

Ovaj je tekst namijenjen isključivo dokumentiranju i nema pravni učinak. Institucije Unije nisu odgovorne za njegov sadržaj. Vjerodostojne inačice relevantnih akata, uključujući njihove preambule, one su koje su objavljene u Službenom listu Europske unije i dostupne u EUR-Lexu. Tim službenim tekstovima može se izravno pristupiti putem poveznica sadržanih u ovom dokumentu.

► **B**

PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/808

od 22. ožujka 2021.

o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ

(Tekst značajan za EGP)

(SL L 180, 21.5.2021., str. 84.)

Koju je izmijenila:

Službeni list

	br.	stranica	datum
► <u>M1</u> Provedbena uredba Komisije (EU) 2021/810 od 20. svibnja 2021.	L 180	112	21.5.2021.

Koju je ispravio:

► **C1** Ispravak, SL L 186, 27.5.2021, str. 33 (2021/810)

**PROVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/808**

od 22. ožujka 2021.

o provođenju analitičkih metoda za rezidue farmakološki djelatnih tvari koje se upotrebljavaju na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane i o tumačenju rezultata kao i o metodama koje treba primjenjivati za uzorkovanje te o stavljanju izvan snage odluka 2002/657/EZ i 98/179/EZ

(Tekst značajan za EGP)

*Članak 1.***Predmet i područje primjene**

Ovom se Uredbom utvrđuju pravila o metodama analize koje se upotrebljavaju za uzorkovanje i laboratorijske analize u vezi s reziduama farmakološki djelatnih tvari u živim životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane, dijelovima njihova tijela i tjelesnim tekućinama, izmetu, tkivima, proizvodima životinjskog podrijetla, nusproizvodima životinjskog podrijetla, hrani za životinje i vodi. Utvrđuju se i pravila za tumačenje analitičkih rezultata tih laboratorijskih analiza.

Ova se Uredba primjenjuje na službene kontrole koje su usmjerene na provjeru usklađenosti sa zahtjevima o prisutnosti rezidua farmakološki djelatnih tvari.

*Članak 2.***Definicije**

Za potrebe ove Uredbe primjenjuju se definicije iz članka 2. Delegirane uredbe Komisije (EU) 2019/2090 ⁽¹⁾, iz Uredbe Komisije (EU) 2019/1871 ⁽²⁾, iz članka 2. Uredbe (EZ) br. 470/2009 Europskog parlamenta i Vijeća ⁽³⁾ te iz Uredbe Vijeća (EEZ) br. 315/93 ⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Delegirana uredba Komisije (EU) 2019/2090 od 19. lipnja 2019. o dopuni Uredbe (EU) 2017/625 Europskog parlamenta i Vijeća u pogledu slučajeva sumnje na neusklađenost ili utvrđene neusklađenosti s pravilima Unije koja se primjenjuju na upotrebu ili rezidue farmakološki djelatnih tvari koje su odobrene u veterinarsko-medicinskim proizvodima ili kao dodaci hrani za životinje ili s pravilima Unije koja se primjenjuju na upotrebu ili rezidue zabranjenih ili neodobrenih farmakološki djelatnih tvari (SL L 317, 9.12.2019., str. 28.).

⁽²⁾ Uredba Komisije (EU) 2019/1871 od 7. studenoga 2019. o referentnim vrijednostima za poduzimanje mjera za neodobrene farmakološki djelatne tvari prisutne u hrani životinjskog podrijetla i stavljanju izvan snage Odluke 2005/34/EZ (SL L 289, 8.11.2019., str. 41.).

⁽³⁾ Uredba (EZ) br. 470/2009 Europskog parlamenta i Vijeća od 6. svibnja 2009. o propisivanju postupaka Zajednice za određivanje najvećih dopuštenih količina rezidua farmakološki djelatnih tvari u hrani životinjskog podrijetla, o stavljanju izvan snage Uredbe Vijeća (EEZ) br. 2377/90 i o izmjeni Direktive 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća i Uredbe (EZ) br. 726/2004 Europskog parlamenta i Vijeća (SL L 152, 16.6.2009., str. 11.).

⁽⁴⁾ Uredba Vijeća (EEZ) br. 315/93 od 8. veljače 1993. o utvrđivanju postupaka Zajednice za kontrolu kontaminanata u hrani (SL L 37, 13.2.1993., str. 1.).

▼B

Primjenjuju se i sljedeće definicije:

- (1) „apsolutno iskorištenje” znači konačni maseni udio završne faze analitičkog postupka za analit podijeljen količinom analita u izvornom uzorku, izraženo kao postotak;
- (2) „točnost” znači stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene stvarne referentne vrijednosti, koji se utvrđuje procjenom istinitosti i preciznosti ⁽⁵⁾;
- (3) „alfa (α) pogreška” znači vjerojatnost da je ispitani uzorak usklađen iako je dobiven neusklađen mjerni rezultat;
- (4) „analit” znači komponenta sustava koja se analizira;
- (5) „odobrena tvar” znači farmakološki djelatna tvar odobrena za upotrebu na životinjama koje se koriste za proizvodnju hrane u skladu s Direktivom 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća ⁽⁶⁾;
- (6) „beta (β) pogreška” znači vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno neusklađen iako je dobiven usklađen mjerni rezultat;
- (7) „mjerno odstupanje” znači razlika između procijenjene vrijednosti rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti;
- (8) „kalibracijski standard” znači sljedeća referentna vrijednost za mjerenja koja predstavlja količinu testirane tvari tako da povezuje njezinu vrijednost s referentnom bazom;
- (9) „potvrđena referentna tvar” (PRT) znači referentna tvar, praćena dokumentacijom koju izdaje delegirano tijelo i koja se oslanja na valjane postupke koji se upotrebljavaju za dobivanje jedne ili više specificiranih vrijednosti svojstva s pridruženim nesigurnostima i sljedivostima ⁽⁷⁾;
- (10) „ko-kromatografija” znači tehnika u kojoj se nepoznata tvar nanosi na kromatografski nosač zajedno s jednim ili više poznatih spojeva, pri čemu se očekuje da će relativno ponašanje nepoznatih i poznatih tvari pomoći u identifikaciji nepoznate tvari;
- (11) „poredbeno ispitivanje” znači analiziranje istog uzorka ili istih uzoraka korištenjem iste metode kako bi se utvrdila učinkovitost metode u različitim laboratorijima, pri čemu ispitivanje omogućuje izračun slučajne mjerne pogreške i mjernog odstupanja laboratorija za korištenu metodu;
- (12) „potvrđna metoda” znači metoda koja daje potpune ili dodatne podatke na temelju kojih je tvar moguće nesumnjivo identificirati i prema potrebi kvantificirati na jedan od sljedećih načina:
 - (a) na najvećoj dopuštenoj količini rezidua ili najvećoj dopuštenoj količini za odobrene tvari;

⁽⁵⁾ ISO 3534-1: 2006. Statistika – Terminološki rječnik i simboli – 1. dio: Opći statistički nazivi i nazivi koji se upotrebljavaju u vjerojatnosti (1. poglavlje).

⁽⁶⁾ Direktiva 2001/82/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 6. studenoga 2001. o zakoniku Zajednice o veterinarsko-medicinskim proizvodima (SL L 311, 28.11.2001., str. 1.).

⁽⁷⁾ JCGM 200:2008, Međunarodni mjeriteljski rječnik – Osnovni i opći pojmovi i pridruženi nazivi (VIM), treće izdanje 2008.: <https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm> (poglavlje 5. Mjerni etaloni).

▼B

- (b) na referentnim vrijednostima za poduzimanje mjera za zabranjene ili neodobrene tvari za koje je utvrđena referentna vrijednost za poduzimanje mjera;
- (c) na najnižoj razumno ostvarivoj koncentraciji za zabranjenu ili neodobrenu tvar za koju nije utvrđena referentna vrijednost za poduzimanje mjera;
- (13) „faktor prekrivanja (k)” znači broj kojim se izražava željena razina pouzdanosti i koji je povezan s proširenom mjernom nesigurnosti;
- (14) „granica odlučivanja za potvrdu ($CC\alpha$)” znači granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost pogreške α , da je uzorak neusklađen, a vrijednost $1 - \alpha$ znači statistička sigurnost, izražena u postotku, da je dozvoljena granica premašena;
- (15) „sposobnost detekcije orijentacije ($CC\beta$)” znači najmanji udio analita koji je moguće detektirati ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost pogreške β :
- (a) u slučaju zabranjenih ili neodobrenih farmakološki djelatnih tvari $CC\beta$ je najniža koncentracija pri kojoj se metodom mogu detektirati ili kvantificirati, sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$, uzorci koji sadržavaju rezidue zabranjenih ili neodobrenih tvari;
- (b) u slučaju odobrenih tvari $CC\beta$ je koncentracija pri kojoj se metodom mogu otkriti, sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$, koncentracije ispod dozvoljene granice;
- (16) „obogaćeni uzorak” znači uzorak obogaćen poznatom količinom analita koji se treba detektirati ili kvantificirati;
- (17) „međulaboratorijsko ispitivanje” znači organiziranje, provedba i ocjena testiranja istog uzorka ili istih uzoraka u dvama laboratorijima ili više njih prema unaprijed određenim uvjetima kako bi se procijenila učinkovitost testiranja, u obliku poredbenog ispitivanja ili ispitivanja sposobnosti;
- (18) „unutarnji standard (IS)” znači tvar koja nije sadržana u uzorku, a čija su fizikalno-kemijska svojstva što sličnija svojstvima analita koji se treba identificirati ili kvantificirati;
- (19) „razina značajnosti” znači koncentracija tvari ili analita u uzorku koja je značajna za određivanje njihove usklađenosti sa zakonodavstvom u pogledu sljedećeg:
- (a) najveće dopuštene količine rezidua ili najveće dopuštene količine za odobrene tvari u skladu s Uredbom Komisije (EZ) br. 124/2009 ⁽⁸⁾ i Uredbom Komisije (EU) br. 37/2010 ⁽⁹⁾;

⁽⁸⁾ Uredba Komisije (EZ) br. 124/2009 od 10. veljače 2009. o određivanju najviših dopuštenih količina kokcidiostatika ili histomonostatika u hrani koji su posljedica neizbježnog prenošenja tih tvari u neciljnu hranu za životinje (SL L 40, 11.2.2009., str. 7.).

⁽⁹⁾ Uredba Komisije (EU) br. 37/2010 od 22. prosinca 2009. o farmakološki djelatnim tvarima i njihovoj klasifikaciji u odnosu na najveće dopuštene količine rezidua u hrani životinjskog podrijetla (SL L 15, 20.1.2010., str. 1.).

▼B

- (b) referentnih vrijednosti za poduzimanje mjera za zabranjene ili neodobrene tvari za koje je utvrđena referentna vrijednost za poduzimanje mjera u skladu s Uredbom (EU) 2019/1871;
- (c) najniže koncentracije koju je analitički moguće dokazati za zabranjenu ili neodobrenu tvar za koju nije utvrđena referentna vrijednost za poduzimanje mjera;
- (20) „najniža kalibrirana razina” znači najniža koncentracija na koju je mjerni sustav kalibriran;
- (21) „matriks” znači materijal iz kojeg je uzet uzorak;
- (22) „učinak matriksa” znači razlika analitičkog odgovora između standarda otopljenog u otapalu i matriksa udruženog sa standardom bez korekcije upotrebom unutarnjeg standarda ili uz korekciju upotrebom unutarnjeg standarda;
- (23) „matriks udružen sa standardom” znači slijepi matriks (tj. bez analita) na koji se dodaje analit pri rasponu koncentracija nakon obrade uzorka;
- (24) „matriks obogaćen standardom” znači slijepi matriks (tj. bez analita) koji se prije ekstrakcije otapalom i obrade uzorka obogaćuje analitom u nizu koncentracija;
- (25) „mjerena veličina” znači određena količina koja podliježe mjerenju;
- (26) „mjerna nesigurnost” znači nenegativni parametar povezan s rezultatom mjerenja koji označava disperziju vrijednosti koje bi se opravdano mogle pripisati mjerenoj veličini na temelju korištenih podataka;
- (27) „kriteriji učinkovitosti” znači zahtjevi u pogledu učinkovitosti prema kojima se može ocijeniti da je analitička metoda primjerena namjeni i da daje pouzdane rezultate;
- (28) „preciznost” znači stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod propisanim uvjetima te se izražava kao standardna devijacija ili koeficijent varijacije rezultata ispitivanja;
- (29) „kvalitativna metoda” znači analitička metoda kojom se tvar ili skupina tvari detektira ili identificira na temelju njihovih kemijskih, bioloških ili fizikalnih svojstava;
- (30) „kvantitativna metoda” znači analitička metoda kojom se određuje količina ili maseni udio tvari tako da se može iskazati kao brojčana vrijednost u odgovarajućim jedinicama;
- (31) „iskorištenje” znači količina analita korigirana iskorištenjem i podijeljena obogaćenom količinom analita u uzorku matriksa, izražena kao postotak;
- (32) „korekcija iskorištenja” znači upotreba unutarnjih standarda, upotreba kalibracijske krivulje matriksa kao i upotreba faktora korekcije iskorištenja te kombinacija tih pristupa;

▼B

- (33) „referentni materijal” znači materijal koji je dovoljno homogen i stabilan u pogledu jednog ili više određenih svojstava, za koji je utvrđeno da je primjeren namjeni u postupku mjerenja ili u ispitivanju nominalnih svojstava ⁽¹⁰⁾;
- (34) „relativni učinak matriksa” znači razlika analitičkog odgovora između standarda otopljenog u otapalu i matriksa udruženog sa standardom uz korekciju upotrebom unutarnjeg standarda;
- (35) „ponovljivost” znači preciznost u uvjetima u kojima isti analitičar koristeći se istom opremom u istom laboratoriju dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim jedinicama u kratkim vremenskim intervalima;
- (36) „obnovljivost” znači preciznost u uvjetima u kojima različiti analitičari koristeći se različitom opremom u različitim laboratorijima dobiju rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim jedinicama ⁽¹¹⁾;
- (37) „robusnost” znači osjetljivost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz određene manje izmjene;
- (38) „orijentacijska metoda” znači metoda koja se primjenjuje za orijentaciju neke tvari ili vrste tvari na razini značajnosti;
- (39) „orijentacijska ciljna koncentracija” (STC) znači koncentracija niža od ili jednaka vrijednosti CC β pri kojoj se uzorak orijentacijskim mjerenjem kategorizira kao potencijalno neusklađen („orijentacijski pozitivan”) i traži se potvrdno ispitivanje;
- (40) „selektivnost” znači sposobnost metode da razlikuje analit koji se mjeri od drugih tvari;
- (41) „ispitivanje unutar jednog laboratorija” ili „unutarnja validacija” znači analitičko ispitivanje u kojem jedan laboratorij u različitim uvjetima i u opravdano dugim vremenskim intervalima primjenjuje jednu metodu za analiziranje istih ili različitih materijala za testiranje;
- (42) „standardno dodavanje” znači postupak pri kojem se jedan dio uzorka analizira kao takav, a drugom se prije analize dodaje poznata količina standardnog analita;
- (43) „standardni analit” znači analit poznatog i potvrđenog sadržaja i čistoće koji se koristi kao referentni materijal u analizi;
- (44) „tvar” znači tvar stalnog sastava koju karakteriziraju dijelovi od kojih je sastavljena i određena fizikalna svojstva;
- (45) „poduzorak za analizu” znači količina materijala uzetog iz uzorka na kojemu se izvodi ispitivanje ili koji se promatra;

⁽¹⁰⁾ Komisija za Codex Alimentarius, Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda/Svjetska zdravstvena organizacija, *Guidelines on analytical terminology* (Smjernice za analitičku terminologiju) (CAC/GL 72-2009).

⁽¹¹⁾ ISO 5725-1:1994 Točnost (istinitost i preciznost) mjernih metoda i rezultata – 1. dio: Opća načela i definicije (poglavlje 3.).

▼B

- (46) „istinitost” znači stupanj podudarnosti između srednje vrijednosti dobivene iz velikog niza rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti;
- (47) „jedinice” znači jedinice opisane u normi ISO 80000 ⁽¹²⁾ i Direktivi Vijeća 80/181/EEZ ⁽¹³⁾;
- (48) „validacija” znači pokazivanje, s pomoću ispitivanja i pribavljanja stvarnih dokaza, da su ispunjeni posebni zahtjevi u pogledu specifične predviđene primjene ⁽¹⁴⁾ putem ispitivanja unutar jednog laboratorija ili poredbenog ispitivanja;
- (49) „unutarlaboratorijska obnovljivost” ili „srednja preciznost/unutarnja obnovljivost” znači preciznost mjerenja pod skupom unutarlaboratorijskih uvjeta u određenom laboratoriju.

*Članak 3.***Metode analize**

Države članice osiguravaju da se uzorci uzeti u skladu s člankom 34. Uredbe (EU) 2017/625 analiziraju korištenjem metoda koje ispunjavaju sljedeće zahtjeve:

- (1) dokumentirane su u uputama za testiranje, po mogućnosti u skladu s priložima normi ISO 78-2:1999 Kemija – Standardni postupci – 2. dio: Metode kemijske analize ⁽¹⁵⁾;
- (2) u skladu su s kriterijima učinkovitosti i drugim zahtjevima za analitičke metode utvrđenima u poglavlju 1. Priloga I. ovoj Uredbi;
- (3) validirane su u skladu sa zahtjevima utvrđenima u poglavljima 2. i 4. Priloga I. ovoj Uredbi;
- (4) omogućavaju izvršenje referentnih vrijednosti za poduzimanje mjera utvrđenih u Uredbi (EU) 2019/1871, utvrđivanje prisutnosti zabranjenih i neodobrenih tvari te izvršenje najvećih dopuštenih količina, koje su utvrđene na temelju Uredbe (EEZ) br. 315/93 i Uredbe (EZ) br. 124/2009, kao i najvećih dopuštenih količina rezidua, koje su utvrđene na temelju uredbi (EZ) br. 1831/2003 i (EZ) br. 470/2009.

*Članak 4.***Kontrola kvalitete**

Države članice osiguravaju kvalitetu rezultata analiza provedenih u skladu s Uredbom (EU) 2017/625, posebno praćenjem ispitivanja ili rezultata kalibracije u skladu s normom ISO/IEC 17025:2017 Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija i sa zahtjevima za kontrolu kvalitete tijekom rutinske analize kako su utvrđeni u poglavlju 3. Priloga I. ovoj Uredbi.

⁽¹²⁾ ISO 80000-1:2009 Veličine i jedinice – 1. dio: Općenito (Uvod).

⁽¹³⁾ Direktiva Vijeća 80/181/EEZ od 20. prosinca 1979. o usklađivanju zakonodavstva država članica u odnosu na mjerne jedinice i o stavljanju izvan snage Direktive 71/354/EEZ (SL L 39, 15.2.1980., str. 40.).

⁽¹⁴⁾ ISO/IEC 17025:2017 Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija (poglavlje 3.).

⁽¹⁵⁾ ISO 78-2: 1999 Kemija – Standardni postupci – 2. dio: Metode kemijske analize (prilozi).

▼B*Članak 5.***Tumačenje rezultata**

- (1) Rezultat analize smatra se neusklađenim kada je jednak ili veći od granice odlučivanja za potvrdu (CC α).
- (2) Za odobrene tvari za koje je utvrđena najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina granica odlučivanja za potvrdu (CC α) je koncentracija pri kojoj i iznad koje se sa statističkom sigurnošću brojčane vrijednosti $1 - \alpha$ može odlučiti da je dozvoljena granica premašena.
- (3) Za neodobrene ili zabranjene tvari ili za odobrene tvari za koje nije utvrđena najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina u određenoj vrsti ili proizvodu granica odlučivanja za potvrdu (CC α) je najniža razina koncentracije pri kojoj se sa statističkom sigurnošću brojčane vrijednosti $1 - \alpha$ može odlučiti da je određeni analit prisutan.
- (4) Za neodobrene ili zabranjene farmakološki djelatne tvari α -pogreška jednaka je ili manja od 1 %. Za sve ostale tvari α -pogreška jednaka je ili manja od 5 %.

*Članak 6.***Metode uzorkovanja**

Države članice osiguravaju da se uzorci uzimaju i označavaju te da se njima rukuje u skladu s detaljnim metodama uzorkovanja utvrđenima u Prilogu II. ovoj Uredbi.

▼M1*Članak 7.***Stavljanja izvan snage i prijelazne mjere**

Odluke 2002/657/EZ i 98/179/EZ stavlja se izvan snage od datuma stupanja na snagu ove Uredbe.

Međutim, zahtjevi utvrđeni u točkama 2. i 3. Priloga I. Odluci 2002/657/EZ nastavljaju se primjenjivati na metode koje su validirane prije datuma stupanja na snagu ove Uredbe do 10. lipnja 2026.

Za potrebe iz članka 8. drugog stavka Uredbe (EU) 2019/1871, Prilog II. Odluci 2002/657/EZ nastavlja se primjenjivati do 27. studenoga 2022.

▼B*Članak 8.***Stupanje na snagu**

Ova Uredba stupa na snagu dvadesetog dana od dana objave u *Službenom listu Europske unije*.

Ova je Uredba u cijelosti obvezujuća i izravno se primjenjuje u svim državama članicama.

*PRILOG I.*

POGLAVLJE 1.

KRITERIJI UČINKOVITOSTI I DRUGI ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE METODE**1.1 Zahtjevi za orijentacijske metode****1.1.1 Kategorije prikladnih orijentacijskih metoda**

Kao prikladne orijentacijske metode primjenjuju se kvalitativne, polukvantitativne ili kvantitativne metode.

1.1.2 Zahtjevi za biološke, biokemijske ili fizikalno-kemijske orijentacijske metode

Za zabranjene ili neodobrene tvari CC β mora biti na najnižoj razumno ostvarivoj razini, a u svakom slučaju niži od referentne vrijednosti za poduzimanje mjera za tvari za koje su referentne vrijednosti za poduzimanje mjera utvrđene Uredbom (EU) 2019/1871.

Za odobrene farmakološki djelatne tvari CC β mora biti niži od najveće dopuštene količine rezidua ili najveće dopuštene količine.

U svrhu orijentacije primjenjuju se samo one analitičke metode za koje se na dokumentirani sljedeći način može pokazati da su validirane i da je njihov postotak lažno usklađenih rezultata manji od ili jednak 5 % (β -pogreška). U slučaju sumnje na neusklađeni rezultat taj se rezultat mora potvrditi potvrdnom metodom.

Kvantitativne orijentacijske metode, koje se upotrebljavaju i za orijentaciju i potvrdu, moraju ispunjavati iste zahtjeve u vezi s točnošću, rasponom i preciznošću opisane u točkama 1.2.2.1 i 1.2.2.2.

1.2 Zahtjevi za potvrdne metode**1.2.1 Opći zahtjevi za potvrdne metode**

Za zabranjene ili neodobrene tvari CC α mora biti na najnižoj razumno ostvarivoj razini. Za zabranjene ili neodobrene tvari za koje je utvrđena referentna vrijednost za poduzimanje mjera na temelju Uredbe (EU) 2019/1871 CC α mora biti manji od referentne vrijednosti za poduzimanje mjera ili jednak toj vrijednosti.

Za odobrene tvari CC α mora biti viši od najveće dopuštene količine rezidua ili najveće dopuštene količine, ali što je bliže moguće tim vrijednostima.

U svrhu potvrđivanja primjenjuju se samo one analitičke metode za koje se na dokumentirani sljedeći način može pokazati da su validirane i da je njihov postotak lažno neusklađenih rezultata (α -pogreška) manji od ili jednak 1 % za zabranjene ili neodobrene tvari odnosno manji od ili jednak 5 % za odobrene tvari.

Potvrdnim metodama dobivaju se informacije o strukturnom kemijskom sastavu analita. Dakle, potvrdne metode koje se temelje isključivo na kromatografskoj analizi bez primjene detekcije masenom spektrometrijom same po sebi nisu prikladne za primjenu kao potvrdne metode za zabranjene ili neodobrene farmakološki djelatne tvari. Ako masena spektrometrija nije prikladna za odobrene tvari, mogu se upotrijebiti druge metode kao što su HPLC-DAD i HPLC-FLD ili njihova kombinacija.

▼B

Kada je to potrebno prema potvrđnoj metodi, prikladan unutarnji standard dodaje se poduzorku za analizu na početku postupka ekstrakcije. Ovisno o raspoloživosti, koriste se stabilni oblici analita obilježeni izotopom, koji su posebno prikladni za detekciju masenom spektrometrijom, ili analogni spojevi koji su po svojoj strukturi vrlo slični analitu. Ako se ne može upotrijebiti odgovarajući unutarnji standard, poželjno je da se identifikacija analita potvrdi ko-kromatografijom⁽¹⁾. U tom slučaju dobiva se samo jedan pik (vrh), pri čemu je povećana visina (ili područje) pika jednaka količini dodanog analita. Ako to nije izvedivo, upotrebljava se matriks udružen sa standardom ili matriks obogaćen standardom.

1.2.2 *Opći kriteriji učinkovitosti za potvrđne metode*

1.2.2.1 Istitinitost ocijenjena iskorištenjem

Za ponovljene analize potvrđene referentne tvari odstupanje prosječnog masenog udjela koji je eksperimentalno određen i korigiran iskorištenjem od potvrđene vrijednosti mora biti u skladu s minimalnim rasponima istinitosti navedenima u tablici 1.

Tablica 1.

Minimalna istinitost kvantitativnih metoda

Maseni udio	Raspon
≤ 1 µg/kg	od – 50 % do +20 %
> 1 µg/kg do 10 µg/kg	od – 30 % do +20 %
≥ 10 µg/kg	od – 20 % do +20 %

Ako nema potvrđenih referentnih tvari, istinitost mjerenja može se ocijeniti na druge načine, na primjer korištenjem tvari s dodijeljenim vrijednostima iz međulaboratorijskih ispitivanja ili dodavanjem poznatih količina analita na slijepi matriks.

1.2.2.2 Preciznost

Koeficijent varijacije (CV) za ponovljene analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uvjetima unutarlaboratorijske obnovljivosti, ne smije biti veći od razine izračunate Horwitzovom jednadžbom. Jednadžba glasi:

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

gdje je C maseni udio izražen kao potencija (eksponent) s bazom 10 (npr. 1 mg/g = 10⁻³). Za masene udjele manje od 120 µg/kg primjenom Horwitzove jednadžbe dobivaju se neprihvatljivo visoke vrijednosti. Stoga najveći dozvoljeni koeficijent varijacije ne smije biti veći od vrijednosti prikazanih u tablici 2.

⁽¹⁾ Ko-kromatografija je postupak u kojem se ekstrakt uzorka prije koraka kromatografije dijeli na dva dijela. Jedan se dio podvrgava kromatografiji kao takav. Drugi se dio miješa sa standardnim analitom koji se ispituje. Potom se ta mješavina isto podvrgava kromatografiji. Količina dodanog standardnog analita mora biti slična procijenjenoj količini analita u ekstraktu. Ko-kromatografija se koristi za poboljšanje identifikacije analita pri upotrebi kromatografskih metoda, posebno kad se ne može koristiti odgovarajući unutarnji standard.



Tablica 2.

Prihvatljivi koeficijent varijacije

Maseni udio	CV obnovljivosti (%)
> 1 000 µg/kg	16 (prilagođeno na temelju Horwitzove jednadžbe)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (prilagođeno na temelju Horwitzove jednadžbe)
10–120 µg/kg	25 (*)
< 10 µg/kg	30 (*)

(*) * Prikazani CV (%) služi kao smjernica i treba biti na najnižoj razumno ostvarivoj razini.

Za analize koje se izvode u uvjetima ponovljivosti koeficijent varijacije u uvjetima ponovljivosti mora biti jednak ili manji od dvije trećine vrijednosti navedenih u tablici 2.

1.2.3 *Zahtjevi za kromatografsku separaciju*

Za tekućinsku (LC) ili plinsku kromatografiju (GC) najmanje prihvatljivo vrijeme zadržavanja analita koji se ispituju mora biti jednako dvostrukom vremenu zadržavanja koje vrijedi za prazni volumen kolone. Vrijeme zadržavanja analita u ekstraktu mora odgovarati vremenu zadržavanja kalibracijskog standarda, matriksa udruženog sa standardom ili matriksa obogaćenog standardom uz odstupanje od $\pm 0,1$ minute. Za brzu kromatografiju, gdje je vrijeme zadržavanja manje od dvije minute, prihvatljivo je odstupanje manje od 5 % vremena zadržavanja. Ako se upotrebljava unutarnji standard, omjer između kromatografskog vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutarnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora odgovarati vremenu zadržavanja kalibracijskog standarda, matriksa udruženog sa standardom ili matriksa obogaćenog standardom uz najveće odstupanje od 0,5 % za plinsku kromatografiju i 1 % za tekućinsku kromatografiju za metode validirane od datuma stupanja na snagu ove Uredbe.

1.2.4 *Posebni kriteriji učinkovitosti za masenu spektrometriju*

1.2.4.1 Detekcija masenom spektrometrijom

Detekcija masenom spektrometrijom izvodi se upotrebom nekih od sljedećih mogućnosti:

1. snimanje cjelokupnih (engl. full scan, FS) masenih spektara;
2. praćenje odabranih iona (engl. selected ion monitoring, SIM);
3. tehnike sekvencijalne masene spektrometrije (MS^n) kao što je praćenje odabranih reakcija (engl. selected reaction monitoring (SRM));
4. kombinacija tehnika masene spektrometrije (MS) ili sekvencijalne masene spektrometrije (MS^n) s odgovarajućim načinima ionizacije.

Primjerene su i masena spektrometrija niske razlučivosti (engl. low resolution mass spectrometry, LRMS, pri jediničnoj masenoj razlučivosti) i masena spektrometrija visoke razlučivosti (engl. high resolution mass spectrometry, HRMS), uključujući npr. dvostruko fokusirajuće instrumente, instrumente koji mjere vrijeme putovanja (engl. time of flight, TOF) i instrumente Orbitrap.

▼B

Za potvrđivanje identiteta analita u masenoj spektrometriji visoke razlučivosti (HRMS) masena devijacija svih dijagnostičkih iona mora biti ispod 5 ppm (ili u slučaju $m/z < 200$ ispod 1 mDa). Na temelju toga mora se odabrati učinkovita razlučivost primjerena svrsi, koja općenito mora biti veća od 10 000 za cijeli raspon mase s ulegnućem od 10 % ili 20 000 na punoj širini na polovini maksimuma (engl. full width at half maximum, FWHM).

Kada se određivanje masenom spektrometrijom provodi snimanjem cjelokupnih spektara (i LRMS i HRMS), primjereni su samo dijagnostički ioni s relativnim intenzitetom većim od 10 % u referentnom spektru kalibracijskog standarda, matriksa udruženog sa standardom ili matriksa obogaćenog standardom. Dijagnostički ioni uključuju molekularni ion (ako je prisutan pri ≥ 10 % intenziteta baznog pika) i karakteristične ione fragmenata ili produkata.

Odabir iona prekursora: kada se određivanje masenom spektrometrijom provodi fragmentacijom nakon odabira iona prekursora, odabir iona prekursora obavlja se pri jediničnoj masenoj razlučivosti ili boljoj. Odabrani ion prekursora čine molekularni ion, karakteristični adukti molekularnog iona, karakteristični ioni produkata ili jedan od njihovih izotopnih iona. Ako odabir prekursora ima interval odabira mase veći od jednog daltona (npr. u slučaju akvizicije koja nije ovisna o podacima), tehnika se smatra potvrđnom analizom snimanjem cjelokupnih spektara.

Ioni fragmenata i produkata: Odabrani ioni fragmenata ili produkata su dijagnostički fragment za analit/produkt koji se mjeri. Neselektivni prijelazi (npr. tropilijev kation ili gubitak vode) trebaju se izostaviti kad god je to moguće. Brojnost dijagnostičkih iona određuje se na temelju područja pikova ili visine integriranih kromatograma ekstrahiranih iona. To se primjenjuje i kada se mjerenja snimanjem cjelokupnih spektara koriste za identifikaciju. Omjer signal-šum (S/N) svih dijagnostičkih iona mora biti jednak ili veći od tri naprama jedan (3: 1).

Relativni intenziteti: relativni intenziteti dijagnostičkih iona (omjer iona) izražavaju se kao postotak intenziteta najbrojnijeg iona ili prijelaza. Omjer iona mora se odrediti uspoređivanjem spektara ili integriranjem signala masenih tragova ekstrahiranih iona. Omjer iona analita koji se potvrđuje mora odgovarati omjeru iona matriksa udruženih sa standardom, matriksa obogaćenih standardom ili standardnih otopina na usporedivim koncentracijama, mjerenom pod istim uvjetima, uz relativno odstupanje od ± 40 %.

Za sve masene spektrometrijske analize mora se odrediti najmanje jedan omjer iona. Poželjno je da su to ioni dobiveni jednim snimanjem, ali mogu potjecati i od različitih snimanja u istoj injekciji (tj. snimanje cjelokupnih spektara i snimanje masenih fragmenata).

1.2.4.2 Identifikacija

Sustav identifikacijskih točaka upotrebljava se za odabir odgovarajućih načina akvizicije i kriterija ocjenjivanja. Za potvrdu identiteta tvari u matriksu za koje je utvrđena najveća dopuštena količina rezidua (odobrena upotreba) potrebne su najmanje četiri identifikacijske točke. Za neodobrene ili zabranjene tvari potrebno je pet identifikacijskih točaka. Jedna točka može potjecati iz kromatografske separacije. U tablici 3. prikazan je broj identifikacijskih točaka koje se mogu dobiti pojedinom tehnikom. Da bi se mogle dobiti identifikacijske točke potrebne za potvrdu, mogu se dodati identifikacijske točke dobivene različitim tehnikama.

▼B

1. Sve masene spektrometrijske analize moraju se kombinirati s tehnikom separacije koja pokazuje dovoljnu snagu separacije i selektivnost za određenu primjenu. Odgovarajuće su tehnike separacije, među ostalim, tekućinska kromatografija (LC), plinska kromatografija (GC), kapilarna elektroforeza (CE) i superkrična tekućinska kromatografija (SFC). U slučaju analita u kojem je prisutan bilo koji izobarni ili izomerni spoj, prihvatljivost vremena zadržavanja (tj. $\pm 0,5$ % u plinskoj kromatografiji te ± 1 % u tekućinskoj kromatografiji i superkričnoj tekućinskoj kromatografiji) obavezna je za potvrdu njegova identiteta.
2. Mogu se kombinirati najviše tri posebne tehnike kako bi se postigao minimalni broj identifikacijskih točaka.
3. Različiti načini ionizacije (npr. elektronska ionizacija i kemijska ionizacija) smatraju se različitim tehnikama.

Tablica 3.

Identifikacijske točke po tehnikama

Tehnika	Identifikacijske točke
Separacija (način GC, LC, SFC, CE)	1
LR-MS ion	1
Odabir iona prekursora pri masenom rasponu od $< \pm 0,5$ Da	1 (neizravni)
LR-MS ⁿ ion produkta	1,5
HR-MS ion	1,5
HR-MS ⁿ ion produkta	2,5

Tablica 4.

Primjeri broja identifikacijskih točaka za posebne tehnike i kombinacije tehnika (n = cijeli broj)

Tehnika	Separacija	Broj iona	Identifikacijske točke
GC-MS (EI ili CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI i CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI ili CI) 2 derivata	GC	2 (derivat A) + 2 (derivat B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- ili LC-MS/MS	GC ili LC	1 prekursor + 2 produkta	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- ili LC-MS/MS	GC ili LC	2 prekursora + 2 produkta	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- ili LC-MS ³	GC ili LC	1 prekursor + 1 MS ² produkt + 1 MS ³ produkt	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- ili LC-HRMS	GC ili LC	n	1 + n × 1,5
GC- ili LC-HRMS/MS	GC ili LC	1 prekursor (maseni raspon $< \pm 0,5$ Da) + 1 produkt	1 + 1 + 2,5 = 4,5

▼B

Tehnika	Separacija	Broj iona	Identifikacijske točke
GC- ili LC-HRMS i HRMS/MS	GC ili LC	1 ion detektiran snimanjem cjelokupnih spektara + 1 HRMS ion produkta ^(a)	1 + 1,5 + 2,5 = 5
GC- i LC-MS	GC i LC	2 iona (GCMS) + 1 ion (LCMS)	1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6

^(a) Ne uzima se dodatna identifikacijska točka za odabir iona prekursora ako je taj ion prekursora isti ion (ili adukt ili izotop) kao HRMS ion praćen snimanjem cjelokupnog spektra.

1.2.5 Posebni kriteriji učinkovitosti za određivanje analita upotrebom tekućinske kromatografije i tehnike detekcije koja nije masena spektrometrija

Kao alternativa metodama koje se temelje na masenoj spektrometriji i samo za odobrene tvari mogu se upotrijebiti sljedeće tehnike, pod uvjetom da su ispunjeni odgovarajući kriteriji za te tehnike:

1. spektrofotometrija detekcijom s diodnim nizom (engl. diode array detection, DAD) uz snimanje cjelokupnog spektra u slučaju upotrebe s HPLC-om;
2. spektrofotometrija fluorescencijskom detekcijom (engl. fluorescence detection spectrophotometry, FLD) u slučaju upotrebe s HPLC-om.

Tekućinska kromatografija uz UV/VIS detekciju (jedna valna dužina) ne može se sama po sebi koristiti kao potvrdna metoda.

1.2.5.1 Kriteriji učinkovitosti za spektrofotometriju s diodnim nizom uz snimanje cjelokupnog spektra

Moraju se ispuniti kriteriji učinkovitosti za kromatografsku separaciju iz poglavlja 1.2.3.

Maksimumi apsorpcije u UV spektru analita moraju biti na istim valnim dužinama kao i oni kalibracijskog standarda u matriksu, uz maksimalnu toleranciju koja ovisi o razlučivosti sustava detekcije. Za detekciju s diodnim nizom maksimalna tolerancija obično je unutar ± 2 nm. Za one dijelove dvaju spektara čija je relativna apsorpcija veća od ili jednaka 10 % spektar analita iznad 220 nm ne smije se vidljivo razlikovati od spektra kalibracijskog standarda. Taj je kriterij zadovoljen kada su, prvo, prisutni isti maksimumi i, drugo, kada razlika između dva spektra ni u jednoj točki nije veća od 10 % od apsorpcije kalibracijskog standarda. U slučaju računalnog pretraživanja baza podataka i uspoređivanja, usporedba podataka o spektru u službenim uzorcima s onima kalibracijske otopine mora biti veća od kritičnog faktora podudarnosti. Taj se faktor određuje tijekom postupka validacije za svaki analit na temelju spektara za koje su ispunjeni prethodno opisani uvjeti. Mora se provjeriti varijabilnost spektara uzrokovana matriksom uzorka i funkcioniranjem detektora.

1.2.5.2 Kriteriji učinkovitosti za spektrofotometriju fluorescencijskom detekcijom

Moraju se ispuniti kriteriji učinkovitosti za kromatografsku separaciju iz poglavlja 1.2.3.

Valne dužine podražaja i emisije, u kombinaciji s kromatografskim uvjetima, moraju se odabrati tako da se učinci interferencijskih komponenata u ekstraktima slijepog uzorka svedu na najmanju mjeru. Između valne dužine podražaja i emisije treba biti najmanje 50 nanometara.

▼B

Najbliži maksimum pika u kromatogramu mora biti odvojen od utvrđenog pika analita za najmanje jednu punu širinu pika izmjerenu na 10 % od maksimalne visine pika analita.

To se odnosi na molekule koje pokazuju prirodnu fluorescenciju i molekule koje pokazuju fluorescenciju nakon transformacije ili derivatizacije.

POGLAVLJE 2.

VALIDACIJA

2.1 Značajke učinkovitosti koje se trebaju odrediti za analitičke metode

Validacijom metode pokazuje se da analitička metoda ispunjava kriterije koji se odnose na odgovarajuće značajke učinkovitosti. Različiti ciljevi kontrole zahtijevaju različite kategorije metoda. U tablici 5. prikazano je koje se značajke učinkovitosti provjeravaju za koju vrstu metode, a daljnje objašnjenje svakog parametra nalazi se u ovom poglavlju.

Tablica 5.

Klasifikacija analitičkih metoda prema značajkama učinkovitosti koje se moraju odrediti

Metoda	Potvrda		Orijentacija		
	Kvalitativna	Kvantitativna	Kvalitativna	Polukvantitativna	Kvantitativna
Tvari	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identifikacija u skladu s točkom 1.2.	x	x			
CC α	x	x			
CC β	—		x	x	x
Istinitost		x			x
Preciznost		x		x.	x
Relativni učinak matriksa/apsolutno iskorištenje (*)		x			x
Selektivnost/specifičnost		x	x	x	x
Stabilnost (#)		x	x	x	x
Robusnost		x	x	x	x

x: potrebno je kako bi se validacijom dokazalo da su ispunjeni zahtjevi za značajku učinkovitosti.

x.: zahtjevi preciznosti iz poglavlja 1.2.2.2. ne moraju se ispuniti za polukvantitativne orijentacijske metode. Međutim, preciznost se određuje kako bi se dokazala prikladnost metode za izbjegavanje lažno usklađenih analitičkih rezultata.

A: zabranjene ili neodobrene tvari

B: odobrene tvari

(#) Ako su podaci o stabilnosti za analite u matriksu dostupni iz znanstvene literature ili iz drugog laboratorija, predmetni laboratorij ne mora ih ponovno utvrditi. Međutim, upućivanje na dostupne podatke o stabilnosti za analite u otopini prihvatljivo je samo ako se primjenjuju istovjetni uvjeti.

(*) Relevantno za metode masene spektrometrije kako bi se validacijom dokazalo da su ispunjeni zahtjevi za značajke učinkovitosti. Relativni učinak matriksa metode određuje se kada taj učinak nije ocijenjen tijekom postupka validacije. Apsolutno iskorištenje metode određuje se kada se ne upotrebljava unutarnji standard ni kalibracija matriksom obogaćenim standardom.

▼ B**2.2 Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost**

U ovom su poglavlju navedeni primjeri i naputci za postupke validacije. Mogu se primijeniti i drugi postupci kako bi se pokazalo da metoda ispunjava kriterije učinkovitosti, pod uvjetom da pružaju istu razinu i kvalitetu informacija.

2.2.1 Uobičajena validacija

Izračunavanje parametara u skladu s uobičajenim metodama zahtijeva izvođenje nekoliko pojedinačnih pokusa. Za svaku veću promjenu mora se odrediti svaka značajka učinkovitosti (vidjeti odjeljak 2.4.). Metodama za ispitivanje više analita moguće je istodobno analizirati nekoliko analita, pod uvjetom da su isključene interferencije koje bi mogle biti značajne. Na isti se način može odrediti nekoliko značajki učinkovitosti. Stoga, da bi se smanjila količina posla, preporučljivo je što više kombinirati pokuse (npr. ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost sa specifičnošću, analizu slijepih uzoraka kako bi se odredila granica odlučivanja za potvrdu i ispitivanje osjetljivosti).

2.2.1.1 Istinitost na temelju potvrđene referentne tvari

Poželjno je odrediti istinitost analitičke metode s pomoću potvrđene referentne tvari. Postupak za to opisan je u normi ISO 5725-4:1994 ⁽²⁾.

U nastavku je naveden primjer:

1. analizirajte šest replika potvrđene referentne tvari u skladu s uputama za testiranje koje vrijede za određenu metodu;
2. odredite koncentraciju analita koji je prisutan u svakom uzorku replika;
3. izračunajte srednju vrijednost, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) za tih šest replika;
4. izračunajte istinitost dijeljenjem detektirane srednje vrijednosti potvrđenom vrijednošću (mjerenom kao koncentracija) i pomnožite sa 100 kako biste rezultat izrazili u postotku.

Istinitost (%) = (srednja vrijednost detektirane koncentracije korigirana iskorištenjem) × 100/potvrđena vrijednost

2.2.1.2 Istinitost na temelju obogaćenih uzoraka

Ako nije dostupna potvrđena referentna tvar, istinitost metode određuje se pokusima uz upotrebu obogaćenog slijepog matriksa, u najmanjoj mjeri u skladu sa sljedećom shemom:

1. za metode validirane od datuma stupanja na snagu ove Uredbe odaberite slijepi uzorak i obogatite pri koncentraciji od:

⁽²⁾ ISO 5725-4:2020, Točnost (istinitost i preciznost) mjernih metoda i rezultata – 4. dio: Osnovne metode određivanja istinitosti standardne mjerne metode (klauzula 3.).

▼B

- (a) 0,5 ⁽³⁾, 1,0 i 1,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera; ili
 - (b) 0,1 ⁽⁴⁾, 1,0 i 1,5 puta najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina za odobrene tvari; ili
 - (c) 1,0, 2,0 i 3,0 puta najniža kalibrirana razina za neodobrene tvari (za koje nije utvrđena referentna vrijednost za poduzimanje mjera);
2. za svaku razinu koncentracije analiza se mora obaviti sa šest replika;
 3. analizirajte uzorke;
 4. izračunajte koncentraciju detektiranu u svakom uzorku;
 5. izračunajte istinitost za svaki uzorak s pomoću jednadžbe u nastavku, a zatim izračunajte srednju istinitost i koeficijent varijacije za šest rezultata pri svakoj razini koncentracije.

Istinitost (%) = (srednja vrijednost detektirane koncentracije korigirana iskorištenjem) × 100/razina obogaćenja

Za metode za odobrene tvari validirane prije datuma početka primjene ove Uredbe dostatno je određivanje istinitosti metode upotrebom šest obogaćenih alikvota pri 0,5, 1,0 i 1,5 puta najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina.

2.2.1.3 Ponovljivost

1. Za metode validirane od datuma stupanja na snagu ove Uredbe mora se pripremiti skup uzoraka istovjetnih slijepih matriksa iste vrste. Oni se moraju obogatiti analitom tako da se dobiju koncentracije jednake:
 - (a) 0,5 ⁽⁵⁾, 1,0 i 1,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera; ili
 - (b) 0,1 ⁽⁶⁾, 1,0 i 1,5 puta najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina za odobrene tvari; ili
 - (c) 1,0, 2,0 i 3,0 puta najniža kalibrirana razina za neodobrene ili zabranjene tvari u slučaju da referentna vrijednost za poduzimanje mjera nije primjenjiva.
2. Za svaku razinu koncentracije analiza se mora obaviti s najmanje šest replika.
3. Analizirajte uzorke.
4. Izračunajte koncentraciju detektiranu u svakom uzorku.
5. Izračunajte srednju koncentraciju, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) obogaćenih uzoraka.
6. Ponovite ove korake još najmanje dvaput.
7. Izračunajte ukupne srednje koncentracije, standardne devijacije (tako da izračunate prosjek standardne devijacije kao kvadrata pojedinačnih izvođenja i zatim izračunate kvadratni korijen te vrijednosti) i koeficijente varijacije za obogaćene uzorke.

⁽³⁾ Kada se za neodobrenu farmakološki djelatnu tvar ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera, koncentracija koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,5 i 1,0 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera.

⁽⁴⁾ Kada se za određenu farmakološki djelatnu tvar ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,1 puta najveća dopuštena količina rezidua, koncentracija od 0,1 puta najveća dopuštena količina rezidua može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,1 i 0,5 puta najveća dopuštena količina rezidua.

⁽⁵⁾ Kada se za neodobrenu farmakološki djelatnu tvar ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera, koncentracija koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,5 i 1,0 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera.

⁽⁶⁾ Kada se za određenu farmakološki djelatnu tvar ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,1 puta najveća dopuštena količina rezidua, koncentracija koja iznosi 0,1 puta najveća dopuštena količina rezidua može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,1 i 0,5 puta najveća dopuštena količina rezidua.

▼ B

Za metode za odobrene tvari validirane prije datuma stupanja na snagu ove Uredbe dostatno je određivanje ponovljivosti uz obogaćene matrikse s koncentracijama u iznosu od 0,5, 1,0 i 1,5 puta najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina.

Druga je mogućnost da se ponovljivost izračuna u skladu s normom ISO 5725-2:2019 ⁽⁷⁾.

2.2.1.4 Unutarlaboratorijska obnovljivost

1. Za validacije koje se provode nakon datuma stupanja na snagu ove Uredbe pripremite skup uzoraka određenog ispitnog materijala (identičnih ili različitih matriksa), kojima je dodan jedan ili više analita tako da se dobiju koncentracije koje iznose:

- (a) 0,5⁽⁵⁾, 1,0 i 1,5 puta referentna vrijednost za poduzimanje mjera; ili
- (b) 0,1⁽⁶⁾, 1,0 i 1,5 puta najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina za odobrene tvari; ili
- (c) 1,0, 2,0 i 3,0 puta najniža kalibrirana razina za neodobrene ili zabranjene tvari u slučaju da referentna vrijednost za poduzimanje mjera nije primjenjiva.

2. Izvršite analizu za svaku razinu koncentracije s najmanje šest replika slijepog uzorka.

3. Analizirajte uzorke.

4. Izračunajte koncentraciju detektiranu u svakom uzorku.

5. Ponovite ove korake još najmanje dvaput, s različitim serijama slijepog uzorka, različitim analitičarima i u što više različitih uvjeta okoliša, npr. različite serije reagensa, otapala, različite sobne temperature, različiti instrumenti ili varijacija drugih parametara.

6. Odredite srednju koncentraciju, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) obogaćenih uzoraka.

Za metode za odobrene tvari validirane prije datuma stupanja na snagu ove Uredbe dostatno je određivanje unutarlaboratorijske obnovljivosti uz obogaćene matrikse s koncentracijama od 0,5, 1,0 i 1,5 puta najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina.

Druga je mogućnost da se i izračun unutarlaboratorijske obnovljivosti/srednje preciznosti obavi u skladu s normama ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 ⁽⁸⁾, Codex CAC/GL 59-2006 ⁽⁹⁾.

2.2.2 Validacija prema alternativnim modelima

Za izračunavanje parametara u skladu s alternativnim modelima potrebno je izvođenje plana testiranja. Plan testiranja mora biti napravljen tako da se u njemu uzme u obzir broj različitih vrsta i različitih čimbenika koji se ispituju. Stoga se kao prvi korak u cijelom postupku validacije razmatraju populacijski uzorci koji će se u budućnosti analizirati u laboratoriju kako bi se odredili najvažnije vrste i čimbenici koji

⁽⁷⁾ ISO 5725-2:2019 Točnost (istinitost i preciznost) mjernih metoda i rezultata – 2. dio: Osnovna metoda određivanja ponovljivosti i obnovljivosti standardne mjerne metode (klauzula 3.).

⁽⁸⁾ ISO 11843-1:1997 Mogućnost dokazivanja – 1. dio: Nazivi i definicije.

⁽⁹⁾ Komisija za Codex alimentarius, Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda/Svjetska zdravstvena organizacija, *Guidelines on estimation of uncertainty of results* (Smjernice za procjenu nesigurnosti rezultata) (CAC/GL 59-2006).

▼B

bi mogli utjecati na mjerne rezultate. Faktorski pristup omogućuje ocjenjivanje mjerne nesigurnosti rezultata ispitivanja, dobivenih u različitim uvjetima ispitivanja u određenom laboratoriju, kao što su različiti analitičari, različiti instrumenti, različite serije reagensa, različiti matriksi, različita protekla vremena ispitivanja i različite temperature ispitivanja. Nakon toga treba odabrati raspon koncentracije koji je prilagođen svrsi u skladu s najvećom dopuštenom količinom rezidua ili najvećom dopuštenom količinom za odobrene tvari ili s referentnom vrijednošću za poduzimanje mjera ili najnižom kalibriranom razinom za zabranjene ili neodobrene tvari.

Faktorskim pristupom nastoje se dobiti pouzdani podaci o preciznosti i mjerni podaci istovremenom kontroliranom varijacijom odabranih faktora. On omogućuje procjenu kombiniranog utjecaja faktorskih učinaka i nasumičnih učinaka. Plan testiranja ujedno omogućuje ispitivanje robusnosti⁽¹⁰⁾ analitičke metode i određivanje standardne devijacije unutarnje obnovljivosti među matriksima.

U daljnjem tekstu navodi se primjer alternativne metode korištenjem ortogonalnog plana testiranja.

Može se ispitati do sedam čimbenika (čimbenici šuma). Ispitivanje je osmišljeno tako da se primjenom plana testiranja istodobno mogu odrediti preciznost, istinitost (na temelju obogaćenih uzoraka), osjetljivost, mjerna nesigurnost i kritične koncentracije.

Tablica 6.

Primjer ortogonalnog plana testiranja sa sedam čimbenika (I–VII) promijenjenih na dvije razine (A/B) u validacijskoj studiji s osam procesa analize (kombinacija razine čimbenika)

Čimbenik	I	II	III	IV	V	VI	VII
Proces analize 01	A	A	A	A	A	A	A
Proces analize 02	A	A	B	A	B	B	B
Proces analize 03	A	B	A	B	A	B	B
Proces analize 04	A	B	B	B	B	A	A
Proces analize 05	B	A	A	B	B	A	B
Proces analize 06	B	A	B	B	A	B	A
Proces analize 07	B	B	A	A	B	B	A
Proces analize 08	B	B	B	A	A	A	B

Izračun značajki metode obavlja se kako opisuju Jülicher i dr.⁽¹¹⁾

⁽¹⁰⁾ Promjene uvjeta ispitivanja koje se ondje navode mogu uključivati uzorke, analite, uvjete pohrane, uvjete okoliša i/ili uvjete pripreme uzoraka. Za sve uvjete ispitivanja koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH, temperatura) mora se ukazati na sve varijacije koje bi mogle utjecati na rezultat analize.

⁽¹¹⁾ Jülicher, B., Gowik, P. i Uhlig, S. (1998.) *Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept* (Ocjena metoda detekcije u analizi tragova s pomoću statistički utemeljenog koncepta unutarnje validacije). *Analyst*, 120, 173.

▼ B**2.2.3 Drugi postupci validacije**

Mogu se primijeniti i drugi postupci kako bi se pokazalo da metoda ispunjava kriterije učinkovitosti za značajke učinkovitosti, pod uvjetom da pružaju istu razinu i kvalitetu informacija. Validacija se može obaviti i provođenjem međulaboratorijskog ispitivanja kao što to utvrđuju Codex Alimentarius, ISO ili IUPAC⁽¹²⁾ ili s pomoću alternativnih metoda kao što su ispitivanja u jednom laboratoriju odnosno unutarnja validacija⁽¹³⁾. Ako se primjenjuju alternativni postupci validacije, u protokolu izvođenja validacije utvrđuju se temeljni model i strategija s odgovarajućim preduvjetima, pretpostavkama i formulama, ili se na njih barem upućuje.

2.3 Selektivnost/specifičnost

Sposobnost razlučivanja između analita i njemu srodnih tvari mora se odrediti u najvećoj mogućoj mjeri. Moraju se odrediti interferencije homologa, izomera, produkta degradacije, endogenih tvari, analoga, metabolita rezidue koju se testira, spojeva matriksa ili bilo koje druge potencijalno interferirajuće tvari te se metoda prema potrebi mora izmijeniti da bi se izbjegle utvrđene interferencije. Za određivanje specifičnosti metode primjenjuje se sljedeći pristup:

1. odaberite niz kemijski srodnih spojeva ili drugih tvari koje bi mogle interferirati sa značajnim spojem koji je možda prisutan u uzorcima i provjerite mogu li interferirati s analizom ciljnih analita;
2. analizirajte odgovarajući broj reprezentativnih slijepih uzoraka, npr. različite serije ili serije različitih životinjskih vrsta ($n \geq 20$) i provjerite interferencije signala, pikova ili tragova iona u značajnom području u kojemu se očekuje elucija ciljnog analita;
3. obogatite reprezentativne slijepe uzorke do relevantne koncentracije tvarima koje bi mogle ometati identifikaciju i/ili kvantifikaciju analita i ispitajte:

(a) bi li prisutnost dodane tvari mogla dovesti do pogrešne identifikacije;

(b) otežava li dodana tvar identifikaciju ciljnog analita;

(c) postoji li značajni utjecaj dodane tvari na kvantifikaciju.

2.4 Robusnost

Mora se ispitati kontinuirana učinkovitost analitičke metode u različitim uvjetima ispitivanja, koji primjerice uključuju različite uvjete uzorkovanja i manje promjene koje se mogu dogoditi pri rutinskom testiranju. Za ispitivanje robusnosti metode trebale bi se uvesti manje promjene uvjeta ispitivanja. Ocjenjuje se važnost tih promjena. Za sve manje promjene za koje se pokazalo da značajno utječu na učinkovitost ispitivanja mora se odrediti svaka značajka učinkovitosti.

⁽¹²⁾ IUPAC (1995.), *Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies* (Protokol o oblikovanju, izvođenju i tumačenju ispitivanja učinkovitosti metoda), Pure & Applied Chem, 67, 331.

⁽¹³⁾ Gowik, P., Jülicher, B. i 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* (Multirezidualna metoda za nesteroidne protuupalne lijekove u plazmi korištenjem tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti uz primjenu detekcije s pomoću niza fotodioda. Opis metode i sveobuhvatna unutarnja validacija), J. Chromatogr., 716, 221.

▼ B**2.5 Stabilnost**

Mora se odrediti stabilnost kalibracijskog standarda, matriksa udruženog sa standardom i/ili matriksa obogaćenih standardom i stabilnost analita ili komponenti matriksa u uzorku tijekom pohrane ili analize jer nestabilnost može utjecati na rezultate ispitivanja.

Stabilnost analita u različitim uvjetima pohrane obično je dobro poznata. Ispitivanja koja se provode radi praćenja uvjeta pohrane standarda i uzoraka, koja su sastavni dio uobičajenog sustava akreditacije laboratorija i kontrole kvalitete, mogu pružiti potrebne podatke. Ako su dostupni podaci o stabilnosti za analite u matriksu (npr. na temelju podataka iz referentnih laboratorija EU-a (EURL), objavljenih podataka itd.), svaki pojedini laboratorij ne mora utvrđivati te podatke. Međutim, upućivanje na dostupne podatke o stabilnosti za analite u otopini i u matriksu prihvatljivo je samo ako se primjenjuju istovjetni uvjeti.

Ako nisu dostupni potrebni podaci o stabilnosti, trebaju se upotrijebiti pristupi u nastavku.

2.5.1 Određivanje stabilnosti analita u otopini

1. Pripremite svježe matične otopine jednog ili više analita i razrijedite ih prema uputama za testiranje kako biste dobili dovoljno alikvota (npr. 40) svake odabrane koncentracije. Pripremaju se uzorci:

(a) otopina analita koje se koriste za obogaćivanje;

(b) otopina analita koje se koriste za konačnu analizu;

(c) svih drugih značajnih otopina (npr. derivatizirani standardi).

2. Izmjerite udio analita u svježe pripremljenoj otopini prema uputama za testiranje.

3. Rasporedite odgovarajuće volumene u prikladne spremnike, označite ih i pohranite u skladu s uvjetima svjetla i temperature iz sheme u tablici 7. Vrijeme pohrane mora se odabrati uzimajući u obzir primijenjenu analitičku praksu, po mogućnosti dok se ne primijete prve pojave degradacije tijekom identifikacije i/ili kvantifikacije. Ako se tijekom ispitivanja stabilnosti ne primijeti degradacija, trajanje pohrane u ispitivanju stabilnosti mora biti jednako trajanju najduljeg roka pohrane otopine.

4. Izračunajte koncentraciju jednog ili više analita u svakom alikvotu u usporedbi s koncentracijom analita u svježe pripremljenoj otopini prema jednadžbi u nastavku:

$$\text{Preostali analit (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{svježa}}$$

C_i = koncentracija u vremenskoj točki i

$C_{\text{svježa}}$ = koncentracija svježe otopine

Srednja vrijednost pet replika otopine koje su bile pohranjene ne smije se razlikovati za više od 15 % od srednje vrijednosti pet svježe pripremljenih replika otopine. Srednja vrijednost pet svježe pripremljenih otopina upotrebljava se kao osnova za izračun postotne razlike.

▼B

Tablica 7.

Shema za određivanje stabilnosti analita u otopini

	-20 °C	+4 °C	+20 °C
Tama	10 alikvota	10 alikvota	10 alikvota
Svjetlo			10 alikvota

2.5.2 *Određivanje stabilnosti analita u matrici*

1. Ako je moguće, upotrijebite prirodno kontaminirane uzorke. Ako prirodno kontaminirani matrics nije na raspolaganju, mora se upotrijebiti slijepi matrics obogaćen analitom.
2. Ako je na raspolaganju prirodno kontaminirani matrics, odredite koncentraciju u matrici dok je još svjež. Pohranite ostale alikvote homogeniziranog prirodno kontaminiranog matricsa na temperaturi od -20 °C ili nižoj, prema potrebi, i određujte koncentracije analita onoliko dugo koliko se uzorak čuva u laboratoriju.
3. Ako prirodno kontaminirani matrics nije na raspolaganju, uzmite slijepi matrics i homogenizirajte ga. Podijelite matrics u pet alikvota. Obogatite svaki alikvot analitom, koji bi po mogućnosti trebao biti pripremljen u maloj količini vodene otopine. Odmah analizirajte jedan alikvot. Ostale alikvote pohranite na temperaturi od barem -20 °C ili nižoj, prema potrebi, i analizirajte ih nakon kratkoročne, srednjoročne i dugoročne pohrane uzimajući u obzir primijenjene analitičke metode.
4. Zabilježite najdulje prihvatljivo vrijeme pohrane i optimalne uvjete pohrane.

Srednja vrijednost pet replika otopine koje su bile pohranjene ne smije se razlikovati od srednje vrijednosti pet svježe pripremljenih replika otopine za više od unutarlaboratorijske obnovljivosti metode. Srednja vrijednost pet svježe pripremljenih otopina upotrebljava se kao osnova za izračun postotne razlike.

2.6 **Granica odlučivanja za potvrdu (CC α)**

CC α se određuje za potvrđne metode. CC α se utvrđuje na temelju uvjeta koji su u skladu sa zahtjevima za identifikaciju ili identifikaciju i kvantifikaciju definiranim u poglavlju 1. pod „Kriteriji učinkovitosti i drugi zahtjevi za analitičke metode“.

Za kontrolu usklađenosti uzoraka kombinirana standardna mjerna nesigurnost već je uzeta u obzir u vrijednosti CC α (granica odlučivanja za potvrdu).

1. Za neodobrene ili zabranjene farmakološki djelatne tvari CC α se računa na sljedeći način:
 - (a) metoda 1.: postupkom kalibracijske krivulje prema normi ISO 11843-1:1997⁽¹⁴⁾ (u tekstu: kritična vrijednost neto varijable stanja). U tom se slučaju koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje na razinu referentne vrijednosti za poduzimanje mjera ili najniže kalibrirane razine ili iznad njih u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke. Nakon identifikacije grafički prikazite odnos signala, ako je moguće, ili ponovno izračunane koncentracije i dodane

⁽¹⁴⁾ ISO 11843-1:1997 Mogućnost dokazivanja – 1. dio: Nazivi i definicije.

▼ B

koncentracije. Granica odlučivanja jednaka je pripadajućoj koncentraciji u točki sjecišta s ordinatom y plus 2,33 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti u točki sjecišta. Ova metoda primjenjiva je samo na kvantitativna ispitivanja. Granice odlučivanja dobivene ovim pristupom moraju se provjeriti analiziranjem slijepog matriksa obogaćenog na izračunanoj granici odlučivanja;

- (b) metoda 2.: analiziranjem najmanje 20 reprezentativnih slijepih uzoraka po matriksu kako bi se izračunao omjer signala i šuma u vremenskom intervalu u kojem se očekuje analit. Kao granica odlučivanja može se uzeti trostruka vrijednost omjera signal-šum. Ovo je primjenjivo na kvantitativna i kvalitativna ispitivanja. Granice odlučivanja dobivene ovim pristupom moraju se provjeriti analiziranjem slijepog matriksa obogaćenog na izračunanoj granici odlučivanja;
- (c) metoda 3.: $CC\alpha = \text{najniža kalibrirana razina} + k(\text{jednostrani, 99 \%}) \times (\text{kombinirana}) \text{ standardna mjerna nesigurnost na najnižoj kalibriranoj razini.}$

Za neodobrene ili zabranjene farmakološki djelatne tvari, ovisno o postupku validacije (i povezanim stupnjevima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, $n = \infty$), upotrebljava se k-faktor od 2,33.

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost prikladne su za definiranje (kombinirane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih čimbenika koji na to utječu.

Metoda 2. za izračun vrijednosti $CC\alpha$ može se upotrebljavati samo do 1. siječnja 2026. u slučaju metoda validiranih prije datuma stupanja na snagu ove Uredbe. Za metode validirane nakon stupanja na snagu ove Uredbe moraju se primjenjivati isključivo metoda 1. ili 3.

2. Za odobrene tvari $CC\alpha$ se izračunava na sljedeći način:

- (a) za odobrene tvari u kombinacijama matriksa/vrsta za koje je utvrđena najveća dopuštena količina rezidua ili najveća dopuštena količina:
- i. metoda 1.: postupkom kalibracijske krivulje prema normi ISO 11843-1:1997 (u tekstu: kritična vrijednost neto varijable stanja). U tom se slučaju koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje na razinu najveće dopuštene količine rezidua ili najveće dopuštene količine ili iznad njih u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke. Nakon identifikacije grafički prikazite odnos signala, ako je moguće, ili ponovno izračunane koncentracije i dodane koncentracije. Granica odlučivanja jednaka je pripadajućoj koncentraciji pri najvećoj dopuštenoj količini rezidua ili najvećoj dopuštenoj količini plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti na dozvoljenoj granici ($\alpha = 5 \%$);
 - ii. metoda 2.: $CC\alpha = \text{najveća dopuštena količina rezidua (ili najveća dopuštena količina)} + k(\text{jednostrani, 95 \%}) \times (\text{kombinirana}) \text{ standardna mjerna nesigurnost pri najvećoj dopuštenoj količini rezidua ili najvećoj dopuštenoj količini.}$

Za odobrene tvari, ovisno o postupku validacije (i povezanim stupnjevima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, $n = \infty$), upotrebljava se k-faktor od 1,64.

▼B

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost prikladne su za definiranje (kombinirane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih čimbenika koji na to utječu.

Za farmakološki djelatne tvari za koje je utvrđena najveća dopuštena količina rezidua za zbroj različitih tvari, CC α tvari s najvišom koncentracijom u uzorku upotrebljava se kao CC α za ocjenjivanje zbroja tvari u mjerenom uzorku;

- (b) za odobrene tvari u kombinacijama matriksa/vrsta za koje nije utvrđena najveća dopuštena količina rezidua ne smiju biti prisutne rezidue osim ako se odvila odobrena primjena u skladu s člankom 11. Direktive 2001/82/EZ. Za odobrene tvari za koje nije utvrđena najveća dopuštena količina rezidua, za izračun vrijednosti CC α upotrebljava se kaskadna najveća dopuštena količina rezidua utvrđena Provedbenom uredbom Komisije (EU) 2018/470 ⁽¹⁵⁾. Primjenjuje se metoda 1. ili 2. iz prethodnog stavka, ali „najveća dopuštena količina rezidua” odnosi se na „0,5 puta kaskadna najveća dopuštena količina rezidua, uz ciljani 0,1 puta kaskadna najveća dopuštena količina rezidua kada je to razumno izvedivo”.

2.7 Sposobnost detekcije za orijentaciju (CC β)

CC β se određuje za orijentacijske metode. CC β se utvrđuje na temelju odjeljka „Kriteriji učinkovitosti i drugi zahtjevi za analitičke metode” kako je utvrđeno u poglavlju 1. ovog Priloga i u skladu sa zahtjevima utvrđenima u tablici 5. Međutim, za orijentacijske metode ne trebaju se primjenjivati potpuni zahtjevi za identifikaciju (usp. 1.2.3., 1.2.4., 1.2.5.).

1. Za neodobrene ili zabranjene farmakološki djelatne tvari mora se osigurati najveća β -pogreška od 5 %. CC β se računa na sljedeći način:

- (a) metoda 1.: postupkom kalibracijske krivulje prema normi ISO 11843-1:1997 (u tekstu: najmanja vrijednost neto varijable stanja koja se može detektirati). U tom slučaju koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji je obogaćen na razinu referentne vrijednosti za poduzimanje mjera ili ispod nje odnosno, ako referentna vrijednost za poduzimanje mjera nije utvrđena, oko orijentacijske ciljne koncentracije u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke. Grafički prikazite odnos signala i dodane koncentracije. Sposobnost detekcije jednaka je odgovarajućoj koncentraciji na orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti za srednji izmjereni udio pri orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji. Ekstrapolacija daleko ispod najniže razine obogaćenja (< 50 % najniže razine obogaćenja) potvrđuje se eksperimentalnim podacima u koraku validacije;
- (b) metoda 2.: ispitivanje obogaćenog slijepog uzorka na razinama koncentracije jednakima i višima od orijentacijske ciljne koncentracije. Za svaku razinu koncentracije analizira se 20 obogaćenih slijepih uzoraka kako bi se osigurala pouzdana osnova za ovo određivanje. Sposobnost detekcije metode jednaka je razini koncentracije kod koje ostaje samo ≤ 5 % lažno usklađenih rezultata;
- (c) metoda 3.: CC β = orijentacijska ciljna koncentracija + k(jednostrani, 95 %) \times (kombinirana) standardna mjerna nesigurnost na orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji ili iznad nje.

Za neodobrene ili zabranjene farmakološki djelatne tvari, ovisno o postupku validacije (i povezanim stupnjevima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, $n = \infty$), upotrebljava se k-faktor od 1,64.

⁽¹⁵⁾ Provedbena uredba Komisije (EU) 2018/470 od 21. ožujka 2018. o detaljnim pravilima o najvećim dopuštenim količinama rezidua koje treba uzeti u obzir pri provođenju kontrola za hranu podrijetlom od životinja liječenih u EU-u u skladu s člankom 11. Direktive 2001/82/EZ (SL L 79, 22.3.2018., str. 16.).

▼ B

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost prikladne su za definiranje (kombinirane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih čimbenika koji na to utječu.

2. Za odobrene tvari mora se osigurati najveća β -pogreška od 5 %. $CC\beta$ se računa na sljedeći način:

- (a) metoda 1.: postupkom kalibracijske krivulje prema normi ISO 11843-1:1997 (u tekstu: najmanja vrijednost neto varijable stanja koja se može detektirati). U tom slučaju koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji je obogaćen na razinu dozvoljene granice ili ispod nje, počevši od orijentacijske ciljne koncentracije u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke i identificirajte analite. Izračunajte standardnu devijaciju srednjeg udjela izmjerenog pri orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji.

Sposobnost detekcije jednaka je odgovarajućoj koncentraciji na orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti za srednji izmjereni udio pri orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji.

- (b) metoda 2.: ispitivanjem obogaćenog slijepog uzorka na razinama koncentracije ispod dopuštene granice. Za svaku razinu koncentracije analizira se 20 obogaćenih slijepih uzoraka kako bi se osigurala pouzdana osnova za ovo određivanje. Sposobnost detekcije metode jednaka je razini koncentracije kod koje ostaje samo ≤ 5 % lažno usklađenih rezultata;

- (c) metoda 3.: $CC\beta = \text{orijentacijska ciljna koncentracija} + k(\text{jednostrani, 95 \%}) \times (\text{kombinirana}) \text{ standardna mjerna nesigurnost pri orijentacijskoj ciljnoj koncentraciji ili iznad nje.}$

Za odobrene tvari, ovisno o postupku validacije (i povezanim stupnjevima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, $n = \infty$), upotrebljava se k-faktor od 1,64 (u kaskadnoj ili redovitoj upotrebi najveće dopuštene količine rezidua).

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost prikladne su za definiranje (kombinirane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih čimbenika koji na to utječu.

Za farmakološki djelatne tvari za koje je utvrđena najveća dopuštena količina rezidua za zbroj različitih tvari, $CC\beta$ tvari s najvišom koncentracijom u uzorku upotrebljava se kao $CC\beta$ za ocjenjivanje zbroja tvari u mjerenom uzorku.

2.8 Kalibracijske krivulje

Kad se kalibracijske krivulje primjenjuju u svrhu kvantifikacije:

- (1) pri njihovoj izradi treba upotrijebiti najmanje pet razina (uključujući nultu razinu), po mogućnosti u jednakim razmacima;
- (2) mora se opisati operativni raspon krivulje;
- (3) mora se opisati matematička formula krivulje i primjerenost podataka krivulji (koeficijent određenja R^2);

▼ B

(4) moraju se opisati rasponi prihvatljivosti parametara krivulje.

Za kalibracijske krivulje na temelju standardne otopine moraju se naznačiti prihvatljivi rasponi matriksa udruženih sa standardom ili matriksa obogaćenih standardom za parametre kalibracijske krivulje, koji mogu varirati od serije do serije.

2.9 Apsolutno iskorištenje

Apsolutno iskorištenje metode određuje se kada se ne upotrebljava unutarnji standard ni kalibracija matriksom obogaćenim standardom.

Kada su ispunjeni zahtjevi za istinitost, kako je utvrđeno u tablici 1., može se koristiti fiksni faktor korekcije. U protivnom se koristi faktor iskorištenja dobiven za tu određenu seriju. Druga je mogućnost da se umjesto faktora korekcije iskorištenja koristi postupak standardnog dodavanja⁽¹⁶⁾ ili unutarnji standard.

Apsolutno iskorištenje izračunava se za najmanje šest reprezentativnih serija matriksa.

Alikvot slijepog matriksa obogaćuje se analitom prije ekstrakcije, a drugi alikvot slijepog matriksa obogaćuje se nakon pripreme uzorka na relevantnu razinu koncentracije i određuje se koncentracija analita.

Iskorištenje se računa na sljedeći način:

Iskorištenje (analit) = (područje matriksa obogaćenog standardom)/(područje matriksa udruženog sa standardom) × 100

2.10 Relativni učinci matriksa

Relativni učinak matriksa određuje se u svim slučajevima. To se može učiniti u okviru validacije ili u zasebnim ispitivanjima. Relativni učinak matriksa mora se izračunati za barem 20 različitih slijepih serija (matriks/vrsta), u skladu s područjem primjene metode, npr. različite vrste koje je potrebno obuhvatiti.

Slijepi matriks nakon ekstrakcije treba obogatiti analitom na referentnoj vrijednosti za poduzimanje mjera, najvećoj dopuštenoj količini rezidua ili najvećoj dopuštenoj količini i treba ga analizirati zajedno s čistom otopinom analita.

Relativni učinak matriksa ili faktor matriksa (engl. matrix factor, MF) računa se na sljedeći način:

$$\text{MF (standard)} = \frac{\text{područje pika MMS standarda}}{\text{područje pika standarda otopine}}$$

$$\text{MF (IS)} = \frac{\text{područje pika MMSIS-a}}{\text{područje pika IS-a otopine}}$$

$$\text{MF (standard normaliziran za IS)} = \frac{\text{MF (standard)}}{\text{MF (IS)}}$$

IS: unutarnji standard

MMS: matriks udružen sa standardom

Koeficijent varijacije ne smije biti veći od 20 % za MF (standard normaliziran za IS).

⁽¹⁶⁾ Količina standardnog analita koja se dodaje može, primjerice, biti od dva do pet puta veća od procijenjene količine analita u uzorku. Cilj je postupka odrediti udio analita u uzorku uzimajući u obzir iskorištenje analitičkog postupka.



POGLAVLJE 3.

**KONTROLA KVALITETE TIJEKOM RUTINSKE ANALIZE –
KONTINUIRANA PROVJERA UČINKOVITOSTI METODE**

Moraju se ispuniti zahtjevi za osiguranje kvalitete analitičkih rezultata iz poglavlja 7.7. norme ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁷⁾.

Tijekom rutinske analize, analiza potvrđenih referentnih tvari (PRT) poželjna je opcija dokazivanja učinkovitosti metode. Budući da su potvrđeni referentni materijali koji sadržavaju relevantne analite u potrebnim razinama koncentracije rijetko dostupni, kao druga mogućnost mogu se upotrijebiti i referentni materijali koje pružaju i opisuju referentni laboratoriji EU-a ili laboratoriji koji su stekli akreditaciju prema normi ISO/IEC 17043:2010 ⁽¹⁸⁾. Još je jedna mogućnost korištenje unutarnjih referentnih materijala koji se redovito kontroliraju.

Kontinuirana provjera učinkovitosti metode tijekom rutinske analize treba se izvršiti u koraku orijentacije i u koraku potvrde.

1. Za korak orijentacije:

za svaku seriju obavljenih analiza istodobno se analizira skup sljedećih uzoraka za kontrolu kvalitete:

- (a) kontrolni uzorak za prikladnost sustava instrumenta, po mogućnosti specifičan za metodu;
- (b) uzorci za kontrolu kvalitete koji su obogaćeni na koncentraciju blizu orijentacijske ciljne koncentracije, a po mogućnosti na CC β orijentacije za odobrene farmakološki djelatne tvari kao i zabranjene ili neodobrene tvari;
- (c) usklađeni kontrolni uzorak (slijepi uzorci) i, kada je relevantno, slijepi uzorci s reagensom.

2. Za korak potvrde:

za svaku seriju obavljenih analiza istodobno se analizira skup sljedećih uzoraka za kontrolu kvalitete:

- (a) kontrolni uzorak za prikladnost sustava instrumenta, po mogućnosti specifičan za metodu;
- (b) uzorci za kontrolu kvalitete koji su obogaćeni na koncentraciju blizu najveće dopuštene količine rezidua ili najveće dopuštene količine za odobrene farmakološki djelatne tvari ili blizu referentne vrijednosti za poduzimanje mjera ili najniže kalibrirane razine za zabranjene ili neodobrene tvari (neusklađeni kontrolni uzorci);
- (c) usklađeni kontrolni uzorak (slijepi uzorci) i, kada je relevantno, slijepi uzorci s reagensom.

Preporučuje se sljedeći redoslijed uzoraka za kontrolu kvalitete: kontrolni uzorak za prikladnost sustava instrumenta, usklađeni kontrolni uzorak, uzorak ili uzorci koje treba potvrditi, ponovno usklađeni kontrolni uzorak i obogaćeni uzorak za kontrolu kvalitete (neusklađeni kontrolni uzorci).

Za kvantitativne metode za svaku seriju službenih uzoraka analizira se i mjeri kalibracijska krivulja prije ili poslije prethodno navedenih uzoraka.

Kada je to izvedivo, ocjenjuje se istinitost (na temelju obogaćenih uzoraka) svih ciljnih analita u neusklađenim kontrolnim uzorcima s pomoću dijagrama kontrole kvalitete u skladu s poglavljem 7.7. norme ISO/IEC 17025:2017. Ako je za to potreban nerazmjerno velik broj određivanja istinitosti, broj analita može se smanjiti na broj reprezentativnih analita.

⁽¹⁷⁾ ISO/IEC 17025: 2017. Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija (poglavlje 7.7.).

⁽¹⁸⁾ ISO/IEC 17043:2010 Ocjenjivanje sukladnosti – Opći zahtjevi za ispitivanje sposobnosti.



POGLAVLJE 4.

**PROŠIRENJE VALIDIRANOG PODRUČJA PRIMJENE PRETHODNO
VALIDIRANE METODE**

Ponekad je potrebno proširiti područje primjene prethodno sveobuhvatno validirane metode. U tim slučajevima proširenje područja primjene treba postići na djelotvoran i analitički pouzdan način. To se može postići izvršavanjem validacije na smanjenom broju uzoraka (npr. na polovini uzoraka) u usporedbi s potpunom validacijom.

Ipak, vrsta i broj izmjena koje treba validirati u jednoj smanjenoj validacijskoj shemi uvijek se moraju temeljiti na stručnom znanju i prethodnom iskustvu, npr. za promjenu tehnike detekcije u svakom bi slučaju bila potrebna potpuna validacija.

Općenito, da bi se osigurala stalna valjanost metode, njezina učinkovitost mora se kontinuirano pratiti i uspoređivati s prvotno dobivenim parametrima validacije. Ta je kontinuirana kontrola učinkovitosti metode po mogućnosti osmišljena tako da se podaci koji nedostaju za potpunu validaciju mogu prikupiti tijekom vremena (npr. s pomoću nekoliko podatkovnih točaka iz uzoraka za kontrolu kvalitete u svakoj analitičkoj seriji).

4.1 Proširenja metoda s obzirom na raspon koncentracija

Zbog promjena najvećih dopuštenih količina rezidua, najvećih dopuštenih količina i referentnih vrijednosti za poduzimanje mjera može postati nužno prilagoditi raspon koncentracije za koji se metoda validira. U tom slučaju prihvatljiva je primjena smanjene validacijske sheme.

Kalibracijske krivulje za izmijenjeni raspon trebaju se pripremiti u skladu s validiranim postupkom. Trebaju se analizirati različite serije obogaćene na različite razine koncentracije (usp. 2.2.1., 2.2.2.). Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost/srednja preciznost trebale bi biti unutar prihvatljivog raspona u usporedbi s onima izvorno validirane metode. Prema potrebi treba ponovno izračunati $CC\beta$ (orijentacijske metode) i $CC\alpha$ (potvrđne metode).

4.2 Proširenja metoda s obzirom na dodatne tvari

Proširenje metoda na dodatne spojeve općenito je moguće samo za analite koji imaju sličnu strukturu i značajke kao oni koji su već uključeni u analitičku metodu. U tom slučaju prihvatljiva je primjena smanjene validacijske sheme. Slično tomu, nije dozvoljeno odstupanje od opisa metoda.

Kalibracijske krivulje za dodatne tvari trebaju se pripremiti u skladu s validiranim postupkom. Trebaju se analizirati različite serije matriksa obogaćene na različite razine koncentracije (usp. 2.2.1., 2.2.2.). Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost/srednja preciznost trebale bi biti unutar usporedivog raspona u odnosu na druge analite u izvorno validiranoj metodi i u skladu sa zahtjevima utvrđenima u točki 1.2.2. Za nove analite mora se izračunati $CC\beta$ (orijentacijske metode) i $CC\alpha$ (potvrđne metode).

4.3 Proširenja metoda s obzirom na matrikse/vrste

Odluka o uključivanju novih matriksa ili vrsta u validiranu analitičku metodu uvijek se mora donijeti za svaki pojedinačni slučaj na temelju znanja i iskustva koje je dosad stečeno u pogledu metode i preliminarnih ispitivanja kojima se ocjenjuju mogući učinci i interferencije matriksa. Općenito, to će biti moguće samo za matrikse koji imaju slična svojstva i za nekritične analite (stabilnost, sposobnost detekcije).

▼ B

Kalibracijske krivulje (standarda ili matriksa) trebaju se pripremiti u skladu s validiranim postupkom. Trebaju se analizirati različite serije matriksa obogaćene na različite razine koncentracije (usp. 2.2.1., 2.2.2.). Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost/srednja preciznost trebale bi biti unutar prihvatljivog raspona u odnosu na izvorno validiranu metodu i u skladu sa zahtjevima utvrđenima u točki 1.2.2. Ovisno o postupku validacije može biti potreban ponovni izračun vrijednosti $CC\beta$ (orijentacijske metode) ili $CC\alpha$ (potvrđne metode).

Ako rezultati nisu unutar prihvatljivog raspona u usporedbi s vrijednostima za izvorni matriks, bit će potrebna dodatna potpuna validacija kako bi se odredili parametri učinkovitosti za pojedini matriks/vrstu.

U slučajevima kada se najveće dopuštene količine rezidua za određenu tvar razlikuju za određene matrikse najvjerojatnije će biti teško prilagoditi područje primjene metode s obzirom na dodatni matriks/vrstu i koncentraciju jer u tom slučaju treba uzeti u obzir dvije izmjene. U takvim slučajevima preporučuje se potpuna validacija.

*PRILOG II.***POSTUPCI UZORKOVANJA I POSTUPANJE SA SLUŽBENIM UZORCIMA****1. Količina uzoraka**

U nacionalnom programu kontrole rezidua moraju se utvrditi najmanje količine uzoraka. Najmanje količine uzoraka moraju biti dovoljne da ovlaštenim laboratorijima omoguće izvođenje analitičkih postupaka potrebnih za orijentaciju i za potvrdne analize. Posebno za perad, akvakulturu, zečeve, divljač iz uzgoja, gmazove i kukce uzorak se sastoji od jedne ili više životinja, ovisno o zahtjevima analitičke metode. Veličina uzorka za jaja iznosi najmanje 12 ili više jaja, prema primijenjenim analitičkim metodama. Ako u jednom uzorku više kategorija tvari treba analizirati različitim analitičkim metodama, veličina uzorka povećava se u skladu s tim.

2. Podjela na poduzorke

Svaki se uzorak mora podijeliti na najmanje dva jednaka poduzorka na kojima se može obaviti cjelokupni analitički postupak, osim ako je to tehnički nemoguće ili ako se to ne zahtijeva nacionalnim zakonodavstvom. Podjela na poduzorke može se izvršiti na mjestu uzorkovanja ili u laboratoriju.

3. Sljedivost

Svaki uzorak uzima se tako da ga je uvijek moguće povezati s poljoprivrednim gospodarstvom podrijetla i serijom životinja ili, prema potrebi, s pojedinačnom životinjom. Konkretno, u skladu s izborom države članice uzorci mlijeka mogu se uzimati na bilo kojem od sljedećih mjesta:

1. na poljoprivrednom gospodarstvu iz spremnika za prikupljanje mlijeka;
2. na razini mliječne industrije, prije ispuštanja mlijeka.

4. Spremnici za uzorke

Uzorci se moraju prikupiti u prikladne spremnike koji osiguravaju cjelovitost i sljedivost uzorka. Spremnici posebno moraju sprečavati zamjenu, međusobnu kontaminaciju i degradaciju uzoraka. Spremnici moraju biti službeno plombirani.

5. Izvješće o uzorkovanju

Za svaki se postupak uzorkovanja mora sastaviti izvješće.

Inspektor u izvješće o uzorkovanju unosi barem sljedeće podatke:

1. adresu nadležnih tijela;
2. ime inspektora ili identifikacijsku oznaku;
3. službenu oznaku uzorka;
4. datum uzorkovanja;
5. ime i adresu vlasnika ili osobe koja je zadužena za životinje ili proizvode životinjskog podrijetla;
6. naziv i adresu poljoprivrednog gospodarstva podrijetla životinja (kod uzorkovanja na gospodarstvu);
7. registracijski broj objekta/broj klaonice;

▼B

8. identifikaciju životinje ili proizvoda;
9. životinjsku vrstu;
10. matriks uzorka;
11. prema potrebi, lijekove davane tijekom posljednja četiri tjedna prije uzorkovanja (kod uzorkovanja na gospodarstvu);
12. tvar ili skupinu tvari koje se ispituju;
13. posebne napomene.

Papirnat ili elektronički primjerci izvješća dostavljaju se ovisno o postupku uzorkovanja. Izvješće o uzorkovanju i njegovi primjerci popunjavaju se na način kojim se jamči njihova vjerodostojnost i pravna valjanost, zbog čega će te dokumente možda morati potpisati inspektor. Kod uzorkovanja na gospodarstvu može se pozvati uzgajivač ili njegov predstavnik da potpišu izvorni primjerak izvješća o uzorkovanju.

Izvornik izvješća o uzorkovanju ostaje kod nadležnog tijela koje mora jamčiti da izvornik izvješća neće biti dostupan neovlaštenim osobama.

Ako je potrebno, o uzorkovanju se može obavijestiti uzgajivač ili vlasnik objekta.

6. Izvješće o uzorkovanju za laboratorij

Izvješće o uzorkovanju za laboratorij koje sastavljaju nadležna tijela mora biti u skladu sa zahtjevima utvrđenima u poglavlju 7. norme ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁾ i sadržavati najmanje sljedeće podatke:

1. adresu nadležnih tijela ili imenovanih tijela;
2. ime inspektora ili identifikacijsku oznaku;
3. službenu oznaku uzorka;
4. datum uzorkovanja;
5. životinjsku vrstu;
6. matriks uzorka;
7. tvari ili skupine tvari koje se ispituju;
8. posebne napomene.

Izvješće o uzorkovanju za laboratorij predaje se laboratoriju zajedno s uzorkom.

7. Prijevoz i pohrana

U programima kontrole rezidua utvrđuju se prikladni uvjeti prijevoza i pohrane za svaku kombinaciju analita i matriksa kako bi se osigurala stabilnost analita i cjelovitost uzorka. Vrijeme prijevoza mora biti što kraće, a temperatura tijekom prijevoza mora biti odgovarajuća kako bi se osigurala stabilnost analita.

Posebna pozornost obraća se na transportne kutije, temperaturu i vrijeme isporuke nadležnom laboratoriju.

U slučaju neusklađenosti sa zahtjevima programa kontrole, laboratorij o tome bez odgode obavješćuje nadležno tijelo.

⁽¹⁾ ISO/IEC 17025: 2017. Opći zahtjevi za osposobljenost ispitnih i umjernih laboratorija (poglavlje 7.7.).