

32002D0657

L 221/8

EIROPAS KOPIENU OFICIĀLAIS VĒSTNESIS

17.8.2002.

KOMISIJAS LĒMUMS**(2002. gada 12. augusts),****ar ko īsteno Padomes Direktīvu 96/23/EK par analīzes metožu veiktspēju un rezultātu interpretēšanu***(izziņots ar dokumenta numuru C(2002) 3044)***(Dokuments attiecas uz EEZ)**

(2002/657/EK)

EIROPAS KOPIENU KOMISIJA,

ņemot vērā Eiropas Kopienas dibināšanas līgumu,

ņemot vērā Padomes 1996. gada 29. aprīļa Direktīvu 96/23/EK, ar ko nosaka pasākumus, lai kontrolētu noteiktas vielas un to atliekas dzīvos dzīvniekos un dzīvnieku valsts produktos, un ar ko atceļ Direktīvas 85/358/EEK un 86/469/EEK un Lēmumus 89/187/EEK un 91/664/EEK⁽¹⁾, un jo īpaši tās 15. panta 1. punkta otro daļu,

tā kā:

- (1) Atliekvielu klātbūtne dzīvnieku izcelsmes produktos ir pamats raizēm par sabiedrības veselību.
- (2) Komisijas 1998. gada 23. februāra Lēmums 98/179/EK, ar ko paredz noteikumus par oficiālu paraugu ņemšanu noteiktu vielu un to atlieku kontrolei dzīvos dzīvniekos un dzīvnieku valsts produktos⁽²⁾, nosaka, ka paraugu analīzes jāveic tikai tām laboratorijām, kuras valsts kompetentā iestāde apstiprinājusi oficiālai atliekvielu kontrolei.
- (3) Ir jānodrošina, lai oficiālai atliekvielu kontrolei apstiprināto laboratoriju iegūtie analīžu rezultāti būtu kvalitatīvi un salīdzināmi. Tas iespējams, izmantojot kvalitātes nodrošināšanas sistēmas un jo īpaši piemērojot metodes, kas apstiprinātas saskaņā ar kopējām procedūrām un veiktspējas kritērijiem, un nodrošinot kopīgo standartu vai standartu, par kuriem panākta vispārēja vienošanās, izsekojamību.
- (4) Padomes 1993. gada 29. oktobra Direktīva 93/99/EEK par papildu pasākumiem, kas attiecas uz pārtikas produktu oficiālo kontroli⁽³⁾, un Lēmums 98/179/EK

prasa no 2002. gada janvāra un uz priekšu saskaņā ar standartiem ISO 17025 (1) apstiprināt oficiālas kontroles laboratorijas. Ievērojot Lēmumu 98/179/EK, no apstiprinātām laboratorijām prasa līdzdalību starptautiski atzītās ārējas kvalitātes vērtēšanas un akreditācijas sistēmā. Turklāt apstiprinātām laboratorijām jāpierāda sava kompetence ar regulāru un veiksmīgu piedalīšanos atbilstošos kvalifikācijas pārbaudes projektos, ko atzīst vai organizē valsts vai Kopienas references laboratorijas.

- (5) Lai uzlabotu koordināciju, Kopienas references laboratoriju, valsts references laboratoriju un valsts kontroles laboratoriju tīkls darbojas saskaņā ar Direktīvu 96/23/EK.
- (6) Saisībā ar jauniem sasniegumiem analītiskajā ķīmijā kopš Direktīvas 96/23/EK pieņemšanas rutīnas metožu un references metožu koncepcijas ir aizstātas ar kritēriju metodi, kur ir noteikti veiktspējas kritēriji un procedūras skrīninga un apstiprinošo metožu validēšanai.
- (7) Lai nodrošinātu saskaņotu Direktīvas 96/23/EK īstenošanu, ir jānosaka kopīgi kritēriji oficiālo kontroles laboratoriju testu rezultātu interpretēšanai.
- (8) Lai nodrošinātu saskaņotu Direktīvas 96/23/EK īstenošanu, to vielu analīzes metodei, kurām nav noteikta atļautā robeža, un jo īpaši attiecībā uz tām vielām, kuru izmantošana nav atļauta vai ir īpaši aizliegta Kopienā, ir jāparedz pakāpeniska minimālās vajadzīgās veiktspējas robežu (MRPL) noteikšana.

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

(9) Komisijas 1990. gada 26. septembra Lēmums 90/515/EEK, ar ko nosaka references metodes smago metālu un arsēna atlieku noteikšanai ⁽¹⁾, Komisijas 1993. gada 14. maija Lēmums 93/256/EEK, ar ko nosaka metodes, kas piemērojamas tireostatiskas vai hormonālas iedarbības vielu atlieku noteikšanai ⁽²⁾, un Komisijas 1993. gada 15. aprīļa Lēmums 93/257/EEK, ar ko nosaka references metodes un valsts references laboratoriju sarakstu atliekvielu noteikšanai ⁽³⁾, kurā jaunākie grozījumi izdarīti ar Lēmumu 98/536/EK ⁽⁴⁾, ir pārskatīti, pirms tos, lai ņemtu vērā zinātnes un tehnikas sasniegumus, atzīst par novecojušiem savā darbības jomā un attiecībā uz noteikumiem, un tie ar šo lēmumu attiecīgi jāatceļ.

(10) Ir jānosaka pārejas periods, lai ļautu oficiālo paraugu analīzes metodes pielāgot šā lēmuma noteikumiem.

(11) Šajā lēmumā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar Pastāvīgās pārtikas aprites un dzīvnieku veselības komitejas atzinumu,

IR PIEŅĒMUSI ŠO LĒMUMU.

1. pants

Priekšmets un darbības joma

Šis lēmums paredz noteikumus analīzes metodēm, kas izmantojamas, pārbaudot oficiālus paraugus, kuri paņemti saskaņā ar Direktīvas 96/23/EK 15. panta 1. punkta otro teikumu, un precīzē kopīgus kritērijus oficiālo kontroles laboratoriju analīžu rezultātu interpretēšanai attiecībā uz šādiem paraugiem.

Šis lēmums neattiecas uz vielām, kurām citos Kopienas tiesību aktos paredzēti konkrētāki noteikumi.

2. pants

Definīcijas

Šajā lēmumā piemēro Direktīvā 96/23/EK un šā lēmuma pielikumā sniegtās definīcijas.

3. pants

Analīzes metodes

Dalībvalstis nodrošina, lai oficiālos paraugus, kas paņemti, ievērojot Direktīvu 96/23/EK, analizē, izmantojot metodes, kas:

- ir dokumentētas testa norādījumos, vēlams saskaņā ar ISO 78-2 (6);
- ir saskaņā ar šā lēmuma pielikuma 2. daļu;
- ir validētas saskaņā ar pielikuma 3. daļā aprakstītajām procedūrām;

⁽¹⁾ OV L 286, 18.10.1990., 33. lpp.

⁽²⁾ OV L 118, 14.5.1993., 64. lpp.

⁽³⁾ OV L 118, 14.5.1993., 75. lpp.

⁽⁴⁾ OV L 251, 11.9.1998., 39. lpp.

d) atbilst minimālās vajadzīgās veiktspējas robežām (MRPL), kas jānosaka saskaņā ar 4. pantu.

4. pants

Minimālās vajadzīgās veiktspējas robežas

Šis lēmums tiks pārskatīts, lai pakāpeniski izveidotu analīzes metožu minimālās vajadzīgās veiktspējas robežas (MRPL), kas izmantojamas vielām, kurām nav noteikta atļautā robeža.

5. pants

Kvalitātes kontrole

Dalībvalstis nodrošina saskaņā ar Direktīvu 96/23/EK paņemto paraugu analīzes rezultātu kvalitāti, jo īpaši ar kontroles testiem un/vai kalibrēšanas rezultātiem saskaņā ar ISO 17025 (1) 5.9. nodaļu.

6. pants

Rezultātu interpretācija

1. Analīzes rezultātu uzskata par neatbilstošu, ja analizējamās vielas apstiprinošās metodes izšķiršanas robeža ir pārsniegta.

2. Ja vielai ir noteikta atļautā robeža, izšķiršanas robeža ir koncentrācija, kuru pārsniedzot ar statistisku noteiktību 1 – α var nolemt, ka atļautā robeža patiešām ir pārsniegta.

3. Ja vielai nav noteikta atļautā robeža, izšķiršanas robeža ir mazākā koncentrācija, pie kādas ar statistisku noteiktību 1 – α metode ļauj noteikt konkrētās analizējamās vielas klātbūtni.

4. Direktīvas 96/23/EK I pielikuma A grupā uzskaitītajām vielām α kļūda ir 1 % vai mazāka. Visām citām vielām α kļūda ir 5 % vai mazāka.

7. pants

Atceļšana

Ar šo atceļ Lēmumus 90/515/EEK, 93/256/EEK un 93/257/EEK.

8. pants

Pārejas noteikumi

Direktīvas 96/23/EK I pielikuma A grupā uzskaitīto vielu oficiālo paraugu analīzes metodes, kas atbilst Lēmumos 90/515/EEK, 93/256/EEK un 93/257/EEK noteiktajiem kritērijiem, drīkst izmantot divus gadus pēc šā lēmuma stāšanās spēkā. Direktīvas 96/23/EK I pielikuma B grupā uzskaitītajām vielām pašlaik piemērojamas metodes atbildīs šim lēmumam ilgākais piecus gadus pēc šā lēmuma piemērošanas datuma.

9. pants

Piemērošanas datums

Šo lēmumu piemēro no 2002. gada 1. septembra.

10. pants

Adresāti

Šis lēmums ir adresēts dalībvalstīm.

Briselē, 2002. gada 12. augustā

Komisijas vārdā —

Komisijas loceklis

David BYRNE

PIELIKUMS

ANALĪZES METOŽU VEIKTSPĒJAS KRITĒRIJI, CITAS PRASĪBAS UN PROCEDŪRAS

1. DEFINĪCIJAS

- 1.1. Pareizība ir testa rezultāta tuva atbilstība apstiprinātajai references vērtībai (2). To nosaka, nosakot ticamību un precizitāti.
- 1.2. Alfa (α) kļūda ir varbūtība, ka testējamais paraugs ir atbilstīgs, pat ja to nosaka ar neatbilstības mērījumu (šķietamas neatbilstības pieņēmums).
- 1.3. Analizējamā viela ir viela, kas nosakāma, identificējama un/vai kvantificējama, un atvasinājumi, kas rodas tās analīzes laikā.
- 1.4. Beta (β) kļūda ir varbūtība, ka testējamais paraugs patiešām ir neatbilstīgs, pat ja to nosaka ar atbilstības mērījumu (šķietamas atbilstības pieņēmums).
- 1.5. Novirze ir starpība starp sagaidāmo testa rezultātu un apstiprināto references vērtību (2).
- 1.6. Kalibrēšanas standarts ir mērīšanas paņēmiens, kas reprezentē interesējošās vielas kvantitāti tā, ka saista tās vērtību ar references pamatu.
- 1.7. Sertificēts standartmateriāls (CRM) ir materiāls, kura sastāvā ir noteikts analizējamās vielas daudzums.
- 1.8. Paralēlā hromatogrāfija ir procedūra, kurā izvilkumu pirms hromatogrāfiskās analīzes posmiem sadala divās daļās. Pirmajai daļai veic hromatogrāfisko analīzi. Otrā daļā sajauc ar standarta analizējamo vielu, kurai jāveic mērījumi. Tad arī šim maisījumam veic hromatogrāfiju. Pievienotās standarta analizējamās vielas daudzumam ir jābūt līdzīgam aptuvenajam analizējamās vielas daudzumam izvilkmā. Šī metode ir paredzēta tam, lai uzlabotu analizējamās vielas identificēšanu, ja izmanto hromatogrāfijas metodes, jo īpaši, ja nevar izmantot nevienu piemērotu starptautisku standartu.
- 1.9. Salīdzinošais pētījums nozīmē to, ka analizē vienu un to pašu paraugu ar to pašu metodi, lai noteiktu šīs metodes veiktspējas rādītājus. Pētījums ietver nejausā mērījuma kļūdu un laboratorijas novirzi.
- 1.10. Apstiprinošās metodes ir metodes, ar ko iegūst pilnu informāciju vai papildinformāciju, kas ļauj nepārprotami identificēt vielu un vajadzības gadījumā līdz interesējošam līmenim to kvantificēt.
- 1.11. Izšķiršanas robeža (CC α) ir robeža, pie kādas vai virs kādas ar α varbūtības kļūdu var secināt, ka paraugs ir neatbilstošs.
- 1.12. Noteikšanas spēja (CC β) ir mazākais vielas saturs, kādu var noteikt, identificēt un/vai kvantificēt paraugā ar β varbūtības kļūdu. Ja vielai nav noteikta atļautā robeža, noteikšanas spēja ir mazākā koncentrācija, pie kādas metode patiešām ļauj noteikt inficētus paraugus ar $1 - \beta$ statistisko noteiktību. Ja vielai ir noteikta atļautā robeža, tas nozīmē, ka noteikšanas spēja ir koncentrācija, pie kādas metode ļauj noteikt koncentrācijas atļautajās robežās ar $1 - \beta$ statistisko noteiktību.
- 1.13. Stiprināts parauga materiāls ir paraugs, kas bagātināts ar zināmu analizējamās vielas, kas jānosaka, daudzumu.
- 1.14. Starplaboratoriju pētījums (salīdzinājums) nozīmē, ka divas vai vairāk laboratorijas vienam un tam pašam paraugam organizē un veic testus un novērtē to rezultātus saskaņā ar iepriekš definētiem nosacījumiem, lai noteiktu testēšanas veiktspēju. Atbilstoši mērķim pētījumu var klasificēt kā salīdzinošo pētījumu vai kvalifikācijas pētījumu.
- 1.15. Iekšējais standarts (IS) ir viela, kuras nav paraugā, bet kuras fizikāli ķīmiskās īpašības ir pēc iespējas līdzīgas nosakāmās analizējamās vielas īpašībām, un ko pievieno katram paraugam, kā arī katram kalibrēšanas standartam.
- 1.16. Laboratorijas paraugs ir paraugs, kas sagatavots nosūtīšanai uz laboratoriju un kas paredzēts pārbaudei vai testēšanai.
- 1.17. Interesējošais līmenis ir tāda vielas vai analizējamās vielas koncentrācija paraugā, kas ir būtiska, lai noteiktu tās atbilstību tiesību aktiem.
- 1.18. Minimālā vajadzīgā veiktspējas robeža (MRPL) ir analizējamās vielas minimālais saturs paraugā, ko var noteikt un apstiprināt. Tas ir vajadzīgs, lai saskaņotu analītisko veiktspēju metodēm, ar kurām nosaka vielas, kam nav noteikta atļautā robeža.

- 1.19. Veiktspējas rādītājs ir funkcionāla īpašība, kas piemīt analīzes metodei. Piemēram, tas var būt specifiskums, precīzība, ticamība, precizitāte, atkārtojamība, reproducējamība, atgūstamība, noteikšanas spēja un robustums.
- 1.20. Veiktspējas kritēriji ir prasības attiecībā uz veiktspējas rādītājiem, saskaņā ar ko var spriest, vai analīzes metode ir piemērota savam mērķim un vai tā dod uzticamus rezultātus.
- 1.21. Atļautā robeža ir vielas maksimālais atlieku daudzums, maksimālais līmenis vai cita maksimālā pielaide, kas citur noteikta Kopienas tiesību aktos.
- 1.22. Precizitāte ir tuva atbilstība starp neatkarīgu testu rezultātiem, kas iegūti, ievērojot izvirzītos (iepriekšnoteiktos) nosacījumus. Precizitātes mēru parasti izsaka kā neprecizitāti un aprēķina kā testa rezultāta standartnovirzi. Lielāka standartnovirze nosaka mazāku precizitāti (2).
- 1.23. Kvalifikācijas pētījums ir viena un tā paša parauga analīze, ļaujot laboratorijām pašām izvēlēties metodes, ja šīs metodes izmanto parastos apstākļos. Pētījums ir jāveic saskaņā ar ISO norādījumiem 43-1 (3) un 43-2 (4), un to var izmantot, lai novērtētu metožu reproducējamību.
- 1.24. Kvalitatīva metode ir analīzes metode, kas identificē vielu, pamatojoties uz tās ķīmiskajām, bioloģiskajām vai fizikālajām īpašībām.
- 1.25. Kvantitatīva metode ir analīzes metode, kas nosaka vielas daudzumu vai masas frakciju tā, ka to var izteikt kā pieņemto vienību skaitlisku vērtību.
- 1.26. Reaģenta tukšā noteikšana ir pilna analīzes procedūra, ko izpilda bez testa porcijas vai lietojot līdzvērtīgu piemērota šķīdinātāja daudzumu testa porcijas vietā.
- 1.27. Atgūstamība ir procentos izteikta vielas tīrā koncentrācija, kas atgūta analīzes procedūras gaitā. To nosaka validēšanas laikā, ja nav pieejams neviens apstiprināts standartmateriāls.
- 1.28. Standartmateriāls ir viela, kurai viena vai vairākas īpašības ir apstiprinātas ar validētu metodi tā, lai to varētu izmantot aparātūras kalibrēšanai vai lai verificētu mērīšanas metodi.
- 1.29. Atkārtojamība nozīmē precizitāti, ievērojot atkārtojamības nosacījumus (2).
- 1.30. Atkārtojamības nosacījumi ir nosacījumi, kad neatkarīgu testu rezultātus iegūst ar vienu un to pašu metodi identiskām testa vienībām vienā un tajā pašā laboratorijā tas pats operators, lietojot to pašu aprīkojumu (2).
- 1.31. Reproducējamība nozīmē precizitāti, ievērojot reproducējamības nosacījumus (2) (4).
- 1.32. Reproducējamības nosacījumi ir nosacījumi, kad testa rezultātus iegūst ar vienu un to pašu metodi identiskām testa vienībām dažādās laboratorijās dažādi operatori, lietojot dažādus aprīkojumus (2) (4).
- 1.33. Robustums nozīmē analīzes metodes jutīgumu pret izmaiņām eksperimenta nosacījumos, ko var izteikt kā parauga materiālu, analizējamo vielu, uzglabāšanas apstākļu, vides un/vai parauga sagatavošanas nosacījumu uzskaitījumu, saskaņā ar ko metodi var lietot bez izmaiņām vai ar konkrētām nelielām modifikācijām. Visiem eksperimenta nosacījumiem, kas praksē var būt pakļauti svārstībām (piemēram, reaģentu stabilitāte, parauga sastāvs, pH, temperatūra) jānorāda visas variācijas, kas var ietekmēt analītisko rezultātu.
- 1.34. Parauga tukšā noteikšana ir pilna analīzes procedūra, ko veic testa porcijai, kas paņemta no parauga, kurā nav analizējamās vielas.
- 1.35. Skrīninga metodes ir metodes, ko izmanto, lai noteiktu vielas vai vielu grupas klātbūtni interesējošajā līmenī. Šīs metodes ir jaudīgas, un tās izmanto, lai izanalizētu lielu skaitu paraugu potenciāli neatbilstošu rezultātu iegūšanai. Tās ir īpaši izstrādātas, lai nevarētu iegūt šķietami atbilstošus rezultātus.
- 1.36. Vienots laboratorijas pētījums (ieksēja validēšana) ir analītisks pētījums, kas ietver vienu laboratoriju, lietojot vienu analīzes metodi vieniem un tiem pašiem vai dažādiem testa materiāliem ar dažādiem nosacījumiem pamatota ilguma laikposmos.
- 1.37. Specifiskums ir metodes izšķirtspēja starp analizējamo vielu, ko mēra, un pārējām vielām. Šī īpašība lielākoties ir aprakstītās mērīšanas tehnikas funkcija, bet tā var atšķirties atkarībā no savienojuma grupas vai matricas.

- 1.38. Standarta pievienošana ir procedūra, kurā testa paraugu sadala divās (vai vairāk) testa porcijās. Vienu porciju analizē tādu, kāda tā ir, bet pārējām porcijām pirms analīzes pievieno noteiktus daudzumus standarta analizējamās vielas. Pievienotās standarta analizējamās vielas daudzums ir divas līdz piecas reizes lielāks nekā novērtētais analizējamās vielas daudzums paraugā. Šī procedūra ir paredzēta tam, lai noteiktu analizējamās vielas saturu paraugā, ņemot vērā analīzes procedūras atgūstamību.
- 1.39. Standarta analizējamā viela ir analizējamā viela ar zināmu un apstiprinātu sastāvu un tīrību, kas analizēs izmantotā kā atsauci.
- 1.40. Viela ir viela ar īpašu vai noteiktu ķīmisko sastāvu un tās metabolīti.
- 1.41. Testa porcija ir vielas daudzums, kas paņemts no testa parauga, kuram veic testu vai novērošanu.
- 1.42. Testa paraugs ir paraugs, kurš sagatavots no laboratorijas parauga un no kura ņem testa porcijas.
- 1.43. Ticamība ir tuva atbilstība starp garā testa rezultātu virknē iegūto vidējo vērtību un apstiprināto references vērtību. Ticamību parasti izsaka kā novirzi (2).
- 1.44. Vienības ir tās vienības, kas aprakstītas ISO 31 (20) un Direktīvā 71/354/EK (19).
- 1.45. Validēšana ir apstiprināšana, ko veic pārbaudot, un efektīva apliecinājuma sniegšana tam, ka īpašā paredzētā lietojuma konkrētās prasības ir izpildītas (1).
- 1.46. Laboratorijas iekšējā reproducējamība ir precizitāte, kas iegūta vienā un tajā pašā laboratorijā, ievērojot izvirzītos (iepriekšnoteiktos) nosacījumus (attiecībā, piemēram, uz metodi, testa materiāliem, operatoriem, vidi) pamatota ilguma laikposmos.

2. VEIKTSPĒJAS KRITĒRIJI UN CITAS PRASĪBAS ANALĪZES METODĒM

Analīzes metodes vai to kombinācijas, kas atšķiras no turpmāk aprakstītajām metodēm, drīkst lietot tikai skrīninga vai apstiprināšanas mērķiem, ja var pierādīt, ka tās atbilst attiecīgajām prasībām, kuras noteiktas šajā lēmumā.

2.1. VISPĀRĪGAS PRASĪBAS

2.1.1. Rīkošanās ar paraugiem

Paraugus iegūst, ar tiem rīkojas un tos apstrādā tā, lai būtu maksimālas iespējas noteikt vielu. Paraugu apstrādes procedūras novērs iespēju nejauši piesārņot vai pazaudēt analizējamās vielas.

2.1.2. Testu veikspēja

2.1.2.1. Atgūstamība

Paraugu analīzes laikā atgūstamību nosaka katrai paraugu partijai, ja lieto fiksētu atgūstamības korekcijas koeficientu. Ja atgūstamība ir noteiktās robežās, tad var izmantot fiksētu korekcijas koeficientu. Pretējā gadījumā lieto atgūstamības koeficientu, kas iegūts minētajai īpašajai partijai, ja vien nav jālieto īpašs paraugā esošās analizējamās vielas atgūstamības koeficients, kad kvantitatīvai analizējamās vielas noteikšanai paraugā izmanto standarta pievienošanas procedūru (sk. 3.5. punktu) vai iekšējo standartu.

2.1.2.2. Specifiskums

Metodei jāspēj izšķirt starp analizējamo vielu un pārējām vielām, ievērojot eksperimenta nosacījumus. Jābūt aptuvenam aprēķinam, līdz kādam apjomam tas ir iespējams. Ir jāizmanto paņēmieni, ar kuriem pārvarēt jebkādu paredzamu vielu pārklāšanos, ja izmanto aprakstītās mērīšanas tehnikas, piemēram, homologus, analogus, interesējošo atlieku metabolisma produktus. Vissvarīgākais ir, lai tiktu izpētīta pārklāšanās, ko var radīt matricas komponenti.

2.2. SKRĪNINGA METODES

Saskaņā ar Direktīvu 96/23/EK skrīninga nolūkiem var lietot tikai tās analīzes tehnikas, kurām var pierādīt dokumentāli izsekojamā veidā, ka tās ir validētas un to šķietamās atbilstības attiecība interesējošajā līmenī ir < 5 % (β -klūda). Ja rodas aizdomas par neatbilstošu rezultātu, šo rezultātu apstiprina ar apstiprinošu metodi.

2.3. APSTIPRINOŠAS METODES ORGANISKAJĀM ATLIEKVIELĀM UN PIESĀRŅOTĀJIEM

Apstiprinošās metodes organiskajām atliekvielām un piesārņotājiem sniedz informāciju par analizējamās vielas ķīmisko struktūru. Attiecīgi – metodes, kas balstās tikai uz hromatogrāfisko analīzi, neizmantojot spektrometrisko noteikšanu, vienas pašas nav piemērotas būt par apstiprinošajām metodēm. Tomēr, ja atsevišķai metodei trūkst pietiekama specifiskuma, vēlamo specifiskumu var iegūt ar analīzes procedūrām, ko veido piemērotas attīrīšanas, hromatogrāfiskās nošķiršanas un spektrometriskās noteikšanas kombinācijas.

Par piemērotām norādīto vielu grupu organisko atliekvielu vai piesārņotāju noteikšanai uzskata šādas metodes vai metožu kombinācijas:

1. tabula

Piemērotas apstiprinošās metodes organiskajām atliekvielām vai piesārņotājiem

Mērīšanas metode	Vielas, 96/23/EK 1. pielikums	Ierobežojumi
LC vai GC ar masspektrometrisko noteikšanu	A un B grupa	Tikai ievērojot nepārtrauktas darbības vai periodiskas darbības hromatogrāfijas nošķiršanu Tikai tad, ja izmanto pilnas skenēšanas metodes vai izmanto vismaz 3 (B grupa) vai 4 (A grupa) identifikācijas punktus metodēm, kas neregistrē pilnu masas spektru
LC vai GC ar IR spektrometrisko noteikšanu	A un B grupa	Īpašas absorbcijas prasības, kas jāievēro IR spektrometrijā
LC pilna skenēšana DAD	B grupa	Īpašas absorbcijas prasības, kas jāievēro UV spektrometrijā
LC – fluorescences	B grupa	Tikai molekulām, kas uzrāda dabisku fluorescenci, un molekulām, kas uzrāda fluorescenci vai nu pēc transformēšanas, vai pēc atvasināšanas
2-DTLC pilna skenēšana UV/VIS	B grupa	Divdimensiju HPTLC un paralēlā hromatogrāfiskā analīze ir obligāta
GC – noteikšana ar elektronu satveres detektoru	B grupa	Tikai tad, ja lieto divas kolonnas ar atšķirīgu polaritāti
LC – imunogramma	B grupa	Tikai tad, ja lieto vismaz divas dažādas hromatogrāfijas sistēmas vai otru, neatkarīgu noteikšanas metodi
LC–UV/VIS (viens viļņa garums)	B grupa	Tikai tad, ja lieto vismaz divas dažādas hromatogrāfijas sistēmas vai otru, neatkarīgu noteikšanas metodi

2.3.1. Kopēji veiktspējas kritēriji un prasības

Apstiprinošās metodes sniedz informāciju par analizējamās vielas ķīmisko struktūru. Ja vairāk nekā viens savienojums dod to pašu atbildes reakciju, tad šī metode nespēj izšķirt starp šiem savienojumiem. Metodes, kas balstās tikai uz hromatogrāfisko analīzi, neizmantojot spektrometrisko noteikšanu, vienas pašas nav piemērotas, lai tās lietotu par apstiprinošajām metodēm.

Ja metodē tas pielietojams, ekstrahēšanas procedūras sākumā testa porcijai pievieno atbilstošu iekšējo standartu. Atkarībā no pieejamības izmanto vai nu stabilas ar izotopu marķētas analizējamās vielas formas, kas ir īpaši piemērotas masspektrometriskajai noteikšanai, vai savienojumus, kas ir strukturāli radniecīgi ar analizējamo vielu.

Ja nav piemērota iekšējā standarta, analizējamās vielas identifikāciju apstiprina ar paralēlo hromatogrāfisko analīzi. Šajā gadījumā iegūst tikai vienu pīķi, palielinātais pīķa augstums (vai laukums) ir ekvivalents pievienotās analizējamās vielas daudzumam. Ar gāzu hromatogrāfiju (GC) vai šķidrums hromatogrāfiju (LC) pīķa platumam pusaugstumā jābūt 90 – 110 % robežās no oriģinālā platumā, bet izdalīšanas laiks ir identisks 5 % robežās. Plānslāņa hromatogrāfijas (TLC) metodēm var attīstīt tikai analizējamo plankumu; jauns plankums neparādās un izskats nemainās.

Standartmateriālam vai pastiprinātajam materiālam, kas satur zināmu analizējamās vielas daudzumu, kurš ir vai nu vienāds ar atļauto robežu vai izšķiršanas robežu, vai tuvu tai (neatbilstošs kontrolparaugs), kā arī atbilstošiem kontroles materiāliem un tukšajiem reaģentiem ieteicams veikt pilnas procedūras vienlaicīgi ar katru analizējamo testa paraugu partiju. Kārtība, kādā izvilkumus injicē analītiskajā instrumentā, ir šāda: tukšais reaģents, atbilstošs kontrolparaugs, apstiprināmais paraugs, atkal atbilstošs kontrolparaugs un visbeidzot – neatbilstošs kontrolparaugs. Jebkura novirzīšanās no šīs kārtības ir jāpamato.

2.3.2. Papildu veikspējas kritēriji un citas prasības kvantitatīvajām analīzes metodēm

2.3.2.1. Kvantitatīvo metožu ticamība

Veicot atkārtotas sertificēta standartmateriāla analīzes, orientējošais diapazons eksperimentāli noteiktai atgūstamības novirzei, kas koriģēta ar vidējo masas frakciju, no apstiprinātās vērtības ir šāds:

2. tabula

Kvantitatīvo metožu minimālā ticamība

Masas frakcija	Diapazons
≤ 1 µg/kg	No – 50 % līdz + 20 %
> 1 µg/kg līdz 10 µg/kg	No – 30 % līdz + 10 %
≥ 10 µg/kg	No – 20 % līdz + 10 %

Ja nav pieejams šāds CRM, ir pieņemami, ka mērījumu ticamību novērtē, atgūstot zināmus daudzumus analizējamās vielas, kas pievienoti tukšajai matricai. Dati, kas koriģēti ar vidējo atgūstamību, ir pieņemami tikai tad, ja tie ir 2. tabulā parādīto diapazonu robežās.

2.3.2.2. Kvantitatīvo metožu precizitāte

Laboratorijas iekšējais variāciju koeficients (CV) atkārtotai standartmateriāla vai pastiprināta materiāla analīzei, ievērojot reproducējamības nosacījumus, nepārsniedz līmeni, kas aprēķināts ar Horvica vienādojumu. Šis vienādojums ir:

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

kur C ir masas frakcija, kas izteikta kā pakāpe (kāpinātājs) no 10 (piem., 1 mg/g = 10⁻³). Piemēri ir norādīti 3. tabulā:

3. tabula

Reproducējamības CV piemēri kvantitatīvajām metodēm analizējamās vielas masas frakciju diapazonā

Masas frakcija	Reproducējamības CV (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Masas frakcijām, kas mazākas par 100 µg/kg, Horvica vienādojuma izmantošana dod nepieņemami augstas vērtības. Tādējādi CV koncentrācijām, kas mazākas par 100 µg/kg, ir viszemākajā iespējamajā līmenī.

Analīzēm, ko veic, ievērojot atkārtojamības nosacījumus, laboratorijas iekšējais CV tipiski varētu būt viena puse un divas trešdaļas no iepriekšminētajām vērtībām. Analīzēm, ko veic, ievērojot laboratorijas iekšējos reproducējamības nosacījumus, laboratorijas iekšējais CV nav lielāks par reproducējamības CV.

Attiecībā uz vielām, kurām ir noteikta atļautā robeža, metode ļauj sasniegt laboratorijas robežās reproducējamību, kas nav lielāka par atbilstošo reproducējamības CV pie koncentrācijas 0,5 × atļautā robeža.

2.3.3. Veiktspējas kritēriji un citas prasības masspektrometriskajai noteikšanai

Masspektrometriskās metodes ir piemērotas izvērtēšanai kā apstiprinošās metodes tikai tad, ja ievēro nepārtrauktas darbības un periodiskas darbības hromatogrāfijas nošķiršanu.

2.3.3.1. Hromatogrāfiskā nošķiršana

GC-MS procedūrās gāzu hromatogrāfiskā nošķiršana jāveic, izmantojot kapilārās kolonnas. LC-MS procedūrās hromatogrāfiskā nošķiršana jāveic, izmantojot piemērotas šķidrums hromatogrāfijas kolonnas. Jebkurā gadījumā minimālais pieņemamais izdalīšanas laiks analizējamajai vielai, ko pēta, ir divkārtšs izdalīšanas laiks, kas atbilst tukšas kolonnas tilpumam. Analizējamās vielas izdalīšanas laiks (vai relatīvais izdalīšanas laiks) testa porcijā atbilst kalibrēšanas standarta izdalīšanas laikam precizētā izdalīšanas laika logā. Izdalīšanas laika logs ir proporcionāls hromatogrāfiskās sistēmas izšķirtspējai. Analizējamās vielas hromatogrāfiskās izdalīšanās laika attiecība iekšējā standarta izdalīšanās laikam, piem., analizējamās vielas relatīvajam izdalīšanās laikam, atbilst kalibrēšanas šķīduma izdalīšanās laikam ar $\pm 0,5$ % pielaidi gāzu hromatogrāfijai un $\pm 2,5$ % pielaidi šķidrums hromatogrāfijai.

2.3.3.2. Masspektrometriskā noteikšana

Masspektrometrisko noteikšanu veic, izmantojot masspektrometriskās noteikšanas metodes, tādas kā pilnas masas spektrs (pilna skenēšana) vai izvēlētu jonu kontrole (SIM), kā arī MS-MS⁽¹⁾ metodes, tādas kā izvēlētas reakcijas kontrole (SRM), un citas piemērotas MS – MS⁽¹⁾ metodes apvienojumā ar atbilstošiem jonizēšanas veidiem. Augstas izšķirtspējas masspektrometrijā (HRMS) izšķirtspēja parasti ir lielāka par 10 000 visam masas diapazonam 10 % atstarpē starp signāliem.

Pilna skenēšana. Ja masspektrometrisko noteikšanu veic, reģistrējot pilnu skenēšanas spektru, visu mērāmo diagnostikas jonu klātbūtne (molekulārais jons, molekulārā jona raksturīgie adukti, jonu raksturīgie fragmenti un izotopa joni) ar relatīvo intensitāti, kas lielāka par 10 % no kalibrēšanas standarta references spektra, ir obligāta.

SIM. Ja masspektrometrisko noteikšanu veic ar fragmentogrāfiju, vēlams, lai molekulārais jons ir viens no izvēlētajiem diagnostikas joniem (molekulārais jons, molekulārā jona raksturīgie adukti, raksturīgie fragmentjoni un visi to izotopu joni). Atlasītajiem diagnostikas joniem nebūtu jābūt tikai no vienas un tās pašas molekulas daļas. Signāla – fona trokšņa attiecība katram diagnostikas jonam ir $\geq 3:1$.

Pilna skenēšana un SIM. Atklāto jonu relatīvā intensitāte, ko izsaka kā visintensīvākā jona vai pārejas procentuālu attiecību, atbilst kalibrēšanas standarta intensitātei, kas iegūta vai nu standarta šķīdumu kalibrēšanā, vai no inficētiem paraugiem, salīdzināmās koncentrācijās, ko mēra, ievērojot tos pašus nosacījumus, ar šādām pielaidēm:

4. tabula

Maksimālās atļautās pielaižu relatīvajai jonu intensitātei, izmantojot virkni masspektrometriju metožu

Relatīvā intensitāte (% no galvenā pīķa)	EI-GC-MS (relatīvi)	CI-GC-MS, GC-MS ^a LC-MS, LC-MS ^a
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % līdz 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % līdz 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Masas spektrālo datu interpretācija. Diagnostikas jonu un/vai prekursora/produkta jonu pāru relatīvā intensitāte nosakāma, salīdzinot spektrus vai integrējot vienas masas pēdu signālus. Kad piemēro fona korekciju, to piemēro vienādi visai partijai (sk. 2.3.1., 4. punkts) un skaidri norāda.

Pilna skenēšana. Ja vienas masas spektrometrijā reģistrē pilnu skenēšanas spektru, jābūt vismaz četriem joniem ar relatīvo intensitāti ≥ 10 % no galvenā pīķa. Molekulāro jonu iekļauj, ja tas ir references spektrā ar relatīvo intensitāti ≥ 10 %. Vismaz četriem joniem jābūt maksimāli atļauto pielaižu robežās, kas noteiktas jonu intensitātei (5. tabula). Meklēšanai var izmantot datorizētu bibliotēku. Šādā gadījumā testa paraugu masas spektrālo datus salīdzinājumā ar kalibrēšanas šķīduma spektrālajiem datiem pārsniedz kritisko atbilstības koeficientu. Šo koeficientu nosaka validēšanas procesa laikā katrai analizējamajai vielai, pamatojoties uz spektru, kuram turpmāk aprakstītie kritēriji ir ievēroti. Pārbauda spektra mainīgumu, ko izraisa parauga matrica un detektora veiktspēja.

(1) Ieguvums: tā paraugā esošās analizējamās vielas masas frakcija, kas ir galīgajā izvilkmū.

SIM. Ja masas fragmentus mēra, izmantojot citas metodes, kas nav pilnas skenēšanas metodes, datu interpretēšanai izmanto identifikācijas punktu sistēmu. Lai apstiprinātu vielas, kas uzskaitītas Direktīvas 96/23/EK I pielikuma A grupā, vajadzīgi vismaz 4 identifikācijas punkti. Lai apstiprinātu vielas, kas uzskaitītas Direktīvas 96/23/EK I pielikuma B grupā, vajadzīgi vismaz 3 identifikācijas punkti. Nākamajā tabulā parādīts identifikācijas punktu skaits, ko katra no masspektrometrijas pamatmetodēm var iegūt. Tomēr, lai pretendētu uz identifikācijas punktiem, kas vajadzīgi apstiprināšanai, un uz identifikācijas punktu summu, kas jāaprēķina:

- izmēra vismaz vienu jonu attiecību un
- visas attiecīgās izmērītās jonu attiecības atbilst iepriekš aprakstītajiem kritērijiem, un
- apvieno vismaz trīs atsevišķas metodes, lai iegūtu minimālo identifikācijas punktu skaitu.

5. tabula

Saistība starp masas fragmentu klašu diapazonu un iegūtajiem identifikācijas punktiem

MS metode	Identifikācijas punkts, kas iegūts uz jonu
Zemas izšķirtspējas masspektrometrija (LR)	1,0
LR-MS prekursora jons	1,0
LR-MS pārejas produkti	1,5
HRMS	2,0
HR-MS prekursora jons	2,0
HR-MS pārejas produkti	2,5

Zemteksta piezīmes:

- Katru jonu drīkst skaitīt tikai vienreiz.
- GC-MS, kas izmanto elektronisko impulsu jonizāciju, atmet, jo tā ir atšķirīga metode no GC-MS, kas izmanto ķīmisko jonizāciju.
- Izmantot dažādas analizējamās vielas, lai palielinātu identifikācijas punktu skaitu, var tikai tad, ja atvasinājumi saistīti ar atšķirīgu reakciju ķīmijas nozarēm.
- Direktīvas 96/23/EK 1. pielikuma A grupas vielām, ja vienu no turpmāk minētajām metodēm izmanto analīzes procedūrā: HPLCkopā ar pilna skenējuma diodes matricu spektrofotometriju (DAD); HPLC kopā ar fluorescences noteikšanu; HPLC kopā ar imunogrammu; divdimensiju TLC kopā ar spektrometrisko noteikšanu; lielākais vienu identifikācijas punktu var ziedot, ja šo metožu kritēriji ir ievēroti.
- Pārejas produkti ietver gan nākamās, gan aiznākamās paaudzes produktus.

6. tabula

Virknei metožu un to kombināciju iegūto identifikācijas punktu piemēri (n = vesels skaitlis)

Metode(-es)	Jonu skaits	Identifikācijas punkti
GC-MS (EIvaiCI)	N	n
GC-MS (EIunCI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS(EIvai CI) 2 atvasinājumi	2 (A atvasinājums) + 2 (B atvasinājums)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prekursors un 2 nākamās paaudzes	4
LC-MS-MS	1 prekursors un 2 nākamās paaudzes	4
GC-MS-MS	2 prekursora joni, katrs ar 1 nākamās paaudzes	5
LC-MS-MS	2 prekursora joni, katrs ar 1 nākamās paaudzes	5
LC-MS-MS-MS	1 prekursors, 1 nākamās paaudzes un 2 aiznākamās paaudzes	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MSun LC-MS	2 + 2	4
GC-MSunHRMS	2 + 1	4

2.3.4. Veiktspējas kritēriji un citas prasības hromatogrāfijai, kas apvienota ar infrasarkanā noteikšanu

Atbilstoši pīķi. Atbilstoši pīķi ir absorbcijas maksimumi kalibrēšanas standarta infrasarkanajā spektrā, kas atbilst šādām prasībām.

2.3.4.1. Infrasarkanā noteikšana

Absorbcijas maksimums. Tas ir viļņu skaits diapazonā $4\ 000\text{--}500\ \text{cm}^{-1}$

Absorbcijas intensitāte. Ir ne mazāk kā vai nu:

- īpatnējā molārā absorbcija – 40 pret pīķa pamatlīniju; vai
- relatīvā absorbcija – 12,5 % no visintensīvākā pīķa absorbcijas $4\ 000\text{--}500\ \text{cm}^{-1}$ rajonā,

ja abas mēra pret nulles absorbciju, un 5 % no visintensīvākā pīķa absorbcijas $4\ 000\text{--}500\ \text{cm}^{-1}$ rajonā, ja abas mēra pret to pīķa pamatlīniju.

Piezīme:

kaut arī teorētiski var dot priekšroku atbilstošiem pīķiem saskaņā ar a) punktu, praksē vieglāk noteikt tos, kas atbilst b) punktam.

To pīķu skaits analizējamās vielas infrasarkanajā spektrā, kuru frekvences atbilst atbilstošajam pīķim kalibrēšanas standarta spektrā, $\pm 1\ \text{cm}^{-1}$ robežās, ir noteikts.

2.3.4.2. Infrasarkanā spektra datu interpretācija

Absorbcija ir visos analizējamās vielas reģionos, kas atbilst atbilstošajam pīķim kalibrēšanas standarta atsaucē spektrā. Kalibrēšanas standarta infrasarkanajā spektrā ir vajadzīgi vismaz seši atbilstoši pīķi. Ja tajā ir mazāk par sešiem atbilstošiem pīķiem (7), spektru pamatā nevar izmantot par atsaucē spektru. "Punktu skaits", t. i., procentuālais daudzums no analizējamās vielas infrasarkanajā spektrā noteiktajiem atbilstošajiem pīķiem, ir vismaz 50. Ja nav skaidras atbilstības atbilstošajam pīķim, analizējamās vielas attiecīgais reģions jāpieskaņo atbilstošajam pīķim. Šī procedūra ir piemērojama tikai absorbcijas pīķiem parauga spektrā ar intensitāti, kas vismaz trīs reizes pārsniedz fona trokšņus no pīķa līdz pīķim.

2.3.5. Veiktspējas kritēriji un citas prasības analizējamās vielas noteikšanai, izmantojot LC kopā ar citām noteikšanas metodēm

2.3.5.1. Hromatogrāfiskā nošķiršana

Ja ir šim nolūkam piemērots materiāls, izmanto iekšējo standartu. Priekšroka dodama radniecīgam standartam, kura izdalīšanas laiks ir līdzīgs analizējamās vielas izdalīšanas laikam. Analizējamā viela eluē izdalīšanas laikā, kas ir tipisks atbilstošam kalibrēšanas standartam, ievērojot tādus pašus eksperimenta nosacījumus. Minimālais pieņemamais izdalīšanas laiks analizējamajai vielai divas reizes pārsniedz atbilstošo laiku tukšas kolonnas tilpumam. Analizējamās vielas izdalīšanas laika un iekšējā standarta izdalīšanas laika attiecība, t. i., analizējamās vielas relatīvais izdalīšanas laiks, ir tāda pati kā kalibrēšanas standartam attiecīgā matricē, $\pm 2,5\ \%$ robežās.

2.3.5.2. Pilnas skenēšanas UV/VIS noteikšana

Jāievēro LC metožu veiktspējas kritēriji.

Maksimālā absorbcija analizējamās vielas spektrā ir tajos pašos viļņu garumos kā kalibrēšanas standartam, robežās, ko nosaka ar noteikšanas sistēmas izšķirtspēju. Nosakot ar diodu matricas detektoru, šī robeža parasti ir $\pm 2\ \text{nm}$; Analizējamās vielas spektrs virs $220\ \text{nm}$ šīm divu spektru daļām ar relatīvo absorbciju $\geq 10\ \%$ redzami neatšķiras no kalibrēšanas standarta spektra. Šis kritērijs ir ievērojams, pirmkārt, ja uzrādās tas pats maksimums un, otrkārt, ja atšķirība starp diviem spektriem nevienā punktā nepārsniedz $10\ \%$ no kalibrēšanas standarta absorbcijas. Ja izmanto datorizētu bibliotēkas meklēšanu un pieskaņošanu, testa paraugu spektra datu un kalibrēšanas šķīduma spektra datu līdzība pārsniedz kritisko atbilstības koeficientu. Šo koeficientu nosaka validēšanas procesa laikā katrai analizējamajai vielai, pamatojoties uz spektru, kuram turpmāk aprakstītie kritēriji ir ievēroti. Pārbauda spektra mainīgumu, ko izraisa parauga matrica un detektora veiktspēja.

2.3.5.3. Veiktspējas kritēriji fluorometriskajai noteikšanai

Jāievēro LC metožu veiktspējas kritēriji.

To piemēro molekulām, kas uzrāda dabisku fluorescenci, un molekulām, kas uzrāda fluorescenci vai nu pēc transformēšanas, vai pēc atvasināšanas. Ierosināšanas un emisijas viļņu garumu atlasī apvienojumā ar hromatogrāfijas nosacījumiem veic tā, lai pēc iespējas samazinātu pārklājošos komponentus tukšā parauga izvilkumos.

Tuvāko pīķi hromatogrammā nošķir no apzīmētā analizējamās vielas pīķa ar vismaz vienu pilnu pīķi, kura platums ir 10 % no analizējamās vielas maksimālā pīķa augstuma.

2.3.5.4. 2.3.5.4. Veiktspējas kritēriji analizējamās vielas noteikšanai ar LC imunogrammu

LC imunogramma pati par sevi nav piemērota, lai to lietotu kā apstiprinošo metodi.

Jāievēro LC metožu attiecīgie kritēriji.

Iepriekšnoteikti kvalitātes kontroles parametri, t. i., nespecifiskā saistīšana, kontrolparaugu relatīvā saistīšana, tukšā parauga absorbcijas vērtība ir robežās, kas iegūtas pārbaudes validēšanas laikā.

Imunogrammai jāsatāv vismaz no piecām frakcijām.

Katra frakcija ir ne mazāka par pusi no pīķa platuma.

Frakcija ar maksimālo analizējamās vielas saturu ir vienāda aizdomīgajam paraugam, neatbilstošajam kontrolparaugam un standartam.

2.3.5.5. Analizējamās vielas noteikšana, izmantojot LC kopā ar UV/VIS noteikšanu (viens viļņu garums)

LC kopā ar UV/VIS noteikšanu (viens viļņu garums) pati par sevi nav piemērota, lai to izmantotu kā apstiprinošo metodi.

Tuvākais pīķa maksimums hromatogrammā jānošķir no apzīmētā analizējamās vielas pīķa ar vismaz vienu pilnu pīķi, kura platums ir 10 % no analizējamās vielas pīķa maksimālā augstuma.

2.3.6. Veiktspējas kritēriji un citas prasības analizējamās vielas noteikšanai ar 2-D TLC kopā ar pilnas skenēšanas UV/VIS spektrometrisko noteikšanu

Divdimensiju HPTLC un paralelā hromatogrāfiskā analīze ir obligāta.

Analizējamās vielas RF vērtības atbilst standartu RF vērtībām ± 5 % robežās.

Analizējamā viela vizuāli nav atšķirama no standarta.

Vienādas krāsas plankumiem tuvākā plankuma centrs jānošķir no analizējamā plankuma centra ar vismaz pusi no plankumu diametru summas.

Analizējamās vielas spektrs vizuāli neatšķiras no standarta spektra, kā aprakstīts pilnas skenēšanas UV/VIS noteikšanai.

Ja izmanto datorizētu bibliotēkas meklēšanu un saskaņošanu, testa paraugu spektra datu un kalibrēšanas šķīduma spektra datu līdzība pārsniedz kritisko atbilstības koeficientu. Šo koeficientu nosaka validēšanas procesa laikā katrai analizējamajai vielai, pamatojoties uz spektru, kuram turpmāk aprakstītie kritēriji ir ievēroti. Pārbauda spektra mainīgumu, ko izraisa parauga matrica un detektora veiktspēja.

2.3.7. Veiktspējas kritēriji un prasības analizējamās vielas noteikšanai ar GC apvienojumā ar elektronu satveres noteikšanu (ECD)

Ja ir šim nolūkam piemērots materiāls, izmanto iekšējo standartu. Priekšroka dodama radniecīgai vielai, kuras izdalīšanas laiks ir līdzīgs analizējamās vielas izdalīšanas laikam. Analizējamā viela eluē izdalīšanas laikā, kas ir tipisks atbilstošam kalibrēšanas standartam, ievērojot tādu pašus eksperimenta nosacījumus. Minimālais pieņemamais izdalīšanas laiks analizējamajai vielai divas reizes pārsniedz atbilstošo laiku tukšas kolonnas tilpumam. Analizējamās vielas izdalīšanas laika un iekšējā standarta izdalīšanas laika attiecība, t. i., analizējamās vielas relatīvais izdalīšanas laiks, ir tāda pati kā kalibrēšanas standartam attiecīgā matricē, $\pm 0,5$ % robežās. Tuvākais pīķa maksimums hromatogrammā jānošķir no apzīmētā analizējamās vielas pīķa ar vismaz vienu pilnu pīķi, kura platums ir 10 % no analizējamās vielas pīķa maksimālā augstuma. Papildinformācijas iegūšanai var izmantot paralelo hromatogrāfisko analīzi.

2.4 2.4. APSTIPRINOŠĀS METODES ELEMENTIEM

Ķīmisko elementu apstiprinošās analīzes pamatojas uz nepārprotamu identifikāciju un pareizu, kā arī precīzu kvantificēšanu, izmantojot attiecīgā ķīmiskā elementa unikālās īpašības (t. i., elementam raksturīgo emitētās vai absorbētās radiācijas viļņu garumu, atommasu) interesējošajā līmenī.

Par piemērotām ķīmisko elementu identificēšanai uzskata šādas metodes vai metožu kombinācijas:

7. tabula

Ķīmiskajiem elementiem piemērotas apstiprinošās metodes

Metode	Mērāmais parametrs
Diferencēta impulsa anodsvīturošanas voltometrija	Elektriskais signāls
Atomu absorbcijas spektrometrija	
Liesma	Absorbcijas viļņu garums
Hidrīda ģenerēšana	Absorbcijas viļņu garums
Aukstais tvaiks	Absorbcijas viļņu garums
Elektrotermiska atomizēšana (grafīta krāsns)	Absorbcijas viļņu garums
Atomu emisijas spektrometrija	
Induktīvi saistīta plazma	Emisijas viļņu garums
Masspektrometrija	
Induktīvi saistīta plazma	Masas – lādiņa attiecība

2.4.1. Kopējie veikspējas kritēriji un citas prasības apstiprinošajām metodēm

Standartmateriālam vai pastiprinātajam materiālam, kas satur noteiktu analizējamās vielas daudzumu, kurš ir vai nu vienāds ar maksimāli atļauto robežu vai izšķiršanas robežu, vai tuvu tai (neatbilstošs kontrolparaugs), kā arī atbilstošiem kontroles materiāliem un tukšajiem reaģentiem ieteicams veikt pilnu procedūru vienlaicīgi ar katrai partijai analizējamo testa paraugu. Ieteicamā kārtība, kādā izvilkumus injicē analītiskajā instrumentā, ir šāda: tukšais reaģents, atbilstošs kontrolparaugs, apstiprināmais paraugs, atbilstošs kontrolparaugs un visbeidzot – neatbilstošs kontrolparaugs. Jebkura novirzīšanās no šīs kārtības ir jāpamato.

Kopumā lielākajai daļai analītisko metožu pirms analizējamās vielas noteikšanas ir vajadzīga pilnīga organiskās matricas šķelšana, lai iegūtu šķīdumus. To var panākt, izmantojot mikroviļņu mineralizēšanas procedūras, kas samazina interesējošās analizējamās vielas zudumu un/vai piesārņošanas risku. Lieto dezinficētus, labas kvalitātes teflona traukus. Ja ķeras pie citām mitrās vai sausās šķelšanas metodēm, jābūt pieejamam dokumentētam apliecinājumam, lai izslēgtu fenomena potenciālo zudumu vai piesārņošanu. Kā alternatīvu šķelšanai noteiktos apstākļos var izvēlēties atdalīšanas procedūras (piemēram, ekstrakciju), lai atdalītu analizējamo vielu no matricas komponentiem un/vai koncentrētu analizējamo vielu nolūkā ievadīt to analītiskajā iekārtā.

Attiecībā uz kalibrēšanu – vai tā ir iekšēja, vai pamatojas uz standarta pievienošanas metodi – jā rūpējas, lai nepārsniegtu analīzēm noteikto darbības diapazonu. Ārējas kalibrēšanas gadījumā ir obligāti sagatavot kalibrēšanas standartus šķīdumā, kas pēc iespējas sakrīt ar parauga šķīduma sastāvu. Piemēro arī fona koriģēšanu, ja to prasa īpaši analītiskie apstākļi.

2.4.2. Papildu veikspējas kritēriji un citas prasības kvantitatīvajām analīzes metodēm

2.4.2.1. Kvantitatīvo metožu ticamība

Ja sertificētam standartmateriālam veic atkārtotas analīzes, lai noteiktu elementus, novirze no eksperimentāli noteiktā sertificētās vērtības vidējā satura nav ārpus $\pm 10\%$ robežām. Ja nav pieejams šāds CRM, ir pieņemami, ka mērījumu ticamību novērtē, atgūstot zināmus daudzumus elementa, kas pievienots nezināmiem paraugiem. Jāpievērš uzmanība faktam, ka atšķirībā no analizējamās vielas pievienotais elements nav ķīmiski saistīts reālajā matricā un tādēļ ar šo paņēmieni iegūtajiem rezultātiem ir mazāka ticamība nekā tiem, kas iegūti, izmantojot CRM. Atgūstamības dati ir pieņemami tikai tad, ja tie ir $\pm 10\%$ robežās no mērķa vērtības.

2.4.2.2. Kvantitatīvo metožu precizitāte

Ja parauga atkārtotas analīzes veic, ievērojot laboratorijas iekšējos reproducējamības nosacījumus, laboratorijas iekšējais variāciju koeficients (CV) vidēji nepārsniedz šādas vērtības:

8. tabula

CV kvantitatīvajām metodēm elementa masas frakciju diapazonā

Masas frakcija	CV (%)
≥ 10 µg/kg līdz 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg līdz 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. Īpašas prasības attiecībā uz diferencēta impulsa anodsvīturošanas voltmetriju (DPASV)

Ir ļoti svarīgi pirms DPASV noteikšanām pabeigt paraugu organiskās vielas destrukciju. Voltogrammās nedrīkst būt nekādu skaidru signālu organisko materiālu klātbūtnes dēļ. DPASV piķu augstumu var ietekmēt neorganiskās matricas sastāvdaļas. Tādēļ kvantificēšana ir jāveic ar standarta pievienošanas metodi. Ar šo metodi iegūst tipiskus parauga šķīduma voltagrammu paraugus.

2.4.4. Īpašas prasības atomu absorbcijas spektrometrijai (AAS)

Šī metode pamatā balstās uz vienu elementu un tādējādi prasa eksperimenta vides optimizēšanu atkarībā no konkrētā kvantificējamā elementa. Ja vien iespējams, rezultātus pārbauda kvantitatīvi un kvalitatīvi, izmantojot alternatīvas absorbcijas līnijas (ideālā gadījumā – izvēlas divas dažādas līnijas). Kalibrēšanas standartus sagatavo šķīduma matricā, kas pēc iespējas sakrīt ar parauga mērīšanas šķīdumu (piemēram, skābes koncentrācija vai modifikatora sastāvs). Lai samazinātu tukšās vērtības, visiem reaģentiem jābūt ar augstāko pieejamo tīrību. Atkarībā no izvēlēta veida – iztvaicēt un/vai atomizēt paraugu – var iegūt dažādu veidu AAS.

2.4.4.1. Īpašas prasības liesmas AAS

Instrumentu komplekts ir pielāgojams katram elementam. Jo īpaši jāpārbauda gāzu sastāvs un plūsmas stiprums. Jālieto avota nepārtrauktības korektors, lai izvairītos no pārtraukumiem, ko izraisa fona absorbcija. Nezināmas matricas gadījumā pārbauda, ir vai nav vajadzīga fona koreģēšana.

2.4.4.2. Īpašas prasības grafīta krāsns AAS

Strādājot ar ultrapēdu līmeņiem grafīta krāsni, pareizību bieži ietekmē piesārņojums laboratorijā. Tādēļ paraugiem un standartiem, ar ko darbojas, jālieto augstas tīrības pakāpes reaģenti, dejonizēts ūdens un inertas plastmasas izstrādājumi. Instrumentu komplekts ir pielāgojams katram elementam. Jo īpaši jāpārbauda pirmapstrāde un atomizēšanas nosacījumi (temperatūra, laiks), kā arī matricas modifikācija.

Darbojoties izotermiskās atomizēšanas nosacījumos (piemēram, transversa 0 veida sakarsēta grafīta caurule ar integrētu Ļova platformu (8)), samazinās matricas ietekmi uz analizējamās vielas atomizēšanu. Apvienojumā ar matricas modificēšanu un Zēmana fona koreģēšanu (9) ir atļauta kvantificēšana ar kalibrēšanas līkni, kas balstās uz standarta šķīduma ūdeni mērījumiem.

2.4.5. Īpašas prasības hidrīda ģenerēšanas atomu absorbcijas spektrometrijai

Organiskie savienojumi, kas satur tādus elementus, kā arsēns, bismuts, ģermānijs, svins, antimons, selēns, alva un telūrs, var būt ļoti stabili un prasa oksidatīvu sadalīšanu, lai iegūtu pareizus rezultātus attiecībā uz kopējo elementa saturu. Tādēļ ieteicama šķelšana mikroviļņos vai pārpelnošana augstā spiedienā, ievērojot stingrus oksidatīvus nosacījumus. Vislielākā uzmanība jāpievērš pilnīgai un reproducējamai elementu konversijai tiem atbilstošajos hidrīdos.

Arsēna hidrīda formēšanās sālsskābes šķīdumā ar NaBH₄ ir atkarīga no arsēna oksidēšanas stāvokļa (As III: ātra formēšanās, As V: ilgāks formēšanās periods). Lai izvairītos no jutīgumu zaudēšanas, nosakot As V ar plūsmas injekcijas metodi, ko rada īsais reakcijas laiks šajā sistēmā, pēc oksidatīvas sadalīšanas As V ir jāreducē uz As III. Šim nolūkam der kālija jodīds/askorbīnskābe vai cisteīns. Tāpat apstrādā tukšos paraugus, kalibrēšanas šķīdumus un parauga šķīdumus. Darbs ar periodisko procesu sistēmu ļauj noteikt abus arsēna veidus, neietekmējot pareizību. Saistībā ar As V hidrīda aizkavētu formēšanos kalibrēšanu var veikt ar piķa laukuma integrēšanu. Instrumentu komplekts ir pielāgojams. Jo īpaši svarīga un pārbaudāma ir gāzes plūsma, kas pārnēs hidrīdu uz atomizētāju.

2.4.6. Īpašas prasības attiecībā uz aukstā tvaika atomu absorbcijas spektrometriju

Auksto tvaiku lieto tikai dzīvsudraba gadījumā. Elementārā dzīvsudraba gaistamības un adsorbcijas zudumu dēļ visās analizēs vajadzīga īpaša uzmanība. Rūpīgi jāizvairās no piesārņošanas ar reāģentiem vai vidi.

Organiskajiem savienojumiem, kas satur dzīvsudrabu, vajadzīga oksidatīva sadalīšana, lai iegūtu pareizus rezultātus attiecībā uz kopējo dzīvsudraba saturu. Sadalīšanai jāizmanto noslēgtas sistēmas ar šķelšanu mikroviļņos vai pārpelnošanu augstā spiedienā. Īpaša rūpība ir vajadzīga, lai iztīrītu iekārtu, kas bijusi saskarē ar dzīvsudrabu.

Priekšrocības ir darbā ar plūsmas injekcijas metodi. Zemākām izšķiršanas robežām pēc termiskas desorbcijas ieteicama elementārā dzīvsudraba adsorbcija uz zelta/platīna adsorbenta. Adsorbenta vai elementa saskare ar mitrumu var traucēt mērījumu, un no tās ir jāizvairās.

2.4.7. Īpašas prasības induktīvi saistītas plazmas atomu emisijas spektrometrijai (ICP-AES)

Induktīvi saistītas plazmas atomu emisijas spektrometrija (10) ir daudzelementu metode, kas ļauj vienlaicīgi veikt vairāku elementu mērījumus. ICP-AES izmantošanai paraugi iepriekš jāšķeļ, lai sadalītu organiskās matricas. Lieto noslēgtas sistēmas ar šķelšanu mikroviļņos vai pārpelnošanu augstspiedienā. Nopietnā ICP-AES analizē būtiska nozīme ir instrumentu kalibrēšanai vai viļņu garuma izvēlei. Instrumentu kalibrēšanai lineāras kalibrēšanas līknes gadījumā parasti vajadzīga četru koncentrāciju kalibrēšanas šķīdumu mērīšana, jo ICP-AES kalibrēšanas līknes parasti ir lineāras četrās līdz sešās koncentrācijas stipruma kārtās. ICP-AES sistēmas kalibrēšanu parasti veic ar daudzelementu standartu, ko sagatavo šķīdumā, kas satur tādu pašu skābes koncentrāciju kā mērāmais šķīdums. Lineārajai līknei pārbauda elementa koncentrācijas.

Viļņu garuma izvēle analizējamās vielas emisijas mērījumiem ir atbilstoša nosakāmo elementu koncentrācijām. Ja analizējamās vielas koncentrācija ir ārpus emisijas līnijas darbības diapazona, izmanto citu emisijas līniju. Vispirms izvēlas vissensitīvāko emisijas līniju (nepārtrauktu), tad mazāk sensitīvu emisijas līniju. Ja strādā ar noteikšanas robežu vai tuvu tai, vissensitīvākā līnija attiecīgajai analizējamajai vielai parasti ir vislabākā izvēle. Galvenās grūtības ICP-AES rada spektra un fona pārklāšanās. Iespējamā pārklāšanās ir, piemēram, vienkārša fona nobīde, tieša spektra pārklāšanās un kompleksa fona nobīde. Katram no šiem pārklāšanās gadījumiem ir savi cēloņi un novēršanas līdzekļi. Atkarībā no matricām piemēro pārklāšanās korekcijas un darbības parametru optimizāciju. No dažiem pārklāšanās veidiem var izvairīties ar atšķaidīšanu vai ar matricu pielāgošanu. Katru analizējamo testa paraugu partiju, standartmateriālu un pastiprināto materiālu, kas satur zināmu analizējamās vielas daudzumu, kā arī tukšo materiālu apstrādā tāpat kā testa paraugus. Plūsmas pārbaudei standartu pārbauda, piemēram, pēc 10 paraugiem. Visiem reāģentiem un plazmas gāzei jābūt ar vislielāko pieejamo tīrības pakāpi.

2.4.8. Īpašas prasības induktīvi saistītai masspektrometrijai (ICP-MS) (11)

Vidējas atommasas mikroelementu, piemēram, hroma, vara un niķeļa, noteikšanu var spēcīgi ietekmēt citu izobārisko un poliatomu jonu pārklāšanās. To var novērst tikai tad, ja pieejamā izšķirtspēja vismaz 7 000–8 000. Grūtības, kas saistītas ar MS metodēm, ietver instrumentu izraisītas novirzes, matricas efektus un molekulāro jonu pārklāšanos ($m/z < 80$). Vairākkārtēja iekšēja standartizēšana, kas ietver to pašu masas diapazonu, kas nosakāmajiem elementiem, ir vajadzīga, lai koriģētu instrumentu izraisītas novirzes un matricas efektus.

Pirms ICP-MS mērījumiem ir vajadzīga pilnīga paraugos esošās organiskās vielas sadalīšana. Tāpat kā AAS pēc šķelšanas noslēgtos traukos gaistošie elementi, piemēram, jods ir jāpārvērš stabilā oksidācijas stāvoklī. Vissmagāko pārklāšanos rada molekulāro jonu kombinācijas ar argonu (plazmas gāze), ūdeņradi, oglekli, slāpekli un skābekli (šķīdināšanas skābes, plazmas gāzes piejaukumi un iekļuvušās atmosfēras gāzes) un parauga matrica. Lai izvairītos no pārklāšanās, vajadzīga pilnīga šķelšana, fona mērījumi, piemērota analizējamo masu izvēle, kas dažreiz saistīta ar mazāku pārpilnību (vajāka noteikšanas robeža) un pareiza šķīdināšanas skābju, piemēram, slāpekļskābes izvēle.

Nosakāmajiem elementiem pārklāšanās jāizslēdz ar piemērotu īpašo analītisko masu izvēli, ietverot izotopu proporcijas apstiprināšanu. Izmantojot iekšējos standartus, katram mērījumam jāpārbauda instrumentu atbilde uz Fano faktoriem.

3. VALIDĒŠANA

Validēšana pierāda, ka analīzes metode atbilst kritērijiem, kas piemērojami attiecīgajiem veiktspējas rādītājiem.

Dažādām pārbaudēm ir vajadzīgas dažādas metožu kategorijas. Nākamajā tabulā noteikti veiktspējas rādītāji, kas verificējami konkrētajam metodes tipam.

9. tabula

Analīzes metožu klasifikācija pēc veiktspējas rādītājiem, kas jānosaka

			Noteikšanas robeža CCβ	Izšķiršanas robeža CCα	Ticamība/atgūstamība	Precizitāte	Selektivitāte/specifiskums
Piemērojamība/ robustums/ stabilitāte	Kvalitatīvās metodes	S	–	–	–	–	+
	+	C	+	–	–	–	+
+	Kvantitatīvās metodes	S	–	–	–	+	+
	+	C	+	+	+	+	+

+

3.1. VALIDĒŠANAS PROCEDŪRAS

Šajā nodaļā noteikti paraugi un/vai atsauces analīzes metožu validēšanas procedūrām. Var izmantot citas metodes, lai pierādītu, ka analīzes metode atbilst veiktspējas kritērijiem, kas noteikti veiktspējas rādītājiem, ja ar tām var sasniegt to pašu informācijas līmeni un kvalitāti.

Validēšanu var īstenot, arī veicot starplaboratoriju pētījumu, kā noteikts ar Pārtikas kodeksu, ISO vai IUPAC (12), vai saskaņā ar alternatīvām metodēm, tādām kā vienoti laboratorijas pētījumi vai iekšēja validēšana (13) (14). Šajā daļā izskatīti vienoti laboratorijas pētījumi (iekšējai validēšanai), izmantojot moduļu metodi. Šo metodi veido:

- 1) tādu kopēju veiktspējas rādītāju kopa, kas nav atkarīgi no izmantotā validēšanas modeļa, un
- 2) specifiskākas, no modeļa atkarīgas procedūras, kā aprakstīts 10. tabulā.

10. tabula

No modeļa neatkarīgi un no modeļa atkarīgi veiktspējas rādītāji

Validēšana		
No modeļa neatkarīgi veiktspējas rādītāji	No modeļa atkarīgi veiktspējas rādītāji	
Kopējie veiktspējas rādītāji (3.1.1.)	Konvencionāla validēšanas metode (3.1.2.)	Iekšējās validēšanas metode (3.1.3.)
Specifiskums	Atgūstamība	Atgūstamība
Ticamība	Atkārtojamība	Atkārtojamība
Robustums: nelielas izmaiņas	Reproducējamība laboratorijas iekšienē	Reproducējamība laboratorijas iekšienē
Stabilitāte	Reproducējamība	Reproducējamība
	Izšķiršanas robeža (CCα)	Izšķiršanas robeža (CCα)
	Noteikšanas spēja (CCβ)	Noteikšanas spēja (CCβ)
	Kalibrēšanas līknes	Kalibrēšanas līkne
Robustums: lielas izmaiņas	Robustums: lielas izmaiņas	Robustums

3.1.1. No modeļa neatkarīgi veikspējas rādītāji

Neatkarīgi no izraudzītās validēšanas metodes jānosaka šādi veikspējas rādītāji. Lai samazinātu darba slodzi, var izmantot rūpīgi izraudzītu un statistiski pareizu metodi, apvienojot veiktos eksperimentus ar dažādu rādītāju noteikšanu.

3.1.1.1. *Specifiskums*

Analīzes metodēm svarīga ir izšķirtspēja starp analizējamo vielu un cieši saistītām vielām (izomēriem, metabolītiem, noārdīšanās produktiem, endogēnām vielām, matricas sastāvdaļām utt.). Lai pārbaudītu pārklāšanos, ir vajadzīgas divas pieejas.

Tādēļ izvēlas potenciāli pārklājošas vielas un analizē attiecīgus tukšos paraugus, lai noteiktu iespējamo pārklāšanos klātbūtni un lai novērtētu pārklāšanos ietekmi:

- atlasa virkni ķīmiski radniecīgu savienojumus (metabolītus, atvasinājumus utt.) vai citas vielas, kas varētu nonākt saskarē ar interesējošo savienojumu, kurš varētu būt paraugos,
- analizē attiecīgu skaitu reprezentatīvu tukšo paraugu ($n \geq 20$) un pārbauda visas pārklāšanās (signālus, pūkus, jonu pēdas) interesējošajā reģionā, kur sagaidāma mērķa analizējamās vielas eluēšana,
- turklāt pastiprina reprezentatīvus tukšos paraugus ar attiecīgu tās vielas koncentrāciju, kas varētu traucēt analizējamās vielas noteikšanu un/vai kvantificēšanu,
- pēc analīzes izpēta, vai:
 - šī klātbūtne var izraisīt kļūdainu identificēšanu,
 - mērķa analizējamās vielas identificēšanu kavē viena vai vairākas pārklāšanās, vai
 - kvantificēšana ir būtiski ietekmēta.

3.1.1.2. *Ticamība*

Šajā punktā ir aprakstīta ticamības (viens no pareizības komponentiem) noteikšana. Ticamību var noteikt tikai ar sertificētu standartmateriālu (CRM). CRM lieto, kad tas ir pieejams. Šī procedūra ir sīki aprakstīta ISO 5725-4 (5). Piemērs ir dots turpmāk:

- saskaņā ar metodes testa norādījumiem analizē sešus CRM replikātus,
- nosaka analizējamās vielas koncentrāciju, kas ir katra replikāta paraugā,
- šīm koncentrācijām aprēķina vidējo, standartnovirzi un variāciju koeficientu (%),
- aprēķina ticamību, dalot noteikto vidējo koncentrāciju ar sertificētu vērtību (kas mērīta kā koncentrācija) un reizinot ar 100, lai izteiktu rezultātu procentos.

Ticamība (%) = vidējā atgūstamā koriģētā koncentrācija, kas noteikta $\times 100$ /sertificēta vērtība.

Ja nekāds CRM nav pieejams, ticamības vietā var noteikt atgūstamību, kā aprakstīts turpmāk 4.1.2.1. punktā.

3.1.1.3. *Piemērojamība/robustums (nelielas izmaiņas)*

Šādos pētījumos izmanto nelielas, pamatotas variācijas, ko apzināti ievieš laboratorijā, un novēro to sekas.

Jāveic pirmizpēte, izvēloties parauga iepriekšējas apstrādes, attīrīšanas un analīzes faktorus, kas var ietekmēt mērījumu rezultātus. Šādi faktori var ietvert analītiķi, reaģentu avotu un vecumu, šķīdumus, standartus un parauga izvilcumus, karsēšanas pakāpi, temperatūru, pH vērtību, kā arī daudzus citus faktorus, kas var būt sastopami laboratorijā. Šie faktori jāmodificē to svarīguma kārtībā, kas atbilst parasti starp laboratorijām sastopamajām novirzēm.

- Identificē iespējamus faktorus, kas var ietekmēt rezultātus.
- Nedaudz variē katru faktoru.

- Veic robustuma testu, izmantojot Jūdena metodi (15)(16). (Šajā punktā var izmantot citas apstiprinātas metodes. Tomēr Jūdena metode ļauj maksimāli ietaupīt laiku un piepūli). Jūdena metode pēc būtības ir frakcionāli faktoriāla. Nav jānosaka mijiedarbība starp dažādajiem faktoriem.
- Ja konstatē, ka faktors ievērojami ietekmē mērījumu rezultātus, veic turpmākus eksperimentus, lai lemtu par šā faktora iedarbības robežas pieņemamību.
- Faktors, kas nozīmīgi ietekmē rezultātus, ir skaidri jānorāda metodes protokolā.

Pamatideja nav pētīt vienu izmaiņu laikā, bet vienreiz ieviest dažas variācijas. Piemēram, ar A, B, C, D, E, F, G apzīmē septiņu dažādu faktoru nominālvērtības, kas varētu ietekmēt rezultātus, ja to nominālvērtības nedaudz mainās. To alternatīvās vērtības apzīmē ar atbilstošiem mazajiem burtiem a, b, c, d, e, f un g. Tas dod 2⁽¹⁾ jeb 128 dažādas iespējamās kombinācijas.

Ir iespējams izvēlēties astoņu šādu kombināciju apakškopu, kurā ir līdzsvars starp lielajiem un mazajiem burtiem (11. tabula). Jāveic astoņas noteikšanas, kurās izmanto izraudzīto faktoru kombināciju (A–G). Noteikšanu rezultāti ir parādīti nākamajā tabulā kā S–Z.

11. tabula

Eksperiments nolūkā pārbaudīt pētījumu robustumu (nelielas izmaiņas)

Faktora vērtība F	Noteikšanu skaita kombinācija							
	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
Novērotais rezultāts R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Aprēķiniem skatīt paraugus robustuma pārbaudei 3.3. punktā.

3.1.1.4. Stabilitāte

Ir novērots, ka analizējamās vielas vai matricas sastāvdaļu nepietiekama stabilitāte paraugā uzglabāšanas laikā vai analīzi laikā var dod ievērojamas novirzes analīzi rezultāta iznākumā. Turklāt jāpārbauda kalibrēšanas standarta stabilitāte šķīdumā. Parasti analizējamās vielas stabilitāti ir viegli raksturot dažādos uzglabāšanas apstākļos. Uzglabāšanas apstākļu kontrole ir daļa no parastās laboratoriju apstiprināšanas sistēmas. Ja tas nav zināms, piemēri tam, kā var noteikt stabilitāti, ir doti turpmāk tekstā.

Analizējamās vielas stabilitāte šķīdumā

- Sagatavo svaigus analizējamās vielas vai vielu standartšķīdumus un atšķaida, kā noteikts testa norādījumos, lai iegūtu pietiekamas alikvotās daļas (piemēram, 40) no katras izvēlētas koncentrācijas (tuvu minimālajai vajadzīgajai veikspējas robežai attiecībā uz vielām, kam nav noteikta atļautā robeža, vai tuvu atļautajai robežai attiecībā uz pārējām vielām. Sagatavo abus analizējamās vielas šķīdumus – ko izmanto pastiprināšanai un galīgās analīzes šķīdumā, un otru, kas interesē (piemēram, standartu atvasinājumu).
- Izmēra analizējamās vielas saturu svaigi sagatavotajā šķīdumā saskaņā ar testa norādījumiem.
- Salej attiecīgus tilpumus piemērotos konteineros, uzliek etiķetes un uzglabā saskaņā ar šādu shēmu:

⁽¹⁾ Atgūstamība (šajā gadījumā): tā paraugam pievienotā analizējamās vielas masas frakcija, kas ir galīgajā izvilkmū. Pārējā dokumenta daļā tiek pieņemts, ka ieguvums un atgūstamība ir vienādi, tādēļ lieto tikai terminu "atgūstamība".

12. tabula

Shēma analizējamās vielas stabilitātes noteikšanai šķīdumā

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Tumšs	10 alikvotās daļas	10 alikvotās daļas	10 alikvotās daļas
Gaišs			10 alikvotās daļas

- Būtu jāizvēlas vienu, divas, trīs un četras nedēļas ilgs vai, ja vajadzīgs, ilgāku uzglabāšanas laiks, t. i., līdz pirmajām degradēšanās pazīmēm, kas novērojamas identificēšanas un/vai kvantificēšanas laikā. Jāreģistrē maksimālais uzglabāšanas laiks un optimālie uzglabāšanas nosacījumi.
- Analizējamās vielas koncentrācijas aprēķināšana katrā alikvotajā daļā jāveic, izmantojot svaigi sagatavotu analizējamās vielas šķīdumu analīzi laikā (kā 100 %).

$$\text{Atlikusī analizējamā viela (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{svaigs}}$$

C_i = koncentrācija laika punktā

C_{svaigs} = koncentrācija svaigā šķīdumā

Analizējamās vielas vai vielu stabilitāte matricā

- Ja vien iespējams, būtu jālieto dabiski inficēti paraugi. Ja dabiski inficēts materiāls nav pieejams, jālieto matrica, kas pastiprināta ar analizējamo vielu.
- Ja ir pieejams dabiski inficēts materiāls, materiāla koncentrācija jānosaka, kamēr tas vēl ir svaigs. Turpmāk materiāla alikvotās daļas būtu jāņem pēc vienas, divām, trim, četrām un 20 nedēļām un jānosaka koncentrācija. Audi jāuzglabā vismaz minus 20 °C temperatūrā vai zemākā, pēc vajadzības.
- Ja nav pieejams dabiski inficēts materiāls, ņem tukšo materiālu un homogenizē to. Sadala materiālu piecās alikvotajās daļās. Stiprina katru alikvoto daļu ar analizējamo vielu, kuru vēlamas sagatavot nelielos ūdens šķīduma daudzumos. Nekavējoties analizē vienu alikvoto daļu. Uzglabā atlikušās alikvotās daļas vismaz minus 20 °C temperatūrā vai zemākā, ja vajadzīgs, un analizē tās pēc vienas, divām, trim, četrām un 20 nedēļām.

3.1.1.5. Kalibrēšanas līknes

Ja kvantificēšanai izmanto kalibrēšanas līknes:

- līknes konstruēšanā jāizmanto vismaz pieci līmeņi (ietverot nulli),
- jāapraksta līknes darbības diapazons,
- jāapraksta līknes matemātiskā formula un datu derīgums,
- jāapraksta līknes parametru pieņemamības diapazons. Ja vajadzīga sērijveida kalibrēšana uz standartšķīduma bāzes, norāda pieņemamības diapazonus tiem kalibrēšanas līknes parametriem, kas var variēt no sērijas uz sēriju.

3.1.2. Konvencionālas validēšanas procedūras

Lai aprēķinātu parametrus saskaņā ar konvencionālām metodēm, jāveic vairāki atsevišķi eksperimenti. Katrs veikspējas rādītājs jānosaka katrām lielākām izmaiņām (sk. iepriekš pieņemamības/robustuma). Metodēm, kas ļauj noteikt vairākas analizējamās vielas, vienlaicīgi var analizēt vairākas analizējamās vielas, kamēr iepriekš ir izslēgtas iespējamās nozīmīgās pārklāšanās. Līdzīgi var noteikt vairākus veikspējas rādītājus. Tā, lai samazinātu darba slodzi, ieteicams pēc iespējas apvienot eksperimentus (piemēram, atkārtojamību un reproducējamību laboratorijas iekšienē ar specifiskumu, tukšo paraugu analīzi, lai noteiktu izšķiršanas robežu un pārbaudītu specifiskumu).

3.1.2.1. Atgūstamība

Ja nav pieejams CRM, atgūstamība jānosaka eksperimentāli, lietojot pastiprinātu tukšo matricu, piemēram, ievērojot šādu shēmu:

- atlasa 18 alikvotās daļas tukšā materiāla un pastiprina sešas alikvotās daļas, katru 1, 1,5 un 2 reiz minimālās vajadzīgās veikspējas robeža vai 0,5, 1 un 1,5 reiz atļautā robeža,
- analizē paraugus un aprēķina koncentrāciju, kas ir katrā paraugā,

- lietojot turpmāk tekstā doto vienādojumu, aprēķina atgūstamību katram paraugam,
- aprēķina vidējo atgūstamību un CV no sešiem rezultātiem katrā līmenī.
- Atgūstamības % = $100 \times \text{izmērītais saturs/stiprināšanas līmenis}$.

Šī konvencionālā atgūstamības noteikšanas metode ir variants standarta pievienošanas metodei, kas aprakstīta 3.5. punktā, ja:

- paraugu pieņem par tukšo paraugu analizējamā parauga vietā,
- uzskata, ka ieguvums ⁽¹⁾ un atgūstamība ⁽²⁾ divām testa porcijām ir līdzīgi,
- testa paraugiem ir tāda pati masa un testa porciju izvilkumiem ir tāds pats tilpums,
- kalibrēšanas standarta daudzumu, ko pievieno otrajai (iezīmētajai) testa porcijai, apzīmē ar xADD (xADD = $\rho A.VA$),
- x1 ir izmērītā vērtība tukšajam paraugam, bet x2 ir izmērītā vērtība otrajai (iezīmētajai) testa porcijai,
- tad atgūstamības % = $100 (x2 - x1)/xADD$.

Ja kādu no iepriekšminētajiem nosacījumiem nevar sasniegt (vai uzskata, ka nevar), tad ir jāveic pilna atgūstamības noteikšanas procedūra ar standarta pievienošanas metodi, kā aprakstīts 3.5. punktā.

3.1.2.2. *Atkārtojamība*

- Sagatavo identisku matricu paraugu kopu, pastiprina ar analizējamo vielu, lai iegūtu koncentrācijas, kas ir 1, 1,5 un 2 reiz minimālā vajadzīgā veikspējas robeža vai 0,5, 1 un 1,5 reiz atļautā robeža.
- Katrā līmenī analīzes jāveic vismaz sešiem replikātiem.
- Analizē paraugus.
- Aprēķina katrā paraugā noteikto koncentrāciju.
- Pastiprinātajiem paraugiem nosaka vidējo koncentrāciju, standartnovirzi un variāciju koeficientu (%).
- Atkārti šīs darbības vismaz divas reizes.
- Pastiprinātajiem paraugiem aprēķina kopējo vidējo koncentrāciju un CV.

3.1.2.3. *Reproducējamība laboratorijas iekšienē*

- Sagatavo specificēta testa materiāla paraugu kopu (identiskas vai dažādas matricas), pastiprina ar analizējamo vielu vai vielām, lai iegūtu koncentrācijas, kas ir 1, 1,5 un 2 reiz minimālā vajadzīgā veikspējas robeža vai 0,5, 1 un 1,5 reiz atļautā robeža.
- Katrā līmenī analīzes jāveic vismaz sešiem replikātiem.
- Atkārti šīs darbības vismaz divas reizes ar dažādiem operatoriem un dažādos vides nosacījumos, piemēram, dažādas reaģentu, šķīdinātāju partijas utt., dažāda istabas temperatūra, dažādi instrumenti utt., ja iespējams.
- Analizē paraugus.
- Aprēķina katrā paraugā noteikto koncentrāciju.
- Pastiprinātajiem paraugiem nosaka vidējo koncentrāciju, standartnovirzi un variāciju koeficientu (%).

3.1.2.4. *Reproducējamība*

Ja jāveic reproducējamības verificēšana, laboratorijām jāpiedalās kōppētījumā saskaņā ar ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. *Izšķiršanas robeža (CCa)*

Izšķiršanas robeža ir jānosaka saskaņā ar identifikācijas prasībām vai prasībām attiecībā uz identificēšanu un kvantificēšanu, kā definēts daļā "Veikspējas kritēriji un citas prasības attiecībā uz analīzes metodēm" (2. daļa).

⁽¹⁾ Ieguvums: tā paraugā esošās analizējamās vielas masas frakcija, kas ir galīgajā izvilkumā.

⁽²⁾ Atgūstamība (šajā gadījumā): tā paraugam pievienotā analizējamās vielas masas frakcija, kas ir galīgajā izvilkumā. Pārējā dokumenta daļā tiek pieņemts, ka ieguvums un atgūstamība ir vienādi, tādēļ lieto tikai terminu "atgūstamība".

Vielām, kurām nav noteikta atļautā robeža, CC α var noteikt:

- vai nu ar kalibrēšanas līknes procedūru saskaņā ar ISO 11843 (17) (šeit minēta kā tīrā variablā stāvokļa kritiskā vērtība). Šajā gadījumā lieto tukšo materiālu, kas vienādiem soļiem ir pastiprināts minimālajā prasītajā veiktspējas līmenī un virs tā. Analizē paraugus. Pēc identificēšanas grafiski attēlo signālu pret pievienoto koncentrāciju. Atbilstošā koncentrācija uz Y nogriežņa plus 2,33 reiz laboratorijas iekšējās reproducējamības standartnovirze ir vienāda ar izšķiršanas robežu. Tas ir piemērojams tikai kvantitatīvām noteikšanām ($\alpha = 1\%$),
- vai arī analizē vismaz 20 tukšos materiālus uz matricu, lai varētu aprēķināt attiecību signālam līdz fona trokšņiem laika logā, kurā gaidāma analizējamā viela. Kā izšķiršanas robežu izmanto trīsreizēju signāla līdz fona trokšņiem attiecību. Tas ir piemērojams kvantitatīvām un kvalitatīvām noteikšanām.

Vielām, kurām ir noteikta atļautā robeža, CC α var noteikt:

- vai nu ar kalibrēšanas līknes procedūru saskaņā ar ISO 11843 (17) (šeit minēta kā tīrā variablā stāvokļa kritiskā vērtība). Šādā gadījumā lieto tukšo materiālu, kas vienādiem soļiem ir pastiprināts līdz atļautajai robežai. Analizē paraugus. Pēc identificēšanas grafiski attēlo signālu pret pievienoto koncentrāciju. Atļautajai robežai atbilstošā koncentrācija plus 1,64 reiz laboratorijas iekšējās reproducējamības standartnovirze ir vienāda ar izšķiršanas robežu ($\alpha = 5\%$),
- vai analizējot vismaz 20 tukšos paraugus uz matricu, kas pastiprināti ar analizējamo vielu vai vielām līdz atļautajai robežai. Koncentrācija līdz atļautajai robežai plus 1,64 reiz atbilstošā standartnovirze ir izšķiršanas robeža ($\alpha = 5\%$).

Sk. arī 5. pantu un 3.2. punktu.

3.1.2.6. Noteikšanas spēja (CC β)

Noteikšanas spēja jānosaka saskaņā ar prasībām attiecībā uz skrīningu, identifikāciju vai identifikāciju un kvantificēšanu, kā noteikts (sk. 2. daļu).

Vielām, kurām nav noteikta atļautā robeža, CC β var noteikt:

- vai nu ar kalibrēšanas līknes procedūru saskaņā ar ISO 11843 (17) (šeit minēta kā tīrā variablā stāvokļa minimālā nosakāmā vērtība). Šajā gadījumā lieto tukšo materiālu, kas vienādiem soļiem ir pastiprināts minimālajā prasītajā veiktspējas līmenī un zem tā. Analizē paraugus. Pēc identificēšanas grafiski attēlo signālu pret pievienoto koncentrāciju. Izšķiršanas robežai atbilstošā koncentrācija plus 1,64 reiz vidējā izmērītā sastāva laboratorijas iekšējās reproducējamības standartnovirze pie izšķiršanas robežas ir vienāds ar noteikšanas spēju ($\beta = 5\%$),
- vai analizējot vismaz 20 tukšos materiālus uz matricu, kas pastiprināti ar analizējamo vielu vai vielām līdz izšķiršanas robežai. Analizē paraugus un identificē analizējamās vielas. Izšķiršanas robežas vērtība plus 1,64 reiz izmērītā sastāva laboratorijas iekšējās reproducējamības standartnovirze ir vienāds ar noteikšanas spēju ($\beta = 5\%$),
- ja nav pieejami kvantitatīvi rezultāti, noteikšanas spēju var noteikt, izpētot pastiprināto tukšo materiālu pie izšķiršanas robežas un virs tās. Šādā gadījumā koncentrācijas līmenis, ja paliek tikai $\leq 5\%$ kļūdaini atbilstošu rezultātu, ir vienāds ar metodes noteikšanas spēju. Tādēļ, lai nodrošinātu šai noteikšanai ticamu pamatu, jāveic vismaz 20 analīzes vismaz vienam koncentrācijas līmenim.

Vielām, kurām nav noteikta atļautā robeža, CC β var noteikt:

- vai nu ar kalibrēšanas līknes procedūru saskaņā ar ISO 11843 (17) (šeit minēta kā tīrā variablā stāvokļa minimālā nosakāmā vērtība). Šādā gadījumā lieto reprezentatīvu tukšo materiālu, kas vienādiem soļiem ir pastiprināts tuvu atļautajai robežai. Analizē paraugus un identificē analizējamo vielu vai vielas. Aprēķina vidējā izmērītā sastāva standartnovirzi pie izšķiršanas robežas. Izšķiršanas robežas vērtībai atbilstošā koncentrācija plus 1,64 reiz laboratorijas iekšējās reproducējamības standartnovirze ir vienāds ar noteikšanas spēju ($\beta = 5\%$),
- vai analizējot vismaz 20 tukšos paraugus uz matricu, kas pastiprināti ar analizējamo vielu vai vielām līdz izšķiršanas robežai. Izšķiršanas robežas vērtība plus 1,64 reiz atbilstošā standartnovirze ir vienāds ar noteikšanas spēju ($\beta = 5\%$).

Sk. arī 3.2. iedaļu.

3.1.2.7. *Robustums (nozīmīgas izmaiņas)*

Analīzes metode jāpārbauda dažādos eksperimentālos apstākļos, kas ietver, piemēram, dažādas sugas, dažādas matricas vai dažādus paraugu ņemšanas nosacījumus. Ieviestajām izmaiņām jābūt nozīmīgām. Šo izmaiņu nozīmīgumu var novērtēt, izmantojot, piemēram, Jūdena metodi (15)(16). Visām nozīmīgajām izmaiņām, par kurām parādīts, ka tām ir svarīga ietekme uz pārbaudes veikspēju, jānosaka katrs veikspējas rādītājs.

3.1.3. **Validēšana saskaņā ar alternatīvām metodēm**

Ja piemēro alternatīvas validēšanas procedūras, validēšanas protokolā nosaka to pamatā esošo modeli un stratēģiju ar attiecīgajiem priekšnoteikumiem, pieņēmumiem un formulām vai sniedz vismaz atsauci uz to pieejamību. Turpmāk tekstā dots alternatīvas metodes piemērs. Ja lieto, piemēram, iekšēju validēšanas modeli, veikspējas rādītājus nosaka tādā veidā, kas ar to pašu validēšanas procedūru ļauj validēt nozīmīgas izmaiņas. Tam ir vajadzīgs validēšanas eksperimentālā plāna projekts.

3.1.3.1. *Eksperimentālais plāns*

Eksperimentālo plānu izstrādā atkarībā no dažādo pētāmo sugu skaita un dažādiem pētāmajiem faktoriem. Tādējādi par pirmo soli visā validēšanas procedūrā uzskata paraugu kopumu, ko nākotnē analizēs laboratorijā, lai atlasītu visnozīmīgākās sugas un tos faktorus, kas var ietekmēt mērījumu rezultātus. Pēc tam izvēlas koncentrācijas diapazonu atkarībā no mērķa atbilstoši interesējošajam līmenim.

Piemērs:

- ar validējamo analīzes metodi vienlaicīgi var pētīt dažādas analizējamās vielas,
- nosaka divas dominējošā faktora variācijas (A un B). Dominējošie faktori veido pamatu, uz kura kombinē faktoru līmeni. Šie dominējošie faktori var ietvert tādus faktorus kā sugas vai matrica. Šajā piemērā uzskatīja, ka dominējošajam faktoram ir divas variācijas, piemēram, divas dažādas sugas (A un B suga). Kopumā ir iespējams variēt dominējošos faktorus vairāk nekā divos līmeņos, kas tikai palielina veicamo analīžu skaitu,
- izvēlētie faktori variējami divos līmeņos (norādot, kurš ir +, bet kurš ir -).

13. tabula**To faktoru piemēri, kurus uzskata par svarīgiem validēšanas procedūrai**

Dzīvnieka dzimums	(1. faktors)
Šķirne	(2. faktors)
Transportēšanas nosacījumi	(3. faktors)
Uzglabāšanas nosacījumi	(4. faktors)
Parauga svaigums	(5. faktors)
Nobarošanas nosacījumi	(6. faktors)
Dažādi operatori ar dažādām pieredzēm	(7. faktors)

14. tabula**Iespējamais eksperimentālais plāns iepriekš minētajam piemēram**

Sugas	1. faktors	2. faktors	3. faktors	4. faktors	5. faktors	6. faktors	7. faktors	Parauga Nr.
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Sugas	1. faktors	2. faktors	3. faktors	4. faktors	5. faktors	6. faktors	7. faktors	Parauga Nr.
B	+	+	-	-	-	-	+	10
B	+	-	-	-	-	+	-	11
B	+	-	-	-	-	-	-	12
B	-	-	-	-	-	-	-	13
B	-	+	-	-	-	-	-	14
B	-	-	-	+	-	+	-	15
B	-	-	-	-	-	-	+	16
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Tālāk katrs paraugs (katru faktoru līmeņa kombināciju) ir jāapstrādā ar četrām dažādām koncentrācijām, kas ir tuvu interesējošajam līmenim, un katram līmenim analizē vienu tukšo paraugu, visam validēšanas eksperimentam kopā jāveic $5 \times 16 = 80$ analīzes.

No šiem 80 mērījumiem ir iespējams aprēķināt rezultātus (13)(14).

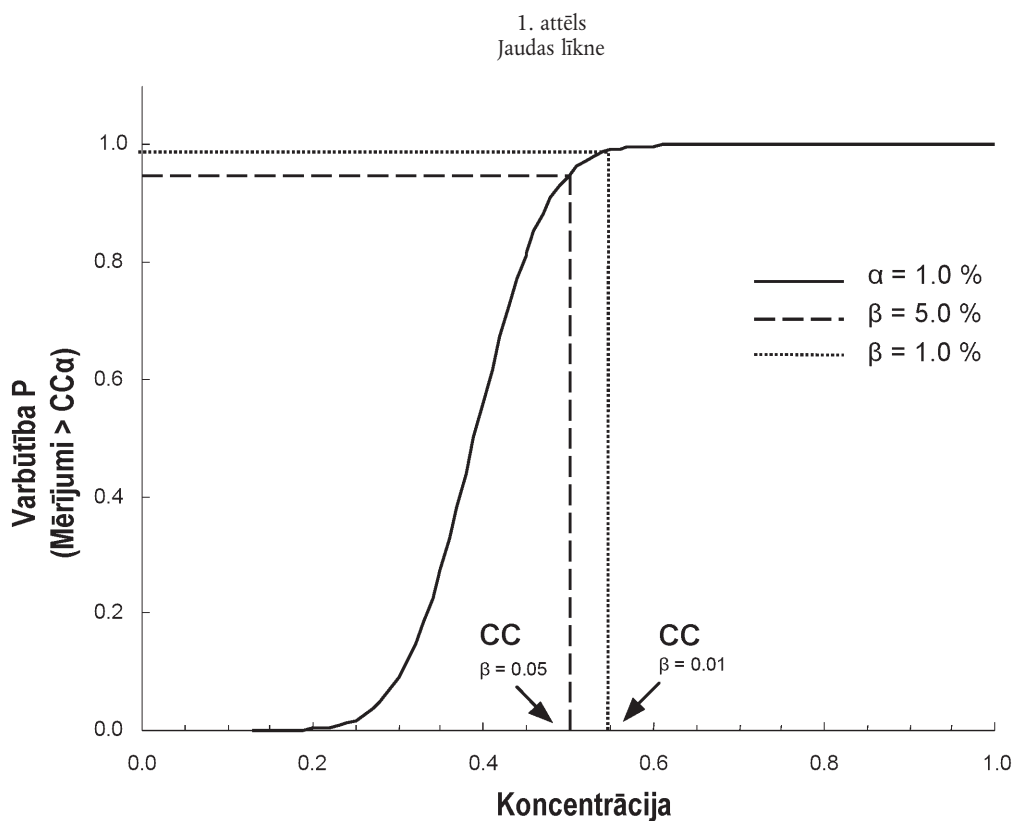
Atgūstamība:

- atkārtojamība uz koncentrācijas līmeni (sir),
- laboratorijas iekšējā atkārtojamība uz koncentrācijas līmeni (sir),
- izšķiršanas robeža (CC α),
- noteikšanas spēja (CC β),
- jaudas līkne (β kļūdas proporcija pret koncentrāciju (sk. 3.1.3.2.)),
- robustums pie nozīmīgām izmaiņām; robustumu pie nelielām izmaiņām var noteikt saskaņā ar 3.1.1.3. punktu,
- ar 16 paraugiem saistītas kalibrēšanas līknes,
- viena kopējā kalibrēšanas līkne,
- kopējās kalibrēšanas līknes prognozējamais intervāls,
- matricas izraisītas novirzes (smat),
- analīzes gaitā radušās novirzes (srūn),
- atsevišķu faktoru ietekme uz mērījumu rezultātiem.

Šie veiktspējas rādītāji ļauj veikt visaptverošu novērtējumu metodes veiktspējas līmenim, jo tiek izpētīta ne tikai atsevišķo faktoru ietekme, bet arī šo faktoru attiecīgās kombinācijas. Ar šā eksperimenta projekta palīdzību var nolemt, vai viens vai otrs no izvēlētajiem faktoriem būtu izslēdzams no kopējās kalibrēšanas līknes, jo tas ievērojami nobīdās no pārējo faktoru standartnovirzes.

3.1.3.2. Jaudas līkne

Jaudas līkne sniedz informāciju par metodes noteikšanas spēju izraudzītajā koncentrācijas diapazonā. Tā attiecas uz β kļūdas risku, piemērojot pētījuma metodi. Jaudas līkne ļauj aprēķināt noteikšanas spējas attiecīgām metožu kategorijām (skrīningam, apstiprināšanai) vai tiem (kvalitatīva vai kvantitatīva) noteiktai β kļūdai (t. i., 5 %).



1. zīmējumā attēlots noteikšanas spējas grafiskas noteikšanas piemērs (analīzes metodes $CC\beta$). Šajā konkrētajā metodē saglabājas risks pieņemt kļūdainu 5 % izšķiršanu pie koncentrācijas 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pie koncentrācijas 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ risks pieņemt maldīgi atbilstošu izšķiršanu samazinās līdz 1 %.

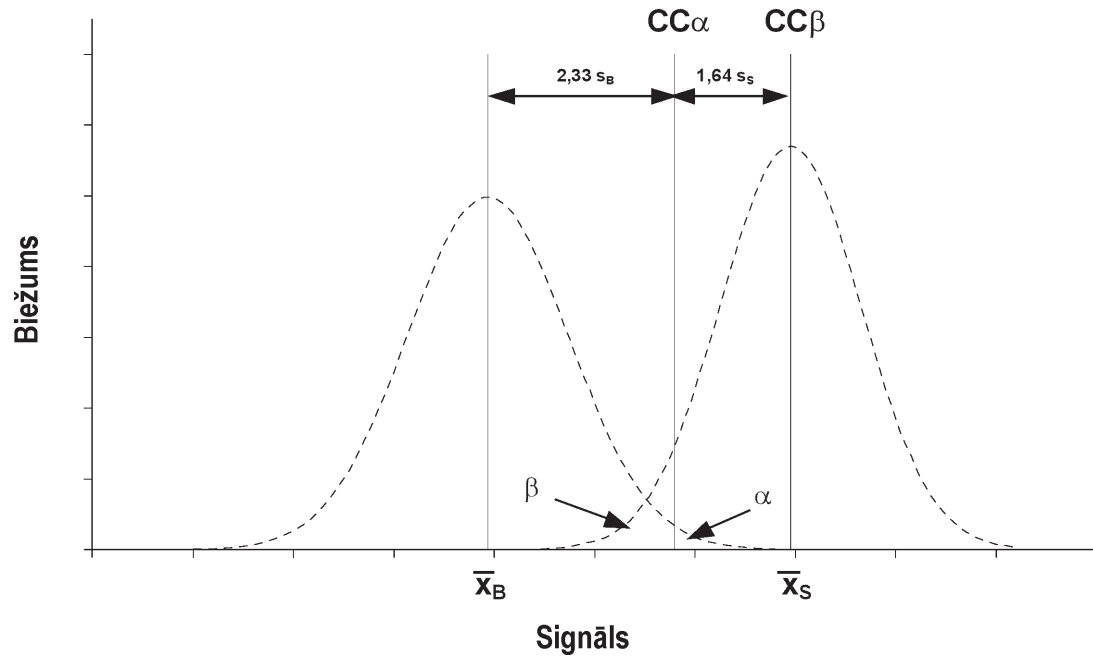
3.1.3.3. Reproducējamība

Koncepcija metodes reproducējamības noteikšanai vienotā laboratorijas pētījumā (iekšējā validēšana) prasa atkārtot piedalīšanos kvalifikācijas pētījumos saskaņā ar ISO norādēm 43-1 (3) un 43-2 (4). Laboratorijām atļauts izvēlēties pašām savas metodes, ja šīs metodes lieto parastos apstākļos. Lai novērtētu metodes reproducējamību, var izmantot laboratorijas standartnovirzi.

3.2. DAŽĀDU ANALĪTISKO ROBEŽU GRAFISKS ATTĒLOJUMS

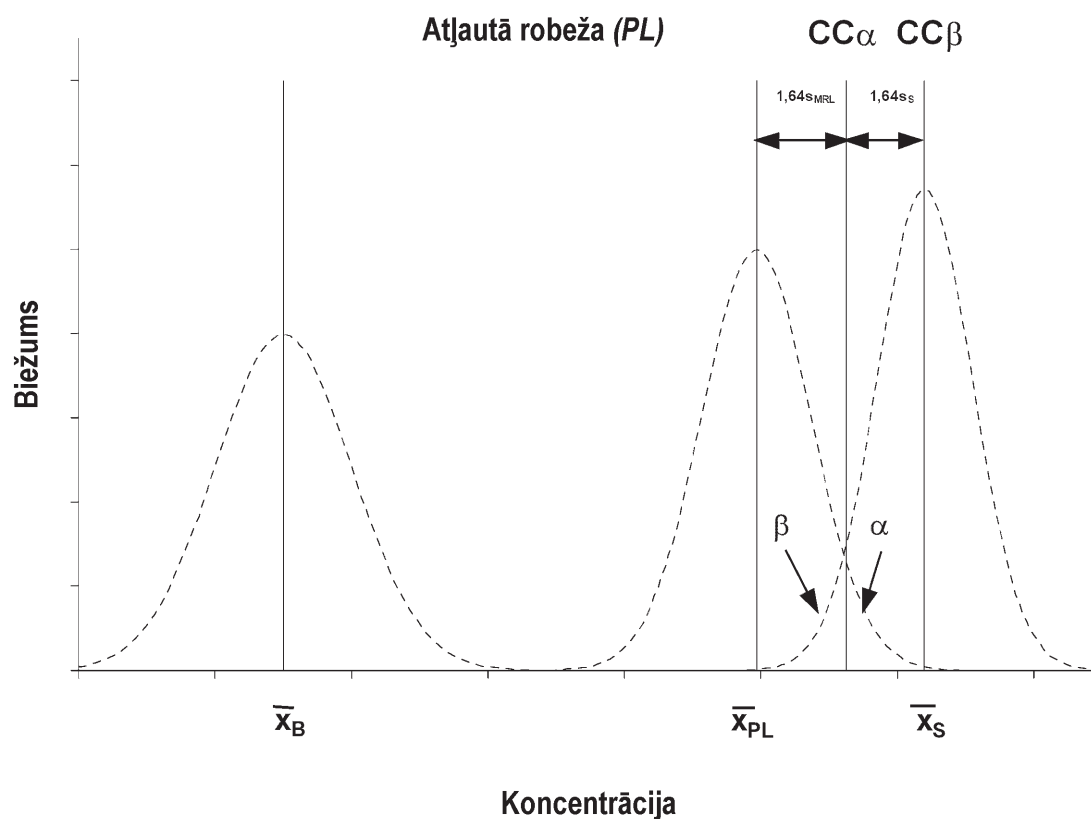
2. attēls

Vielas, kurām nav noteikta atļautā robeža



- \bar{x}_S inficēta parauga signāla vērtība
- s_B tukšā parauga standartnovirze (noteikta, ievērojot laboratorijas iekšējās reproducējamības nosacījumus)
- s_S inficētā parauga standartnovirze (noteikta, ievērojot laboratorijas iekšējās reproducējamības nosacījumus)
- α kļūdaini neatbilstošu rezultātu proporcija
- β kļūdaini atbilstošu rezultātu proporcija
- $CC\alpha$ signāls ar doto α kļūdu un 50 % β kļūdu
- $CC\beta$ signāls ar ļoti mazu α kļūdu un β kļūdu

3. attēls
Vielas, kurām ir noteikta atļautā robeža



- \bar{X}_B vidējā "koncentrācija" tukšajā paraugā
- \bar{X}_{PL} vidējā koncentrācija paraugā, kas līdz atļautajai robežai satur analizējamo vielu
- \bar{X}_S vidējā koncentrācija inficētā paraugā
- S_{PL} standartnovirze paraugā, kas līdz atļautajai robežai satur analizējamo vielu (noteikta, ievērojot laboratorijas iekšējos atkārtojamības nosacījumus)
- S_S inficētā parauga standartnovirze (noteikta, ievērojot laboratorijas iekšējās reproducējamības nosacījumus)
- α kļūdaini neatbilstošu rezultātu proporcija
- β kļūdaini atbilstošu rezultātu proporcija
- CC_α signāls ar doto α kļūdu un 50 % β kļūdu
- CC_β signāls ar ļoti mazu α kļūdu un β kļūdu

3.3. APRĒĶINU PIEMĒRS ROBUSTUMA PĀRBAUDEI NELIELU IZMAIŅU GADĪJUMĀ SASKAŅĀ AR JŪDENA METODI (16)

Vidējo vērtību salīdzināšana (A)

$$A_A = AA = \Sigma(A_i)/4(A_i)/4$$

$$A_B = AB = \Sigma(B_i)/4(B_i)/4$$

$$A_C = AC = \Sigma(C_i)/4(C_i)/4$$

$$A_D = AD = \Sigma(D_i)/4(D_i)/4$$

$$A_E = AE = \Sigma(E_i)/4(E_i)/4$$

$$A_F = AF = \Sigma(F_i)/4(F_i)/4$$

$$A_G = AG = \Sigma(G_i)/4(G_i)/4$$

$$A_a = Aa = \Sigma(a_i)/4(a_i)/4$$

$$A_b = Ab = \Sigma(b_i)/4(b_i)/4$$

$$A_c = Ac = \Sigma(c_i)/4(c_i)/4$$

$$A_d = Ad = \Sigma(d_i)/4(d_i)/4$$

$$A_e = Ae = \Sigma(e_i)/4(e_i)/4$$

$$A_f = Af = \Sigma(f_i)/4(f_i)/4$$

$$A_g = Ag = \Sigma(g_i)/4(g_i)/4$$

Salīdzina lielo burtu (no AA līdz AG) vidējos ar tiem atbilstošo mazo burtu vidējiem (no Aa līdz Ag). Ja faktoram ir ietekme, atšķirība būs ievērojami lielāka nekā citu faktoru atšķirības.

Robustu metodi neietekmē izmaiņas, kas gandrīz vienmēr sastopamas starp laboratorijām.

Ja nav īpašas atšķirības, ar septiņām atšķirībām dod reālāko izlases kļūdas mērījumu.

Atšķirības (Di)

$$Da = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$$

$$Db = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$$

$$Dc = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$$

$$Dd = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$$

$$De = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$$

$$Df = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$$

$$Dg = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$$

Atšķirību kvadrāti (Di²)

$$Da^2 = \text{vērtība } a$$

$$Db^2 = \text{vērtība } b$$

$$Dc^2 = \text{vērtība } c$$

$$Dd^2 = \text{vērtība } d$$

$$De^2 = \text{vērtība } e$$

$$Df^2 = \text{vērtība } f$$

$$Dg^2 = \text{vērtība } g$$

Atšķirību standartnovirze Di (SDi):

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

Ja SDi ievērojami pārsniedz standartnovirzi metodei, ko veic saskaņā ar laboratorijas iekšējās reproducējamības nosacījumiem (sk. iepriekš), ir iepriekš pieņemts secinājums, ka visiem faktoriem kopā ir ietekme uz rezultātu, pat ja katrs atsevišķais faktors neuzrāda nozīmīgu ietekmi, un ka metode, salīdzinot ar izraudzītajām modifikācijām, nav pietiekami robusta.

3.4. APRĒĶINA PIEMĒRI IEKŠĒJAI VALIDĒŠANAS PROCEDŪRAI

Piemēri un aprēķini iekšējam validēšanas protokolam, kā aprakstīts pie validēšanas alternatīviem modeļiem (3.1.3.) (13) (14).

3.5. PIEMĒRI STANDARTA PIEVIENOŠANAS METODEI

Testa paraugu ar analizējamās vielas saturu T sadala divās testa porcijās – 1. un 2. testa porcija ar attiecīgu masu m¹ un m². Otrajai testa porcijai pievieno ρA koncentrācijas analizējamās vielas šķīdumu ar tilpumu VA. Pēc metodei raksturīgās ekstrakcijas un attīrīšanas soļiem iegūst divu testa porciju izvilkumus ar attiecīgajiem tilpumiem V1 un V2. Pieņem, ka analizējamās vielas atgūstamība ir rc. Abus izvilkumus pārbauda ar sensitivitātes mērīšanas b metodi un attiecīgi nosaka analīzes mērījumu x1 un x2.

Ja pieņem, ka rc un b ir vienādi analizējamajai vielai sākotnējā paraugā un inficētajā paraugā, tad T saturu var aprēķināt kā:

$$T = x_1 \cdot V_1 \cdot T = x_1 \cdot V_1 \cdot \rho A \cdot VA / (x_2 \cdot V_2 \cdot m_1 - x_1 \cdot V_1 \cdot m_2)_A \cdot V_A / (x_2 \cdot V_2 \cdot m_1 - V_1 \cdot m_2)$$

Šī metode ļauj noteikt atgūstamību rc. Tad papildus pārbaudei, kas aprakstīta iepriekš, daļai no pirmās testa porcijas izvilkuma (tilpums V3) pievieno zināmu daudzumu ρB.VB analizējamās vielas un veic pārbaudi. Analīzes mērījums ir x3, un atgūstamība ir:

$$rc = x_2 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot rc$$

$$= x_2 \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot \rho B \cdot VB / [x_3 \cdot V_1 \cdot V_3 (T \cdot m_2$$

$$+ \rho A \cdot VA) - x_2 \cdot V_2 \cdot T \cdot m_1 (V_3 - VB)]_B \cdot V_B / [x_3 \cdot V_1 \cdot V_3 (T \cdot m_2 + \text{Turklāt ir iespējams aprēķināt sensitivitāti } b \text{ kā } :_A \cdot V_A) - x_2 \cdot V_2 \cdot T \cdot m_1$$

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

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

Visi piemērošanas nosacījumi un sīkas ziņas ir aprakstīti (18).

4. LIETOTIE SAĪSINĀJUMI

AAS	atomu absorbcijas spektrometrija
AES	atomu emisijas spektrometrija
AOAC-I	STARPTAUTISKĀ Oficiālo ķīmiķu analītiķu asociācija
B	saistītā frakcija (imūntests)
CI	ķīmiskā jonizācija
CRM	sertificēts standartmateriāls
CV	variāciju koeficients
2 D	divdimensiju
DAD	noteikšana ar diodu matricas detektoru
DPASV	diferencēta impulsa anodsvītrosanas voltmetrija
ECD	noteikšana ar elektronu satveres detektoru
EI	elektronu impulsa jonizācija
GC	gāzu hromatogrāfija
HPLC	augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija
HPTLC	augstas izšķirtspējas plānslāņa hromatogrāfija
HRMS	augsta izšķirtspēja (masspektrometrija)
ICP-AES	induktīvi saistītas plazmas atomu emisijas spektrometrija
ICP-MS	induktīvi saistītas plazmas masspektrometrija
IR	infrasarkan
ISO	Starptautiskā Standartizācijas organizācija
LC	šķidrums hromatogrāfija
LR(MS)	zema izšķirtspēja (masspektrometrija)
MRPL	minimālā vajadzīgā veiktspējas robeža
MS	masspektrometrija
m/z	masas/lādiņa attiecība
RF	šķīdinātāja frontes relatīvā migrācija (TLC)
RSDL	laboratorijas relatīvās standartnovirzes
SIM	izvēlētu jonu kontrole
TLC	plānslāņa hromatogrāfija
UV	ultravioletā gaisma
VIS	redzamā gaisma

5. ATSAUCES

- (1) 1. ISO 17025: 1999 *General requirement for the competence of calibration and testing laboratories.*
- (2) 2. ISO 3534-1: 1993 *Statistical Methods for quality control – Vol. 1 vocabulary and symbols.*
- (3) 3. ISO Guide 43-1: 1997 *Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.*
- (4) 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) 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) 6. ISO 78-2: 1999 *Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis.*
 - (7) 7. W. G. de Ruig and J. M. Weseman “A new approach to confirmation by infrared spectrometry” *J. Chemometrics* 4 (1990) 61-77.
 - (8) 8. Sk., piem., 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) 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, xxvi + 675. lpp.
 - (10) 10. *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.
 - (11) 11. *Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications*, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, 329. lpp.
 - (12) 12. IUPAC (1995), *Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies*, *Pure & Applied Chem.* 67, 331.
 - (13) 13. Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) *Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept.* *Analyst*, 120, 173.
 - (14) 14. Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) *Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation.* *J. Chromatogr.*, 716, 221.
 - (15) 15. *OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures*, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.
 - (16) 16. W.J. Youden; Steiner, E.H.; “*Statistical Manual of the AOAC-Association of Official Analytical Chemists*”, AOAC-I, Washington DC: 1975, 35. lpp. ff.
 - (17) 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) 18. R. W. Stephany & L. A. van Ginkel: “*Yield or recovery: a world of difference*”. *Proceedings Eight Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206.* ISBN 3-900554-17X, 2.-9. lpp.
 - (19) 19. 1971. gada 18. oktobra Direktīva 71/354/EEK par dalībvalstu tiesību aktu tuvināšanu attiecībā uz mērvienībām (OV L 243, 29.10.1971., 29. lpp.).
 - (20) 20. ISO 31-0: 1992 *Quantities and units – Part 0: General principles.*
-