

II

(Säädökset, joita ei tarvitse julkaista)

KOMISSIO

KOMISSION PÄÄTÖS,
tehty 12 päivänä elokuuta 2002,
neuvoston direktiivin 96/23/EY täytäntöönpanosta määritysmenetelmien suorituskyvyn ja tulosten tulkinnan osalta

(tiedoksiannettu numerolla K(2002) 3044)

(ETA:n kannalta merkityksellinen teksti)

(2002/657/EY)

EUROOPAN YHTEISÖJEN KOMISSIO, joka

ottaa huomioon Euroopan yhteisön perustamissopimuksen,

ottaa huomioon elävissä eläimissä ja niistä saatavissa tuotteissa olevien tiettyjen aineiden ja niiden jäämien osalta suoritettavista tarkastustoimenpiteistä ja direktiivien 85/358/ETY ja 86/469/ETY sekä päätösten 89/187/ETY ja 91/664/ETY kumoamisesta 29 päivänä huhtikuuta 1996 annetun neuvoston direktiivin 96/23/EY⁽¹⁾ ja erityisesti sen 15 artiklan 1 kohdan toisen kappaleen,

sekä katsoo seuraavaa:

- (1) Eläimistä saatavissa tuotteissa olevat jäämät ovat kansanterveydellinen ongelma.
- (2) Eräiden elävistä eläimistä ja eläintuotteista seurattavien aineiden ja niiden jäämien määrittämistä varten tehtävää virallista näytteenottoa koskevista yksityiskohtaisista säännöistä 23 päivänä helmikuuta 1998 tehdyssä komission päätöksessä 98/179/EY⁽²⁾ säädetään, että näytteitä saavat analysoida ainoastaan sellaiset laboratoriot, joille toimivaltainen viranomainen on myöntänyt luvan virallista jäämävalvontaa varten.
- (3) Virallista jäämävalvontaa varten hyväksytyjen laboratoriorien tuottamien määrittäytulosten laatu ja vertailtavuus on varmistettava. Tähän olisi päästävä käyttämällä laadunvalvontajärjestelmiä ja erityisesti soveltamalla yhteisten menettelyjen ja suorituskykyvaatimusten mukaisesti validoituja menetelmiä ja varmistamalla jäljitettävyyden yleisiin standardeihin tai yhteisesti sovittuihin standardeihin.
- (4) Virallista elintarvikkeiden tarkastusta koskevista lisätoimenpiteistä 29 päivänä lokakuuta 1993 annetussa neuvoston direktiivissä 93/99/ETY⁽³⁾ ja komission päätöksessä 98/179/EY vaaditaan, että viralliset valvonta-

laboratoriot on akkreditoitava ISO-standardin 17025 (1) mukaisesti tammikuusta 2002 alkaen. Päätöksen 98/179/EY mukaan hyväksytyjen laboratoriorien on oltava mukana kansainvälisesti tunnustetussa ulkopuolisessa laadunarviointi- ja akkreditointiohjelmassa. Hyväksytyjen laboratoriorien on lisäksi osoitettava pätevyytensä osallistumalla säännöllisesti ja menestyksekkäästi kansallisten vertailulaboratoriorien tai yhteisön vertailulaboratoriorien tunnustamiin tai järjestämiin asianmukaisiin kelpoisuuden testausohjelmiin.

- (5) Yhteisön vertailulaboratoriorien, kansallisten vertailulaboratoriorien ja kansallisten valvontalaboratoriorien verkko toimii direktiivin 96/23/EY nojalla, ja sen tarkoituksena on parantaa koordinoitua.
- (6) Direktiivin 96/23/EY antamisen jälkeen analyttinen kemia on kehittynyt niin paljon, että rutiinimenetelmien ja vertailumenetelmien käsite on vanhentunut. Se on korvattu suorituskykyperusteita soveltavalla lähestymistavalla, jossa vahvistetaan seulonta- ja varmistusmenetelmien validointiperusteet ja -menettelyt.
- (7) Virallisten valvontalaboratoriorien testitulosten tulkintaa varten on sovittava yhteisistä perusteista, jotta voidaan varmistaa neuvoston direktiivin 96/23/EY yhdenmukainen täytäntöönpano.
- (8) On säädettävä määritysmenetelmän suorituskykyä koskevien vähimmäisvaatimusten (minimum required performance limits, MRPL) asteittaisesta vahvistamisesta aineille, joille ei ole vahvistettu sallittuja raja-arvoja, ja erityisesti aineille, joiden käyttö yhteisössä ei ole sallittua tai on erityisesti kielletty. Tämän tarkoituksena on varmistaa neuvoston direktiivin 96/23/EY yhdenmukainen täytäntöönpano.

⁽¹⁾ EYVL L 125, 23.5.1996, s. 10.⁽²⁾ EYVL L 65, 5.3.1998, s. 31.⁽³⁾ EYVL L 290, 24.11.1993, s. 14.

- (9) Raskasmetallien ja arsenikin jäämien havaitsemiseksi käytettävistä vertailumenetelmistä 26 päivänä syyskuuta 1990 tehtyä komission päätöstä 90/515/ETY⁽¹⁾, vaikutukseltaan hormonaalisten tai tyrostaattisten aineiden jäämien määrittämismenetelmistä 14 päivänä huhtikuuta 1993 tehtyä päätöstä 93/256/ETY⁽²⁾ ja jäämien havaitsemiseksi käytettävistä vertailumenetelmistä ja kansallisten vertailulaboratorioiden luettelosta 15 päivänä huhtikuuta 1993 tehtyä komission päätöstä 93/257/ETY⁽³⁾, sellaisena kuin se on viimeksi muutettuna päätöksellä 98/536/EY⁽⁴⁾, on tarkasteltu uudelleen tieteellisen ja teknisen tiedon kehityksen huomioon ottamiseksi. Niiden soveltamisala ja säännökset on havaittu vanhentuneiksi, ja ne olisi näin ollen kumottava tällä päätöksellä.
- (10) Olisi säädettävä siirtymäkaudesta, jotta virallisten näytteiden määritysmenetelmät voitaisiin mukauttaa tämän päätöksen säännösten mukaisesti.
- (11) Tässä päätöksessä säädetyt toimenpiteet ovat elintarvikkeetjua ja eläinten terveyttä käsittelevän pysyvän komitean lausunnon mukaiset,

ON TEHNYT TÄMÄN PÄÄTÖKSEN:

1 artikla

Aihe ja soveltamisala

Tässä päätöksessä säädetään määritysmenetelmien käyttämisestä direktiivin 96/23/EY 15 artiklan 1 kohdan toisen virkkeen mukaisesti otettujen virallisten näytteiden testauksessa ja vahvistetaan yhteiset perusteet virallisissa valvontalaboratorioissa kyseisistä näytteistä saatujen määritystulosten tulkitsemiseksi.

Tätä päätöstä ei sovelleta aineisiin, joista on annettu tarkempia säännöksiä yhteisön muussa lainsäädännössä.

2 artikla

Määritelmät

Tässä päätöksessä sovelletaan neuvoston direktiivissä 96/23/EY ja tämän päätöksen liitteessä annettuja määritelmiä.

3 artikla

Määrittämismenetelmät

Jäsenvaltioiden on varmistettava, että direktiivin 96/23/EY mukaisesti otetut viralliset näytteet analysoidaan menetelmillä, jotka

- on dokumentoitu mieluiten ISO-standardin 78-2 (6) mukaisissa testausohjeissa;
- ovat tämän päätöksen liitteessä olevan 2 osan säännösten mukaisia;
- on validoitu tämän päätöksen liitteessä olevassa 3 osassa selostettujen menettelyjen mukaisesti;

⁽¹⁾ EYVL L 286, 18.10.1990, s. 33.

⁽²⁾ EYVL L 118, 14.5.1993, s. 64.

⁽³⁾ EYVL L 118, 14.5.1993, s. 75.

⁽⁴⁾ EYVL L 251, 11.9.1998, s. 39.

- d) ovat 4 artiklan mukaisesti vahvistettavien asiaankuuluvien suorituskykyä koskevien vähimmäisvaatimusten (MPRL) mukaisia.

4 artikla

Suorituskykyä koskevat vähimmäisvaatimukset

Tätä päätöstä tarkastellaan uudelleen määritysmenetelmien suorituskykyä koskevien vähimmäisvaatimusten (MPRL) vahvistamiseksi vähitellen sellaisille aineille, joille sallittuja rajoja ei vielä ole vahvistettu.

5 artikla

Laadunvalvonta

Jäsenvaltioiden on varmistettava direktiivin 96/23/EY mukaisesti otettujen näytteiden määritystulosten laatu, erityisesti seurantatesteillä ja/tai kalibrointituloksilla ISO-standardin 17025 (1) luvun 5.9 mukaisesti.

6 artikla

Tulosten tulkinta

1. Määritystulosta on pidettävä vaatimusten vastaisena, jos ylitetään analyysin varmistusmenetelmässä määritely päätöksentekoon oikeuttava raja.

2. Jos aineelle on vahvistettu sallittu raja-arvo, päätösraja on se konsentraatio, jonka yläpuolella voidaan päättää tilastollisella varmuudella $1 - \alpha$, että sallittu raja on todella ylitetty.

3. Jos aineelle ei ole vahvistettu sallittua raja-arvoa, päätösraja on alin konsentraatio, jolla menetelmä pystyy erottamaan tilastollisella varmuudella $1 - \alpha$, että kyseistä analyyttiä on näytteessä.

4. Direktiivin 96/23/EY liitteessä I olevassa A ryhmässä mainituilla aineilla α -virhe saa olla enintään 1 %. Kaikilla muilla aineilla α -virhe saa olla enintään 5 %.

7 artikla

Kumoaminen

Kumotaan päätökset 90/515/ETY, 93/256/ETY ja 93/257/ETY.

8 artikla

Siirtymäsäännökset

Direktiivin 96/23/EY liitteessä I olevassa A ryhmässä mainituille aineille saa käyttää virallisten näytteiden määritysmenetelmiä, jotka täyttävät päätöksessä 90/515/ETY, 93/256/ETY ja 93/257/ETY asetetut perusteet, enintään kaksi vuotta tämän päätöksen voimaantulon jälkeen. Direktiivin 96/23/EY liitteessä I olevassa B ryhmässä mainituille aineille nykyisin käytettävien menetelmien on oltava tämän päätöksen mukaisia viimeistään viisi vuotta tämän päätöksen soveltamispäivän jälkeen.

9 artikla

Soveltamispäivä

Tätä päätöstä sovelletaan 1 päivästä syyskuuta 2002.

10 artikla

Osoitus

Tämä päätös on osoitettu kaikille jäsenvaltioille.

Tehty Brysselissä 12 päivänä elokuuta 2002.

Komission puolesta

David BYRNE

Komission jäsen

LIITE

MÄÄRITYSMENETELMIÄ KOSKEVAT SUORITUSKYKYVAATIMUKSET, MUUT VAATIMUKSET JA MENETELYT

1 MÄÄRITELMÄT

- 1.1 (Menetelmän) tarkkuus: Testituloksen ja hyväksytyyn vertailuarvon (2) välisen eron suuruus. Sen määrittävät oikeellisuus ja täsmällisyys (toistotarkkuus).
- 1.2 Alfa (α) -virhe: Todennäköisyys, että testattu näyte on vaatimustenmukainen, vaikka mittaustulos osoittaa, että se olisi vaatimustenvastainen ("väärä päätös vaatimustenvastaisuudesta").
- 1.3 Analyytti: Aine, joka on osoitettava, tunnistettava ja/tai kvantifioitava, sekä sen määrittämisen aikana muodostuvat johdokset.
- 1.4 Beeta (β) -virhe: Todennäköisyys, että testattu näyte on oikeasti vaatimustenvastainen, vaikka mittaustulos osoittaa, että se olisi vaatimustenmukainen ("väärä päätös vaatimustenmukaisuudesta").
- 1.5 Systemaattinen virhe: Odotetun testituloksen ja hyväksytyyn vertailuarvon (2) välisen eron suuruus.
- 1.6 Kalibrointistandardi: Mittauksessa käytettävä standardi, jonka avulla voidaan mitattavan aineen määrä määrittää siten, että se voidaan laskea vertailuaineen perusteella.
- 1.7 Sertifioitu vertailumateriaali (CRM): Materiaali, jolla on ilmoitettu olevan tietty analyyttipitoisuus.
- 1.8 Yhteiskromatografia: Menetelmä, jossa uute jaetaan kahteen osaan ennen kromatografointia. Toinen osanäyte kromatografoidaan sellaisenaan. Toinen osa sekoitetaan standardianalyytin kanssa, joka on tarkoitus mitata. Tämä seos kromatografoidaan myös. Lisätyn standardianalyytin määrän on oltava samanlainen kuin uutteen sisältämän tutkittavan analyytin arvioitu määrä. Menetelmä on suunniteltu parantamaan analyytin tunnistusta käytettäessä kromatografisia menetelmiä, erityisesti kun sopivaa sisäistä standardia ei ole käytettävissä.
- 1.9 Kollaboraatiotutkimus: Sama näyte analysoidaan samalla menetelmällä menetelmän suorituskykyarvojen määrittämiseksi. Tutkimus kattaa mittauksen satunnaisvirheen ja laboratorion systemaattisen virheen.
- 1.10 Varmistusmenetelmä: Menetelmä, jolla saadaan täydelliset tiedot tai täydentäviä tietoja, joiden avulla aine voidaan tunnistaa yksiselitteisesti ja tarvittaessa kvantifioida tietyllä tasolla.
- 1.11 Päätösraja (CC α): Raja, jonka kohdalla ja yläpuolella voidaan päätellä virhetodennäköisyydellä α , että näyte on vaatimustenvastainen.
- 1.12 Osoituskyky (CC β): Pienin ainepitoisuus, joka voidaan osoittaa, tunnistaa ja/tai kvantifioida näytteessä virhetodennäköisyydellä β . Aineille, joille ei ole vahvistettu sallittua rajaa, osoituskyky on alhaisin konsentraatio, jolla kyseinen menetelmä pystyy osoittamaan oikeasti kontaminoidut näytteet tilastollisella varmuudella $1 - \beta$. Jos aineille on vahvistettu sallittu raja, tämä merkitsee, että osoituskyky on se konsentraatio, jolla kyseinen menetelmä pystyy osoittamaan sallitut rajakonsentraatiot tilastollisella varmuudella $1 - \beta$.
- 1.13 Väkevöity näytemateriaali: Näyte, johon on lisätty tunnettu määrä osoitettavaa analyyttiä.
- 1.14 Laboratoriodenvälinen tutkimus (vertailu): Kaksi tai useampi laboratoriota järjestää, suorittaa ja arvioi samasta näytteestä tehdyt testaukset, jotka tehdään ennalta määrättyissä olosuhteissa. Tarkoituksena on määrittää testin suorituskyky. Tarkoituksen mukaan tutkimus voidaan luokitella kollaboraatiotutkimukseksi tai pätevyystutkimukseksi.
- 1.15 Sisäinen standardi (IS): Aine, jota näyte ei sisällä ja jonka fysikaalis-kemialliset ominaisuudet ovat mahdollisimman samankaltaiset tunnistettavan analyytin kanssa. Tätä ainetta lisätään jokaiseen näytteeseen ja jokaiseen kalibrointi-standardiin.
- 1.16 Laboratorionäyte: Laboratorioon lähetettäväksi valmistettu näyte, joka on tarkoitus tutkia tai testata.
- 1.17 Tietty taso: Näytteessä olevan aineen tai analyytin pitoisuus, joka on merkityksellinen sen kannalta, onko aine lainsäädännön vaatimusten mukainen.
- 1.18 Suorituskykyä koskeva vähimmäisvaatimus (MPRL): Pienin näytteessä oleva analyyttipitoisuus, joka on ainakin voitava osoittaa ja varmistaa. Aineille, joille ei ole vahvistettu sallittuja rajoja, on tarkoitus yhdenmukaistaa menetelmien analyyttistä suorituskykyä koskevat vaatimukset.

- 1.19 Suorituskykyarvo: Funktionaalinen ominaisuus, jonka voidaan katsoa liittyvän kyseiseen analyttiseen menetelmään. Se voi olla esimerkiksi spesifisyys, tarkkuus, oikeellisuus, täsmällisyys, toistettavuus, uusittavuus, saanto, osoituskyky ja häiriönkestävyys (olosuhdeherkkyys).
- 1.20 Suorituskykyvaatimukset: Suorituskykyarvoja koskevat vaatimukset, joiden perusteella voidaan päätellä, että kyseinen analyttinen menetelmä sopii tarkoitukseen ja tuottaa luotettavia tuloksia.
- 1.21 Sallittu raja(-arvo): Jäämien enimmäisraja, enimmäistaso tai muu enimmäistoleranssi, joka on vahvistettu muualla yhteisön lainsäädännössä.
- 1.22 Täsmällisyys (toistotarkkuus): Ennaltamäärätyissä olosuhteissa saatujen toisistaan riippumattomien testitulosten eron suuruus. Täsmällisyys ilmaistaan tavallisesti epätäsmällisyytenä ja se lasketaan testituloksen keskihajontana. Suuri keskihajonta merkitsee vähäistä täsmällisyyttä (2).
- 1.23 Pätevyystutkimus: Sama näyte analysoidaan siten, että laboratoriot saavat itse valita menetelmänsä, kunhan menetelmiä käytetään rutiiniosuhteissa. Tutkimuksessa on noudatettava ISO-ohjetta 43-1 (3) ja 43-2 (4) ja sen avulla voidaan arvioida menetelmien uusittavuutta.
- 1.24 Kvalitatiivinen menetelmä: Analyttinen menetelmä, joka tunnistaa aineen sen kemiallisten, biologisten tai fysikaalisten ominaisuuksien perusteella.
- 1.25 Kvantitatiivinen menetelmä: Analyttinen menetelmä, jolla määritetään aineen määrä tai massafraktio siten, että se voidaan ilmaista numeerisena arvona asianmukaisissa yksiköissä.
- 1.26 Reagenssinnollakoe: Kokonainen määrittäminen, joka tehdään ilman näyteannosta tai jossa käytetään vastaavaa määrää sopivaa liuotinta näyteannoksen sijasta.
- 1.27 Saanto: Analyttisessä menetelmässä talteen saadun aineen prosenttiosuus aineen oikeasta konsentraatiosta. Saantotekijä määritetään validoinnin yhteydessä, jos sertifioituja vertailumateriaaleja ei ole käytettävissä.
- 1.28 Vertailumateriaali: Materiaali, jonka yksi tai useampi ominaisuus on vahvistettu validoidulla menetelmällä siten, että materiaalia voidaan käyttää laitteen kalibrointiin tai määrittämenetelmän todentamiseen.
- 1.29 Toistettavuus: Täsmällisyys toistettavuusolosuhteissa (2).
- 1.30 Toistettavuusolosuhteet: Sama henkilö tekee samassa laboratorioissa samoilla laitteilla samoista näytteistä toisistaan riippumattomat testaukset samalla menetelmällä (2).
- 1.31 Uusittavuus: Täsmällisyys uusittavuusolosuhteissa (2) (4).
- 1.32 Uusittavuusolosuhteet: Eri henkilöt tekevät eri laboratorioissa eri laitteilla samoista näytteistä testaukset samalla menetelmällä (2) (4).
- 1.33 Häiriönkestävyys: Analyttisen menetelmän herkkyys sellaisten koeolosuhteiden muutoksille, jotka voidaan kuvata sellaisten näytemateriaalien, analyttien, säilytysolosuhteiden, ympäristöolosuhteiden sekä näytteen valmisteluolosuhteiden avulla, joiden vallitessa menetelmää voidaan käyttää esitetystä muodosta tai määritetyn pienin muutoksin. Sellaiset koeolosuhteiden muutokset, jotka käytännössä voivat vaihdella (esimerkiksi reagenssien stabiilisuus, näytteen koostumus, pH, lämpötila) ja vaikuttaa määrittäytuloksiin, on ilmoitettava.
- 1.34 Näytteen nollakoe: Kokonainen määrittäminen, joka tehdään analyttisiä sisältämättömästä näytteestä otetusta näyteannoksesta.
- 1.35 Seulontamenetelmät: Menetelmät, joilla osoitetaan aineen tai aineryhmän olemassaolo tietyllä tasolla. Tällaisten menetelmien näytteenkäsittelykapasiteetti on suuri, ja niillä on tarkoitus seuloa suuri määrä näytteitä mahdollisesti vaatimustenvastaisen tulosten havaitsemiseksi. Menetelmät on erityisesti suunniteltu välttämään vääriä vaatimustenmukaiset tulokset.
- 1.36 Yhden laboratorion tutkimus (sisäinen validointi): Yhdessä laboratorioissa analysoidaan yhdellä menetelmällä samat tai erilaiset näytemateriaalit eri olosuhteissa perustelluin pitkin aikavälein.
- 1.37 Spesifisyys: Menetelmän kyky erottaa mitattava analytti muista aineista. Tämä ominaisuus määrittyy ensisijaisesti määrittämenetelmän käytettävän menetelmän mukaan, mutta se voi vaihdella yhdisteen tai matriisin tyyppin mukaan.

- 1.38 Standardilisäys: Menettely, jossa testinäyte jaetaan kahteen (tai sitä useampaan) näyteannokseen. Yksi annos analysoidaan sellaisenaan, ja muihin näyteannoksiin lisätään tunnetut määrät standardianalyyttiä ennen määrittystä. Lisätyn standardiaineen määrän on oltava kahdesta viiteen kertaa niin suuri kuin näytteen sisältämän analyytin arvioitu määrä. Menetelmä on suunniteltu analyytin pitoisuuden määrittämiseksi näytteestä ottaen huomioon määrittysmenetelmän saanto.
- 1.39 Standardianalyytti: Analyytti, joka sisältää tunnetun ja sertifioidun määrän puhtausasteeltaan tunnettua ja sertifioitua ainetta ja jota voidaan siten käyttää määrittämisessä vertailuaineena.
- 1.40 Aine: Erityisen tai määritellyn kemiallisen koostumuksen omaava aine ja sen metaboliitit.
- 1.41 Testiannos: Ainemäärä, joka on otettu testinäytteestä, johon testi tai havainto kohdistuu.
- 1.42 Testinäyte: Laboratorionäytteestä valmistettu näyte, josta testiannokset otetaan.
- 1.43 Oikeellisuus: Suuresta määrästä testituloksia saadun keskiarvon ja hyväksytyin vertailuarvon välisen eron suuruus. Oikeellisuus ilmaistaan yleensä systemaattisen virheen muodossa (2).
- 1.44 Yksikkö: ISO-standardissa 31 (20) ja direktiivissä 71/354/ETY (19) selostetut yksiköt.
- 1.45 Validointi: Vahvistaminen tutkimalla ja tosiasiallista näyttöä esittämällä, että erityiset vaatimukset tiettyä aiottua tarkoitusta varten täyttyvät (1).
- 1.46 Laboratorionsisäinen uusittavuus: Täsmällisyys, johon päästään samassa laboratoriossa ennaltamäärätyissä olosuhteissa (jotka liittyvät esim. menetelmiin, testimateriaaleihin, määrittämisessä käytettävien tekijöihin ja ympäristöön) perustellulla pitkällä aikavälillä.

2 MÄÄRITYSMENETELMIÄ KOSKEVAT SUORITUSKYKYPERUSTEET JA MUUT VAATIMUKSET

Muita kuin seuraavassa esitettyjä analyttisiä menetelmiä tai niiden yhdistelmiä saa käyttää seulontaan tai varmistukseen vain, jos voidaan osoittaa, että ne täyttävät tässä päätöksessä säädetyt asianmukaiset vaatimukset.

2.1 YLEISET VAATIMUKSET

2.1.1 Näytteiden käsittely

Näytteet on otettava ja niitä on käsiteltävä ja prosessoitava siten, että määritettävän aineen osoitusmahdollisuus on mahdollisimman suuri. Näytteenkäsittelymenetelmien on estettävä analyttien tahaton kontaminaatio tai häviäminen.

2.1.2 Testien suoritus

2.1.2.1 Saanto

Saanto on määritettävä jokaisesta näyte-erästä, mikäli käytetään kiinteää korjaustekijää. Jos saanto on sallituissa rajoissa, kiinteää korjaustekijää voidaan käyttää. Muussa tapauksessa on käytettävä kyseisen näyte-erän omaa saantotekijää, paitsi jos käytetään näytteen sisältämän analyytin spesifistä saantotekijää, jolloin näytteessä olevan analyytin kvantitatiivinen määrittäminen on tehtävä standardilisäysmenetelmällä (kohta 3.5) tai sisäisen standardin avulla.

2.1.2.2 Spesifisyys

Menetelmän on pystyttävä erottamaan analyytti muista aineista koeolosuhteissa. Siitä, missä määrin se on mahdollista, on esitettävä arvio. On käytettävä strategioita, joilla pyritään estämään mahdolliset interferenssit muiden aineiden (esim. kyseisen jäämän homologien, analogien tai metaboliatuotteiden) kanssa käytettäessä kuvattua mittaustekniikkaa. On ensiarvoisen tärkeää selvittää kaikki interferenssit, jotka voivat aiheutua matriisin aineosista.

2.2 SEULONTAMENETELMÄT

Seulontatarkoituksiin on direktiivin 96/23/EY mukaisesti käytettävä vain niitä analyttisiä menetelmiä, joista voidaan dokumentoidusti ja jäljitettävissä olevalla tavalla osoittaa, että menetelmä on validoitu ja että sen väärin vaatimustenmukaisen tulosten osuus (β -virhe) on alle 5 % tietyllä tasolla. Jos tuloksen epäillään osoittavan vaatimustenvastaisuutta, se on vahvistettava varmistusmenetelmän avulla.

2.3 ORGAANISTEN JÄÄMIEN JA KONTAMINANTTIEN VARMISTUSMENETELMÄT

Orgaanisten jäämien tai kontaminanttien varmistusmenetelmien on annettava tietoa analyytin kemiallisesta rakenteesta. Sen vuoksi pelkästään kromatografiaan perustuvat menetelmät, joissa ei käytetä osoitukseen spektrometriaa, eivät sovellu sellaisenaan varmistusmenetelmiksi. Jos jokin tekniikka ei ole tarpeeksi spesifinen, tarvittava spesifisyys on saavutettava analyytisillä menetelmillä, jotka koostuvat sopiviksi katsotuista puhdistuksen, kromatografisen erotuksen ja spektrometrisen detektion yhdistelmästä.

Seuraavien menetelmien tai menetelmäyhdistelmien katsotaan olevan sopivia orgaanisten jäämien tai kontaminanttien tunnistamiseen mainituille aineryhmille:

Taulukko 1

Sopivia varmistusmenetelmiä orgaanisille jäämille ja kontaminanteille

Mittaustekniikka	Direktiivin 96/23/EY liitteessä I mainitut aineet	Rajoitukset
Neste- tai kaasukromatografia ja massaspektrometria	Ryhmät A ja B	Vain jos ensin tehdään kromatografinen erotus joko on-line- tai off-line Vain jos rekisteröidään koko massaspekttri tai käytetään ainakin 3:a (ryhmä B) tai 4:ää (ryhmä A) tunnistuspistettä, jos ei rekisteröidä koko massaspekttriä
Neste- tai kaasukromatografia ja infrapuna-(IR)spektrometria	Ryhmät A ja B	IR-absorptiospektrometriaa koskevat erityisvaatimukset on täytettävä
Nestekromatografia ja full-scan-DAD (diodirividetektiio)	Ryhmä B	UV-absorptiospektrometriaa koskevat erityisvaatimukset on täytettävä
Nestekromatografia-fluoresenssi	Ryhmä B	Vain molekyyille, joilla esiintyy luontaista fluoresenssia sekä molekyyille, joilla esiintyy fluoresenssia joko transformaation tai derivaation jälkeen.
Nestekromatografia ja full-scan-UV-VIS-spektrometria	Ryhmä B	Kaksiulotteinen HPTLC ja yhteiskromatografia ovat pakollisia.
Kaasukromatografia-elektro-nisieppausdetektio	Ryhmä B	Vain jos käytetään kahta kolonnia, joilla on eri polariteetti
Nestekromatografia-immunogrammi	Ryhmä B	Vain jos käytetään vähintään kahta erilaista kromatografijärjestelmää tai toista, riippumatonta osoitusmenetelmää
Nestekromatografia-UV-VIS (yksi aallonpituus)	Ryhmä B	Vain jos käytetään vähintään kahta erilaista kromatografijärjestelmää tai toista, riippumatonta osoitusmenetelmää

2.3.1 Yhteiset suorituskykyperusteet ja vaatimukset

Varmistusmenetelmien on annettava tietoa analyytin kemiallisesta rakenteesta. Jos useampi kuin yksi yhdiste antaa saman vasteen, menetelmällä ei voi erottaa kyseisiä yhdisteitä. Yleisesti pelkästään kromatografiaan perustuvat menetelmät, joissa ei käytetä osoitukseen spektrometriaa, eivät sovellu sellaisenaan varmistusmenetelmiksi.

Jos menetelmässä käytetään sopivaa sisäistä standardia, se on lisättävä näyteannokseen uuttoprosessin alussa. Saatavuuden mukaan on käytettävä joko analyytin vakaita isotooppimerkittyjä muotoja, jotka soveltuvat erityisesti massaspektrometriseen osoitukseen, tai yhdisteitä, jotka ovat rakenteellisesti lähellä analyyttiä.

Jos sopivaa sisäistä standardia ei ole käytettävissä, analyytin tunnistus on varmistettava yhteiskromatografialla. Kromatografiassa saa tulla vain yksi piikki, jolloin piikin korkeuden (tai pinta-alan) lisääntyminen vastaa lisätyn analyytin määrää. Käytettäessä kaasu- tai nestekromatografiaa piikin puolikorkeuden leveyden on oltava välillä 90—110 % alkuleveydestä, ja retentioajat saavat poiketa toisistaan korkeintaan 5 %. Ohutkerroskromatografiamenetelmissä (TLC) vain analyytiksi oletettu täplä saa vahvistua. Uutta täplää ei saa syntyä, ja täplän ulkomuoto ei saa muuttua.

Vertailumateriaalia tai väkevöityä materiaalia, joka sisältää tunnetut määrät analyyttiä, jonka pitoisuus on lähellä joko jäämien sallittua määrää tai päätösrajaa (vaatimustenvastainen valvontanäyte), sekä vaatimustenmukaisia valvontamateriaaleja ja nollareagensseja, olisi syytä viedä läpi koko prosessin samanaikaisesti kunkin analysoitavan koenäyte-erän kanssa. Uutteiden injektiojärjestys määrittelylaitteeseen on seuraava: reagenssinollanäyte, vaatimustenmukainen valvontanäyte, varmistettavat näytteet, vaatimustenmukainen valvontanäyte uudelleen ja lopuksi vaatimustenvastainen valvontanäyte. Kaikki poikkeamat tästä järjestyksestä on perusteltava.

2.3.2 Muita suorituskykyperusteita ja vaatimuksia kvantitatiivisia määrittymenetelmiä varten

2.3.2.1 Kvantitatiivisten menetelmien oikeellisuus

Sertifioidun vertailuaineen toistomäärittysten kokeellisesti määritetyn, saannon suhteen korjatun keskimääräisen massaosuuden poikkeaman vertailuarvosta on oltava seuraavien rajojen sisällä:

Taulukko 2

Kvantitatiivisten menetelmien vähimmäisoikeellisuus

Massaosuus	Rajat
$\leq 1 \mu\text{g}/\text{kg}$	- 50 % — + 20 %
$> 1 \mu\text{g}/\text{kg} - 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	- 30 % — + 10 %
$\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}$	- 20 % — + 10 %

Jos tällaista sertifioitua vertailuainetta ei ole saatavissa, on hyväksyttävää arvioida mittausten oikeellisuus lisäämällä nollamatriisiin tunnettu määrä analyyttiä ja laskemalla saanto. Keskimääräisen saannon suhteen korjatut mittaustulokset ovat hyväksyttäviä, jos ne ovat taulukossa 2 esitetyissä rajoissa.

2.3.2.2 Kvantitatiivisten menetelmien täsmällisyys

Laboratorioiden välinen vaihtelukerroin (CV) vertailumateriaalin tai väkevöidyn materiaalin toistomäärittämiselle uusittavuusolosuhteissa ei saa olla suurempi kuin Horwitzin yhtälöllä laskettu taso. Yhtälö on seuraava:

$$\text{Vaihtelukerroin CV} = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

missä C on massaosuus 10:n potenssina (esim. $1 \text{ mg}/\text{g} = 10^{-3}$). Esimerkkejä annetaan taulukossa 3.

Taulukko 3

Esimerkkejä kvantitatiivisten menetelmien uusittavuuteen liittyvistä vaihtelukertoimista tietyillä analyytin massaosuuksilla

Massaosuus	Uusittavuus-CV (%)
1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(*)
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	(*)
100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	23
1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (1 mg/kg)	16

(*) Jos massaosuus on pienempi kuin 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Horwitzin yhtälö antaa liian suuria arvoja. Siksi konsentraatioiden, jotka ovat pienemmät kuin 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, vaihtelukertoimien on oltava mahdollisimman pienet.

Toistettavuusolosuhteissa tehdyille määrittämisille laboratorion sisäinen vaihtelukerroin on tavallisesti välillä puolet ja kaksi kolmasosaa edellä mainituista arvoista. Laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa tehdyille määrittämisille laboratorion sisäinen vaihtelukerroin ei saa olla suurempi kuin uusittavuuteen liittyvä vaihtelukerroin.

Aineille, joille on vahvistettu sallittu raja, menetelmän on taattava laboratorion sisäinen uusittavuus, joka ei ole suurempi kuin uusittavuuteen liittyvä vastaava vaihtelukerroin konsentraatiolla $0,5 \times$ sallittu raja.

2.3.3 Massaspektrometrisiä osoitusmenetelmiä koskevat suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset

Massaspektrometriset menetelmät sopivat varmistaviksi menetelmiksi vain joko on-line- tai off-line-kromatografian jälkeen.

2.3.3.1 Kromatografinen erotus

GC-MS-menetelmissä kromatografinen erotus on tehtävä kapillaarikolonneilla. LC-MS-menetelmissä kromatografinen erotus on tehtävä sopivilla LC-kolonneilla. Kaikissa tapauksissa analyysin pienin hyväksyttävä retentioaika on kaksi kertaa kolonnin tyhjätilavuutta vastaava retentioaika. Testiannoksessa olevan analyysin retentioajan (tai suhteellisen retentioajan) on vastattava kalibrointiaineen retentioaikaa määrätyn retentioaikaikkunan puitteissa. Retentioaikaikkunan on oltava oikeassa suhteessa kromatografiajärjestelmän erotuskykyyn. Analyysin kromatografisen retentioajan ja sisäisen standardin retentioajan suhteen, eli analyysin suhteellisen retentioajan, on vastattava kalibrointiliuoksen suhteellista retentioaikaa $\pm 0,5$ prosentin toleranssin puitteissa (GC) tai $\pm 2,5$ prosentin toleranssin puitteissa (LC).

2.3.3.2 Massaspektrometrinen detektio

Massaspektrometridetektiossa on käytettävä esimerkiksi seuraavia MS-menetelmiä: täydelliset massaspektrit (full scan) tai selektiivinen ionimonitorointi (SIM) sekä MS-MSⁿ-menetelmät, kuten selektiivinen reaktiomonitorointi (SRM), tai muita sopivia MS- tai MS-MSⁿ-menetelmiä yhdessä asianmukaisten ionisaatiomoodien kanssa. Korkean erotuskyvyn massaspektrometria (HRMS): Erotuskyvyn on yleensä oltava koko massa-alueella suurempi kuin 10 000 käyttäen 10 % laakson määritelmää.

Full scan: Kun massaspektrometrinen määrittäminen tehdään rekisteröimällä full-scan-spektrit, kaikkien mitattujen diagnostisten ionien (molekyyli-ioni, sen karakteristiset adduktiotuotteet, karakteristiset fragmentti-ionit ja isotooppi-ionit), joiden suhteellinen intensiteetti kalibrointistandardin vertailuspektrissä on yli 10 %, mukanaolo on pakollista.

SIM: Kun massaspektrometrinen määrittäminen tehdään fragmentografialla, molekyyli-ionin on mielellään oltava yksi valituista diagnostisista ioneista (molekyyli-ioni, sen karakteristiset adduktiotuotteet, karakteristiset fragmentti-ionit ja kaikki niiden isotooppi-ionit). Valitut diagnostiset ionit eivät saa olla peräisin yksinomaan samasta molekyylin osasta. Kunkin diagnostisen ionin signaali-kohinasuhteen on oltava $\geq 3:1$.

Full scan ja SIM: Osoitettavien ionien suhteellisten intensiteettien, jotka esitetään prosentiosuutena suurimman intensiteetin omaavan ionin tai siirtymän intensiteetistä, on vastattava kalibrointistandardin intensiteettejä joko kalibrointiliuoksissa tai analyytillä väkevöidyissä näytteissä. Pitoisuuksien on oltava vertailukelpoiset, mittaolosuhteiden samat ja toleranssit seuraavan taulukon mukaiset:

Taulukko 4

Suurimmat sallitut ionien suhteellisten intensiteettien toleranssit erilaisia massaspektrometrisiä menetelmiä käytettäessä

Suhteellinen intensiteetti (% peruspiikistä)	EI-GC-MS (suhteellinen)	GC-MS-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (suhteellinen)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 %—50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 %—20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Massaspektridatan tulkinta: Diagnostisten ionien ja/tai prekursori/tuoteioniparien suhteelliset intensiteetit on tunnistettava vertaamalla spektrejä tai integroimalla yksittäiset massasignaalit. Jos käytetään taustakorjausta, sitä on käytettävä samalla tavalla koko erässä (ks. 2.3.1, kohta 4) ja se on ilmoitettava selkeästi.

Full scan: Jos täydelliset spektrit mitataan yhdessä massaspektrometrissä, määrittämisessä on oltava vähintään neljä ionia, joiden suhteellinen intensiteetti verrattuna peruspiikkiin on vähintään 10 %. Molekulaarisen ionin on oltava mukana, jos sen suhteellinen intensiteetti vertailuspektrissä on vähintään 10 %. Vähintään neljän ionin on oltava suhteellisten ioni-intensiteettien maksimaalisten sallittujen toleranssien rajoissa (taulukko 5). Tietokoneavusteista kirjastohakua voidaan käyttää. Tässä tapauksessa testinäytteiden massaspektridatan ja kalibrointiliuoksen datan välisen suhteen on oltava suurempi kuin kriittinen vastaavuustekijä. Tämä tekijä on määritettävä validointiprosessin yhteydessä kullekin analyytille sellaisten spektrien perusteella, jotka täyttävät jäljempänä esitetyt vaatimukset. Näyttematriisin ja detektorin (ilmaisimen) suorituskyvyn aiheuttama vaihtelu spektreissä on selvitettävä.

SIM: Jos massafragmentteja mitataan muilla kuin full-scan-menetelmillä, tuloksia on tulkittava tunnistuspisteiden avulla. Direktiivin 96/23/EY liitteen I ryhmän A aineiden varmistukseen on vaadittava vähintään neljä tunnistuspistettä. Direktiivin 96/23/EY liitteen I ryhmän B aineiden varmistukseen vaaditaan vähintään kolme tunnistuspistettä. Seuraavassa taulukossa esitetään, kuinka monta tunnistuspistettä eri massaspektrometriset perusmenetelmät "ansaitsevat". Jotta varmistuksen edellyttämät tunnistuspisteet voidaan myöntää ja tunnistuspisteiden summa laskea:

- a) on mitattava vähintään yksi ionisuhde; ja
 b) kaikkien relevanttien mitattujen ionisuhdeiden on täytettävä yllä kuvatut vaatimukset; ja
 c) tunnistuspisteiden vähimmäismäärän saavuttamiseksi voidaan yhdistää enintään kolme eri menetelmää.

Taulukko 5**Erialaisten massafragmenttiluokkien ja saatujen tunnistuspisteiden välinen suhde**

MS-menetelmä	Tunnistuspisteitä ionia kohti
Matalan erotuskyvyn massaspektrometri (LR)	1,0
LR-MS ⁿ prekursori-ioni	1,0
LR-MS ⁿ siirtymätuotteet	1,5
HRMS	2,0
HR-MS ⁿ prekursori-ioni	2,0
HR-MS ⁿ siirtymätuotteet	2,5

Huomautuksia:

- (1) Kukin ioni voidaan laskea vain kerran.
 (2) GC-MS, jossa käytetään elektroni-iskuionisaatiota, katsotaan eri menetelmäksi kuin GC-MS, jossa käytetään kemiallista ionisaatiota.
 (3) Eri analyyttejä voidaan käyttää lisäämään tunnistuspisteiden lukumäärää vain, jos johdosten reaktiokemiat ovat erilaisia.
 (4) Direktiivin 96/23/EY liitteen I ryhmän A aineille, jos määrittämisessä käytetään jotakin seuraavista tekniikoista: full-scan-diodirividetektoriin (DAD) kytketty HPLC, fluoresenssidetektoriin kytketty HPLC, immunogrammiin kytketty HPLC tai kaksikulotteinen TLC kytkettynä spektrometriseen detektioon; enintään yksi tunnistuspiste voidaan tuottaa, mikäli menetelmien relevantit vaatimukset täyttyvät.
 (5) Siirtymätuotteet sisältävät sekä tytärtuotteet että niiden tytärtuotteet.

Taulukko 6**Esimerkkejä eri tekniikoilla ja niiden yhdistelmillä saatavien tunnistuspisteiden määristä (n = kokonaisluku)**

Tekniikka (tekniikat)	Ionien lukumäärä	Tunnistus-pisteet
GC-MS (EI tai CI)	N	n
GC-MS (EI ja CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI tai CI) 2 johdosta	2 (johdos A) + 2 (johdos B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prekursori ja 2 tytärtä	4
LC-MS-MS	1 prekursori ja 2 tytärtä	4
GC-MS-MS	2 prekursori-onia, kummallakin 1 tytär	5
LC-MS-MS	2 prekursori-onia, kummallakin 1 tytär	5
LC-MS-MS-MS	1 prekursori, 1 tytär ja 2 tyttärentytärtä	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS ja LC-MS	2 + 2	4
GC-MS ja HRMS	2 + 1	4

2.3.4 Infrapunadetektioon kytkettyä kromatografiaa koskevat suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset

Riittävät piikit: Riittäviä piikkejä ovat kalibrintistandardin infrapunaspektrin absorptiomaksimit, jotka täytävät seuraavat vaatimukset:

2.3.4.1 Infrapunadetektio

Absorptiomaksimi: Oltava aaltolukualueella 4 000—500 cm^{-1} .

Absorption intensiteetti: Ei saa olla pienempi kuin

- a) spesifinen mooliabsorbanssi = 40 suhteessa piikin perusviivaan, eikä
- b) suhteellinen absorbanssi = 12,5 % alueella 4 000—500 cm^{-1} sijaitsevan intensiivisimmän piikin absorbanssista,

kun molemmat mitataan suhteessa nolla-absorbanssiin, ja 5 % alueella 4 000—500 cm^{-1} sijaitsevan intensiivisimmän piikin absorbanssista, kun molemmat mitataan suhteessa niiden piikin perustason.

Huomautus: Vaikka a kohdan mukaisesti määritetyt riittävät piikit ovat teoriassa suositeltavampia, b kohdan piikit on käytännössä helpompi määrittää.

Analyysissä on määritettävä sellaisten analyytin infrapunaspektrissä olevien piikkien lukumäärä, joiden frekvenssit vastaavat kalibrintistandardin spektrissä olevaa riittävää piikkiä $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$:n rajoissa.

2.3.4.2 Infrapunaspektridatan tulkinta

Absorptiota on esiinnyttävä analyytin spektrin kaikilla alueilla, jotka vastaavat kalibrintistandardin vertailuspektrissä olevaa riittävää piikkiä. Kalibrintistandardin infrapunaspektrissä vaaditaan vähintään kuusi riittävää piikkiä. Jos riittävien piikkien määrä on alle kuusi (7), kyseistä infrapunaspektriä ei saa käyttää vertailuspektrinä. "Tuloksen", toisin sanoen analyytin infrapunaspektristä havaittujen riittävien piikkien prosentuaalisen osuuden, on oltava vähintään 50. Jos riittävän piikin suhteen ei saada täyttä vastaavuutta, analyytin spektrin relevantin alueen on vastattava yhteensopivan piikin aluetta. Menetelmää voidaan soveltaa vain sellaisiin absorptiopiikkeihin näytteen spektrissä, joiden intensiteetti on vähintään kolme kertaa kahden piikin välinen taustakohina.

2.3.5 Suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset määritettäessä analyyttiä nestekromatografialla yhdessä muiden detektiomenetelmien kanssa

2.3.5.1 Kromatografinen erotus

Sisäistä standardia on käytettävä, jos soveltuva ainetta on saatavissa. Sen on oltava mieluiten analyyttiä muistuttava standardi, jonka retentioaika on lähellä analyytin retentioaikaa. Analyytin on eluoiduttava vastaavalle kalibrintistandardille samoissa koeolosuhteissa tyypillisessä retentioajassa. Pienin hyväksyttävä analyytin retentioaika on oltava kaksi kertaa kolonnin tyhjätilavuutta vastaava retentioaika. Analyytin retentioajan suhde sisäisen standardin retentioaikaan, ts. analyytin suhteellisen retentioajan, on oltava sama kuin kalibrintistandardin suhteellinen retentioaika asianmukaisessa matriisissa $\pm 2,5 \%$:n rajoissa.

2.3.5.2 Full-scan-UV/VIS-detektio

Menetelmän on täytettävä nestekromatografiamenetelmiin sovellettavat suorituskykyperusteet.

Analyytin spektrissä esiintyvien absorptiomaksimien on oltava samoilla aallonpituuksilla kuin kalibrintistandardin absorptiomaksimit detektiojärjestelmän resoluution rajoissa. Diodirividetektiossa se on tavallisesti $\pm 2 \text{ nm}$. Yli 220 nm:ssä analyytin spektri ei silmämääräisesti tarkasteltuna saa erota kalibrintistandardin spektristä niillä kummankin spektrin alueilla, joissa suhteellinen absorbanssi on vähintään 10 %. Tämä peruste täyttyy, kun spektrissä esiintyvät samat maksimit ja näiden kahden spektrin ero ei ole suurempi kuin 10 % kalibrintistandardin absorbanssista missään tarkastelukohdassa. Tietokoneavusteista kirjastohakua ja vertailua käytettäessä testinäytteiden massaspektridatan ja kalibrintiliuoksen datan suhteen on oltava suurempi kuin kriittinen vastavuustekijä. Tämä tekijä on määritettävä validointiprosessin yhteydessä kullekin analyytille sellaisten spektrien perusteella, jotka täyttävät edellä esitetyt vaatimukset. Näytematriisin ja detektorin suorituskyvyn aiheuttama vaihtelu spektreissä on selvitettävä.

2.3.5.3 Fluorimetristä detektiota koskevat suorituskykyperusteet

Menetelmän on täytettävä nestekromatografiamenetelmiin sovellettavat suorituskykyperusteet.

Tämä koskee molekyyliä, joilla esiintyy luontaista fluoresenssia sekä molekyyliä, joilla esiintyy fluoresenssia joko transformaation tai derivaation jälkeen. Virittymis- ja emissioaallonpituudet ja kromatografiset olosuhteet on valittava siten, että nollanäyteuutteissa esiintyvät interferoivat komponentit minimoidaan.

Analyytin piikkiä lähinnä olevan piikin huipun on oltava vähintään yhden täyden piikinleveyden etäisyydellä korkeudella 10 % analyyttipiikin enimmäiskorkeudesta.

2.3.5.4 Suorituskykyperusteet analyytin määrittämiseksi LC-immunogrammi -menetelmällä

LC-immunogrammi ei yksinään riitä käytettäväksi varmistusmenetelmänä.

Menetelmän on täytettävä nestekromatografiamenetelmiin sovellettavat vaatimukset.

Etukäteen määriteltyjen laadunvalvontaparametrien, kuten epäspesifisen sitoutumisen, valvontanäytteiden suhteellisen sitoutumisen ja nollanäytteen absorbanssin on oltava määrittämenetelmän validoinnin yhteydessä saatujen raja-arvojen sisällä.

Immunogrammi on tehtävä vähintään viidestä jakeesta.

Kunkin jakeen on oltava alle puolet piikin leveydestä.

Jakeen, joka sisältää suurimman pitoisuuden analyyttiä, on oltava sama epäilyssä näytteessä, vaatimustenvastaisessa valvontanäytteessä ja standardissa.

2.3.5.5 Analyytin määrittäminen nestekromatografialla UV/VIS-detektion kanssa (yksi aallonpituus)

Nestekromatografia yhdessä UV/VIS-detektion kanssa (yksi aallonpituus) ei sovellu yksinään varmistusmenetelmäksi.

Analyytin piikkiä lähinnä olevan piikin huipun on oltava vähintään yhden täyden piikinleveyden etäisyydellä korkeudella 10 % analyyttipiikin enimmäiskorkeudesta.

2.3.6 Suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset analyytin määrittämiseksi kaksikulotteisella ohutkerroskromatografialla yhdessä full-scan-UV/VIS-spektrometridetektion kanssa

Kaksikulotteinen HPTLC ja yhteiskromatografia ovat pakollisia.

Analyytin RF-arvojen on vastattava standardien RF-arvoja $\pm 5\%$:n rajoissa.

Analyytin ja standardin aiheuttamien täplien on oltava ulkonäöltään samanlaisia.

Samaväristen täplien tapauksessa lähimmän täplän keskuksen etäisyyden analyytin täplän keskukselta on oltava vähintään puolet täplien halkaisijoiden summasta.

Analyytin spektri ei silmämääräisesti tarkasteltuna saa erota standardin spektristä, kuten full-scan-UV/VIS-detektiota käsittelevässä kohdassa selostetaan.

Tietokoneavusteista kirjastohakua ja vertailua käytettäessä testinäytteiden massaspektridatan ja kalibroitiliuoksen datan suhteen on oltava suurempi kuin kriittinen vastaavuustekijä. Tämä tekijä on määritettävä validointiprosessin yhteydessä kullekin analyytille sellaisten spektrien perusteella, jotka täyttävät edellä esitetyt vaatimukset. Näytematriisin ja detektorin suorituskyvyn aiheuttama vaihtelu spektreissä on selvitettävä.

2.3.7 Suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset määrittäessä analyyttiä kaasukromatografialla yhdessä elektronisieppausdetektion (ECD) kanssa

Sisäistä standardia on käytettävä, jos soveltuvaa ainetta on saatavissa. Sen on oltava mieluiten samantapainen aine, jonka retentioaika on lähellä analyytin retentioaika. Analyytin on eluoiduttava vastaavalle standardille samoissa koeolosuhteissa ominaisessa retentioajassa. Pienin hyväksyttävä analyytin retentioaika on oltava kaksi kertaa kolonnin tyhjätilavuutta vastaava retentioaika. Analyytin retentioajan suhde sisäisen standardin retentioaikaan, ts. analyytin suhteellisen retentioajan, on oltava sama kuin kalibroitistandardin suhteellinen retentioaika asianmukaisessa matriisissa $\pm 0,5\%$:n rajoissa. Analyytin piikkiä lähinnä olevan piikin huipun on oltava vähintään yhden täyden piikinleveyden etäisyydellä korkeudella 10 % analyyttipiikin enimmäiskorkeudesta. Lisätietojen saamiseksi voidaan käyttää yhteiskromatografiaa.

2.4 ALKUAINIEN VARMISTUSMENETELMÄT

Kemiallisten alkuaineiden varmistusanalyysien on perustuttava yksiselitteiseen tunnistukseen sekä tarkkaan ja täsmälliseen kvantifointiin kyseisen kemiallisen alkuaineen yksilöllisten fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien (kuten emitoidun tai absorboidun säteilyn kyseiselle alkuaineelle ominaisen aallonpituuden tai atomimassan) perusteella.

Seuraavia menetelmiä tai niiden yhdistelmiä pidetään sopivina kemiallisten alkuaineiden tunnistamiseen:

Taulukko 7

Sopivia varmistusmenetelmiä kemiallisille alkuaineille

Tekniikka	Mitattava muuttuja
Differentiaalipulssitekniikalla tehtävä anodinen liuotusvoltammetria	Sähköinen signaali
Atomiabsorptiospektrometria	
Liekki	Absorptioaallonpituus
Hydridien muodostuminen	Absorptioaallonpituus
Kylmä höyry	Absorptioaallonpituus
Elektroterminen atomisaatio (grafiittiuuni)	Absorptioaallonpituus
Atomiemissiospektrometria	
Induktiivisesti kytketty plasma	Emissioaallonpituus
Massaspektrometria	
Induktiivisesti kytketty plasma	Massa—varaus-suhde

2.4.1 Yhteiset suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset varmistusmenetelmille

Vertailumateriaalia tai väkevöityä materiaalia, joka sisältää tunnetut määrät analyyttiä, jonka pitoisuus on lähellä joko jäämien sallittua määrää tai päätösrajaa (vaatimustenvastainen valvontanäyte), sekä vaatimustenmukaisia valvontamateriaaleja ja nollareagensseja olisi syytä viedä läpi koko prosessin samanaikaisesti kunkin analysoidun koenäyte-erän kanssa. Uutteiden suositeltu injektiojärjestys määrittämislaitteeseen on seuraava: reagenssinäyte, vaatimustenmukainen valvontanäyte, varmistettavat näytteet, vaatimustenmukainen valvontanäyte ja lopuksi vaatimustenvastainen valvontanäyte. Kaikki poikkeamat tästä on perusteltava.

Useimmat määritystekniikat vaativat yleensä orgaanisen matriisin täydellisen digestion, jotta analyytti saataisiin liuokseen ennen määrittämistä. Tämä voidaan saavuttaa käyttäen mikroaaltomineralisaatiomenetelmiä, jotka minimoivat analyyttien hävikin tai kontaminaation riskin. Määrittämisessä on käytettävä hyvälaatuisia dekontamoituja teflonastioita. Jos käytetään muita märkä- tai kuivadigestiomenetelmiä, hävikki- tai kontaminaatioilmiöiden poissulkemiseen tarvittava dokumentoitu näyttö on oltava saatavilla. Digestion asemesta voidaan joissakin tapauksissa käyttää erotusmenetelmiä (kuten uutamista), joilla erotetaan ja/tai väkevöidään analyytit matriisin komponenteista ja joilla näytteet voidaan konsentroida ennen kuin ne syötetään määrittämislaitteeseen.

Kalibroinnin suhteen on muistettava, että analyysille vahvistettuja työskentelyrajoja ei saa ylittää. Tämä koskee sekä ulkoista kalibrointia että standardilisäysmenetelmää. Käytettäessä ulkoista kalibrointia kalibrointistandardit on ehdottomasti valmistettava näyteliuoksen koostumusta mahdollisimman hyvin vastaavaan liuokseen. Taustakorjausta on myös käytettävä, jos erityiset määrittämisolosuhteet sitä edellyttävät.

2.4.2 Muita suorituskykyperusteita ja vaatimuksia kvantitatiivisia määritysmenetelmiä varten

2.4.2.1 Kvantitatiivisten menetelmien oikeellisuus

Kun alkuaineiden sertifioidun vertailumateriaalin analyysia toistetaan, pitoisuuden kokeellisesti määritetyn keskiarvon poikkeaman sertifioidusta arvosta on oltava $\pm 10\%$:n sisällä. Jos tällaista vertailumateriaalia ei ole saatavissa, on hyväksyttävää arvioida mittauksen oikeellisuus lisäämällä tuntemattomiin näytteisiin tunnettuja määriä alkuainetta ja määrittämällä saanto. On huomattava, että toisin kuin analyytti, lisätty alkuaine ei ole kemiallisesti sidottuna todellisessa matriisissa, ja tämän vuoksi tällä menetelmällä saadut tulokset ovat vähemmän valideja kuin sertifioidulla vertailumateriaalilla saadut tulokset. Saantoa koskevat mittaustulokset ovat hyväksyttävää vain, jos ne ovat $\pm 10\%$:n sisällä tavoitearvosta.

2.4.2.2 Kvantitatiivisten menetelmien täsmällisyys

Kun näytteen analyysia toistetaan laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa, laboratorion sisäinen keskiarvon vaihtelukerroin (CV) ei saa ylittää seuraavia arvoja:

Taulukko 8

Esimerkkejä kvantitatiivisiin menetelmiin liittyvistä vaihtelukertoimista tietyillä analyytin massaosuuk-silla

Massaosuus	CV (%)
≥ 10 µg/kg—100 µg/kg	20
> 100 µg/kg—1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3 Erityisvaatimukset DPASV-menetelmää (differentialipulssitekniikalla tehtävä anodinen liuotusvoltam-metria) varten

On erittäin tärkeää tuhota näytteissä olevat orgaaniset aineet ennen DPASV-määrittystä. Voltammogrammeissa ei saa näkyä orgaanisista aineista johtuvia leveitä signaaleja. Epäorgaaniset matriisikomponentit voivat vaikuttaa DPASV:n piikkien korkeuteen. Kvantifointi on tämän vuoksi tehtävä standardilisäysmenetelmällä. Menetelmän mukana on toimitettava esimerkkejä näyteliuoksen tyypillisistä voltammogrammeista.

2.4.4 Erityisvaatimukset atomiabsorptiospektrometriaa (AAS) varten

Tämä tekniikka on alkuainekohtainen ja edellyttää sen vuoksi kvantifioitavasta alkuaineesta riippuvaista kokeel-listen asetusten optimointia. Mikäli mahdollista, tulokset on tarkistettava kvantitatiivisesti ja kvantitatiivisesti käyttämällä vaihtoehtoisia absorptioviivoja (parhaassa tapauksessa on valittava kaksi erillistä viivaa). Kalibrointi-standardit on valmistettava liuosmatriisiin, joka vastaa mitattavaa näyteliuosta mahdollisimman tarkkaan (esimer-kiksi happokonsentraation tai modifointiaineiden koostumuksen osalta). Nolla-arvojen minimoimiseksi kaikkien reagenssien tulee olla puhtainta saatavilla olevaa laatua. Näytteen höyrystys- ja/tai atomisointimenetelmän mukai-sesti voidaan erottaa AAS:n eri lajeja.

2.4.4.1 Erityisvaatimukset liekki-AAS:aa varten

Mittalaitteen asetukset on optimoitava jokaista alkuainetta varten. Erityisesti kaasun koostumus ja virtausnopeus on tarkistettava. Tausta-absorption aiheuttamien interferenssien välttämiseksi on käytettävä jatkuvaa lähdekor-jainta. Tuntemattomien matriisien kohdalla on tarkastettava, tarvitaanko taustakorjausta.

2.4.4.2 Erityisvaatimukset grafiittiuuni-AAS:aa varten

Laboratoriossa tapahtunut kontaminaatio vaikuttaa usein tarkkuuteen, kun määritetään erittäin pieniä pitoisuuksia grafiittiuunitekniikalla. Tämän vuoksi on syytä käyttää erittäin puhtaita reagensseja, deionisoitua vettä ja inertteja muovivälineitä näytteiden ja standardien käsittelyssä. Mittalaitteen asetukset on optimoitava jokaista alkuainetta varten. Erityisesti esikäsittely- ja atomisointiolosuhteet (lämpötila, aika) sekä matriisimodifikaatio on tarkistettava.

Työskentely isotermissä atomisointiolosuhteissa (esimerkiksi poikittainen lämmitetty grafiittiputki, jossa on L'vov-tasanne (8)) vähentää matriisin vaikutusta analyytin atomisaatioon. Yhdessä matriisin modifikaation ja Zeeman-taustakorjauksen (9) kanssa voidaan kvantifointi tehdä kalibrointikäyrän avulla, joka perustuu standar-dien vesiliuosten mittaukseen.

2.4.5 Erityisvaatimukset hydridien muodostukseen perustuvaa atomiabsorptiospektrometriaa varten

Orgaaniset yhdisteet, jotka sisältävät esimerkiksi arseenia, vismuttia, germaniumia, lyijyä, antimonia, seleeniä, tinaa ja telluuria, voivat olla hyvin vakaita ja vaatia hapettavaa hajotusta, jotta alkuaineen kokonaismäärä voitaisiin määrittää oikein. Tämän vuoksi on suositeltavaa käyttää mikroaaltodigestiota tai korkeapainetuhkausta voimakkaasti hapettavissa olosuhteissa. Erityistä huomiota on kiinnitettävä alkuaineiden täydelliseen ja uusitta-vissa olevaan muuntumiseen vastaaviksi hydrideiksi.

Arseenihydridin muodostuminen suolahappoliuoksessa NaBH₄:n kanssa määräytyy As:n hapettumisasteen mukaan (As III: nopea muodostuminen, As V: pidempi muodostumisaika). Jotta vältettäisiin järjestelmän lyhyestä reaktioajasta johtuva herkkyyden pieneneminen As V:n määrittämisessä virtausinjektitekniikalla, As V on redusoi-tava As III:ksi hapettavan hajotuksen jälkeen. Kaliumjodidi/askorbiinihappo tai kysteini soveltuvat tähän. Nolla-liuokset, kalibrointiliuokset ja näyteliuokset on käsiteltävä samalla tavalla. Kun määrittäykset tehdään erämenet-mällä, voidaan molemmat As-laadut määrittää tämän vaikuttamatta tarkkuuteen. As V -hydridin hitaan muodos-tumisen vuoksi kalibrointi on tehtävä piikkialueen integroinnin avulla. Mittalaitteen asetukset on optimoitava. Hydridin atomisaattoriin siirtävän kaasun virtaus on erityisen tärkeä, ja se on tarkistettava.

2.4.6 Erityisvaatimukset kylmähöyryatomiabsorptiospektrometriaa varten

Kylmähöyrytekniikkaa käytetään vain elohopean määrittämiseen. Alkuainemuotoisen elohopean haihtumis- ja adsorptiohäviöiden vuoksi koko määrittäminen vaatii erityistä huolellisuutta. Reagenssien tai ympäristön aiheuttamaa saastumista on huolellisesti vältettävä.

Elohopeaa sisältävät orgaaniset yhdisteet vaativat hapettavaa hajotusta, jotta elohopean kokonaismäärä saataisiin mitattua oikein. Hajotukseen on käytettävä tiiviisti suljettuja järjestelmiä, joissa käytetään mikroaaltohajotusta tai korkeapainetuhkausta. Elohopean kanssa kosketuksissa olleet laitteet ja tarvikkeet on puhdistettava erityisen huolellisesti.

Virtausinjektiotekniikan käytöllä on etuja. Kun on kyseessä alhaiset päätösrajat, suositellaan alkuainemuotoisen elohopean adsorptiota kulta/platina-adsorptioaineeseen sekä termistä desorptiota. Kosteuden joutumista adsorptioaineeseen tai kennoon on vältettävä, sillä kosteus haittaa mittausta.

2.4.7 Erityisvaatimukset induktiivisesti kytkettyyn plasmassa perustuvaa atomiemissiospektrometriaa (ICP-AES) varten

Induktiivisesti kytkettyyn plasmassa perustuva atomiemissiospektrometria (10) on monialkuainemenetelmä, jonka avulla voidaan samanaikaisesti mitata useita alkuaineita. ICP-AES-menetelmän käyttöä varten näytteet on ensin digeroitava, jotta orgaaniset matriisit saadaan hajotettua. Hajotukseen on käytettävä tiiviisti suljettuja järjestelmiä, joissa käytetään mikroaaltodigestiota tai korkeapainetuhkausta. Mittalaitteen kalibroinnilla ja alkuaineen tai aallonpituuden valinnalla on tärkeä merkitys tavoiteltaessa luotettavaa ICP-AES-analyysia. Lineaaristen kalibrointikuvaajien tapauksessa mittalaitteen kalibrointiin vaaditaan vain neljän konsentraation kalibrointiliuosten mittausta, sillä ICP-AES:n kalibrointikäyrät ovat yleensä lineaarisia 4–6 konsentraatiokertaluokan alueella. ICP-AES-järjestelmän kalibrointi on tavallisesti tehtävä monialkuaineisen standardin avulla. Se on valmistettava liuoksessa, jonka happokonsentraatio on sama kuin mitattavassa liuoksessa. Lineaarisen kuvaajan osalta on tarkistettava alkuaineiden konsentraatiot.

Analyyttien emissioaallonpituudet on valittava määritettävien alkuaineiden konsentraatioille sopivaksi. Kun analyytin konsentraatio on emissioviivan käyttöalueen ulkopuolella, on käytettävä toista emissioviivaa. Aluksi on valittava herkin emissioviiva (jossa ei esiinny interferenssiä), sen jälkeen vähemmän herkkä viiva. Kun työskennellään lähellä osoitusrajaa, kyseisen analyytin herkin emissioviiva on yleensä paras valinta. ICP-AES:n suurimmat ongelmat ovat spektri- ja taustainterferenssit. Mahdollisia interferenssejä ovat esimerkiksi yksinkertainen taustasiirtymä, luiskamainen taustasiirtymä, suora spektrien päällekkäisyys ja monimutkainen taustasiirtymä. Jokaisella interferenssin lajilla on oma syynsä ja korjaustapansa. Matriisin mukaan on tehtävä interferenssikorjauksia ja optimoitava suoritusmuuttujia. Joitakin interferenssejä voidaan välttää laimentamalla tai muuttamalla matriiseja. Kunkin näyte-erän kanssa on käsiteltävä vertailumateriaali ja väkevöity materiaali, joissa on tunnettu määrä analyyttiä (analyyttejä) samoin kuin nollamateriaali, samalla tavalla kuin näytteet. Liukuman varalta standardi on tarkistettava esimerkiksi kymmenen näytteen jälkeen. Kaikkien reagenssien ja plasmakaasun on oltava puhtainta saatavilla olevaa laatua.

2.4.8 Erityisvaatimukset induktiivisesti kytkettyä massaspektrometriaa (ICP-MS) varten (11)

Keskimääräisen atomimassan omaavien metallien, kuten kromin, kuparin ja nikkelin, määrittäminen voi kärsiä muiden isobaaristen ja moniatomisten ionien aiheuttamasta voimakkaasta interferenssistä. Tilanne voidaan kiertää vain, jos käytettävissä on vähintään 7 000–8 000:n erotuskyky. MS-tekniikkaan liittyviä vaikeuksia ovat laitteiden liukuma, matriisivaikutukset sekä molekulaaristen ionien interferenssi ($m/z < 80$). Laitteiden liukuman korjaus ja matriisivaikutusten korjaus vaativat useita sisäisiä standardeja, jotka kattavat saman massa-alueen kuin määritettävät alkuaineet.

Näytteissä olevan orgaanisen aineen täydellinen hajottaminen on tarpeen ennen ICP-MS-mittauksia. Kuten AAS:n tapauksessa, haihtuvat alkuaineet, kuten jodi, on siirrettävä vakaaseen hapettumistilaan tiiviisti suljetuissa astioissa tehdyn digestion jälkeen. Pahimman interferenssin aiheuttavat argonin (plasmakaasun), vedyn, hiilen, typen ja hapen (liuotinhapot, plasmakaasun epäpuhtaudet ja ilmakemien kaasut) sekä näytematriisin molekulaariset ioniyhdistelmät. Interferenssien välttämiseksi vaaditaan täydellistä hajotusta, taustamittauksia sekä analyyttisten massojen, johon joskus liittyy matalampi saanto (huonompi osoitusraja), sekä liuotinhappojen (esim. typpihappo) oikeaa valintaa.

Määritettäviin alkuaineisiin kohdistuvat interferenssit on suljettava pois valitsemalla sopivat analytyttiset massat, ja myös isotooppisuhteet on varmistettava. Mittalaitteiden vaste, Fano-tekijät huomioon ottaen, on tarkistettava sisäisten standardien avulla jokaista mittausta varten.

3 VALIDOINTI

Validoinnissa on osoitettava, että määrittämenetelmä täyttää relevantteja suoritusarvoja koskevat vaatimukset.

Erityyppistä valvontaa varten käytetään erilaisia menetelmiä. Seuraavassa taulukossa esitetään, mitkä suoritusarvot on todennettava millekin menetelmälle.

Taulukko 9

Määrittämenetelmien luokittelu määritettävien suoritusarvojen perusteella

		Päätösraja CC β	Päätösraja CC α	Oikeellisuus/ Saanto	Analyttinen toistotarkkuus	Selektiivisyys/ Spesifisyys	Soveltavuus/ Häiriönkestävyys/ Stabiilisuus
Kvalitatiiviset menetelmät	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvantitatiiviset menetelmät	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = seulontamenetelmät; C = varmistusmenetelmät; + = määrittäminen on pakollista.

3.1 VALIDOINTIMENETTELYT

Tässä luvussa annetaan esimerkkejä ja/tai kirjallisuusviitteitä määrittämenetelmien validointimenetelyistä. Sen osoittamiseksi, että määrittämenetelmä täyttää kyseistä suoritusarvoa koskevat vaatimukset, voidaan käyttää myös muita tapoja, mikäli saavutetaan sama informaation taso ja laatu.

Validointi voidaan tehdä myös laboratoriodenvälisen tutkimuksen avulla. Sellaisia ovat vahvistaneet Codex Alimentarius, ISO ja IUPAC (12). Voidaan tehdä myös yhden laboratorion tutkimus eli sisäinen validointi (13) (14). Tässä osassa selostetaan yhden laboratorion tutkimus (sisäinen validointi), jossa sovelletaan modulaarista lähestymistapaa. Tässä lähestymistavassa on

1. käytetyistä validointimallista riippumattomia yhteisiä ominaisuuksia, ja
2. spesifisempiä malleista riippuvaisia menettelyjä, kuten taulukossa 10 selostetaan.

Taulukko 10

Mallista riippumattomat ja riippuvaiset suoritusarvomuuttujat

Validointi		
Mallista riippumattomat suoritusarvomuuttujat	Mallista riippuvaiset suoritusarvomuuttujat	
Yleiset suoritusominaisuudet (3.1.1)	Tavanomainen validointitapa (3.1.2)	Sisäinen validointitapa (3.1.3)
Spesifisyys	Saanto	Saanto
Oikeellisuus	Toistettavuus	Toistettavuus
Häiriönkestävyys: pienet muutokset	Laboratorion sisäinen uusittavuus	Laboratorion sisäinen uusittavuus
Stabiilisuus	Uusittavuus	Uusittavuus
	Päätösraja (CC α)	Päätösraja (CC α)
	Detektiokyky (CC β)	Detektiokyky (CC β)
	Kalibrointikäyrät	Kalibrointikäyrät
	Häiriönkestävyys: suuret muutokset	Häiriönkestävyys

3.1.1 Mallista riippumattomat suoritusominaisuudet

Valitusta validointimenetelmästä riippumatta on määritettävä seuraavassa esitetyt suoritusarvot. Työmäärän vähentämiseksi eri parametrien määrittämiseksi tehtyjä kokeita voidaan yhdistää huolellisesti suunnitellun ja tilastollisesti pätevän menettelyn mukaisesti.

3.1.1.1 Spesifisyys

Analyttisissä menetelmissä kyky erottaa analyytti sitä läheisesti muistuttavista aineista (isomeereista, metaboliiteista, hajoamistuotteista, endogeenisista aineista, matriisin komponenteista jne.) on tärkeä. Interferenssien käsittelemiseksi tarvitaan kaksi lähestymistapaa.

Sitä varten on valittava mahdollisesti interferoivat aineet, ja relevantit nollanäytteet on analysoitava mahdollisten interferenssien toteamiseksi ja niiden vaikutusten arvioimiseksi.

- valitaan joukko kemiallisesti toisiaan lähellä olevia yhdisteitä (metaboliitteja, johdoksia jne.) tai muita aineita, joita todennäköisesti esiintyy yhdessä tutkittavan yhdisteen kanssa, jota voi olla näytteissä,
- analysoidaan sopiva määrä edustavia nollanäytteitä ($n \geq 20$) ja etsitään interferenssejä (signaaleja, piikkejä, ionien jälkiä) sillä alueella, jossa kohteena olevan analyytin oletetaan eluoituvan,
- vastaavat nollanäytteet on lisäksi väkevöitävä relevanttiin konsentraatioon aineella, jotka todennäköisesti interferoivat analyytin tunnistuksen ja/tai kvantifioinnin kanssa,
- määrittämisen jälkeen on tutkittava:
 - aiheuttaako aineen läsnäolo väärän tunnistuksen,
 - vaikeuttaako yhden tai useamman interferenssin vaikutus kohdeanalyytin tunnistusta,
 - onko vaikutus kvantifointiin huomattava.

3.1.1.2 Oikeellisuus

Tässä kappaleessa kuvataan oikeellisuuden (yksi tarkkuuden osatekijä) määrittäminen. Oikeellisuus voidaan määrittää vain sertifioidun vertailumateriaalin (CRM) avulla. Sertifioituja vertailumateriaaleja on käytettävä aina, kun sellainen on saatavilla. Menetelmä on kuvattu tarkkaan standardissa ISO 5725-4 (5). Seuraavassa on esimerkki:

- analysoidaan kuusi CRM:n rinnakkaisnäytettä testiohjeiden mukaisesti,
- määritetään analyytin konsentraatio kussakin rinnakkaisnäytteessä,
- lasketaan konsentraatioiden keskiarvo, keskihajonta ja vaihtelukerroin (%),
- lasketaan oikeellisuus jakamalla tulokseksi saatu keskimääräinen konsentraatio sertifioidulla arvolla (mitattu konsentraationa) ja kerrotaan tulos sadalla prosentuaalisen tuloksen saamiseksi:

Oikeellisuus (%) = keskimääräinen saannon suhteen korjattu konsentraatio \times 100 / sertifioitu arvo.

Jos CRM:ää ei ole saatavissa, voidaan oikeellisuuden asemesta määrittää saanto kohdassa 4.1.2.1 esitetyllä tavalla.

3.1.1.3 Sovellettavuus ja/tai häiriönkestävyys (pienet muutokset)

Näissä tutkimuksissa laboratorio aiheuttaa tarkoituksella pieniä, todellisissa tilanteissa esiintyviä muutoksia ja tarkkailee niiden vaikutuksia.

Esitutkimuksessa on valittava näytteen esikäsittelyyn, puhdistukseen ja määrittämiseen liittyviä tekijöitä, jotka voivat vaikuttaa mittaustuloksiin. Näitä tekijöitä voivat olla määrittämisen suorittava henkilö, reagenssien, liuottimien, standardien ja näyteliuosten lähde ja ikä, lämmitysnopeus, lämpötila, pH-arvo ja monet muut laboratoriossa esiintyvät tekijät. Näitä muutoksia on varoitava sellaisessa kertaluokassa, joka vastaa laboratorioissa yleensä esiintyviä poikkeamia.

- yksilöidään tuloksiin mahdollisesti vaikuttavia tekijöitä,
- muutetaan jokaista tekijää hieman,

- tehdään häiriönkestävyydestä Youdenin menetelmällä (15) (16). (Muitakin hyväksytyjä menetelmiä voidaan käyttää, mutta Youdenin menetelmään tarvitaan erityisen vähän aikaa ja vaivaa.) Menetelmä perustuu osittais-tekijämenetelmään. Eri tekijöiden välisiä riippuvuuksia ei voida osoittaa,
- jos jokin tekijä vaikuttaa huomattavasti mittaustuloksiin, tehdään lisäkokeita, joiden perusteella voidaan päättää tämän tekijän hyväksyttävät rajat,
- sellaiset tekijät, jotka vaikuttavat huomattavasti tuloksiin, on ilmoitettava selkeästi menetelmäkuvauksessa.

Perusajatus ei ole yhden muutoksen tutkiminen kerrallaan vaan useiden muutosten tekeminen samalla kertaa. Olkoot esimerkiksi A, B, C, D, E, F ja G seitsemän sellaisen tekijän nimellisarvot, joiden pieni muuttaminen voisi vaikuttaa tuloksiin. Merkittäköön näiden tekijöiden vaihtoehtoisia arvoja vastaavilla pienillä kirjaimilla a, b, c, d, e, f ja g. Arvoista voidaan muodostaa 2⁷ eli 128 erilaista yhdistelmää.

On mahdollista valita sellainen kahdeksan yhdistelmän osajoukko, jossa isot ja pienet kirjaimet ovat tasapainossa (Taulukko 11). Tehdään kahdeksan määritystä, joissa käytetään valittujen tekijöiden (A—G) yhdistelmää. Määrittystulokset esitetään taulukossa 11 (S—Z).

Taulukko 11

Koejärjestely häiriönkestävyyden testausta varten (pienet muutokset)

Tekijän arvo F	Määrittäsyhdistelmän numero							
	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
Havaittu tulos R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Laskuesimerkkejä häiriönkestävyydestäuksesta on kohdassa 3.3.

3.1.1.4 Stabiilisuus

On havaittu, että tutkittavan aineen tai näytteen matriisin komponenttien riittämätön stabiilisuus säilytyksen tai määrittämisen aikana voi aiheuttaa huomattavia poikkeamia määrittäytuloksissa. Lisäksi myös kalibroitistandardin stabiilisuus liuoksessa on tarkistettava. Analyytin stabiilisuus on yleensä hyvin karakterisoitu eri säilytysoloissa. Säilytysolojen seuranta on osa laboratorion normaalia akkreditointijärjestelmää. Seuraavassa on esimerkkejä siitä, miten stabiilisuus voidaan määrittää, kun sitä ei tunneta.

Analyytin stabiilisuus liuoksessa

- valmistetaan analyyt(e)istä tuoret kantaliuokset ja laimennetaan ne testiohjeissa esitetyllä tavalla, jotta saadaan riittävä määrä (esim. 40) osanäytteitä kutakin valittua konsentraatiota kohti (pienimmän vaaditun suoritusrajan lähellä aineille, joille ei ole vahvistettu sallittua rajaa, tai sallitun rajan lähellä muille aineille). Valmistetaan analyyttiliuokset sekä väkevöintiä että lopullista määrittystä varten sekä mahdolliset muut tarvittavat liuokset (esim. johdosstandardit),
- mitataan analyyttipitoisuus juuri valmistetussa liuoksessa testiohjeiden mukaisesti,
- siirretään asianmukaiset määrät liuosta sopiviin astioihin, merkitään astiat ja säilytetään niitä seuraavan suunnitelman mukaisesti:

Taulukko 12

Analyytin stabiilisuuden määrittäminen liuoksessa

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Pimeässä	10 näytettä	10 näytettä	10 näytettä
Valossa			10 näytettä

- säilytysajaksi voidaan valita 1, 2, 3 tai 4 viikkoa tai tarvittaessa pidempi aika, esimerkiksi siihen asti, kun ensimmäiset hajoamisilmiöt ovat havaittavissa tunnistuksen ja/tai kvantifioinnin yhteydessä. Enimmäissäilytysaika ja optimaaliset säilytysolosuhteet on kirjattava,
- analyytin (analyyttien) konsentraation laskeminen kustakin näytteestä on tehtävä käyttämällä tuoreen liuoksen konsentraatiota 100-prosenttisena arvona.

$$\text{Jäljellä oleva analyytti (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{tuore}}$$

C_i konsentraatio tietyllä ajan hetkellä

C_{tuore} tuoreen liuoksen konsentraatio

Analyytin (analyyttien) stabiilisuus matriisissa

- aitoja näytteitä on käytettävä aina kun se on mahdollista. Jos aitoa materiaalia ei ole saatavilla, on käytettävä analyytillä väkevöityä matriisia,
- jos aitoa materiaalia on saatavilla, aineen konsentraatio näytteessä on määritettävä materiaalin ollessa vielä tuoretta. Materiaalista voidaan ottaa lisää näytteitä 1, 2, 4 ja 20 viikon kuluttua ja määrittää niiden konsentraatiot. Kudoksen säilytyslämpötilan on oltava tarvittaessa vähintään - 20 °C,
- jos aitoa materiaalia ei ole käytettävissä, otetaan nollamateriaalia ja homogenoidaan se. Materiaali jaetaan viiteen osaan. Osat väkevöidään analyytillä, joka on mieluiten valmistettava pieneen määrään vesiliuosta. Yksi osanäyte analysoidaan heti. Muita osanäytteitä säilytetään vähintään - 20 °C:n lämpötilassa, ja ne analysoidaan 1, 2, 4 ja 20 viikon kuluttua.

3.1.1.5 Kalibrointikäyrät

Kun kvantifointiin käytetään kalibrointikäyriä:

- käyrän muodostamiseen on käytettävä vähintään viittä tasoa (nolla mukaan lukien),
- käyrän toiminta-alue on kuvattava,
- käyrän matemaattinen kaava ja datapisteiden sovituksen hyvyys on kuvattava,
- käyrän muuttujien hyväksyttävyyserajat on kuvattava.

Jos on tarvetta käyttää standardiliuokseen perustuvaa sarjakalibrointia, kalibrointikäyrän muuttujille on esitettävä hyväksymisrajat (jotka voivat vaihdella sarjojen välillä).

3.1.2 Tavanomaiset validointitavat

Muuttujien laskenta tavanomaisilla menetelmillä vaatii useita erillisiä kokeita. Jokainen suoritusarvo on määritettävä kutakin suurta muutosta kohti (ks. edellä oleva sovellettavuutta ja/tai häiriönkestävyyttä koskeva kohta). Useita analyyttejä kattavissa menetelmissä voidaan analysoida useita aineita samanaikaisesti, kunhan mahdollisesti merkitykselliset interferenssit on etukäteen suljettu pois. Useita suoritusarvoja voidaan määrittää samankaltaisella tavalla. Työmäärän vähentämiseksi onkin suositeltavaa yhdistellä kokeita niin paljon kuin mahdollista (esim. toistettavuus ja laboratorion sisäinen uusittavuus yhdessä spesifisyyden kanssa tai nollanäytteiden määrittäminen päätösrajan määrittämistä varten yhdessä spesifisyyden testauksen kanssa).

3.1.2.1 Saanto

Jos käytettävissä ei ole sertifioitua vertailumateriaalia, saanto on määritettävä kokeellisesti väkevöidyn nollamatriisin avulla esimerkiksi seuraavalla tavalla:

- nollamateriaalista valmistetaan 18 osanäytettä. Kuusi osanäytettä väkevöidään siten, että konsentraatio on 1, 1,5 tai 2 kertaa vähimmäissuoritusraja tai 0,5, 1 ja 1,5 kertaa sallittu raja,
- näytteet analysoidaan ja kunkin näytteen konsentraatio lasketaan,

- kunkin näytteen saanto lasketaan jäljempänä esitettävän yhtälön avulla,
- keskimääräinen saanto ja vaihtelukerroin lasketaan kullakin tasolla saaduista kuudesta tuloksesta,
- saanto- % = $100 \times \text{mitattu määrä} / \text{väkevöimismäärä}$.

Tätä tavanomaista menetelmää saannon määrittämiseksi voidaan käyttää kohdassa 3.5 esitetyn standardilisäysmenetelmän muunnoksena, kun

- näyte katsotaan nollanäytteeksi eikä tutkittavaksi näytteeksi,
- analyytin määrän näytteessä (uuton jälkeen) ⁽¹⁾ ja sen saannon ⁽²⁾ katsotaan olevan samat molemmissa näyteannoksissa,
- testinäytteiden massat ovat samat, ja testiannosuuhteiden tilavuudet ovat samat,
- toiseen (väkevöityyn) testiannokseen lisätyn kalibroitistandardin määrää merkitään xADD. ($xADD = \rho A.VA$),
- x1 on nollanäytteen mitattu arvo ja x2 on toisen (väkevöidyn) testiannoksen mitattu arvo,
- Täten saanto- % = $100 (x2 - x1) / xADD$.

Jos jokin edellä mainituista ehdoista ei täyty tai sen ei uskota täyttyvän, on saanto määritettävä täydellisen kaavan mukaan standardilisäysmenetelmällä kohdan 3.5 mukaisesti.

3.1.2.2 Toistettavuus

- valmistetaan joukko näytteitä, joiden matriisit ovat identtiset ja jotka on väkevöity niin, että konsentraatiot vastaavat 1, 1,5 ja 2 kertaa vähimmäissuoritusrajaa tai 0,5, 1 ja 1,5 kertaa sallittua rajaa,
- määrittäminen on tehtävä kullakin tasolla vähintään kuudelle rinnakkaisnäytteelle,
- näytteet analysoidaan,
- kunkin näytteen konsentraatio lasketaan,
- väkevöityjen näytteiden keskimääräinen konsentraatio, keskihajonta ja vaihtelukerroin (%) lasketaan,
- nämä vaiheet toistetaan ainakin kaksi kertaa,
- kaikkien väkevöityjen näytteiden keskimääräiset konsentraatiot ja vaihtelukertoimet lasketaan.

3.1.2.3 Laboratorion sisäinen uusittavuus

- valmistetaan määrätystä testimateriaalista (joiden matriisi on sama tai erilainen) joukko näytteitä, jotka on väkevöity analyytillä niin, että konsentraatiot vastaavat 1, 1,5 ja 2 kertaa vähimmäissuoritusrajaa tai 0,5, 1 ja 1,5 kertaa sallittua rajaa,
- määrittäminen on tehtävä kullakin tasolla vähintään kuudelle rinnakkaisnäytteelle,
- nämä vaiheet toistetaan ainakin kahdella muulla kerralla niin, että laitteiden käyttäjä ja ympäristöolosuhteet, kuten reagenssien ja liuottimien erät, huonelämpötila, mittalaitteet jne. muuttuvat, mikäli mahdollista,
- näytteet analysoidaan,
- kunkin näytteen konsentraatio lasketaan,
- väkevöityjen näytteiden keskimääräinen konsentraatio, keskihajonta ja vaihtelukerroin (%) lasketaan.

3.1.2.4 Uusittavuus

Kun uusittavuus on todennettava, laboratorioden olisi osallistuttava ISO-standardin 5725-2 (5) mukaisiin kollaoratiivisiin tutkimuksiin.

3.1.2.5 Päätösraja (CCa)

Päätösraja on vahvistettava tunnistuksen tai sekä tunnistuksen että kvantifioinnin vaatimusten mukaisesti siten kuin osassa 2 "Analyyttisiä menetelmiä koskevat suorituskykyperusteet ja muut vaatimukset" on selostettu.

⁽¹⁾ Analyytin määrä (yield): se näytteessä olevan analyytin massaosuus, joka on läsnä lopullisessa uutuksessa.

⁽²⁾ Saanto (tässä): se näytteeseen lisätyn analyytin massaosuus, joka on läsnä lopullisessa uutuksessa. Muissa asiakirjan osissa oletetaan, että nämä kaksi arvoa ovat samat, ja näin ollen käytetään ainoastaan termiä "saanto".

Jos aineille ei ole vahvistettu sallittua rajaa, $CC\alpha$ voidaan vahvistaa

- joko ISO-standardin 11843 (17) mukaisella kalibrointikäyrämenetelmällä (jota tässä kutsutaan nettotilamuuttujan kriittiseksi arvoksi). Tässä tapauksessa on käytettävä nollamateriaalia, joka väkevöidään siten, että konsentraatio on vähimmäissuoritustason kohdalla ja sen yläpuolella tasaisin välein. Näytteet analysoidaan. Tunnistuksen jälkeen piirretään kuvaaja, jossa esitetään signaali lisätyn konsentraation funktiona. Päätösraja on yhtä suuri kuin y-akselin leikkauspistettä vastaava konsentraatio plus 2,33 kertaa leikkauspistettä vastaavan laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonta. Tämä koskee vain kvantitatiivisia analyysejä ($\alpha = 1\%$),
- tai analysoimalla vähintään 20 nollamateriaalia matriisia kohti, jotta voitaisiin laskea signaali-kohinasuhde siinä aikaikkunassa, jossa tutkittavan aineen oletetaan esiintyvän. Päätösrajana voidaan käyttää signaali-kohinasuhdetta kerrottuna kolmella. Tämä koskee sekä kvantitatiivisia että kvalitatiivisia analyysejä.

Jos aineille on vahvistettu sallittu raja, $CC\alpha$ voidaan vahvistaa

- joko ISO-standardin 11843 (17) mukaisella kalibrointikäyrämenetelmällä (jota tässä kutsutaan nettotilamuuttujan kriittiseksi arvoksi). Tässä tapauksessa on käytettävä nollamateriaalia, joka väkevöidään tasaisin välein sallittujen rajojen ympärillä. Näytteet analysoidaan. Tunnistuksen jälkeen piirretään kuvaaja, jossa esitetään signaali lisätyn konsentraation funktiona. Päätösraja on yhtä suuri kuin sallittuja rajoja vastaava konsentraatio plus 1,64 kertaa laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonta ($\alpha = 5\%$),
- tai analysoimalla vähintään 20 sellaista nollamateriaalia matriisia kohti, jotka on väkevöity analyyt(e)illä siten, että konsentraatio vastaa sallittua rajaa. Päätösraja on yhtä suuri kuin sallittua rajaa vastaava konsentraatio plus 1,64 kertaa vastaava keskihajonta ($\alpha = 5\%$).

Ks. myös 5 artikla ja kohta 3.2.

3.1.2.6 Detektiokyky ($CC\beta$)

Detektiokyky on määritettävä seulonnan, tunnistuksen tai tunnistuksen ja kvantifoinnin vaatimusten mukaisesti siten kuin osassa 2 on esitetty.

Jos aineille ei ole vahvistettu sallittua rajaa, $CC\beta$ voidaan vahvistaa

- joko ISO-standardin 11843 (17) mukaisella kalibrointikäyrämenetelmällä (jota tässä kutsutaan nettotilamuuttujan pienimmäksi havaittavaksi arvoksi). Tässä tapauksessa on käytettävä edustavaa nollamateriaalia, joka väkevöidään siten, että konsentraatio on vähimmäissuoritustason kohdalla ja sen alapuolella tasaisin välein. Näytteet analysoidaan. Tunnistuksen jälkeen piirretään kuvaaja, jossa esitetään signaali lisätyn konsentraation funktiona. Detektiokyky on yhtä suuri kuin päätösrajaa vastaava konsentraatio plus 1,64 kertaa päätösrajaa vastaavan keskimääräisen mitatun pitoisuuden laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonta ($\beta = 5\%$),
- analysoimalla matriisia kohti vähintään 20 sellaista nollamateriaalinäytettä, jotka on väkevöity tutkittavalla aineella päätösrajan mukaisiksi. Analysoidaan näytteet ja tunnistetaan analyytit. Detektiokyky on yhtä suuri kuin päätösraja plus 1,64 kertaa mitatun pitoisuuden laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonta ($\beta = 5\%$),
- jos kvantitatiivisia tuloksia ei ole saatavilla, detektiokyky voidaan määrittää tutkimalla väkevöityä nollamateriaalia päätösrajan kohdalla ja sen yläpuolella. Tässä tapauksessa menetelmän detektiokyky on yhtä suuri kuin se konsentraatio, jolla esiintyy enää enintään 5 % vääriä vaatimustenmukaisia tuloksia. Jotta taattaisiin määrittelyksen luotettavuus, ainakin yhdellä konsentraatiotasolla on tehtävä ainakin 20 tutkimusta.

Jos aineille on vahvistettu sallittu raja, $CC\beta$ voidaan vahvistaa

- joko standardin ISO 11843 (17) mukaisella kalibrointikäyrämenetelmällä (jota tässä kutsutaan nettotilamuuttujan pienimmäksi havaittavaksi arvoksi). Tässä tapauksessa on käytettävä edustavaa nollamateriaalia, joka väkevöidään tasaisin välein sallitun rajan ympärillä. Analysoidaan näytteet ja tunnistetaan analyytit. Lasketaan keskimääräisen mitatun pitoisuuden keskihajonta päätösrajan kohdalla. Detektiokyky on yhtä suuri kuin päätösrajaa vastaava konsentraatio plus 1,64 kertaa keskimääräisen mitatun pitoisuuden laboratorion sisäisen uusittavuuden keskihajonta ($\beta = 5\%$),
- tai analysoimalla matriisia kohti vähintään 20 sellaista nollamateriaalia, jotka on väkevöity analyyt(e)illä päätösrajaa vastaaviksi. Detektiokyky on yhtä suuri kuin päätösraja plus 1,64 kertaa vastaava keskihajonta ($\beta = 5\%$).

Katso myös kohta 3.2.

3.1.2.7 Häiriönkestävyys (suuret muutokset)

Määrittäminen on testattava erilaisissa koeolosuhteissa, joihin kuuluvat esim. eri lajit, eri matriisit ja erilaiset näytteenotto-olosuhteet. Tehtyjen muutosten on oltava suuria. Näiden muutosten merkitystä voidaan arvioida esimerkiksi Youdenin menetelmällä (15) (16). Kukin suoritusarvo on määritettävä kaikkien niiden suurten muutosten osalta, joilla on osoitettu olevan merkittävä vaikutus määrittäksen suorituskykyyn.

3.1.3 Vaihtoehtoisten mallien mukainen validointi

Jos käytetään vaihtoehtoisia validointimenetelmiä, pohjana oleva malli ja strategia ja siihen liittyvät vaatimukset, oletukset ja kaavat on määriteltävä validointikuvauksessa tai niihin on vähintäänkin annettava viitteet. Seuraavassa on esitetty esimerkki vaihtoehtoisesta menetelmästä. Jos käytetään esimerkiksi laboratorionsisäistä validointimallia, suoritusarvot määritetään sellaisella tavalla, joka mahdollistaa suuriin muutoksiin liittyvän validoinnin samassa validointimenetelyssä. Tämä edellyttää koesuunnitelman laatimista validointia varten.

3.1.3.1 Koesuunnitelma

Koesuunnitelma määräytyy käytettyjen eläinlajien lukumäärän ja tutkittavien tekijöiden mukaan. Koko validointimenettelyn ensimmäisessä vaiheessa on otettava huomioon laboratorioissa tulevaisuudessa analysoitavat näytepopulaatiot, jotta voitaisiin valita tärkeimmät eläinlajit ja mittaustuloksiin mahdollisesti vaikuttavat tekijät. Tämän jälkeen on valittava konsentraatioalue tarkoitukseen sopivalla tavalla tärkeäksi katsotun tason perusteella.

Esimerkki:

- Validoitavalla määrittämenetelmällä voidaan tutkia useita analyyttejä samanaikaisesti.
- On tunnistettu kaksi johtavan tekijän muunnosta (A ja B). Tekijöiden tasoja yhdistellään näiden johtavien tekijöiden pohjalta. Johtavia tekijöitä voivat olla esimerkiksi eläinlaji tai matriisi. Tässä esimerkissä johtava tekijä vaihtelee kahdella tasolla eli tarkastellaan kahta eri eläinlajia (lajit A ja B). Yleisesti on mahdollista vaihdella johtavia tekijöitä useammalla kuin kahdella tasolla. Tämä lisää tehtävien analyysien määrää.
- Valittuja tekijöitä varioidaan kahdella tasolla (joita merkitään merkinnöillä + ja -).

Taulukko 13

Esimerkkejä validointimenetelyssä tärkeinä pidetyistä tekijöistä

Eläimen sukupuoli	(tekijä 1)
Rotu	(tekijä 2)
Kuljetusolosuhteet	(tekijä 3)
Säilytysolosuhteet	(tekijä 4)
Näytteen tuoreus	(tekijä 5)
Lihotusolosuhteet	(tekijä 6)
Eri suorittajat, joilla on erilainen kokemus	(tekijä 7)

Taulukko 14

Mahdollinen koesuunnitelma edellä olevaa esimerkkiä varten

Laji	Tekijä 1	Tekijä 2	Tekijä 3	Tekijä 4	Tekijä 5	Tekijä 6	Tekijä 7	Näytteen numero
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Laji	Tekijä 1	Tekijä 2	Tekijä 3	Tekijä 4	Tekijä 5	Tekijä 6	Tekijä 7	Näytteen numero
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Koska kuhunkin näytteeseen (jokaiseen tekijätasojen yhdistelmään) on lisättävä tutkittavaa ainetta neljällä eri konsentraatiolla, jotka ovat lähellä valittua tasoa, ja koska jokaisella tasolla on analysoitava yksi nollanäyte, koko validointimenettelyssä on suoritettava $5 \times 16 = 80$ analyysia.

Näistä 80:stä mittaustuloksesta voidaan laskea (13) (14):

Saanto

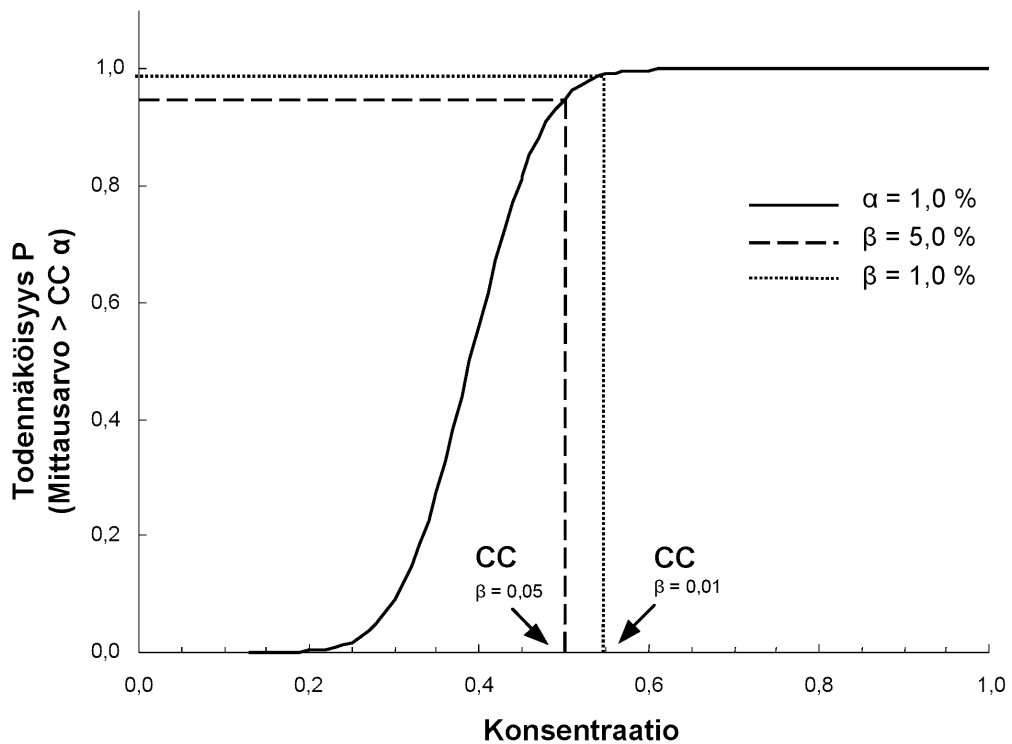
- Toistettavuus konsentraatiotasoa kohti (s_{tr})
- Laboratorion sisäinen uusittavuus konsentraatiotasoa kohti (s_{IR})
- Päätösraja ($CC\alpha$)
- Detektiokyky ($CC\beta$)
- Tehokkuuskäyrä (β -virhe konsentraation funktiona (ks. 3.1.3.2))
- Häiriönkestävyys (suuret muutokset); häiriönkestävyys pienten muutosten suhteen voidaan määrittää kohdan 3.1.1.3 mukaisesti)
- 16 näytteeseen liittyvää kalibrointikäyrää
- 1 yleinen kalibrointikäyrä
- Yleisen kalibrointikäyrän ennusteväli
- Matriisin aiheuttamat poikkeamat (s_{mat})
- Analyysiajon aiheuttamat poikkeamat (s_{run})
- Yksittäisten tekijöiden vaikutus mittaustuloksiin.

Näiden suoritusarvojen avulla menetelmän suorituskyky voidaan arvioida perusteellisesti, sillä yksittäisten tekijöiden lisäksi tutkitaan myös niiden yhdistelmien vaikutusta. Tämän koesuunnitelman avulla on mahdollista päätellä, onko jokin valituista tekijöistä jätettävä pois yleisestä kalibrointikäyrästä siksi, että se poikkeaa huomattavasti muiden tekijöiden keskihajonnasta.

3.1.3.2 Tehokkuuskäyrä

Tehokkuuskäyrä antaa tietoja menetelmän detektiokyvystä valitulla konsentraatioalueella. Se antaa tietoa tutkitun menetelmän β -virheriskistä. Tehokkuuskäyrän avulla voidaan laskea eri luokkiin (seulonta, varmistus) tai tyyppiin (kvalitatiivinen tai kvantitatiivinen) kuuluvien menetelmien detektiokyky tietyllä β -virheellä (esimerkiksi 5 %).

Kuva 1:
Tehokkuuskäyrä



Kuvassa 1 on esimerkki määrittämenetelmän detektiokyvyn ($CC\beta$) graafisesta määrittämisestä. Tällä nimenomaisella menetelmällä jäljellä oleva väärän päätöksen tekemisen riski on 5 %, kun konsentraatio on 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Kun konsentraatio on 0,55 g/kg , väärän vaatimustenmukaisuutta merkitsevän päätöksen riski pienenee 1 prosenttiin.

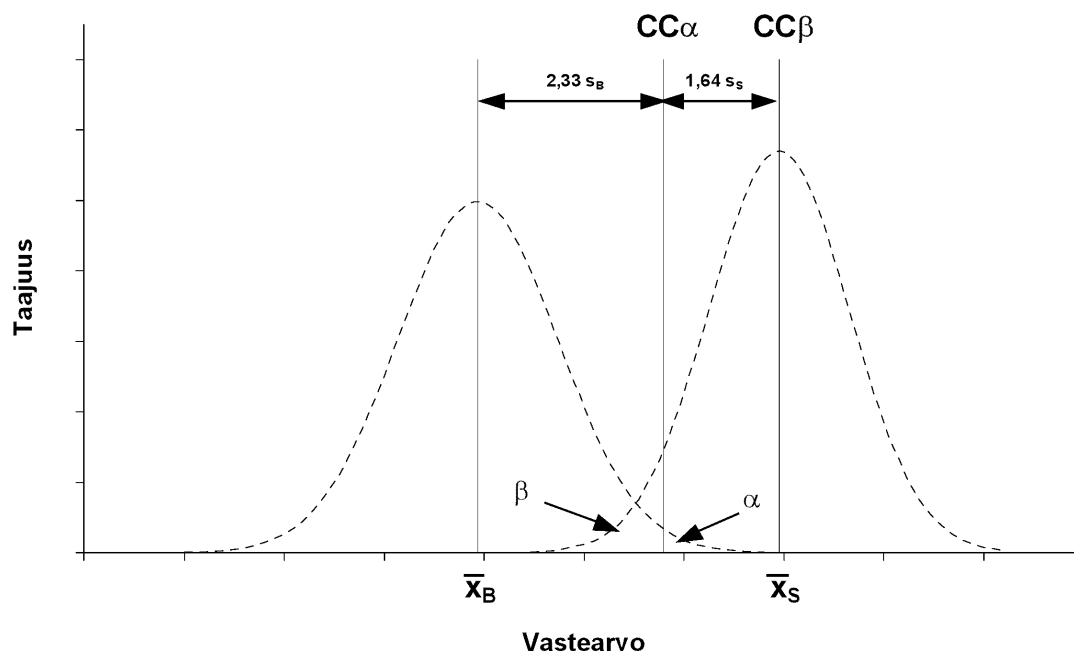
3.1.3.3 Uusittavuus

Menetelmän uusittavuuden määrittäminen laboratorionsisäisellä validointimenetelmällä vaatii toistuvaa osallistumista ISO:n ohjeiden 43-1 (3) ja 43-2 (4) mukaiseen pätevyystutkimukseen. Laboratoriot saavat itse valita menetelmänsä, kunhan menetelmiä käytetään rutiinolosuhteissa. Laboratorion keskihajontaa voidaan käyttää menetelmän uusittavuuden arvioimiseen.

3.2 ERILAISTEN ANALYYTTISTEN RAJOJEN GRAAFINEN ESITYS

Kuva 2:

Aineet, joille ei ole vahvistettu sallittua rajaa



\bar{x}_S Kontaminoituneen näytteen keskimääräinen vastearvo

s_B Nollanäytteen keskijonota (määritetty laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa)

s_S Kontaminoituneen näytteen keskijonota (määritetty laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa)

α Väärien vaatimustenvastaisten tulosten osuus

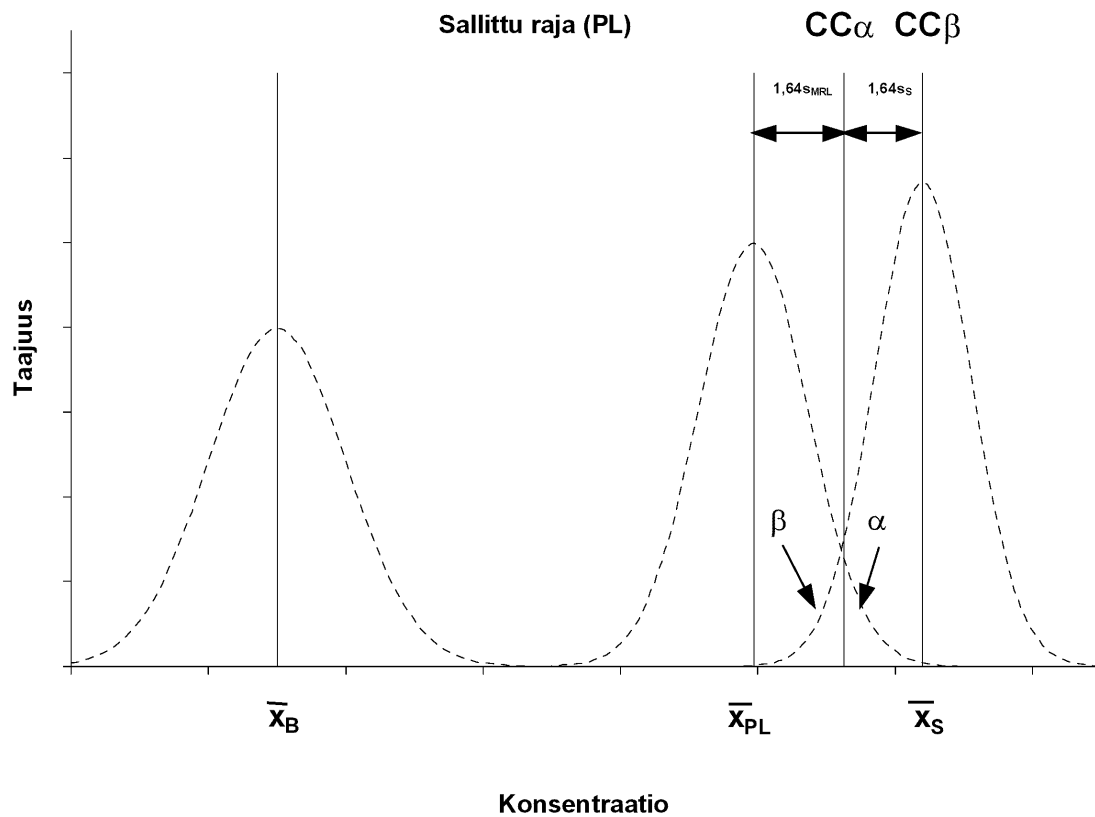
β Väärien vaatimustenmukaisten tulosten osuus

CC_α Vaste tietyllä α -virheellä ja 50 %:n β -virheellä

CC_β Vaste erittäin pienellä α -virheellä ja tietyllä β -virheellä

Kuva 3:

Aineet, joille on vahvistettu sallittu raja



- \bar{x}_B Nollanäytteen keskimääräinen "konsentraatio"
- \bar{x}_{PL} Sellaisen näytteen keskimääräinen konsentraatio, jossa on sallitun raja-arvon verran tutkittavaa ainetta
- \bar{x}_S Kontaminoituneen näytteen keskimääräinen konsentraatio
- s_{PL} Sellaisen näytteen keskihajonta, jossa on sallitun rajan verran tutkittavaa ainetta (määritetty laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa)
- s_S Kontaminoituneen näytteen keskihajonta (määritetty laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa)
- α Väärien vaatimustenvastaisten tulosten osuus
- β Väärien vaatimustenvastaisten tulosten osuus
- CC α Vaste tietyllä α -virheellä ja 50 %:n β -virheellä
- CC β Vaste erittäin pienellä α -virheellä ja tietyllä β -virheellä

3.3 LASKUESIMERKKI HÄIRIÖNKESTÄVYYSTESTAUKSESTA PIENTEN MUUTOSTEN SUHTEEN YOUSENIN MENETELMÄLLÄ (16)

Keskiarvojen (A) vertailu

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Vertaa isojen kirjainten keskiarvoja ($A_A - A_C$) vastaavien pienten kirjainten keskiarvoihin ($A_a - A_g$). Jos tekijällä on merkitystä, erotus on merkittävästi suurempi kuin muiden tekijöiden erotukset.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	Laboratorioiden välisten, lähes väistämättömien erojen ei pitäisi vaikuttaa häiriöitä hyvin sietävän menetelmän suorituskykyyn.
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	Jos mitään selkeää eroa ei ole, kyseiset seitsemän erotusta antavat oikeimman kuvan satunnaisvirheestä.
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Erotukset (D_i)

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

Erotusten neliöt (D_i^2)

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

Erotusten keskihajonta D_i (S_{D_i}):

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

Jos S_{D_i} on merkittävästi suurempi kuin menetelmän keskihajonta laboratorion sisäisissä uusittavuusolosuhteissa edellä selostetun mukaisesti, on itsestään selvää, että kaikilla tekijöillä on yhdessä vaikutusta tulokseen, vaikka mikään yksittäinen tekijä ei osoitakaan suurta vaikutusta, ja että menetelmä ei kestä häiritä riittävän hyvin valittujen muutosten suhteen.

3.4 LASKUESIMERKKEJÄ SISÄISTÄ VALIDOINTIMENETTELYÄ VARTEN

Esimerkkejä ja laskuja sisäistä validointia varten on kohdassa 3.1.3 (validointi vaihtoehtoisten mallien mukaan) (13) (14).

3.5 ESIMERKKEJÄ STANDARDILISÄYSMENETELMÄÄ VARTEN

Testinäyte, joka sisältää analyyttiä määrän T, jaetaan kahteen testiannokseen 1 ja 2, joiden massat ovat m_1 ja m_2 . Testiannokseen 2 lisätään tilavuus V_A analyyttiliuosta, jonka konsentraatio on ρ_A . Menetelmän erotus- ja puhdistusvaiheiden jälkeen saadaan kaksi testiannosuutetta, joiden tilavuudet ovat V_1 ja V_2 . Tutkittavan aineen saannon oletetaan olevan rc. Molemmat näytteet määritetään mittaumenetelmällä, jonka herkkyys on b, ja analyttiset vasteet ovat x_1 ja x_2 .

Jos oletetaan, että rc ja b ovat samoja alkuperäisessä näytteessä ja väkevöidyssä näytteessä olevalle analyyttille, pitoisuus T voidaan laskea kaavasta

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

Menetelmän avulla voidaan määrittää saanto rc. Tämän jälkeen, edellä kuvatun määrittämisen lisäksi, osaan testiannosta 1 (tilavuus V_3) lisätään tunnettu määrä $\rho_B \cdot V_B$ analyyttiä, joka määritetään. Määrittäsvaste on x_3 , ja saanto on

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

Lisäksi on mahdollista laskea herkkyys b kaavasta

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

Kaikki sovellusehdot ja yksityiskohdat on selostettu kirjallisuudessa (18).

4 KÄYTETYT LYHENTEET

AAS	atomiabsorptiospektrometria
AES	atomiemissiospektrometria
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists INTERNATIONAL
B	sitoutunut osuus (immunologisissa määrittelyissä)
CI	kemiallinen ionisaatio
CRM	sertifioitu vertailumateriaali
CV	vaihteluerro
2 D	kaksiulotteinen
DAD	diodirividetektio
DPASV	differentiaalipulssitekniikalla tehtävä anodinen liuotusvoltammetria
ECD	elektronisieppausdetektio
EI	elektroni-iskuionisaatio
GC	kaasukromatografia
HPLC	korkean suorituskyvyn nestekromatografia
HPTLC	korkean suorituskyvyn ohutkerroskromatografia
HRMS	korkean erotuskyvyn (massaspektrometria)
ICP-AES	induktiivisesti kytkettyyn plasmaan perustuva atomiemissiospektrometria
ICP-MS	induktiivisesti kytkettyyn plasmaan perustuva massaspektrometria
IR	infrapuna
ISO	Kansainvälinen standardoimisjärjestö
LC	nestekromatografia
LR(MS)	alhaisen erotuskyvyn (massaspektrometria)
MRPL	pienin vaadittu suoritusraja
MS	massaspektrometria
m/z	massan ja varauksen suhde
RF	(analyttitiplän) kulkeutuminen suhteessa liuotinvyöhykkeen etureunaan (TLC)
RSDL	laboratorion suhteelliset keskihajonnat
SIM	valitun ionin monitorointi
TLC	ohutkerroskromatografia
UV	ultraviolettilvalo
VIS	näkyvä valo

5 KIRJALLISUUSVIITTEET

- (1) ISO 17025:1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories
- (2) ISO 3534-1:1993 Statistical Methods for quality control — Vol. 1 vocabulary and symbols
- (3) ISO Guide 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes
- (4) ISO Guide 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies
- (5) ISO 5725:1994 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. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173
 - (14) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221
 - (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA
 - (16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; "Statistical Manual of the AOAC—Association of Official Analytical Chemists", AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff
 - (17) ISO 11843: 1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case 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
-