

II

(Atti per i quali la pubblicazione non è una condizione di applicabilità)

COMMISSIONE

DECISIONE DELLA COMMISSIONE

del 12 agosto 2002

che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati

[notificata con il numero C(2002) 3044]

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(2002/657/CE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

vista la direttiva 96/23/CE del Consiglio, del 29 aprile 1996, concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE ⁽¹⁾ in particolare l'articolo 15, paragrafo 1, seconda frase,

considerando quanto segue:

- (1) La presenza di residui nei prodotti di origine animale è oggetto di preoccupazione per la salute pubblica.
- (2) La decisione 98/179/CE della Commissione, del 23 febbraio 1998, recante modalità d'applicazione per il prelievo ufficiale di campioni al fine della sorveglianza su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei prodotti di origine animale ⁽²⁾, recita che l'analisi dei campioni deve essere effettuata esclusivamente presso laboratori per il controllo ufficiale dei residui riconosciuti dall'autorità competente.
- (3) È necessario assicurare la qualità e la comparabilità dei risultati analitici prodotti dai laboratori per il controllo ufficiale dei residui riconosciuti dall'autorità competente. Tale obiettivo deve essere conseguito attraverso l'impiego dei sistemi di controllo della qualità e in modo particolare applicando i metodi certificati in base a procedure e a criteri di rendimento comuni e garantendo la rintracciabilità rispetto a parametri comuni o comunemente accettati.
- (4) La direttiva 93/99/CEE del Consiglio, del 29 ottobre 1993, riguardante misure supplementari in merito al controllo ufficiale dei prodotti alimentari e la decisione 98/179/CE ⁽³⁾ richiedono che a partire dal gennaio 2002
- (5) Una rete di laboratori comunitari di riferimento, laboratori nazionali di riferimento e laboratori nazionali di controllo opera in forza della direttiva 96/23/CE per migliorare il coordinamento.
- (6) In conseguenza dei progressi compiuti nel campo della chimica analitica dopo l'adozione della direttiva 96/23/CE il concetto di metodi di routine e metodi di riferimento è stato sostituito dall'impostazione basata sui criteri nella quale si istituiscono criteri di rendimento e procedure per la convalida dei metodi di screening e di conferma.
- (7) È necessario determinare criteri comuni per l'interpretazione dei risultati delle prove dei laboratori di controllo ufficiali al fine di garantire l'attuazione armonizzata della direttiva 96/23/CE.
- (8) È necessario prevedere l'istituzione progressiva di limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) dei metodi analitici per le sostanze per le quali non è stato definito alcun limite consentito ed in particolare per quelle sostanze il cui impiego non è autorizzato oppure espressamente vietato all'interno della Comunità, al fine di garantire un'attuazione armonizzata della direttiva 96/23/CE.

⁽¹⁾ GU L 125 del 23.5.1996, pag. 10.

⁽²⁾ GU L 65 del 5.3.1998, pag. 31.

⁽³⁾ GU L 290 del 24.11.1993, pag. 14.

- (9) La decisione 90/515/CE della Commissione, del 26 settembre 1990, che stabilisce i metodi di riferimento per la ricerca di residui di metalli pesanti e arsenico ⁽¹⁾, la decisione 93/256/CE della Commissione, del 14 maggio 1993, che stabilisce i metodi da impiegare per la ricerca dei residui di sostanze ad azione ormonica e di sostanze ad azione tireostatica ⁽²⁾ e la decisione 93/257/CE della Commissione, del 15 aprile 1993, che stabilisce i metodi di riferimento e l'elenco dei laboratori di riferimento nazionali per la ricerca dei residui ⁽³⁾, modificata da ultimo dalla decisione 98/536/CE ⁽⁴⁾, sono state in primo luogo sottoposte a riesame al fine di prendere in considerazione gli sviluppi nelle conoscenze scientifiche e tecniche, sono state giudicate sorpassate in termini di sfera di applicazione e disposizioni e devono di conseguenza essere abrogate dalla presente decisione.
- (10) Per consentire l'adattamento dei metodi di analisi dei campioni ufficiali alle disposizioni della presente decisione deve essere contemplato un periodo di transizione.
- (11) Le misure previste dalla presente decisione sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali,

HA ADOTTATO LA PRESENTE DECISIONE:

Articolo 1

Materia e sfera di applicazione

La presente decisione stabilisce le norme per i metodi analitici da utilizzare nelle analisi di campioni ufficiali prelevati in ottemperanza all'articolo 15, paragrafo 1, seconda frase, della direttiva 96/23/CE e riporta criteri comuni per l'interpretazione dei risultati analitici provenienti dai laboratori di controllo ufficiali per tali campioni.

La presente decisione non si applica alle sostanze per le quali siano state stabilite norme più particolari in altra legislazione comunitaria.

Articolo 2

Definizioni

Ai fini della presente decisione si applicano le definizioni di cui alla direttiva 96/23/CE e all'allegato della presente decisione.

Articolo 3

Metodi analitici

Gli Stati membri garantiscono che i campioni ufficiali prelevati a norma della direttiva 96/23/CE siano analizzati con l'impiego di metodi che:

- sono documentati nelle istruzioni dell'analisi, preferibilmente in ottemperanza alla ISO 78-2 (6);
- rispettano la parte 2 dell'allegato alla presente decisione;
- sono stati convalidati in ossequio alla procedure descritte nella parte 3 dell'allegato;

⁽¹⁾ GU L 286 del 18.10.1990, pag. 33.

⁽²⁾ GU L 118 del 14.5.1993, pag. 64.

⁽³⁾ GU L 118 del 14.5.1993, pag. 75.

⁽⁴⁾ GU L 251 dell'11.9.1998, pag. 39.

- rispettano i pertinenti limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) da stabilire in ossequio all'articolo 4.

Articolo 4

Limiti minimi di rendimento richiesti

La presente decisione sarà rivista per stabilire progressivamente i limiti minimi di rendimento richiesti (LMRR) dei metodi analitici da utilizzare per le sostanze per le quali non è stato stabilito alcun limite consentito.

Articolo 5

Controllo di qualità

Gli Stati membri garantiscono la qualità dei risultati delle analisi dei campioni prelevati a norma della direttiva 96/23/CE, in particolare attraverso la sorveglianza delle analisi e/o la calibrazione dei risultati in ossequio al capitolo 5.9 della ISO 17025 (1).

Articolo 6

Interpretazione dei risultati

- Il risultato di un'analisi sarà considerato non conforme se viene superato il limite di decisione del metodo di conferma per l'analita.
- Se per una sostanza è stato stabilito un limite consentito, il limite di decisione è la concentrazione oltre la quale è possibile stabilire con una certezza statistica di $1 - \alpha$ che il limite consentito è stato effettivamente superato.
- Se per una sostanza non è stato stabilito un limite consentito, il limite di decisione è il livello di concentrazione più basso al quale un metodo è in grado di stabilire con una certezza statistica di $1 - \alpha$ che quel particolare analita è effettivamente presente.
- Per le sostanze elencate nel gruppo A dell'allegato I alla direttiva 96/23/CE, l'errore α è pari o inferiore all'1 %. Per tutte le altre sostanze l'errore α è pari o inferiore al 5 %.

Articolo 7

Abrogazione

Sono abrogate le decisioni 90/515/CEE, 93/256/CEE e 93/257/CEE.

Articolo 8

Disposizioni transitorie

I metodi per l'analisi dei campioni ufficiali delle sostanze elencate nel gruppo A dell'allegato I alla direttiva 96/23/CE, che soddisfano i criteri stabiliti nelle decisioni 90/515/CEE, 93/256/CEE e 93/257/CEE possono essere utilizzati fino a due anni dopo l'entrata in vigore della presente decisione. I metodi attualmente impiegati per le sostanze elencate nel gruppo B dell'allegato I alla decisione 96/23/CE devono essere conformi alla presente decisione al più tardi cinque anni dopo la data di applicazione della presente decisione.

*Articolo 9***Data di applicazione**

La presente decisione si applica dal 1° settembre 2002.

*Articolo 10***Destinatari**

Gli Stati membri sono destinatari della presente decisione.

Fatto a Bruxelles, il 12 agosto 2002.

Per la Commissione

David BYRNE

Membro della Commissione

ALLEGATO

CRITERI DI RENDIMENTO, ALTRE PRESCRIZIONI E PROCEDURE PER I METODI ANALITICI

1. DEFINIZIONI

- 1.1. Per accuratezza si intende lo scostamento tra il risultato di una prova e il valore di riferimento convenuto (2). L'accuratezza è determinata dall'esattezza e dalla precisione.
- 1.2. L'errore alfa (α) rappresenta la probabilità che il campione sottoposto ad analisi sia conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura non conforme («decisione di falsa non conformità»).
- 1.3. Per analita si intende la sostanza che si deve rilevare, individuare e/o quantificare, nonché i derivati che emergono durante la sua analisi.
- 1.4. L'errore beta (β) rappresenta la probabilità che il campione sottoposto ad analisi sia effettivamente non conforme, sebbene sia stata ottenuta una misura conforme («decisione di falsa conformità»).
- 1.5. Per distorsione si intende la differenza tra il risultato previsto di una prova ed un valore di riferimento convenuto (2).
- 1.6. Per standard di calibrazione si intende un dispositivo per le misurazioni che rappresenta la quantità della sostanza di interesse in modo da collegarne il valore a una base di riferimento.
- 1.7. Per materiale di riferimento certificato (MRC) si intende un materiale al quale è stato assegnato un contenuto di analita specificato.
- 1.8. La co-cromatografia è una procedura nella quale, prima delle fasi cromatografiche, l'estratto viene diviso in due parti. Una parte viene sottoposta a cromatografia tale e quale; la seconda parte è miscelata con l'analita standard che deve essere misurato; quindi la miscela è sottoposta a cromatografia. La quantità di analita standard aggiunto deve essere simile alla quantità stimata dell'analita nell'estratto. Tale metodo è studiato per migliorare l'identificazione di un analita quando vengono impiegati metodi cromatografici, in particolare quando non si può utilizzare alcuno standard interno adeguato.
- 1.9. Per studio collaborativo si intende l'analisi dello stesso campione per mezzo dello stesso metodo al fine di determinare le caratteristiche di rendimento del metodo. Lo studio copre gli errori di misurazione casuali e le distorsioni di laboratorio.
- 1.10. I metodi di conferma sono metodi che forniscono informazioni complete o complementari atte ad identificare la sostanza in modo univoco e, se necessario, quantificarla al livello di interesse.
- 1.11. Il limite di decisione ($CC\alpha$) è il limite al quale e oltre il quale è possibile concludere con una probabilità di errore pari ad α che un campione è non conforme.
- 1.12. Capacità di rilevazione ($CC\beta$) rappresenta il contenuto più piccolo della sostanza che è possibile rilevare, identificare e/o quantificare in un campione con una probabilità di errore di β . Se per una sostanza non è stato stabilito un limite consentito, la capacità di rilevazione è il livello di concentrazione più basso al quale un metodo è in grado di rilevare campioni effettivamente contaminati con una certezza statistica di $1 - \beta$. Per le sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, ciò significa che la capacità di rilevazione è la concentrazione alla quale il metodo è in grado di rilevare le concentrazioni limite consentite con una certezza statistica di $1 - \beta$.
- 1.13. Il campione da analizzare fortificato è un campione arricchito con una quantità nota dell'analita da rilevare.
- 1.14. Per studio inter-laboratorio (raffronto) si intende l'organizzazione, la realizzazione e la valutazione di prove sullo stesso campione da parte di due o più laboratori secondo condizioni predeterminate volte a valutare il rendimento della prova. In base alle sue finalità, lo studio può essere classificato come studio collaborativo o studio di competenza.
- 1.15. Lo standard interno (SI) è una sostanza non contenuta nel campione avente proprietà fisico-chimiche il più possibile simili a quelle dell'analita da identificare e che viene aggiunta ad ogni campione nonché ad ogni soluzione di calibrazione.
- 1.16. Campione di laboratorio è il campione preparato per l'invio in laboratorio e che deve essere sottoposto ad esame o ad analisi.
- 1.17. Per livello di interesse si intende la concentrazione della sostanza o dell'analita in un campione che è significativa per determinare la sua conformità alla legislazione.
- 1.18. Il limite minimo di rendimento richiesto (LMRR) è il contenuto minimo di analita in un campione che deve essere rilevato e confermato. Tale limite è volto ad armonizzare il rendimento analitico dei metodi per le sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito.

- 1.19. La caratteristica di rendimento è la qualità funzionale che può essere attribuita ad un metodo analitico. Può riguardare, ad esempio, la specificità, l'accuratezza, l'esattezza, la precisione, la ripetibilità, la riproducibilità, il recupero, la capacità di rilevazione e la robustezza.
- 1.20. Per criteri di rendimento si intendono le prescrizioni per una caratteristica di rendimento in base alla quale è possibile stabilire che il metodo analitico è adeguato e che genera risultati affidabili.
- 1.21. Il limite consentito è il limite massimo del residuo, il livello massimo o altra tolleranza massima per le sostanze stabiliti nella legislazione comunitaria.
- 1.22. Per precisione si intende la concordanza tra i risultati di prove indipendenti ottenuti in condizioni concordate (predeterminate). La misura della precisione è espressa, in genere, in termini di imprecisione e calcolata quale deviazione standard del risultato della prova. Una minore precisione è determinata da una deviazione standard più ampia (2).
- 1.23. Per studio di competenza si intende l'analisi dello stesso campione, consentendo ai laboratori di scegliere il proprio metodo, a patto che tali metodi siano utilizzati in condizioni di routine. Lo studio deve essere condotto in base alla guida ISO 43-1 (3) e 43-2 (4) e può essere utilizzato per valutare la riproducibilità dei metodi.
- 1.24. Per metodo qualitativo si intende un metodo analitico che identifica una sostanza sulla base delle sue proprietà chimiche, biologiche o fisiche.
- 1.25. Per metodo quantitativo si intende un metodo analitico che determina la quantità o la frazione di massa di una sostanza in modo che possa essere espressa come valore numerico di unità appropriate.
- 1.26. Il dosaggio in bianco del reagente è la procedura analitica completa applicata senza l'aliquota da analizzare oppure utilizzando invece dell'aliquota da analizzare una quantità equivalente di solvente adeguato.
- 1.27. Per recupero si intende la percentuale della concentrazione effettiva di una sostanza recuperata durante la procedura analitica. Il recupero è determinato durante la validazione, se non è disponibile alcun materiale di riferimento certificato.
- 1.28. Per materiale di riferimento si intende un materiale del quale sono state confermate una o più proprietà per mezzo di un metodo validato e che per questo motivo può essere impiegato per calibrare un apparato o per verificare un metodo di misura.
- 1.29. Per ripetibilità si intende precisione in condizioni di ripetibilità (2).
- 1.30. Per condizioni di ripetibilità si intendono condizioni alle quali si ottengono risultati di prove indipendenti con lo stesso metodo su elementi di prova identici nello stesso laboratorio con lo stesso operatore che utilizza la stessa apparecchiatura (2).
- 1.31. Per riproducibilità si intende la precisione in condizioni di riproducibilità (2) (4).
- 1.32. Per condizioni di riproducibilità si intendono condizioni alle quali si ottengono risultati di prove con lo stesso metodo su elementi di prova identici in laboratori differenti con differenti operatori che utilizzano apparecchiature differenti (2) (4).
- 1.33. Per robustezza si intende la sensibilità di un metodo analitico alle variazioni nelle condizioni sperimentali che possono essere espresse come un elenco di materiali da analizzare, analiti, condizioni di conservazione, condizioni ambientali e/o di preparazione del campione in base alle quali il metodo può essere applicato come specificato oppure con piccole modifiche segnalate. Per tutte le condizioni sperimentali che possono essere soggette nella pratica ad oscillazione (ad esempio, stabilità dei reagenti, composizione del campione, pH, temperatura) deve essere indicata qualsiasi variazione che possa influenzare il risultato dell'analisi.
- 1.34. Per dosaggio in bianco del campione si intende la procedura analitica completa applicata ad un'aliquota da analizzare presa da un campione dal quale l'analita è assente.
- 1.35. Per metodo di screening si intende il metodo utilizzato per rilevare la presenza di una sostanza o di una classe di sostanze al livello di interesse. Tali metodi consentono di analizzare un elevato numero di campioni in tempi brevi e vengono impiegati per vagliare campioni molto numerosi alla ricerca di potenziali risultati non conformi. Sono progettati specificamente per evitare falsi risultati conformi.
- 1.36. Per studio di laboratorio singolo (convalida interna) si intende uno studio analitico che coinvolge un unico laboratorio che utilizza un metodo per analizzare lo stesso materiale di prova o materiali differenti in condizioni differenti nel corso di ampi intervalli di tempo di durata giustificata.
- 1.37. Per specificità si intende la capacità di un metodo di distinguere tra l'analita che si intende misurare e le altre sostanze. Tale caratteristica è prevalentemente una funzione della tecnica di misura descritta, ma può variare in base alla classe del composto o della matrice.

- 1.38. Per addizione standard si intende una procedura nella quale il campione da analizzare viene suddiviso in due (o più) aliquote da analizzare. Un'aliquota viene analizzata tale e quale, mentre prima dell'analisi vengono aggiunte alle altre aliquote da analizzare quantità note dell'analita standard. La quantità dell'analita standard aggiunta deve essere compresa tra due e cinque volte la quantità stimata dell'analita nel campione. Tale procedura è studiata per determinare il contenuto di un analita in un campione, prendendo in considerazione il recupero della procedura analitica.
- 1.39. Per analita standard si intende un analita di contenuto e purezza noti e certificati da utilizzare come riferimento nell'analisi.
- 1.40. Per sostanza si intende una materia di composizione chimica specifica o definita ed i suoi metaboliti.
- 1.41. Per aliquota da analizzare si intende la quantità di materiale prelevata dal campione da analizzare sulla quale viene svolta la prova o l'osservazione.
- 1.42. Per campione da analizzare si intende un campione preparato dal campione di laboratorio e dal quale vengono tratte le aliquote da analizzare.
- 1.43. Per esattezza si intende la concordanza tra il valore medio ottenuto da un'ampia serie di risultati e un valore di riferimento accettato. L'esattezza viene in genere espressa come distorsione (2).
- 1.44. Per unità si intendono le unità descritte nella ISO 31 (20) e nella direttiva 71/354/CE (19).
- 1.45. Per validazione si intende la conferma attraverso il controllo e la fornitura di prove efficaci circa il rispetto delle prescrizioni particolari per un uso specifico previsto (1).
- 1.46. Per riproducibilità intra-laboratorio si intende la precisione ottenuta nello stesso laboratorio in condizioni convenute (predeterminate) (relative, ad esempio, al metodo, ai materiali della prova, agli operatori, all'ambiente) nel corso di ampi intervalli di tempo di durata giustificata.

2. CRITERI DI RENDIMENTO E ALTRE PRESCRIZIONI PER I METODI ANALITICI

È possibile utilizzare i metodi analitici o le combinazioni di metodi diversi da quelli descritti in seguito ai fini di screening o di conferma solo se è possibile provare che essi rispettano le prescrizioni pertinenti stabilite nella presente decisione.

2.1. PRESCRIZIONI GENERALI

2.1.1. Manipolazione dei campioni

I campioni sono ottenuti, manipolati e trattati in modo tale che esista la massima possibilità di rilevare la sostanza. Le procedure per la manipolazione del campione escludono la possibilità di contaminazione o perdita accidentale di analiti.

2.1.2. Esecuzione delle prove

2.1.2.1. Recupero

Se viene impiegato un fattore fisso di correzione del recupero, il recupero deve essere determinato durante l'analisi dei campioni per ciascun lotto di campioni. Se il recupero è entro i limiti potrà essere impiegato il fattore di correzione fisso; in caso contrario si impiega il fattore di recupero ottenuto per quel lotto specifico, a meno che non si debba applicare il fattore di recupero specifico dell'analita nel campione, nel qual caso è utilizzato il metodo di addizione standard (vedere 3.5) o uno standard interno per la determinazione quantitativa di un analita in un campione.

2.1.2.2. Specificità

In condizioni sperimentali un metodo è in grado di distinguere tra l'analita e le altre sostanze. Deve essere fornita una stima della misura in cui ciò è possibile. Si devono adottare strategie per superare qualsiasi interferenza prevista con altre sostanze quando si utilizza la tecnica di misurazione descritta, ad esempio, prodotti omologhi, analoghi, prodotti metabolici del residuo in questione. È di fondamentale importanza studiare l'interferenza che potrebbe scaturire da componenti della matrice.

2.2. METODI DI SCREENING

In ottemperanza alla direttiva 96/23/CE, sono utilizzate per finalità di screening solo quelle tecniche analitiche la cui validazione può essere dimostrata in modo documentato e rintracciabile e che hanno un tasso di falsi conformi inferiore al 5 % (errore β) al livello di interesse. Nel caso di un sospetto risultato non conforme, tale risultato è confermato per mezzo di un metodo di conferma.

2.3. METODI DI CONFERMA PER RESIDUI E CONTAMINANTI ORGANICI

I metodi di conferma per i residui o i contaminanti organici forniscono informazioni sulla struttura chimica dell'analita. Di conseguenza, i metodi basati esclusivamente sull'analisi cromatografica senza l'uso della rilevazione spettrometrica non sono adeguati all'impiego come metodi di conferma senza il ricorso ad altri metodi. Tuttavia, se una singola tecnica non dispone di sufficiente specificità, la specificità desiderata deve essere ottenuta per mezzo di procedure analitiche consistenti in combinazioni adeguate di raffinazione, separazione cromatografica e rilevazione spettrometrica.

I metodi o le combinazioni di metodi che seguono sono considerati adeguati per l'individuazione di residui o contaminanti organici per i gruppi di sostanze indicati:

Tabella 1

Metodi di conferma adeguati per residui o contaminanti organici

Tecnica di misurazione	Sostanze allegato I 96/23/CE	Limitazioni
LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria di massa	Gruppo A e B	Solo in seguito a una separazione cromatografica on-line o off-line Solo se vengono impiegate tecniche a scansione completa o si utilizzano almeno 3 (per il gruppo B) o 4 (per il gruppo A) punti di identificazione per le tecniche che non registrano gli spettri completi della massa
LC o GC con rilevazione attraverso spettrometria a infrarossi	Gruppo A e B	Nella spettrometria a infrarossi è necessario rispettare le prescrizioni specifiche per l'assorbimento
LC a scansione totale (DAD)	Gruppo B	Nella spettrometria a raggi ultravioletti è necessario rispettare requisiti specifici per l'assorbimento
LC-fluorescenza	Gruppo B	Solo per le molecole che presentano una fluorescenza nativa e le molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivazione
2-D TLC-UV/VIS a scansione completa	Gruppo B	La HPTLC bidimensionale e la co-cromatografia sono obbligatorie
GC con rilevamento della cattura degli elettroni	Gruppo B	Solo se vengono utilizzate colonne di polarità differente
LC-immunogramma	Gruppo B	Solo se vengono impiegati almeno due sistemi cromatografici differenti oppure un secondo metodo di rilevazione indipendente
LC-UV/VIS (lunghezza d'onda unica)	Gruppo B	Solo se vengono impiegati almeno due sistemi cromatografici differenti oppure un secondo metodo di rilevazione indipendente

2.3.1. Criteri di rendimento comuni e prescrizioni

I metodi di conferma forniscono informazioni sulla struttura chimica dell'analita. Il metodo non è in grado di discriminare tra composti che forniscono la stessa risposta. I metodi basati esclusivamente sull'analisi cromatografica senza l'uso della rilevazione spettrometrica non sono adeguati all'impiego come metodi di conferma senza il ricorso ad altri metodi.

Ove impiegato nel metodo, all'inizio della procedura di estrazione si aggiunge all'aliquota da analizzare uno standard interno adeguato. A seconda della disponibilità, sono impiegate forme stabili dell'analita marcate con isotopi, che sono particolarmente indicate per la rilevazione con la spettrometria di massa, oppure composti correlati in modo strutturale all'analita.

Ove non sia possibile impiegare alcuno standard interno adeguato, l'identificazione dell'analita è confermata dalla co-cromatografia. In tal caso si ottiene un solo picco, dato che l'altezza (o l'area) del picco ingrandito è equivalente alla quantità di analita aggiunto. Con la gas-cromatografia (GC) o la cromatografia liquida (LC), la larghezza del picco a metà dell'altezza massima si trova entro il 90-110 % della larghezza originale e i tempi di ritenzione devono essere identici entro un margine del 5 %. Per i metodi basati sulla cromatografia su strato sottile (TLC) si intensifica solo il punto che si presume sia dovuto all'analita; non compare un nuovo punto e l'aspetto visivo non cambia.

Il materiale di riferimento o fortificato contenente quantità note di analita, al limite consentito o al limite di decisione, o in prossimità di tali limiti (campione di controllo non conforme), nonché i materiali di controllo conformi e i reagenti bianchi sono di preferenza utilizzati simultaneamente durante l'intera procedura con ciascun lotto di campioni da analizzare. L'ordine per l'inserimento degli estratti nello strumento di analisi è il seguente: reagente bianco, campione di controllo conforme, campione/i sottoposto/i a conferma, ancora campione di controllo conforme e, da ultimo, campione di controllo non conforme. È giustificata qualsiasi variazione rispetto a tale sequenza.

2.3.2. Criteri di rendimento aggiuntivi e altre prescrizioni per i metodi di analisi quantitativi

2.3.2.1. Esattezza dei metodi quantitativi

Nel caso di analisi ripetute di un materiale di riferimento certificato, gli intervalli di riferimento per la deviazione della frazione di massa media determinata per via sperimentale e corretta per il recupero dal valore certificato sono i seguenti:

Tabella 2

Esattezza minima dei metodi quantitativi

Frazione di massa	Intervallo
≤ 1 µg/kg	da - 50 % a + 20 %
Da meno di 1 µg/kg a 10 µg/kg	da - 30 % a + 10 %
≥ 10 µg/kg	da - 20 % a + 10 %

Quando tali MRC non sono disponibili, si accetta che l'esattezza delle misure sia valutata per mezzo del recupero di aggiunte di quantità note dell'analita, o degli analiti, ad una matrice bianca. I dati corretti con il recupero medio sono accettabili solo se rientrano negli intervalli riportati nella tabella 2.

2.3.2.2. Precisione dei metodi quantitativi

Il coefficiente di variazione (CV) inter-laboratorio per l'analisi ripetuta di un materiale di riferimento o fortificato, in condizioni di riproducibilità non supera il livello calcolato per mezzo dell'equazione di Horwitz. L'equazione è la seguente:

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

dove C è la frazione di massa espressa come potenza (esponente) di 10 (ad esempio, 1 mg/g = 10⁻³). Nella tabella 3 sono riportati degli esempi.

Tabella 3

Esempi di CV di riproducibilità per metodi quantitativi a intervalli di frazioni di massa dell'analita

Frazione di massa	CV di riproducibilità
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Per frazioni di massa inferiori a 100 µg/kg l'applicazione dell'equazione di Horwitz fornisce risultati eccessivamente elevati. Pertanto i CV per concentrazioni inferiori a 100 µg/kg sono i più bassi possibile.

Per le analisi eseguite in condizioni di ripetibilità, il CV intra-laboratorio sarà compreso in genere tra la metà e i due terzi dei valori riportati in precedenza. Per le analisi eseguite in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio, il CV intra-laboratorio non supera il CV di riproducibilità.

Nel caso di sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito, il metodo consegue una riproducibilità intra-laboratorio non superiore al corrispondente CV di riproducibilità ad una concentrazione di 0,5 × il limite consentito.

2.3.3. Criteri di rendimento e altre prescrizioni per la rilevazione per mezzo della spettrometria di massa

I metodi di spettrometria di massa possono essere presi in considerazione come metodi di conferma solo previa separazione cromatografica on-line o off-line.

2.3.3.1. Separazione cromatografica

Per le procedure GC-MS la separazione gas-cromatografica deve essere eseguita utilizzando colonne capillari. Per le procedure LC-MS la separazione cromatografica è eseguita utilizzando colonne LC adeguate. In ogni caso, il tempo di ritenzione minimo accettabile per l'analita sotto esame è pari al doppio del tempo di ritenzione corrispondente al volume vuoto della colonna. Il tempo di ritenzione (o tempo di ritenzione relativo) dell'analita nell'aliquota da analizzare corrisponde a quello dello standard di calibrazione entro una finestra del tempo di ritenzione specificata. La finestra del tempo di ritenzione deve essere commisurata al potere di risoluzione del sistema cromatografico. Il rapporto tra il tempo di ritenzione cromatografica dell'analita e quello dello standard interno, vale a dire il tempo di ritenzione relativo dell'analita, corrisponde a quello della soluzione di calibrazione con una tolleranza di 0,5 % per la GC e 2,5 % per la LC.

2.3.3.2. Rilevazione con tecniche di spettrometria di massa

La rilevazione con tecniche di spettrometria di massa è eseguita utilizzando tecniche MS quale la registrazione degli spettri della massa completi (scansioni complete) oppure la SIM (Selected Ion Monitoring), nonché tecniche MS-MS quali la SRM (Selected Reaction Monitoring), o altre tecniche MS o MS-MS in combinazione con modalità di ionizzazione appropriate. Nella spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS) la risoluzione (R) è in genere superiore a 10 000 per l'intero intervallo di massa al 10 % della valle.

Scansione totale: quando la determinazione con tecniche di spettrometria di massa viene eseguita registrando gli spettri a scansione totale, è obbligatoria la presenza di tutti gli ioni diagnostici misurati (lo ione molecolare, addotti caratteristici dello ione molecolare, ioni frammentati caratteristici e gli ioni isotopi), con un'intensità relativa di oltre il 10 % nello spettro di riferimento dello standard di calibrazione.

SIM: quando la determinazione per mezzo della spettrometria di massa è eseguita con tecniche di frammento-grafia, è preferibile che lo ione molecolare sia uno degli ioni diagnostici selezionati (lo ione molecolare, addotti caratteristici dello ione molecolare, ioni frammentati caratteristici e tutti i loro ioni isotopi). Gli ioni diagnostici selezionati non devono avere origine esclusivamente dalla stessa parte della molecola. Il rapporto segnale-rumore per ciascuno ione diagnostico è $\geq 3:1$.

Scansione totale e SIM: le intensità relative degli ioni rilevati, espresse come percentuale dell'intensità dello ione o della transizione più intensa, corrispondono a quelle dello standard di calibrazione, provenienti da soluzioni dello standard di calibrazione o da campioni drogati, a concentrazioni paragonabili, misurate nelle stesse condizioni, entro le seguenti tolleranze:

Tabella 4

Tolleranze massime consentite per intensità di ioni relative utilizzando una gamma di tecniche di spettrometria di massa

Intensità relativa (% del picco di base)	EI-GC-MS (relativa)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativa)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % – 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % – 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Interpretazione dei dati della spettrometria di massa: le intensità relative degli ioni diagnostici e/o delle coppie di ioni precursore/prodotto devono essere identificate confrontando gli spettri oppure integrando i segnali delle singole tracce della massa. Ogni volta che si applica la correzione del fondo (background), questa è applicata in modo uniforme nell'intero lotto (Cfr. 2.3.1, paragrafo 4) ed è chiaramente indicata.

Scansione completa: quando si registrano spettri a scansione totale in una singola spettrometria di massa, sono presenti almeno quattro ioni con un'intensità pari o superiore al 10 % del picco di base. Se presente nello spettro di riferimento con un'intensità relativa pari o superiore al 10 %, lo ione molecolare è incluso. Almeno quattro ioni si trovano entro le tolleranze massime consentite per le intensità relative degli ioni (tabella 5). È possibile eseguire ricerche computerizzate all'interno della libreria. In tal caso, il raffronto dei dati provenienti dalla spettrometria di massa sui campioni da analizzare con quelli sulla soluzione di calibrazione superano un fattore di corrispondenza critico. Per ogni analita tale fattore sarà determinato nel corso del processo di validazione sulla base degli spettri per i quali sono rispettati i criteri descritti in seguito. È controllata la variabilità nello spettro provocata dalla matrice semplice e dal rendimento dello strumento di rilevazione.

SIM: quando i frammenti di massa sono misurati utilizzando tecniche diverse dalla scansione totale, per interpretare i dati sarà utilizzato un sistema di punti di identificazione. Per la conferma delle sostanze elencate nel gruppo A dell'allegato I alla direttiva 96/23/CE sono richiesti almeno quattro punti di identificazione. Per la conferma delle sostanze elencate nel gruppo B dell'allegato I alla direttiva 96/23/CE, sono richiesti almeno tre punti di identificazione. Nella tabella sottostante è riportato il numero di punti di identificazione che ciascuna tecnica di spettrometria di massa di base può ottenere. Tuttavia, per poter ricevere i punti di identificazione richiesti per la conferma ed il totale dei punti di identificazione da calcolare:

- è misurato almeno un rapporto di ioni e
- tutti i rapporti di ioni pertinenti misurati rispettano i criteri descritti in precedenza e
- è possibile combinare un massimo di tre tecniche separate per conseguire il numero minimo di punti di identificazione.

Tabella 5

La relazione tra una gamma di classi di frammenti di massa ed i punti di identificazione ottenuti

Tecnica MS	Punti di identificazione ottenuti per ione
Spettrometria di massa a bassa risoluzione (LR)	1,0
LR-MS ⁿ , Ione precursore	1,0
LR-MS ⁿ Prodotti di transizione	1,5
HRMS	2,0
HR- MS ⁿ Ione precursore	2,0
HR-MS ⁿ Prodotti di transizione	2,5

Note:

- Ogni ione può essere contato una sola volta.
- La GC-MS con impiego di ionizzazione ad impatto di elettroni è considerata una tecnica differente dalla GC-MS con impiego della ionizzazione chimica.
- È possibile utilizzare analiti differenti per aumentare il numero di punti di identificazione solo se i derivati impiegano chimiche di reazione differenti.
- Per le sostanze nel gruppo A dell'allegato 1 alla direttiva 96/23/CE, se si impiega nella procedura analitica una delle seguenti tecniche: la HPLC accoppiata alla DAD (Diode Array Spectrophotometry) a scansione totale; oppure la HPLC accoppiata alla rilevazione a fluorescenza; oppure la HPLC accoppiata a un immunogramma; oppure la TLC bidimensionale accoppiata alla rilevazione spettrometrica; queste tecniche possono apportare al massimo un punto di identificazione, a patto che vengano rispettati i criteri pertinenti per tali tecniche.
- I prodotti di transizione comprendono prodotti figlia e nonna

Tabella 6

Esempi del numero di punti di identificazione ottenuti da una gamma di tecniche e per le loro combinazioni (n = un intero)

Tecnica/che	Numero di ioni	Punti di identificazione
GC-MS (EI o CI)	N	n
GC-MS (EI e CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI o CI) 2 derivati	2 (Derivato A) + 2 (Derivato B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 precursore e 2 figlie	4
LC-MS-MS	1 precursore e 2 figlie	4
GC-MS-MS	2 ioni precursori, ciascuno con 1 figlia	5
LC-MS-MS	2 ioni precursori, ciascuno con 1 figlia	5
LC-MS-MS-MS	1 precursore, 1 figlia e 2 nonne	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS e LC-MS	2 + 2	4
GC-MS e HRMS	2 + 1	4

2.3.4. Criteri di rendimento e altre prescrizioni per la cromatografia accoppiata alla rilevazione con tecniche agli infrarossi

Picchi adeguati: i picchi adeguati sono i massimi di assorbimento di uno standard di calibrazione nello spettro dell'infrarosso che rispettano i requisiti che seguono.

2.3.4.1. Rilevazione all'infrarosso

Assorbimento massimo: avviene su un numero d'onda compreso tra 4 000 e 500 cm^{-1} .

Intensità dell'assorbimento: non è inferiore a

- a) un'assorbanza molare specifica di 40 rispetto alla linea base del picco; oppure
- b) un'assorbanza relativa del 12,5 % dell'assorbanza del picco più intenso nell'intervallo 4 000-500 cm^{-1} , quando entrambe sono misurate rispetto all'assorbanza zero, e 5 % dell'assorbanza del picco più intenso nell'intervallo 4 000-500 cm^{-1} quando entrambe sono misurate rispetto alla linea base del picco.

Nota: sebbene picchi adeguati in base al punto a) possano essere preferibili da un punto di vista teorico, quelli calcolati in base al punto b) risultano di più facile determinazione.

Viene determinato il numero di picchi nello spettro infrarosso dell'analita le cui frequenze corrispondono ad un picco adeguato nello spettro dello standard di calibrazione, entro un margine di $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4.2. Interpretazione dei dati dello spettro all'infrarosso

L'assorbimento è presente in tutte le regioni dello spettro dell'analita al quale corrisponde un picco sufficiente nello spettro di riferimento dello standard di calibrazione. Sono richiesti almeno sei picchi sufficienti nello spettro infrarosso dello standard di calibrazione. Se sono presenti meno di sei picchi adeguati (7) lo spettro risultante non può essere utilizzato come spettro di riferimento. Il «punteggio», vale a dire la percentuale di picchi sufficienti trovati nello spettro infrarosso dell'analita, deve essere almeno 50. Quando non esiste una corrispondenza precisa per un picco sufficiente, la regione pertinente dello spettro dell'analita è coerente con la presenza di un picco corrispondente. La procedura si applica solo ai picchi di assorbimento nello stesso spettro del campione con un'intensità almeno tripla rispetto al rumore tra un picco ed il successivo.

2.3.5. Criteri di rendimento e altre prescrizioni per la determinazione di un analita utilizzando la LC con altre tecniche di rilevazione

2.3.5.1. Separazione cromatografica

Se è disponibile un materiale adeguato a tale fine si utilizza uno standard interno. È preferibilmente uno standard correlato con un tempo di ritenzione prossimo a quello dell'analita. L'analita eluisce al tempo di ritenzione tipico per lo standard di calibrazione corrispondente alle stesse condizioni sperimentali. Il tempo di ritenzione minimo accettabile per un analita è pari a due volte il tempo di ritenzione corrispondente al volume vuoto della colonna. Il rapporto tra il tempo di ritenzione dell'analita e quello dello standard interno, vale a dire il tempo di ritenzione relativo dell'analita, è identico a quello dello standard di calibrazione nella matrice appropriata, con un margine di $\pm 2,5 \%$.

2.3.5.2. Rilevazione UV/VIS a scansione totale

Devono essere rispettati i criteri di rendimento per i metodi LC.

I massimi di assorbimento nello spettro dell'analita avvengono alle stesse lunghezze d'onda di quelli dello standard di calibrazione entro un margine determinato dalla risoluzione del sistema di rilevazione. Per la rilevazione a schiera di diodi (diode array) tale margine è in genere di $\pm 2 \text{ nm}$. Al di sopra dei 220 nm lo spettro dell'analita non è visivamente differente dallo spettro dello standard di calibrazione per le parti dei due spettri aventi un'assorbanza relativa pari o superiore al 10 %. Tale criterio è rispettato, in primo luogo, quando sono presenti gli stessi massimi e, in secondo luogo, quando la differenza osservata tra i due spettri non è superiore, in alcun punto, al 10 % dell'assorbanza dello standard di calibrazione. Nel caso di ricerche computerizzate all'interno della libreria, il raffronto dei dati provenienti dalla spettrometria sui campioni da analizzare con quelli sulla soluzione di calibrazione supera un fattore di corrispondenza critico. Per ogni analita tale fattore sarà determinato nel corso del processo di validazione sulla base degli spettri per i quali sono rispettati i criteri descritti in precedenza. È controllata la variabilità nello spettro provocata dalla matrice semplice e dal rendimento dello strumento di rilevazione.

2.3.5.3. Criteri di rendimento per la rilevazione fluorimetrica

Devono essere rispettati i criteri di rendimento per i metodi LC.

Ciò si applica alle molecole che presentano una fluorescenza nativa e alle molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivazione. La scelta delle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione combinate alle condizioni cromatografiche è compiuta in modo tale da ridurre al minimo l'insorgenza di componenti interferenti negli estratti dei campioni bianchi.

Il picco massimo più vicino nel cromatogramma è separato dal picco dell'analita designato di almeno una larghezza di picco completa al 10 % dell'altezza massima del picco dell'analita.

2.3.5.4. Criteri di rendimento per la determinazione di un analita per mezzo di un immunogramma LC

Un immunogramma LC non può essere utilizzato autonomamente come metodo di conferma.

Devono essere rispettati i criteri pertinenti per i metodi LC.

I parametri predefiniti per il controllo della qualità, vale a dire il legame non specifico, il legame relativo dei campioni di controllo, il valore di assorbanza del bianco, devono ricadere entro i limiti ottenuti durante la validazione del campione da analizzare.

L'immunogramma deve essere costituito da almeno cinque frazioni.

Ciascuna frazione è inferiore alla metà della larghezza del picco.

La frazione con il massimo contenuto di analita deve essere identica a quella per il campione sospetto, il campione di controllo non conforme e lo standard.

2.3.5.5. Determinazione di un analita utilizzando la LC con rilevazione UV/VIS (lunghezza d'onda singola)

La LC con rilevazione UV/VIS (lunghezza d'onda singola) non è adeguata per essere impiegata autonomamente come metodo di conferma.

Il picco massimo più vicino nel cromatogramma è separato dal picco dell'analita designato di almeno una larghezza di picco completa al 10 % dell'altezza massima del picco dell'analita.

2.3.6. **Criteri di rendimento e altre prescrizioni per la determinazione di un analita per mezzo della TLC bidimensionale accoppiata alla rilevazione UV/VIS spettrometrica a scansione completa**

La HPTLC bidimensionale e la co-cromatografia sono obbligatorie.

I valori RF dell'analita corrispondono ai valori RF degli standard entro una tolleranza di ± 5 %.

L'aspetto visivo dell'analita è indistinguibile da quello dello standard.

Per punti dello stesso colore, il centro del punto più vicino è separato dal centro del punto dell'analita di almeno la metà della somma del diametro dei punti.

Lo spettro dell'analita non è visivamente differente dallo spettro dello standard, come descritto per la rilevazione UV/VIS a scansione completa.

Nel caso di ricerche computerizzate all'interno della libreria, il raffronto dei dati provenienti dalla spettrometria sui campioni da analizzare con quelli sulla soluzione di calibrazione supera un fattore di corrispondenza critico. Per ogni analita tale fattore sarà determinato nel corso del processo di validazione sulla base degli spettri per i quali sono rispettati i criteri descritti in precedenza. È controllata la variabilità nello spettro provocata dalla matrice semplice e dal rendimento dello strumento di rilevazione.

2.3.7. **Criteri di rendimento e prescrizioni per la determinazione di un analita per mezzo della GC in combinazione con l'ECD (electron capture detection, rilevazione con cattura degli elettroni)**

Se è disponibile un materiale adeguato a tale fine si utilizza uno standard interno. Questo è preferibilmente una sostanza correlata con un tempo di ritenzione prossimo a quello dell'analita. L'analita eluisce al tempo di ritenzione tipico per lo standard di calibrazione corrispondente alle stesse condizioni sperimentali. Il rapporto tra il tempo di ritenzione dell'analita e quello dello standard interno, vale a dire il tempo di ritenzione relativo dell'analita, è identico a quello dello standard di calibrazione nella matrice appropriata, con un margine dello 0,5 %. Il picco massimo più vicino nel cromatogramma è separato dal picco dell'analita designato di almeno una larghezza di picco completa al 10 % dell'altezza massima del picco dell'analita. Per ottenere ulteriori informazioni si potrà ricorrere alla co-cromatografia.

2.4. METODI DI CONFERMA PER GLI ELEMENTI

Le analisi di conferma per gli elementi chimici si basano sul concetto di identificazione inequivocabile e quantificazione accurata e precisa per mezzo delle proprietà fisico-chimiche uniche dell'elemento chimico studiato (ad esempio, lunghezza d'onda della radiazione emessa o assorbita caratteristica dell'elemento, massa atomica) al livello d'interesse.

I metodi o le combinazioni di metodi che seguono sono considerati adeguati per l'identificazione degli elementi chimici:

Tabella 7

Metodi di conferma adeguati per gli elementi chimici

Tecnica	Parametro misurato
Voltammetria di ridissoluzione anodica differenziale ad impulsi	Segnale elettrico
Spettrometria dell'assorbimento atomico	
Fiamma	Lunghezza d'onda di assorbimento
Generazione di idruri	Lunghezza d'onda di assorbimento
Vapore freddo	Lunghezza d'onda di assorbimento
Atomizzazione elettrotermica (fornace di grafite)	Lunghezza d'onda di assorbimento
Atomic Emission Spectrometry, spettrometria di emissione atomica	
Plasma induttivo	Lunghezza d'onda di emissione
Spettrometria di massa	
Plasma induttivo	Rapporto massa-carica

2.4.1. Criteri di rendimento comuni e altre prescrizioni per i metodi di conferma

Il materiale di riferimento o fortificato contenente quantità note di analita, al limite massimo consentito o al limite di decisione (campione di controllo non conforme), nonché i materiali di controllo conformi e i reagenti bianchi devono di preferenza essere utilizzati simultaneamente durante l'intera procedura con ciascun lotto di campioni da analizzare. L'ordine raccomandato per l'inserimento degli estratti nello strumento di analisi è il seguente: reagente bianco, campione di controllo conforme, campione/i da confermare, campione di controllo conforme e, da ultimo, campione di controllo non conforme. Viene giustificato qualsiasi scostamento.

In genere la maggior parte delle tecniche di analisi richiede la completa digestione della matrice organica per ottenere soluzioni prima della determinazione dell'analita. Ciò può essere ottenuto utilizzando procedure di mineralizzazione a microonde che riducono al minimo il rischio di perdita e/o contaminazione degli analiti da analizzare. Sono utilizzati contenitori in Teflon decontaminati di buona qualità. Se si ricorre ad altri metodi di digestione a secco o con presenza di liquido, sono disponibili prove documentate che escludano potenziali fenomeni di perdita o di contaminazione. In talune circostanze, quale alternativa alla digestione, per separare gli analiti dai componenti della matrice e/o concentrare gli analiti al fine di introdurre i campioni nello strumento di analisi si potranno scegliere procedure di separazione (ad esempio, estrazione).

Per quanto riguarda la calibrazione, sia esterna che basata sul metodo di aggiunta dello standard, si presta attenzione a non superare l'intervallo di lavoro definito per l'analisi. Nel caso di calibrazione esterna, gli standard calibranti devono obbligatoriamente essere preparati in una soluzione che corrisponda il più possibile alla composizione della soluzione campione. Si applica inoltre la correzione del fondo se richiesto dalla circostanza analitica specifica.

2.4.2. Criteri di rendimento aggiuntivi e altre prescrizioni per i metodi di analisi quantitativi

2.4.2.1. Esattezza dei metodi quantitativi

Nel caso di analisi ripetute degli elementi di un materiale di riferimento certificato, la deviazione del contenuto medio determinato per via sperimentale dal valore certificato non ricade al di fuori del limite di $\pm 10\%$. Quando tali MRC non sono disponibili, si accetta che l'esattezza delle misure venga valutata per mezzo del recupero di aggiunte di quantità note dell'elemento a campioni non conosciuti. Si attira l'attenzione sul fatto che, a differenza dell'analita, l'elemento aggiunto non è legato chimicamente nella vera matrice e che, pertanto, i risultati ottenuti con questa impostazione hanno validità inferiore a quelli ottenuti con l'uso degli MRC. I dati del recupero sono accettabili solo quando si trovano entro $\pm 10\%$ dal valore bersaglio.

2.4.2.2. Precisione dei metodi quantitativi

Nel caso di analisi ripetute di un campione eseguite in condizioni di riproducibilità in laboratorio, il coefficiente di variazione (CV) intra-laboratorio della media non supera i seguenti valori:

Tabella 8

CV per metodi quantitativi a intervalli di frazioni di massa dell'elemento

Frazione di massa	CV (%)
≥ 10 µg/kg a 100 µg/kg	20
da meno di 100 µg/kg a 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. Prescrizioni specifiche per la DPASV (Differential Pulse Anodic Stripping Voltametry)

La completa distruzione della materia organica nei campioni prima delle analisi DPASV ha un'importanza assoluta. Nei voltamogrammi non sono visibili segnali ampi dovuti alla presenza di materiali organici. I costituenti della matrice inorganica possono influenzare le altezze dei picchi nella DPASV. La quantificazione è pertanto eseguita attraverso il metodo delle aggiunte di standard. Con il metodo sono forniti campioni di voltamogrammi tipici di una soluzione campione.

2.4.4. Prescrizioni specifiche per l'AAS (Atomic Absorption Spectrometry)

Si tratta fondamentalmente di una tecnica ad elemento singolo che richiede, pertanto, un'ottimizzazione delle regolazioni sperimentali a seconda dell'elemento specifico da quantificare. Ogniqualvolta ciò sia possibile i risultati sono verificati qualitativamente e quantitativamente ricorrendo a linee di assorbimento alternative (idealmente, sono selezionate due linee differenti). Gli standard di calibrazione sono preparati in una matrice di soluzione che corrisponda il più possibile a quella della soluzione del campione da analizzare (ad esempio, concentrazione degli acidi o composizione dell'agente modificatore). Per ridurre al minimo i valori dei bianchi, tutti i reagenti sono della più elevata purezza disponibile. A seconda della modalità scelta per vaporizzare e/o atomizzare i campioni è possibile distinguere vari tipi di AAS.

2.4.4.1. Prescrizioni specifiche per l'AAS con fiamma

Le regolazioni per gli strumenti sono ottimizzate per ciascun elemento. In particolare sono verificate le velocità di flusso e la composizione del gas. Per evitare interferenze provocate dall'assorbimento nel fondo, è impiegato un correttore di sorgente continuo. Nel caso di matrici sconosciute, si verifica se la correzione del fondo è richiesta o meno.

2.4.4.2. Prescrizioni specifiche per l'AAS con fornace a grafite

Quando si lavora a livelli di tracce estremamente ridotte nella fornace a grafite la contaminazione in laboratorio spesso inficia l'accuratezza. Per la manipolazione del campione e dello standard si utilizzano pertanto reagenti ad elevata purezza, acqua deionizzata e oggetti in plastica inerte. Le regolazioni per gli strumenti sono ottimizzate per ciascun elemento. In particolare, occorre verificare le condizioni di pretrattamento e atomizzazione (temperatura, tempo) nonché le modifiche alla matrice.

Lavorando in condizioni di atomizzazione isoterma (ad esempio, tubo trasversale in grafite riscaldato con piattaforma Lvov integrata) (8) si ridurrà l'influenza della matrice sull'atomizzazione dell'analita. Oltre alla modifica della matrice e alla correzione Zeeman (9) del fondo è consentita la quantificazione per mezzo di una curva di calibrazione basata sulla misurazione di soluzioni standard acquose.

2.4.5. Prescrizioni specifiche per la spettrometria dell'assorbimento atomico con generazione di idruri

I composti organici che contengono elementi quali arsenico, bismuto, germanio, piombo, antimonio, selenio, stagno e tellurio possono risultare estremamente stabili e possono richiedere una decomposizione ossidante per ottenere risultati corretti per il contenuto totale degli elementi. Si consiglia pertanto la digestione a microonde oppure l'incinerazione ad alta pressione in condizioni fortemente ossidanti. La massima cura è prestata alla conversione completa e riproducibile degli elementi nei loro idruri corrispondenti.

La formazione di idruro di arsenico in soluzione di acido cloridrico con NaBH₄ dipende dallo stato di ossidazione dell'arsenico (As III: formazione rapida, As V: periodo di formazione più lungo). Per evitare una perdita di sensibilità per la determinazione di As V con tecniche di iniezione del flusso, provocate dal breve tempo di reazione in questo sistema, As V deve essere ridotto ad As III dopo la decomposizione ossidante. Lo ioduro di potassio/acido ascorbico o la cisteina sono adeguati a tale fine. I bianchi, le soluzioni di calibrazione e le soluzioni campione sono trattate nello stesso modo. L'utilizzo di un sistema a lotti consente di determinare entrambe le specie di arsenico senza compromettere l'accuratezza. A causa della formazione ritardata dell'idruro As V, la calibrazione è eseguita attraverso l'integrazione dell'area di picco. Sono ottimizzate le impostazioni per gli strumenti; il flusso del gas, che trasferisce l'idruro all'atomizzatore, è particolarmente importante e viene verificato.

2.4.6. **Prescrizioni specifiche per la spettrometria dell'assorbimento atomico con vapore freddo**

Il vapore freddo è utilizzato solo in caso di mercurio. A causa della volatilizzazione e delle perdite di adsorbimento del mercurio elementare, si deve prestare particolare attenzione durante l'intera analisi. Si deve fare attenzione ad evitare la contaminazione da parte dei reagenti o dell'ambiente.

I composti organici che contengono mercurio richiedono una decomposizione ossidante per ottenere risultati corretti per il contenuto totale di mercurio. Per la decomposizione devono essere impiegati sistemi sigillati con digestione a microonde o incineratori ad alta pressione. Particolare cura è prestata alla pulizia delle apparecchiature venute a contatto con il mercurio.

L'utilizzo della tecnica di iniezione del flusso presenta alcuni vantaggi. Per i limiti di decisione inferiori si raccomanda l'adsorbimento del mercurio elementare su un adsorbitore in oro/platino seguito da desorbimento termico. Il contatto tra l'adsorbitore o la cella e l'umidità compromette la misurazione ed è evitato.

2.4.7. **Prescrizioni specifiche per la spettrometria dell'emissione atomica con plasma induttivo (ICP-AES)**

La spettrometria dell'emissione atomica con plasma induttivo (10) è un metodo multi-elemento che consente la misurazione simultanea di più elementi. Per utilizzare l'ICP-AES, i campioni devono essere innanzitutto digeriti per decomporre le matrici organiche. Sono utilizzati sistemi sigillati con digestione a microonde oppure l'incinerazione ad alta pressione. La calibrazione degli strumenti e la scelta dell'elemento o della lunghezza d'onda svolgono un ruolo essenziale in un'analisi ICP-AES significativa. Per la calibrazione degli strumenti, nel caso di curve di calibrazione lineari, è in genere necessario misurare soluzioni di calibrazione di quattro sole concentrazioni, in quanto le curve di calibrazione dell'ICP-AES sono in genere lineari su quattro-sei ordini di grandezza di concentrazione. La calibrazione del sistema ICP-AES è eseguita, in genere, con uno standard multi-elemento a sua volta preparato in una soluzione che contiene la stessa concentrazione di acido della soluzione di misurazione. Si verificano le concentrazioni degli elementi per la curva lineare.

La scelta delle lunghezze d'onda per la misura delle emissioni da parte degli analiti è adeguata alle concentrazioni degli elementi da determinare. Quando la concentrazione dell'analita ricade all'esterno dell'intervallo operativo di una linea di emissione si impiega una linea di emissione differente. Si sceglie innanzitutto la linea di emissione più sensibile (senza interferenze) e successivamente una linea meno sensibile. Quando si lavora in prossimità o al limite di rilevazione, la scelta migliore è rappresentata dalla linea più sensibile per il rispettivo analita. Le principali difficoltà nella ICP-AES sono provocate dalle interferenze dello spettro e del fondo. Le possibili interferenze sono, ad esempio, lo spostamento semplice del fondo (simple background shift), lo spostamento inclinato del fondo (sloping background shift), la sovrapposizione diretta degli spettri e lo spostamento complesso del fondo (complex background shift). Ciascuna di queste interferenze ha cause e rimedi specifici. A seconda delle matrici, si applicano correzioni alle interferenze e si devono ottimizzare i parametri operativi. Alcune interferenze possono essere evitate per mezzo della diluizione o adattando le matrici. Il materiale di riferimento e fortificato contenente quantità note dell'analita (o degli analiti), nonché il materiale bianco, è trattato in modo identico ai campioni da analizzare con ogni lotto di campioni analizzati. Se l'analisi è volta a riscontrare una deviazione, lo standard è verificato, ad esempio, dopo dieci campioni. Tutti i reagenti e il gas plasma sono della massima purezza disponibile.

2.4.8. **Prescrizioni specifiche per la spettrometria di massa ad accoppiamento induttivo (ICP-MS) (11)**

La determinazione di elementi di massa atomica media presenti in tracce, quali cromo, rame e nichel può essere soggetta a forti interferenze da parte di altri ioni isobarici e poliatomici. È possibile superare tali interferenze solo se è disponibile una potenza di risoluzione pari ad almeno 7 000-8 000. Le difficoltà collegate alle tecniche di MS comprendono la deviazione strumentale, gli effetti della matrice e l'interferenza degli ioni molecolari ($m/z < 80$). Per correggere la deviazione degli strumenti e gli effetti della matrice è richiesta una standardizzazione interna multipla che copra lo stesso intervallo di massa degli elementi da determinare.

Prima delle misurazioni per mezzo della ICP-MS è richiesta la completa decomposizione della materia organica nei campioni. Come avviene per l'AAS, dopo la digestione in recipienti sigillati gli elementi volatili, ad esempio lo iodio, devono essere trasferiti ad uno stato di ossidazione stabile. Le combinazioni di ioni molecolari di argon (gas di plasma), idrogeno, carbonio, azoto ed ossigeno (acidi di dissoluzione, impurità del gas di plasma e gas atmosferici catturati) e la matrice del campione provocano interferenze particolarmente forti. Per evitare interferenze sono necessarie la digestione completa, le misurazioni del fondo, la scelta appropriata delle masse da analizzare, talvolta associata a una scarsa abbondanza (limite di rilevazione più basso) e degli acidi di dissoluzione, ad esempio l'acido nitrico.

Per gli elementi da determinare, le interferenze devono essere escluse dalla scelta appropriata di masse analitiche specifiche, compresa la conferma delle proporzioni di isotopi. Per ciascuna misurazione si verifica la risposta strumentale prendendo in considerazione fattori Fano, attraverso l'impiego di standard interni.

3. VALIDAZIONE

La validazione dimostra che il metodo analitico è conforme ai criteri applicabili per le caratteristiche di rendimento pertinenti.

Finalità di controllo differenti richiedono categorie di metodi differenti. Nella tabella che segue sono illustrate le caratteristiche di rendimento da verificare per ogni tipi di metodo.

Tabella 9

Classificazione di metodi analitici in base alle caratteristiche di rendimento che devono essere determinate

		Limite di rilevazione CC β	Limite di decisione CC α	Esattezza/Recupero	Precisione	Selettività/ Specificità	Applicabilità/ Robustezza/Stabilità
Metodi qualitativi	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Metodi quantitativi	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = metodi di screening; C = metodi di conferma; + = la determinazione è obbligatoria.

3.1. PROCEDURE DI VALIDAZIONE

Nel presente capitolo sono illustrati esempi e/o riferimenti per le procedure di validazione dei metodi analitici. Per dimostrare che il metodo analitico è conforme ai criteri di rendimento per le caratteristiche di rendimento possono essere utilizzati altri approcci, a patto che forniscano informazioni di pari livello e qualità.

La validazione può inoltre essere eseguita attraverso uno studio inter-laboratorio, quali quelli istituiti dal Codex Alimentarius, dall'ISO o dall'IUPAC (12) oppure in base a metodi alternativi, quali studi condotti in singoli laboratori o attraverso la validazione interna (13)(14). In questa parte ci si concentra sugli studi condotti in singoli laboratori (o validazione interna) utilizzando una strategia modulare. Questo approccio prevede:

- 1) un gruppo di caratteristiche di rendimento comuni indipendenti dal modello di validazione utilizzato; e
- 2) procedure dipendenti dal modello più specifiche descritte nella tabella 10.

Tabella 10

Parametri di rendimento dipendenti e indipendenti dal modello

Validazione		
Parametri di rendimento indipendenti dal modello	Parametri di rendimento dipendenti dal modello	
Caratteristiche di rendimento comuni (3.1.1)	Approccio di validazione convenzionale (3.1.2)	Approccio di validazione interno (3.1.3)
Specificità	Recupero	Recupero
Esattezza	Ripetibilità	Ripetibilità
Robustezza: cambiamenti lievi	Riproducibilità intralaboratorio	Riproducibilità intralaboratorio
Stabilità	Riproducibilità	Riproducibilità
	Limite di decisione (CC α)	Limite di decisione (CC α)
	Capacità di rilevazione (CC β)	Capacità di rilevazione (CC β)
	Curve di calibrazione	Curva di calibrazione
	Robustezza: cambiamenti significativi	Robustezza

3.1.1. Caratteristiche di rendimento indipendenti dal modello

Le caratteristiche di rendimento che seguono devono essere determinate a prescindere dall'approccio di validazione scelto. Per ridurre al minimo il carico di lavoro, per combinare gli esperimenti eseguiti per determinare parametri differenti potrà essere impiegato un approccio studiato con attenzione e valido dal punto di vista statistico.

3.1.1.1. Specificità

Per i metodi analitici riveste importanza la capacità di discriminazione tra l'analita e sostanze strettamente correlate (isomeri, metaboliti, prodotti di degradazione, sostanze endogene, componenti della matrice, ecc.). Per verificare la presenza di interferenze sono necessari due approcci.

Si scelgono pertanto due sostanze potenzialmente in grado di interferirsi e si devono analizzare i campioni bianchi pertinenti per rilevare la presenza di possibili interferenze e valutarne gli effetti:

- Selezionare una gamma di composti chimicamente correlati (metaboliti, derivati, ecc.) o altre sostanze che è probabile riscontrare con il composto in esame e che possono essere presenti nei campioni.
- Analizzare un numero adeguato di campioni bianchi rappresentativi ($n \geq 20$) e verificare la presenza di eventuali interferenze (segnali, picchi, tracce di ioni) nella regione interessata alla quale l'analita in fase di studio deve eluire.
- In aggiunta, i campioni bianchi rappresentativi sono fortificati ad una concentrazione pertinente con sostanze che possono interferire con l'identificazione e/o la quantificazione dell'analita.
- Dopo l'analisi, verificare se:
 - la presenza può portare a una falsa identificazione,
 - l'identificazione dell'analita bersaglio è ostacolata dalla presenza di una o più interferenze, oppure
 - se la quantificazione è influenzata in modo percettibile.

3.1.1.2. Esattezza

Nel presente paragrafo si descrive la determinazione dell'esattezza (una componente dell'accuratezza) che può essere stabilita solo per mezzo di un materiale di riferimento certificato (MRC). Un MRC deve essere utilizzato ogniqualvolta sia disponibile. La procedura è descritta dettagliatamente nella ISO 5725-4 (5). Di seguito ne viene riportato un esempio:

- Analizzare sei duplicati dell'MRC in base alle istruzioni di test per il metodo.
- Determinare la concentrazione dell'analita presente in ciascun campione dei duplicati.
- Calcolare la media, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (%) per tali concentrazioni.
- Calcolare l'esattezza dividendo la concentrazione media rilevata per il valore certificato (misurato come concentrazione) e moltiplicarlo per 100, per esprimere il risultato come una percentuale:

Esattezza (%) = concentrazione media rilevata corretta per il recupero \times 100/valore certificato.

Se non è disponibile alcun MRC, anziché l'esattezza, il recupero potrà essere determinato come descritto al paragrafo 4.1.2.1 in seguito.

3.1.1.3. Robustezza/applicabilità (cambiamenti lievi)

Tali studi impiegano l'introduzione di lievi variazioni ragionevoli da parte del laboratorio e ne osservano le conseguenze.

Gli studi pre-investigativi devono essere svolti scegliendo fattori del pretrattamento, della pulitura e dell'analisi del campione che possono influenzare i risultati della misurazione. Tali fattori possono comprendere l'analista, l'origine e l'età dei reagenti, dei solventi degli standard e degli estratti del campione, la velocità di riscaldamento, la temperatura, il valore del pH, nonché numerosi altri eventi che possono verificarsi in laboratorio. Tali fattori devono essere modificati in un ordine di grandezza che corrisponde alle deviazioni riscontrate in genere nei laboratori.

- Identificare possibili fattori che potrebbero influenzare i risultati.
- Variare leggermente ciascun fattore.

- Eseguire un test di robustezza utilizzando l'approccio di Youden (15) (16). (A questo punto è possibile utilizzare anche altri metodi approvati. L'approccio di Youden, tuttavia, consente di ridurre al minimo il tempo e l'impegno richiesti). L'approccio di Youden è studiato come metodo fattoriale frazionale e non consente di rilevare le interazioni tra i differenti fattori.
- Quando si riscontra che un fattore influenza i risultati delle misurazioni in modo significativo, condurre ulteriori esperimenti per decidere i limiti accettabili per tale fattore.
- Nel protocollo del metodo devono essere indicati chiaramente i fattori che influenzano i risultati in modo significativo.

L'idea basilare non è quella di studiare un cambiamento alla volta, ma di introdurre numerose variazioni contemporaneamente. Ad esempio, si presuma che A, B, C, D, E, F, G indichino i valori nominali di sette fattori differenti che possono influenzare i risultati se i loro valori nominali vengono variati leggermente. Si presuma che i valori alternativi siano indicati dalle lettere minuscole corrispondenti a, b, c, d, e, f, g. Ciò produce 2⁷ o 128 diverse possibili combinazioni.

È possibile scegliere un sottoinsieme di otto di queste combinazioni che presentano un equilibrio tra lettere maiuscole e minuscole (tabella 11). È necessario eseguire otto determinazioni che utilizzeranno una combinazione dei fattori scelti (A-G). I risultati delle determinazioni sono riportati nella tabella 11 come S-Z.

Tabella 11

Progetto sperimentale per gli studi di robustezza (cambiamenti lievi)

Valore di fattore F	N. di combinazioni di determinazioni							
	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
Risultato osservato R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Per i calcoli si vedano gli esempi delle prove di robustezza al punto 3.3.

3.1.1.4. Stabilità

È stato osservato che un'insufficiente stabilità dell'analita o dei costituenti della matrice nel campione durante la conservazione o l'analisi può dare luogo a deviazioni significative nel risultato finale dell'analisi. Si deve inoltre verificare la stabilità dello standard di calibrazione nella soluzione. La stabilità dell'analita è in genere ben caratterizzata in svariate condizioni di conservazione. Il monitoraggio della condizione di conservazione sarà parte del normale sistema di accreditamento del laboratorio. Di seguito vengono riportati esempi di come determinare la stabilità quando la condizione di conservazione non è nota.

Stabilità dell'analita in soluzione:

- Preparare soluzioni di base fresche dell'analita/degli analiti e diluire secondo quanto specificato nelle istruzioni del test per ottenere un numero di aliquote sufficiente (ad esempio, 40) di ciascuna concentrazione selezionata (a circa il limite minimo di rendimento richiesto per le sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito o a circa il limite consentito per le altre sostanze). Preparare entrambe le soluzioni dell'analita impiegate per la fortificazione e utilizzate nella soluzione finale da analizzare e qualsiasi altra soluzione che possa interessare (ad esempio, standard derivati).
- Misurare il contenuto di analita nella soluzione appena preparata attenendosi alle istruzioni del test.
- Versare volumi appropriati in contenitori adeguati, etichettarli e riporli seguendo lo schema:

Tabella 12

Schema per la determinazione della stabilità dell'analita in soluzione

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Buio	10 aliquote	10 aliquote	10 aliquote
Luce			10 aliquote

- Per il tempo di conservazione si potrà scegliere 1, 2, 3 e 4 settimane o più, se necessario, vale a dire fino alla comparsa dei primi fenomeni di degrado durante l'identificazione e/o la quantificazione. Devono essere registrati il tempo di conservazione massimo e le condizioni di conservazione ottimali.
- Il calcolo della concentrazione dell'analita/degli analiti in ciascuna aliquota deve essere eseguito utilizzando la soluzione al 100 % dell'analita appena preparata al momento dell'analisi.

$$\text{Analita restante (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fresca}}$$

C_i concentrazione al tempo preso in esame

C_{fresca} concentrazione della soluzione fresca

Stabilità dell'analita/degli analiti nella matrice

- Ogniqualvolta sia possibile devono essere utilizzati campioni reali. Ove non sia disponibile alcun materiale di questo tipo, deve essere utilizzata la matrice fortificata con l'analita.
- Ove sia disponibile materiale di questo tipo, la concentrazione nel materiale deve essere determinata mentre il materiale è ancora fresco. Dopo 1, 2, 4 e 20 settimane devono essere prelevate ulteriori aliquote del materiale e si devono determinare le concentrazioni. Il tessuto deve essere conservato ad almeno -20 °C o a temperature inferiori, se richiesto.
- Se non è disponibile alcun materiale di tale tipo, prendere del materiale bianco e omogeneizzarlo. Dividere il materiale in 5 aliquote. Fortificare ciascuna aliquota con l'analita che deve preferibilmente essere preparato in una piccola quantità di soluzione acquosa. Analizzare un'aliquota immediatamente. Conservare le aliquote restanti ad almeno -20 °C, o a temperature inferiori, ed analizzarle dopo 1, 2, 4 e 20 settimane.

3.1.1.5. Curve di calibrazione

Quando per la quantificazione vengono impiegate curve di calibrazione:

- nella costruzione della curva devono essere utilizzati almeno cinque livelli (compreso lo zero),
- si deve descrivere la curva operativa della curva,
- si deve descrivere la formula matematica della curva e la bontà dell'adattamento dei dati sulla curva,
- si devono descrivere gli intervalli di accettabilità per i parametri della curva.

Ove sia necessaria una calibrazione seriale basata su una soluzione standard, si indicano gli intervalli accettabili per i parametri della curva di calibrazione che possono variare da serie a serie.

3.1.2. Procedure di validazione convenzionali

Il calcolo dei parametri in base ai metodi convenzionali richiede l'esecuzione di svariati esperimenti singoli. Per ciascuna modifica importante si deve determinare la caratteristica di rendimento (cfr. il paragrafo «Robustezza/applicabilità», in precedenza). Per i metodi ad analita multiplo è possibile analizzare contemporaneamente svariati analiti, previa esclusione di possibili interferenze specifiche. In tal modo è possibile determinare svariate caratteristiche. Pertanto, per ridurre il carico di lavoro è consigliabile combinare per quanto possibile gli esperimenti (ad esempio, ripetibilità e riproducibilità intra-laboratorio con la specificità, analisi dei campioni bianchi per determinare il limite di decisione e test della specificità).

3.1.2.1. Recupero

Se non esiste alcun MRC, il recupero deve essere determinato per mezzo di esperimenti che impiegano una matrice bianca fortificata ricorrendo, ad esempio, al seguente schema:

- selezionare 18 aliquote di un materiale bianco e fortificare 6 aliquote a 1, 1,5 e 2 volte ciascuna il limite di rendimento minimo richiesto oppure a 0,5, 1 e 1,5 volte il limite consentito,
- analizzare i campioni e calcolare la concentrazione presente in ciascun campione,

- utilizzando l'equazione che segue, calcolare il recupero per ciascun campione,
- calcolare il recupero medio e il CV derivante dai 6 risultati a ciascun livello,
- recupero % = $100 \times \text{Contenuto misurato} / \text{Livello di fortificazione}$.

Questo metodo convenzionale per la determinazione del recupero è una variante del metodo di aggiunta dello standard descritto al punto 3.5, quando:

- il campione è considerato un campione bianco anziché un campione da analizzare,
- si considera che il componente finale ⁽¹⁾ e il recupero ⁽²⁾ per le due porzioni di analisi siano simili,
- i campioni da analizzare hanno la stessa massa e gli estratti dell'aliquota hanno lo stesso volume,
- la quantità di standard di calibrazione aggiunta alla seconda aliquota (drogata) da analizzare è rilevata xADD. (xADD = $\rho A.VA$),
- x1 è il valore misurato per il bianco e x2 è il valore misurato per la seconda aliquota (drogata) da analizzare,
- pertanto, % recupero = $100 (x2 - x1) / xADD$.

Ove non sia soddisfatta (o si presuma) di non soddisfare una qualsiasi delle condizioni elencate in precedenza, si deve eseguire la procedura completa per la determinazione del recupero per mezzo del metodo di aggiunta dello standard, come descritto al punto 3.5.

3.1.2.2. Ripetibilità

- Preparare un gruppo di campioni di matrice identica, fortificata con l'analita in modo da produrre concentrazioni equivalenti a 1, 1,5 e 2 volte il limite di rendimento minimo richiesto oppure a 0,5, 1 e 1,5 volte il limite consentito.
- L'analisi deve essere eseguita con almeno sei duplicati ad ogni livello.
- Analizzare i campioni.
- Calcolare la concentrazione rilevata in ciascun campione.
- Trovare la concentrazione media, la deviazione standard e il coefficiente di variazione (%) dei campioni fortificati.
- Ripetere tali passaggi in almeno altre due occasioni.
- Calcolare le concentrazioni medie complessive ed i CV per i campioni fortificati.

3.1.2.3. Riproducibilità intra-laboratorio

- Preparare un gruppo di campioni del materiale da analizzare specificato (matrici identiche o differenti), fortificati con l'analita/gli analiti per produrre concentrazioni equivalenti a 1, 1,5 e 2 volte il limite minimo di rendimento richiesto oppure a 0,5, 1 e 1,5 volte il limite consentito.
- L'analisi deve essere eseguita con almeno sei duplicati ad ogni livello.
- Se possibile, ripetere tali passaggi in almeno altre due occasioni con operatori differenti ed in condizioni ambientali differenti, ad esempio, lotti di reagenti o di solventi differenti, ecc., temperature ambientali differenti, strumenti differenti, ecc.
- Analizzare i campioni.
- Calcolare la concentrazione rilevata in ciascun campione.
- Trovare la concentrazione media, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (%) dei campioni fortificati.

3.1.2.4. Riproducibilità

Quando si deve verificare la riproducibilità, i laboratori devono partecipare a studi collaborativi in base alla ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. Limite di decisione (CCa)

Il limite di decisione deve essere definito secondo i requisiti per l'identificazione o l'identificazione più la quantificazione in base alle definizioni contenute nella parte 2 «Criteri di rendimento e altre prescrizioni per i metodi analitici».

⁽¹⁾ Componente finale: quella frazione di massa dell'analita contenuta nel campione che è presente nell'estratto finale.

⁽²⁾ Recupero (in questo contesto): quella frazione di massa dell'analita aggiunta al campione, che è presente nell'estratto finale. Nel resto del documento si presume che componente finale e recupero siano uguali e pertanto si impiegherà solo il termine «recupero».

Nel caso di sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito è possibile stabilire il CC α :

- per mezzo della procedura della curva di calibrazione in base alla ISO 11843 (17) (qui denominato valore critico della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco che viene fortificato al livello di rendimento minimo richiesto, o al di sotto di tale livello, ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni. Dopo l'identificazione, tracciare il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente al punto di intercettazione dell'asse y più 2,33 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio del punto di intercettazione equivale al limite di decisione. Questo metodo si applica solo alle analisi quantitative ($\alpha = 1\%$).
- In alternativa, analizzando almeno 20 materiali bianchi per matrice per essere in grado di calcolare il rapporto segnale-rumore nell'intervallo di tempo al quale è previsto l'analita. Possono essere utilizzati come limite di decisione tre rapporti segnale-rumore. Questo metodo si applica alle analisi quantitative e qualitative.

Nel caso di sostanze per le quali è stato stabilito un limite consentito è possibile stabilire il CC α :

- Per mezzo della procedura della curva di calibrazione in base alla ISO 11843 (17) (qui denominato valore critico della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco che viene fortificato al limite consentito ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni. Dopo l'identificazione, tracciare il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente al limite consentito più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio equivale al limite di decisione ($\alpha = 5\%$).
- In alternativa, analizzando almeno 20 materiali bianchi per matrice fortificati con l'analita/gli analiti al limite consentito. La concentrazione al limite consentito più 1,64 volte la deviazione standard corrispondente equivale al limite di decisione ($\alpha = 5\%$).

Cfr. inoltre l'articolo 5 e il punto 3.2.

3.1.2.6. Capacità di rilevazione (CC β)

La capacità di rilevazione deve essere determinata in base alle prescrizioni per lo screening, l'identificazione o l'identificazione più la quantificazione come definite in precedenza (cfr. la parte 2).

Nel caso di sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito è possibile stabilire il CC β :

- Per mezzo della procedura della curva di calibrazione in base alla ISO 11843 (17) (qui denominato valore critico della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco rappresentativo, che viene fortificato al livello di rendimento minimo richiesto, o al di sotto di tale livello, ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni. Dopo l'identificazione, tracciare il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente al limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio del contenuto medio misurato al limite di decisione equivale alla capacità di rilevamento ($\beta = 5\%$).
- In alternativa, analizzando almeno 20 materiali bianchi per matrice fortificati con l'analita/gli analiti al limite di decisione. Analizzare i campioni ed identificare gli analiti. Il valore del limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio del contenuto misurato equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$).
- Quando non sono disponibili risultati quantitativi la capacità di rilevazione può essere determinata dallo studio del materiale bianco fortificato al limite di decisione e oltre. In questo caso il livello di concentrazione, dove rimangono solo $\leq 5\%$ di falsi risultati conformi, equivale alla capacità di rilevazione del metodo. Al fine di garantire una base affidabile per tale determinazione si devono pertanto eseguire almeno 20 studi per almeno un livello di concentrazione.

Nel caso di sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito è possibile stabilire il CC β :

- per mezzo della procedura della curva di calibrazione in base alla ISO 11843 (17) (qui denominato valore critico della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco rappresentativo, che viene fortificato al limite consentito ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni ed identificare l'analita/gli analiti. Calcolare la deviazione standard del contenuto medio misurato al limite di decisione. La concentrazione corrispondente al valore del limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intra-laboratorio equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$).
- In alternativa, analizzando almeno 20 materiali bianchi per matrice fortificati con l'analita/gli analiti al limite di decisione. Il valore del limite di decisione più 1,64 volte la deviazione standard corrispondente equivale alla capacità di rilevazione ($\beta = 5\%$).

Cfr. inoltre la sezione 3.2.

3.1.2.7. Robustezza (cambiamenti significativi)

Il metodo analitico deve essere testato in condizioni sperimentali differenti che comprendono, ad esempio, specie differenti, matrici differenti o condizioni di campionatura differenti. I cambiamenti introdotti devono essere importanti. L'importanza di tali cambiamenti può essere valutata, ad esempio, utilizzando l'approccio di Youden (15) (16). Si deve determinare la caratteristica di rendimento per tutti i cambiamenti significativi che hanno dimostrato di avere un effetto significativo sul rendimento dell'analisi.

3.1.3. Validazione in base a modelli alternativi

Ove si applichino procedure di validazione alternative, sono definiti nel protocollo di validazione il modello e la strategia di base con i rispettivi requisiti, ipotesi, e formule o si riportano almeno riferimenti circa la loro disponibilità. In seguito viene presentato un esempio di un approccio alternativo. Quando si applica, ad esempio, il modello di validazione interno, le caratteristiche di rendimento sono determinate in modo da consentire la validazione per cambiamenti significativi entro la stessa procedura di validazione. Ciò comporta la necessità di progettare un piano sperimentale per la validazione.

3.1.3.1. Piano sperimentale

Un piano sperimentale deve essere progettato in base al numero delle varie specie e dei differenti fattori in corso di studio. Come primo passo dell'intera procedura di validazione si considerano pertanto le popolazioni campione che verranno analizzate in futuro in laboratorio al fine di selezionare le specie più importanti e quei fattori che potrebbero influenzare i risultati delle misurazioni. In seguito si sceglie l'intervallo di concentrazione in modo adeguato allo scopo in base al livello di interesse.

Esempio:

- Con il metodo analitico in corso di validazione è possibile studiare svariati analiti contemporaneamente.
- Sono state individuate due variazioni del fattore principale (A e B). I fattori principali costituiscono la base sulla quale vengono combinati i livelli dei fattori. Tali fattori principali possono comprendere fattori quali specie o matrice. Nell'esempio che segue il fattore principale ha subito una variazione su due livelli, vale a dire sono state considerate due specie differenti (specie A e specie B). In generale è possibile variare i fattori principali su più di due livelli e questo non fa altro che aumentare il numero di analisi da eseguire.
- I fattori selezionati devono essere variati su due livelli (indicati come + o -).

Tabella 13

Esempi di fattori considerati importanti per una procedura di validazione

Sesso dell'animale	(fattore 1)
Razza	(fattore 2)
Condizioni di trasporto	(fattore 3)
Condizioni di conservazione	(fattore 4)
Freschezza del campione	(fattore 5)
Condizioni di ingrasso	(fattore 6)
Operatori differenti con esperienza differente	(fattore 7)

Tabella 14

Possibile piano sperimentale per l'esempio precedente

Specie	Fattore 1	Fattore 2	Fattore 3	Fattore 4	Fattore 5	Fattore 6	Fattore 7	Fattore 8
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Specie	Fattore 1	Fattore 2	Fattore 3	Fattore 4	Fattore 5	Fattore 6	Fattore 7	Fattore 8
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Dato che ciascun campione (ciascuna combinazione di livello di fattori) deve essere drogato con 4 concentrazioni differenti al livello di interesse e che è necessario analizzare un campione bianco per ciascun livello, per l'intero esperimento di validazione si devono eseguire $5 \times 16 = 80$.

Da questi 80 risultati delle misurazioni è possibile calcolare (13) (14):

Recupero

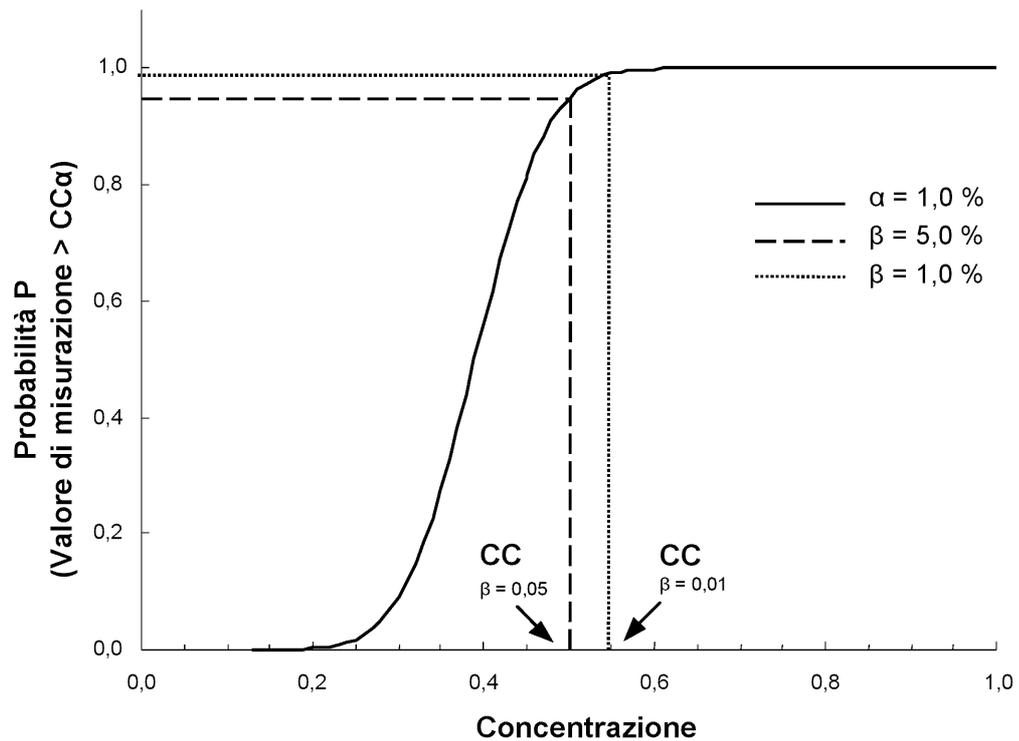
- Ripetibilità per livello di concentrazione (sir)
- Riproducibilità intra-laboratorio per livello di concentrazione (siR)
- Limite di decisione (CC α)
- Capacità di rilevazione (CC β)
- Curva di potenza (tasso di errore β rispetto alla concentrazione) (cfr. 3.1.3.2)
- Robustezza rispetto a cambiamenti significativi; la robustezza rispetto ai cambiamenti lievi può essere determinata in base al paragrafo 3.1.1.3)
- 16 curve di calibrazione correlate al campione
- 1 curva di calibrazione complessiva
- Intervallo di previsione della curva di calibrazione complessiva
- Deviazioni prodotte dalla matrice (smat)
- Deviazioni prodotte dal ciclo operativo (srun)
- Effetto dei singoli fattori sui risultati delle misurazioni

Tali caratteristiche di rendimento consentono una valutazione esauriente del livello di rendimento del metodo, dato che viene studiato non solo l'effetto dei singoli fattori, ma anche le combinazioni pertinenti di tali fattori. Con l'aiuto di tale progetto sperimentale è possibile decidere se occorre escludere dalla curva di calibrazione complessiva questo o quel fattore selezionato, in quanto devia in modo significativo dalle deviazioni standard degli altri fattori.

3.1.3.2. Curva di potenza

La curva di potenza fornisce informazioni sulla capacità di rilevazione del metodo entro l'intervallo di concentrazione scelto. Si riferisce al rischio di errore β quando si applica il metodo studiato. La curva di potenza consente di calcolare le capacità di rilevazione per le rispettive categorie (screening, conferma) o per i rispettivi tipi (qualitativo o quantitativo) di metodi per un determinato errore β (ad esempio, 5 %).

Figura 1:
Curva di potenza



Nella figura 1 è riportato un esempio della rappresentazione grafica della capacità di rilevazione ($CC\beta$) di un metodo analitico. Questo particolare metodo ha il rischio residuo del 5 % di prendere una decisione falsa ad una concentrazione di 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Ad una concentrazione di 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ il rischio di prendere una decisione di falsa conformità scende all'1 %.

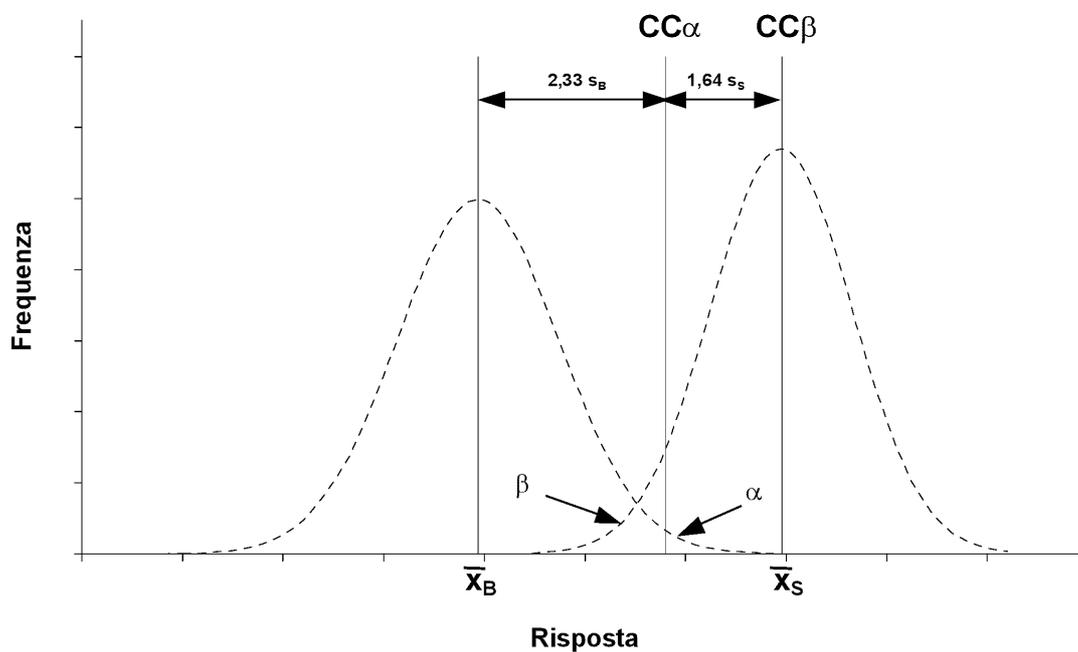
3.1.3.3. Riproducibilità

La determinazione della riproducibilità di un metodo da parte degli studi di laboratorio singolo (validazione interna) richiede la partecipazione ripetuta a studi di competenza in base alle guide ISO 43-1(3) e 43-2(4). I laboratori hanno la facoltà di scegliere i propri metodi, a patto che tali metodi vengano impiegati in condizioni di routine. La deviazione standard del laboratorio può essere utilizzata per valutare la riproducibilità del metodo.

3.2. RAPPRESENTAZIONE GRAFICA DEI DIVERSI LIMITI ANALITICI

Figura 2:

Sostanze per le quali non è stato stabilito un limite consentito



\bar{X}_S Valore medio di risposta del campione contaminato

s_B Deviazione standard del campione bianco (determinata in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio)

s_S Deviazione del campione contaminato (determinata in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio)

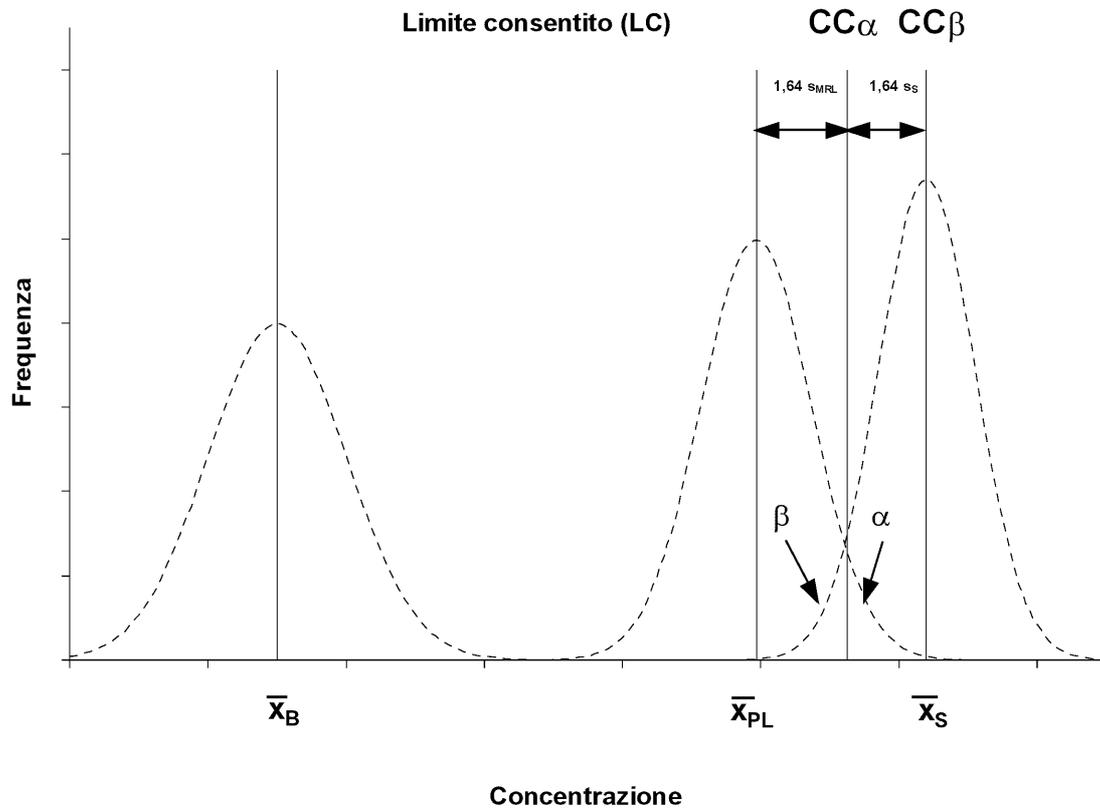
α Tasso di risultati falsi non conformi

β Tasso di risultati falsi conformi

$CC\alpha$ Risposta con un errore α dato ed un errore β del 50 %

$CC\beta$ Risposta con un errore α particolarmente piccolo ed un errore β dato

Figura 3:
Sostanze con un limite consentito stabilito



- \bar{x}_B «Concentrazione» media del campione bianco
- \bar{x}_{PL} Concentrazione media del campione contenente l'analita al limite consentito
- \bar{x}_S Concentrazione media del campione contaminato
- s_{PL} Deviazione standard del campione contenente l'analita al livello consentito (determinata in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio)
- s_S Deviazione standard del campione contaminato (determinata in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio)
- α Tasso di risultati falsi non conformi
- β Tasso di risultati falsi conformi
- CC_α Risposta con un errore α dato ed un errore β del 50 %
- CC_β Risposta con un errore α particolarmente piccolo ed un errore β dato

3.3. ESEMPIO DI CALCOLO DEL TEST DI ROBUSTEZZA PER CAMBIAMENTI LIEVI SECONDO L'APPROCCIO DI YOUNDEN (16)

Raffronto delle medie (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Confrontare le medie delle lettere maiuscole (da AA a AG) con le medie delle lettere minuscole corrispondenti (da Aa a Ag). Se un fattore ha un effetto, la differenza sarà significativamente superiore rispetto alle differenze degli altri fattori.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	Un metodo robusto non deve essere influenzato dai cambiamenti riscontrati quasi certamente da un laboratorio all'altro.
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	Se non è presente alcuna differenza notevole, la misura più realistica dell'errore casuale è data dalle sette differenze.
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Differenze (D_i)	Quadrato delle differenze (D_i^2)
$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	$D_a^2 =$ valore a
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	$D_b^2 =$ valore b
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	$D_c^2 =$ valore c
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	$D_d^2 =$ valore d
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	$D_e^2 =$ valore e
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	$D_f^2 =$ valore f
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	$D_g^2 =$ valore g

Deviazione standard delle differenze $D_i(S_{D_i})$:

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

Quando la S_{D_i} è significativamente più grande della deviazione standard del metodo eseguito in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio (cfr. in precedenza), è inevitabile concludere che tutti i fattori insieme hanno un effetto sul risultato, anche se ciascun singolo fattore non mostra un'effetto significativo, e che il metodo non è sufficientemente robusto rispetto alle modifiche scelte.

3.4. ESEMPI DI CALCOLI PER LA PROCEDURA DI VALIDAZIONE INTERNA

Esempi e calcoli per il protocollo di validazione interna come descritto per la validazione secondo modelli alternativi (3.1.3.) (13) (14).

3.5. ESEMPI DI CALCOLI PER IL METODO DI AGGIUNTA DELLO STANDARD

Un campione da analizzare con un contenuto T dell'analita è diviso in due aliquote da analizzare 1 e 2, di massa m_1 e m_2 rispettivamente. L'aliquota 2 è drogata con un volume V_A di una soluzione di concentrazione ρ_A dell'analita. Dopo le fasi di estrazione e purificazione del metodo vengono ottenuti due estratti delle aliquote aventi rispettivamente volume V_1 e V_2 . Il recupero dell'analita deve essere rc . Entrambi gli estratti sono saggiati con un metodo di misurazione di sensibilità b e danno una risposta analitica, rispettivamente, di x_1 e x_2 .

Se si presume che rc e b siano identici per l'analita nel campione nativo e nel campione addizionato, allora il contenuto T potrà essere calcolato come:

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

Tale metodo consentirà la determinazione del recupero rc . Quindi, in aggiunta all'analisi descritta in precedenza, parte dell'estratto dell'aliquota 1 (di volume V_3) è drogata con una quantità nota $\rho_B \cdot V_B$ dell'analita e saggiata a sua volta. La risposta analitica è x_3 ed il recupero è:

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

È inoltre possibile calcolare la sensibilità b , come:

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

Sono state descritte tutte le condizioni di applicazioni e le informazioni dettagliate (18).

4. ABBREVIAZIONI UTILIZZATE NEL TESTO

AAS	Atomic Absorption Spectrometry, spettrometria dell'assorbimento atomico
AES	Atomic Emission Spectrometry, spettrometria di emissione atomica
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists Internazionale
B	Frazione combinata (immunoassay)
CI	Ionizzazione chimica
MRC	Materiale di riferimento certificato
CV	Coefficiente di variazione
2 D	Bidimensionale
DAD	Diode array detection, rilevazione tramite serie di diodi
DPASV	Differential pulse anodic stripping voltametry, voltammetria di ridissoluzione anodica differenziale ad impulsi
ECD	Electron capture detection, rilevazione della cattura degli elettroni
EI	Electronic impact ionisation, ionizzazione ad impatto elettronico
GC	Gas chromatography, gas cromatografia
HPLC	High performance liquid chromatography, cromatografia liquida ad alta efficienza
HPTLC	High performance thin layer chromatography, cromatografia su strato sottile ad alta risoluzione
HRMS	High resolution (mass spectrometry), alta risoluzione (spettrometria di massa)
ICP-AES	Inductively coupled plasma- atomic emission spectrometry, spettrometria di emissione atomica a plasma induttivo
ICP-MS	Inductively coupled plasma-mass spectrometry, spettrometria di massa a plasma induttivo
IR	Infrarosso
ISO	International Standard Organisation, Organizzazione internazionale per la standardizzazione
LC	Liquid chromatography, cromatografia liquida
LR(MS)	Low resolution (mass spectrometry), bassa risoluzione (spettrometria di massa)
LMRC	Limite minimo di rendimento richiesto
MS	Spettrometria di massa
m/z	Rapporto massa/carica
RF	Relative migration to the solvent front (TLC), migrazione relativa al fronte del solvente (TLC)
RSDL	Relative standard deviations of the laboratory, deviazioni standard relative del laboratorio
SIM	Selected ion monitoring, monitoraggio di ioni selezionati
TLC	Thin layer chromatography, cromatografia su strato sottile
UV	Ultra violet light, luce ultravioletta
VIS	Visible light, luce visibile

5. RIFERIMENTI

- (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) Cfr., ad esempio, 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, pag. 329.
 - (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, *Pure & Applied Chem*, 67, 331.
 - (13) Jülicher, B., Gowik, P. und Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173.
 - (14) Gowik, P., Jülicher, B. und Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. *J. Chromatogr.*, 716, 221.
 - (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.
 - (16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; «Statistical Manual of the AOAC – Association of Official Analytical Chemists», AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff.
 - (17) ISO 11843:1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case.
 - (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: «Yield or recovery: a world of difference». *Atti dell'8° Euro Food Chem*, Vienna, Austria, 18-20 settembre, (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, pagine 2-9.
 - (19) Direttiva 71/354/CEE del Consiglio, del 18 ottobre 1971, per il ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri relative alle unità di misura (GU L 243 del 29.10.1971, pag. 29).
 - (20) ISO 31-0:1992 Quantities and units — Part 0: General principles.
-