Wert gewählt werden.

Beispiel:

- Mehrere Analyte können gleichzeitig mit der zu validierenden Analysemethode untersucht werden.
- Zwei Varianten des Leitfaktors sind ermittelt worden (A und B). Leitfaktoren bilden die Grundlage, auf der die Faktorausprägungen kombiniert werden. Diese Leitfaktoren können Faktoren wie Tierarten oder die Matrix sein. Im vorliegenden Beispiel wurde der Leitfaktor in zwei Ausprägungen variiert, d. h. zwei verschiedene Tierarten (A und B) wurden untersucht. Im Allgemeinen ist es möglich, die Leitfaktoren in mehr als zwei Ausprägungen zu variieren, so dass sich nur die Anzahl der durchzuführenden Analysen erhöht.
- Die gewählten Faktoren sind in zwei Ausprägungen zu variieren (die als + oder - angegeben werden).

**Tabelle 13**

**Beispiele für Faktoren, die für ein Validierungsverfahren als wichtig erachtet werden**

Geschlecht des Tieres	(Faktor 1)
Rasse	(Faktor 2)
Transportbedingungen	(Faktor 3)
Lagerungsbedingungen	(Faktor 4)
Frische der Probe	(Faktor 5)
Mastbedingungen	(Faktor 6)
Verschiedene Analytiker mit unterschiedlicher Erfahrung	(Faktor 7)

**Tabelle 14**

**Möglicher Versuchsplan für das oben genannte Beispiel**

Tierart	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Probe Nr.
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Tierart	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Probe Nr.
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Da jede Probe (jede Kombination von Faktorausprägungen) mit 4 verschiedenen Konzentrationen im Bereich des interessierenden Werts dotiert und eine Leerwertprobe für jede Kombination analysiert werden muss, sind  $5 \times 16 = 80$  Analysen für die gesamte Validierungsstudie durchzuführen.

Aus diesen 80 Messergebnissen können folgende Leistungsmerkmale berechnet werden (13) (14).

#### Wiederfindung

- Wiederholpräzision pro Konzentrationsstufe (sir),
- laborinterne Reproduzierbarkeit pro Konzentrationsstufe (siR),
- Entscheidungsgrenze (CC $\alpha$ ),
- Nachweisvermögen (CC $\beta$ ),
- Gütekurve ( $\beta$ -Fehlerrate versus Konzentration, siehe Abschnitt 3.1.3.2),
- Robustheit gegenüber größeren Änderungen (die Robustheit gegenüber geringfügigen Änderungen kann gemäß Abschnitt 3.1.1.3 bestimmt werden),
- 16 probenbezogene Kalibrierkurven,
- 1 Gesamtkalibrierkurve,
- Vorhersageintervall der Gesamtkalibrierkurve,
- matrixinduzierte Abweichungen (smat),
- laufinduzierte Abweichungen (sr<sub>un</sub>),
- Auswirkung der einzelnen Faktoren auf die Messergebnisse.

Diese Leistungsmerkmale erlauben die umfassende Bewertung des Leistungsgrads der Methode, da nicht nur der Einfluss der einzelnen Faktoren untersucht wird, sondern auch derjenige der einschlägigen Kombinationen dieser Faktoren. Mit Hilfe dieses Versuchsdesigns kann festgestellt werden, ob irgendeiner der gewählten Faktoren aus der Gesamtkalibrierkurve ausgeschlossen werden muss, weil er wesentlich von den Standardabweichungen der anderen Faktoren abweicht.

#### 3.1.3.2. Gütekurve

Die Gütekurve gibt Aufschluss über das Nachweisvermögen der Methode innerhalb des gewählten Konzentrationsbereichs. Sie bezieht sich auf die  $\beta$ -Fehlerwahrscheinlichkeit beim Einsatz der untersuchten Methode. Die Gütekurve erlaubt die Berechnung des Nachweisvermögens für die jeweiligen Kategorien (Screening, Bestätigung) oder Arten (qualitativ oder quantitativ) von Methoden für einen bestimmten  $\beta$ -Fehler (z. B. 5 %).

Abbildung 1  
Gütekurve

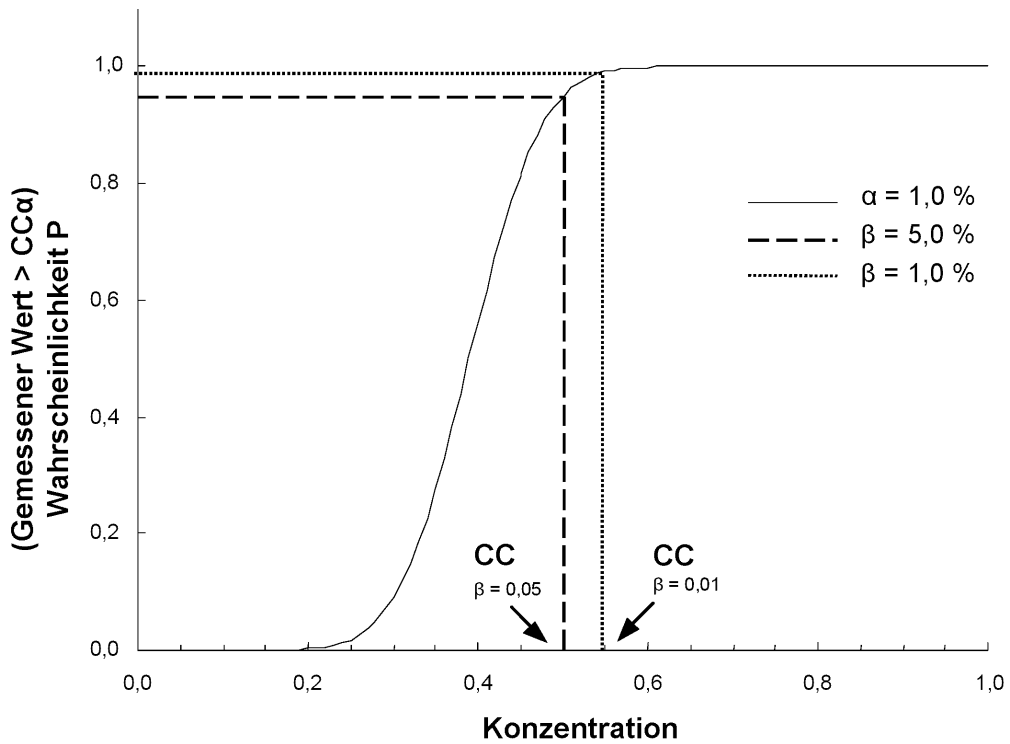


Abbildung 1 zeigt ein Beispiel für die grafische Darstellung des Nachweisvermögens ( $CC\beta$ ) einer Analysemethode. Für die betreffende Methode besteht bei einer Konzentration von  $0,50 \mu\text{g}/\text{kg}$  eine Restwahrscheinlichkeit von 5 %, dass eine falsche Entscheidung getroffen wird. Bei einer Konzentration von  $0,55 \mu\text{g}/\text{kg}$  nimmt die Wahrscheinlichkeit einer falsch negativen Entscheidung auf 1 % ab.

3.1.3.3. Reproduzierbarkeit

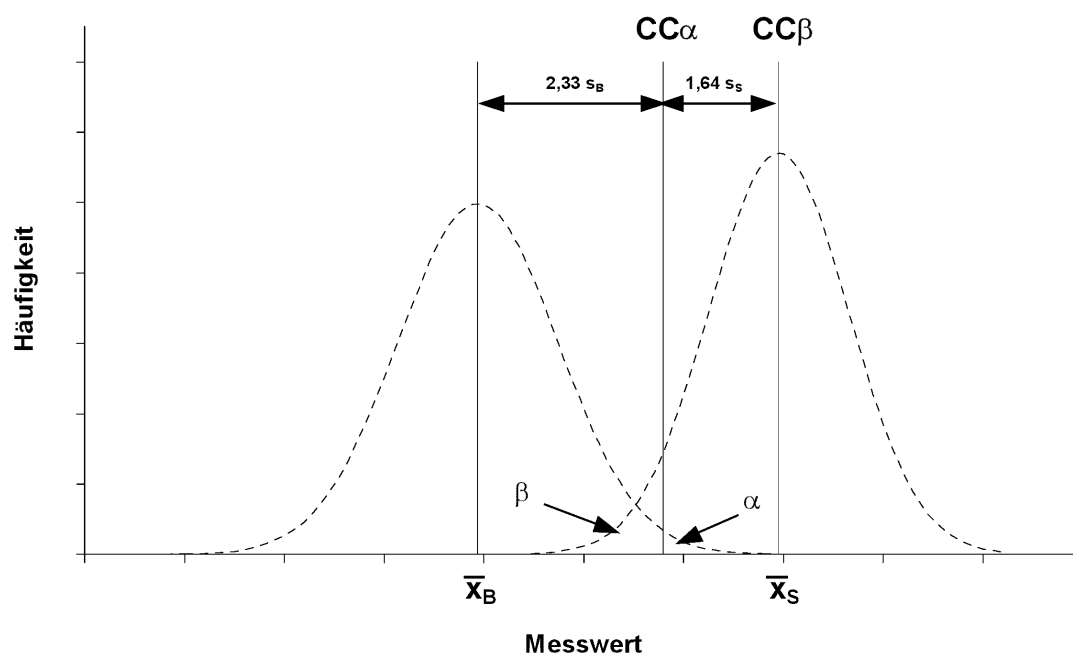
Die Bestimmung der Reproduzierbarkeit einer Methode nach dem Konzept der laborinternen Validierung erfordert die wiederholte Teilnahme an Laboreignungsprüfungen gemäß ISO-Leitfaden 43-1 (3) und 43-2 (4). Die Laboratorien können ihre Methoden selbst wählen, sofern diese Methoden unter Routinebedingungen eingesetzt werden. Die Standardabweichung des Laboratoriums kann zur Bewertung der Reproduzierbarkeit der Methode herangezogen werden.



## 3.2. GRAFISCHE DARSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ANALYTISCHEN GRENZEN

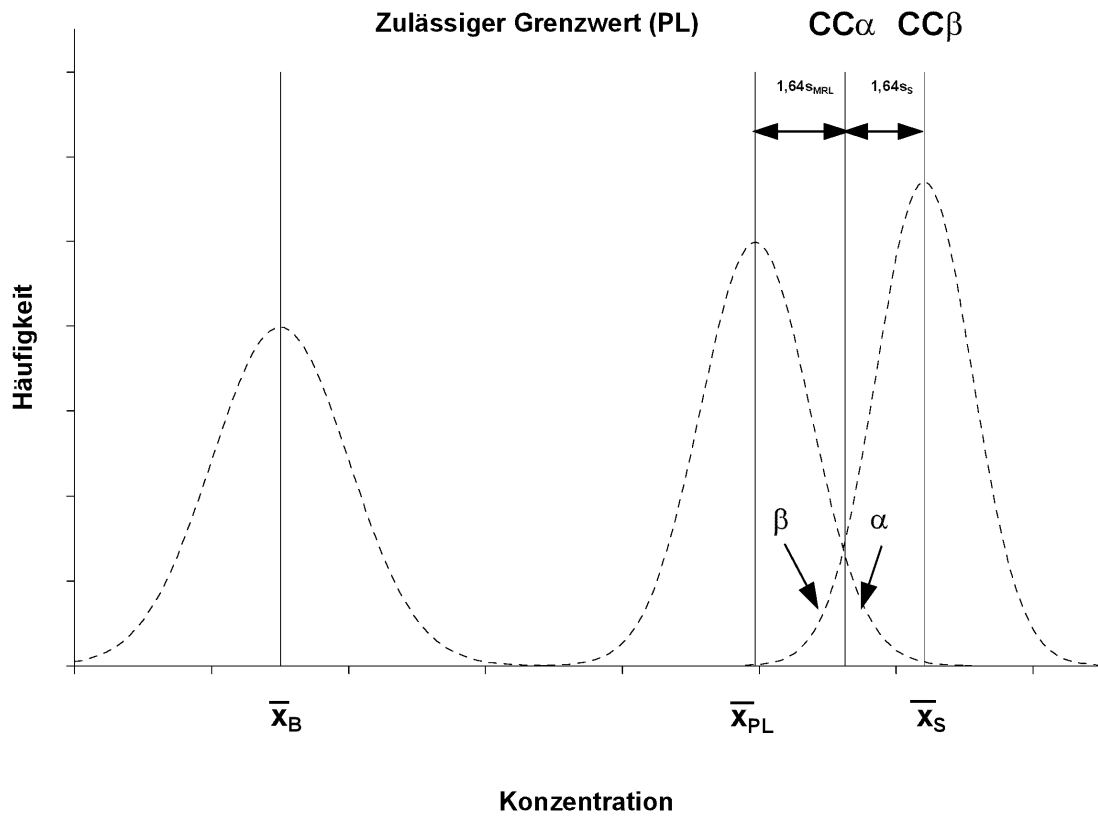
Abbildung 2

Stoffe, für die kein zulässiger Grenzwert festgelegt worden ist



- $\bar{x}_S$  mittlerer Messwert der verunreinigten Probe
- $s_B$  Standardabweichung der Leerwertprobe (bestimmt unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)
- $s_S$  Standardabweichung der verunreinigten Probe (bestimmt unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)
- $\alpha$  Rate falsch positiver Ergebnisse
- $\beta$  Rate falsch negativer Ergebnisse
- $CC_\alpha$  Messwert mit einem gegebenen  $\alpha$ -Fehler und 50%- $\beta$ -Fehler
- $CC_\beta$  Messwert mit einem sehr kleinen  $\alpha$ -Fehler und einem gegebenen  $\beta$ -Fehler

Abbildung 3  
 Stoffe mit einem festgelegten zulässigen Grenzwert



$\bar{x}_B$	mittlere „Konzentration“ der Leerwertprobe
$\bar{x}_{ZUL. GRENZWERT}$	ittlere Konzentration der Probe, die den Analyten in der Konzentration des zulässigen Grenzwerts enthält
$\bar{x}_S$	mittlere Konzentration der verunreinigten Probe
$S_{ZUL. GRENZWERT}$	Standardabweichung der Probe, die den Analyten in der Konzentration des zulässigen Grenzwerts enthält (bestimmt unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)
$S_S$	Standardabweichung der verunreinigten Probe (bestinnt unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen)
$\alpha$	Rate falsch positiver Ergebnisse
$\beta$	Rate falsch negativer Ergebnisse
$CC\alpha$	Messwert mit einem gegebenen $\alpha$ -Fehler und 50%- $\beta$ -Fehler
$CC\beta$	Messwert mit einem sehr kleinen $\alpha$ -Fehler und einem gegebenen $\beta$ -Fehler

### 3.3. BERECHNUNGSBEISPIEL FÜR EINEN ROBUSTHEITSTEST GEGENÜBER GERINGFÜGIGEN ÄNDERUNGEN NACH DEM ANSATZ VON YOUDEN (16)

#### Vergleich der Mittelwerte (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Die Mittelwerte der Großbuchstaben ( $A_A$ bis $A_G$ ) mit den Mittelwerten ihrer entsprechenden Kleinbuchstaben ( $A_a$ bis $A_g$ ) vergleichen. Wenn ein Faktor eine Auswirkung hat, ist der Unterschied wesentlich größer als die Unterschiede der anderen Faktoren.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	Eine robuste Methode sollte nicht durch Veränderungen beeinflusst werden, die fast sicher zwischen Laboratorien zu beobachten sind.
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	Wenn kein auffallender Unterschied besteht, ist das reellste Maß des Zufallsfehlers durch die sieben Unterschiede angegeben.
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

#### Unterschiede ( $D_i$ )

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

#### Unterschiedsquadrate ( $D_i^2$ )

$$\begin{aligned} D_a^2 &= \text{Wert a} \\ D_b^2 &= \text{Wert b} \\ D_c^2 &= \text{Wert c} \\ D_d^2 &= \text{Wert d} \\ D_e^2 &= \text{Wert e} \\ D_f^2 &= \text{Wert f} \\ D_g^2 &= \text{Wert g} \end{aligned}$$

Standardabweichung der Unterschiede  $D_i$  ( $S_{D_i}$ ):

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

Wenn  $S_{D_i}$  wesentlich größer als die Standardabweichung der unter laborinternen Reproduzierbarkeitsbedingungen durchgeführten Methode (siehe oben) ist, so steht von vornherein fest, dass alle Faktoren zusammen eine Auswirkung auf das Ergebnis haben, auch wenn jeder einzelne Faktor keinen wesentlichen Einfluss zeigt, und dass die Methode somit nicht robust genug gegenüber den gewählten Veränderungen ist.

### 3.4. BERECHNUNGSBEISPIELE FÜR DAS LABORINTERNE VALIDIERUNGSVERFAHREN

Beispiele und Berechnungen für das laborinterne Validierungsmodell, das im Abschnitt 3.1.3, Validierung nach alternativen Modellen, beschrieben ist (13) (14).

### 3.5. BEISPIELE FÜR DIE STANDARDADDITIONSMETHODE

Eine Untersuchungsprobe mit einem Gehalt T des Analyten wird in zwei Analysenproben 1 und 2 mit den Massen  $m_1$  und  $m_2$  geteilt. Die Analysenprobe 2 wird mit einem Volumen  $V_A$  einer Lösung der Konzentration  $\rho_A$  des Analyten dotiert. Zwei Extrakte der Analysenproben mit den Volumina  $V_1$  und  $V_2$  werden nach den Extraktions- und Aufreinigungsschritten der Methode gewonnen. Die Wiederfindung des Analyten soll  $rc$  sein. Beide Extrakte werden mit einer Messmethode mit der Empfindlichkeit  $b$  gemessen und liefern ein Analysenergebnis von  $x_1$  bzw.  $x_2$ .

Angenommen  $rc$  und  $b$  sind gleich für den Analyten in der nativen Probe und in der dotierten Probe, dann lässt sich der Gehalt T wie folgt berechnen:

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

Die Methode erlaubt die Bestimmung der Wiederfindung  $rc$ . Dabei wird, zusätzlich zum oben beschriebenen Test, ein Teil des Extrakts der Analysenprobe 1 (Volumen  $V_3$ ) mit einer bekannten Menge  $\rho_B \cdot V_B$  des Analyten dotiert und analysiert. Das Analysenergebnis ist  $x_3$  und die Wiederfindung ist:

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

Außerdem kann die Empfindlichkeit  $b$  wie folgt berechnet werden:

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

Alle Anwendungsbedingungen und die Einzelheiten sind bereits beschrieben worden (18).

**4. VERWENDETE ABKÜRZUNGEN**

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie
AES	Atomemissionsspektrometrie
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists INTERNATIONAL
B	gebundene Fraktion (Immunoassays)
CI	chemische Ionisierung
CRM	zertifiziertes Referenzmaterial
CV	Variationskoeffizient
2D	zweidimensional
DAD	Dioden-Array-Detektion
DPASV	differenzielle anodische Stripping-Pulsvoltammetrie
ECD	Elektroneneinfangdetektion
EI	Elektronenstoßionisierung
GC	Gaschromatografie
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatografie
HPTLC	Hochleistungsdünnschichtchromatografie
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
ICP-AES	Atomemissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IR	infrarot
ISO	International Standard Organisation
LC	Flüssigchromatografie
LRMS	niedrig auflösende Massenspektrometrie
MRPL	geforderte Mindestleistungsgrenze
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
RF	Retentionsfaktor (TLC)
RSDL	relative Standardabweichungen des Laboratoriums
SIM	Einzelmassenregistrierung
TLC	Dünnschichtchromatografie
UV	ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht

**5. LITERATUR**

- (1) ISO 17025:1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories
- (2) ISO 3534-1:1993 Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: Probability and general statistical terms
- (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 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method

- (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) See e.g. 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) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675
  - (10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992
  - (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, pp. 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. und 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. und 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, p. 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, page 2-9
  - (19) Council Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement Official Journal L 243, 29.10.1971, p. 29
  - (20) ISO 31-0:1992 Quantities and units — Part 0: General principles
-