

31993D0256

L 118/64

DZIENNIK URZĘDOWY WSPÓLNOT EUROPEJSKICH

14.5.1993

DECYZJA KOMISJI**z dnia 14 kwietnia 1993 r.****ustanawiająca metody stosowane w celu wykrywania pozostałości substancji mających działanie hormonalne lub tyreostatyczne**

(93/256/EWG)

KOMISJA WSPÓLNOT EUROPEJSKICH,

przyjęte procedury analityczne muszą być wystarczająco wrażliwe, aby wykryć obecność pozostałości substancji o działaniu hormonalnym lub tyreostatycznym;

uwzględniając Traktat ustanawiający Europejską Wspólnotę Gospodarczą,

pobieranie próbek stanowi istotną część metody analizy; dlatego też powinny być ustanowione zasady pobierania próbek;

uwzględniając dyrektywę Rady 85/358/EWG z 16 lipca 1985, uzupełniającą dyrektywę 81/602/EWG, dotyczącą zakazu niektórych substancji mających działanie hormonalne i jakichkolwiek innych substancji o działaniu tyreostatycznym⁽¹⁾, ostatnio zmienioną dyrektywą 88/146/EWG⁽²⁾, w szczególności jej art. 5 ust. 2,dla celów niniejszej decyzji, powinno się wziąć pod uwagę kryteria określone w punkcie 1 Załącznika do dyrektywy Rady 85/591/EWG z dnia 20 grudnia 1985 dotyczącej wprowadzenia wspólnotowych metod pobierania próbek i analizy w celu monitorowania środków spożywczych przeznaczonych do spożycia przez ludzi⁽³⁾;

a także mając na uwadze, co następuje:

Biorąc pod uwagę rozwój wiedzy naukowej i technicznej, oraz dla jasności, konieczne jest uchylene decyzji Komisji 87/410/EWG⁽⁴⁾;artykuł 8 ust. 1 dyrektywy Rady 64/433/EWG z dnia 26 czerwca 1964 w sprawie problemów zdrowotnych wpływających na handel wewnątrzspółnotowy świeżym mięsem⁽⁵⁾, ostatnio zmienionej dyrektywą 92/5/EWG⁽⁶⁾, oraz art. 11 ust. 4 drugi akapit dyrektywy Rady 85/397/EWG z dnia 5 sierpnia 1985 w sprawie zdrowia i problemów zdrowotnych zwierząt wpływających na handel wewnątrzspółnotowy mlekiem poddanym obróbce cieplnej⁽⁷⁾, ostatnio zmienionej dyrektywą 89/662/EWG⁽⁸⁾, stanowią, że badania pozostałości prowadzone są zgodnie z uznanymi naukowo metodami, szczególnie tymi, które ustanowiono w dyrektywach wspólnotowych lub w innych normach międzynarodowych;

Środki przewidziane w niniejszej decyzji są zgodne z opinią Stałego Komitetu Weterynaryjnego,

PRZYJMUJE NINIEJSZĄ DECYZJĘ:

ustalenie metod analizy próbek obejmuje zdefiniowanie stosowanych procedur analitycznych, reguł, jakich należy przestrzegać podczas przygotowywania próbek oraz kryteriów, jakie należy stosować podczas przeprowadzania analiz;

Artykuł 1

Rutynowe procedury analityczne, dozwolone do wykrywania pozostałości substancji o działaniu hormonalnym lub tyreostatycznym, obejmują co następuje:

⁽¹⁾ Dz.U. L 191 z 23.7.1985, str. 46.⁽²⁾ Dz.U. L 70 z 16.3.1988, str. 16.⁽³⁾ Dz.U. L 121 z 29.7.1964, str. 2012/64.⁽⁴⁾ Dz.U. L 57 z 2.3.1992, str. 1.⁽⁵⁾ Dz.U. L 226 z 24.8.1985, str. 13.⁽⁶⁾ Dz.U. L 395 z 30.12.1989, str. 13.⁽⁷⁾ Dz.U. L 372 z 31.12.1985, str. 50.⁽⁸⁾ Dz.U. L 223 z 11.8.1987, str. 18.

- oznaczanie immunologiczne,
- chromatografia cienko-warstwowa,
- chromatografia cieczowa,
- chromatografia gazowa,
- spektrometria mas,
- spektrometria,

lub jakakolwiek inna metoda spełniająca kryteria porównywalne do tych, ustanowionych dla odpowiednich metod w Załączniku.

Artykuł 2

Próbki do analizy pobiera się według następujących zasad:

1. próbka musi być reprezentatywna i o wystarczającej wielkości, umożliwiającej wykonanie odpowiedniej analizy, na wykonanie powtórzeń analizy oraz wszelkich analiz potwierdzających;
2. próbki muszą być oznaczone w taki sposób, aby zawsze była możliwa ich identyfikacja;
3. procedury pobierania próbek, pakowanie, konserwacja, transport oraz przechowywanie próbek muszą być takie, aby była zachowana ich integralność, i aby nie wpływały ujemnie na wyniki badań. Należy zapobiec nieupoważnionemu dostępowi do próbek.

Artykuł 3

Kryteria mające zastosowanie w rutynowych metodach analizy pozostałości substancji o działaniu hormonalnym lub tyreostaticznym przedstawiono w niniejszym Załączniku.

Artykuł 4

Niniejsza decyzja zostanie ponownie zbadana przed 1 stycznia 1996, celem uwzględnienia rozwoju wiedzy naukowej i technicznej.

Artykuł 5

Decyzja Komisji 87/410/EEC zostaje niniejszym uchylona.

Artykuł 6

Niniejsza decyzja jest skierowana do Państw Członkowskich.

Sporządzono w Brukseli, dnia 14 kwietnia 1993 r.

W imieniu Komisji

René STEICHEN

Członek Komisji

ZAŁĄCZNIK

1. **DEFINICJE I WYMAGANIA OGÓLNE**1.1. **Definicje**1.1.1. *Rutynowe metody analizy*

Są to metody analizy stosowane przez Państwa Członkowskie, celem wprowadzenia w życie krajowych planów kontroli pozostałości w zwierzętach służących do produkcji żywności oraz ich produktach, zgodnie z dyrektywą Rady 86/469/EWG⁽¹⁾. Metody rutynowe muszą być zatwierdzone przez działające laboratoria i muszą spełniać odpowiednie kryteria zawarte w niniejszym Załączniku. Mogą być one zastosowane do celów klasyfikacji oraz/lub określenia zgodności:

— metody stosowane w celu klasyfikacji (metody klasyfikacyjne) są metodami używanymi do wykrywania obecności analitu lub klasy analitów na dowolnym poziomie. Metody te posiadają wysoką wydajność próbki oraz są stosowane przy przesiewie dużej ilości próbek w poszukiwaniu potencjalnych „pozytywnych”. Mają one na celu uniknięcie fałszywych rezultatów negatywnych,

— metody stosowane w celu określenia zgodności (metody zgodności) są metodami dostarczającymi informację pełną lub uzupełniającą, umożliwiającą jednoznaczną identyfikację analitu na dowolnym poziomie. Metody te mają na celu zarówno uniknięcie fałszywych rezultatów pozytywnych, jak również zachowanie niskiego poziomu prawdopodobieństwa fałszywych rezultatów negatywnych.

1.1.2. *Analit*

Jest to składnik próbki do badań, który powinien być wykryty, zidentyfikowany i/lub obliczony. Termin „analit” może zawierać związek pochodny powstały z analitu podczas wykonywania analizy.

Wynik oznaczania analitu należy wyrazić jako:

— ilość w jednostkach masy (np. μg , ng),

lub

— zawartość, wyrażoną ułamkiem masowym (np. $\mu\text{g kg}^{-1}$, ng kg^{-1}), stężeniem masowym (np. $\mu\text{g l}^{-1}$) lub stężeniem molowym (np. mol l^{-1})

1.1.3. *Próbki*1.1.3.1. *Próbka laboratoryjna*

Jest to próbka przygotowana do wysłania do laboratorium do celów badawczych.

1.1.3.2. *Próbka do badań*

Jest to próbka przygotowana z próbki laboratoryjnej, z której będą pobrane próbki analityczne.

1.1.3.3. *Próbka analityczna*

Jest to ilość materiału pobrana z próbki do badań (lub z próbki laboratoryjnej, jeżeli są jednakowe), która poddana jest badaniu lub obserwacji.

1.1.4. *Analit wzorcowy*

Jest to dobrze określona substancja deklarowanej zawartości analitu, o najwyższej możliwej czystości, służąca jako wzorzec podczas analizy.

1.1.5. *Materiał odniesienia*

Jest to materiał, którego jedna lub kilka właściwości zostało potwierdzonych zatwierdzoną metodą, a więc może być on użyty do wzorcowania przyrządu lub do sprawdzenia metody pomiaru.

(¹) Dz.U. L 275 z 26.9.1986, str. 36

- 1.1.6. *Próby zerowe*
- 1.1.6.1. *Próba zerowa próbki*
- Jest to kompletna procedura analityczna, przeprowadzona na próbce analitycznej pobranej z próbki, w której nie występuje analit.
- 1.1.6.2. *Odczynnikowa próba zerowa*
- Jest to kompletna procedura analityczna, przeprowadzona z pominięciem próbki analitycznej lub zastosowaniem równoważnej ilości odpowiedniego rozpuszczalnika, zamiast próbki analitycznej.
- 1.1.7. *Właściwość*
- Właściwość stanowi zdolność danej metody do odróżnienia badanego analitu od innych substancji. Cecha ta jest funkcją nadrzędną stosowanej zasady pomiaru, ale może być różna, w zależności od klasy związku lub formy.
- Szczegóły dotyczące właściwości muszą nawiązywać przynajmniej do jakichkolwiek substancji, po których można się spodziewać, że zasygnalizują użycie opisanej zasady pomiaru, np. produkty homologiczne, analogowe, produkty przemiany materii danej pozostałości. Powinno być możliwe określenie, na podstawie szczegółów dotyczących właściwości, stopnia, do którego dana metoda może odróżnić analit od innych substancji w warunkach eksperymentalnych.
- 1.1.8. *Dokładność*
- W niniejszej decyzji jest mowa o dokładności wartości średniej. Definicja, którą należy zastosować, znajduje się w ISO 3534–1977, pozycja 2.83 (Dokładność wartości średniej: stopień zgodności pomiędzy wartością prawdziwą a wartością średnią otrzymaną na podstawie dużej serii wyników badań.)
- Zasadnicze ograniczenia dokładności to:
- błędy przypadkowe (losowe);
 - błędy systematyczne
- Przy bardzo dużej ilości eksperymentów, dokładność wartości średniej osiąga błąd systematyczny. Przy sprawdzaniu teoretycznym metody musi być podana liczba eksperymentów.
- Miernikiem dokładności jest różnica pomiędzy mierzoną wartością średnią materiału odniesienia a jego wartością rzeczywistą, wyrażona jako procent wartości rzeczywistej. Gdy materiał odniesienia nie jest dostępny, ocenę parametrów można przeprowadzić analizując wzbogaconą próbkę materiałową.
- W przypadku braku zarówno sprawdzonych metod określających, jak i poświadczonych materiałów odniesienia, wówczas zawartość analitu w próbce może być określona na podstawie wyników uzyskanych przy pomocy metody, która wykazuje wysoki stopień właściwości, dokładności i precyzji dla analitu.
- 1.1.9. *Precyzja*
- Jest to stopień zgodności pomiędzy wynikami badania uzyskanymi przy kilkakrotnym stosowaniu procedury eksperymentalnej w przepisanych warunkach (ISO 3534–1977⁽¹⁾, pozycja 2.84), obejmujący powtarzalność i odtwarzalność wyników.
- Powtarzalność:
- Stopień zgodności pomiędzy wzajemnie niezależnymi wynikami badań, uzyskanymi w warunkach powtarzalności, tj. przy zastosowaniu tej samej metody i identycznego materiału badania, w tym samym laboratorium, przez tego samego operatora z użyciem tego samego wyposażenia, w krótkich odstępach czasu.
- Odtwarzalność:
- Stopień zgodności pomiędzy wzajemnie niezależnymi wynikami badań, uzyskanymi w warunkach odtwarzalności, tj. przy zastosowaniu tej samej metody i identycznego materiału badania, w różnych laboratoriach, przez różnych operatorów i użyciem różnego wyposażenia.
- Zgodnie z Załącznikiem do dyrektywy Rady 85/591/EWG⁽²⁾, wartości precyzji dla metod analiz, które należy uwzględnić w myśl powyższej dyrektywy, należy uzyskać z badania międzylaboratoryjnego, które najlepiej przeprowadzić według ISO 5725–1986⁽³⁾. W tym celu zostały określone w ISO 5725–1986 terminy powtarzalność i odtwarzalność. Do wykonania takich badań należy użyć próbek materiałowych o znanej zawartości analitu, z maksymalną ilością wdrożonych pozostałości.

⁽¹⁾ Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna: Statystyka – słownictwo i symbole

⁽²⁾ Dz.U. L 372 z 31.12.1985, str. 50

⁽³⁾ Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna: Precyzja metod badawczych – określenie powtarzalności i odtwarzalności dla normalizacyjnej metody badań za pomocą badań międzylaboratoryjnych.

Do czasu ustalenia odtwarzalności metody poprzez badanie międzylaboratoryjne, do celu wstępnej selekcji proponowanych metod wystarczy dostępność danych dotyczących powtarzalności

Miarą powtarzalności i odtwarzalności jest współczynnik zmienności, określony w ISO 3534-1977, 2.35 (Współczynnik zmienności: stosunek odchylenia standardowego do średniej wartości arytmetycznej).

1.1.10. *Granica wykrywania*

Jest to najmniejsza pomierzona zawartość, z której możliwe jest wykrycie obecności analitu, z rozsądną statystyczną pewnością (przynajmniej 95 % dla substancji niedozwolonych – zob. 1.2.6.1).

Granica wykrywania może być obliczona w różny sposób:

a) jednym ze sposobów jest wykonanie prób zerowych próbek na co najmniej 20 próbkach zerowych. Granica wykrycia jest obliczona jako widoczna zawartość odpowiadająca wartości średniej plus trzykrotna odchyłka standardowa dla prób zerowych.

Uwaga 1: Powinna być określona próbka analityczna zazwyczaj stosowana w tych analizach.

Uwaga 2: Jeżeli jest spodziewane, że takie czynniki, jak gatunek, płeć, wiek, karmienie, czy też inne czynniki środowiskowe, mają wpływ na właściwości danej metody, to wymagany jest zestaw złożony z przynajmniej 20 próbek zerowych dla każdej populacji homogenicznej, dla której ma być zastosowana dana metoda;

b) alternatywnie, w przypadku oznaczeń spektrometrycznych, w których reprezentatywne próby zerowe wydają jedynie biały dźwięk, granica wykrycia jest obliczona jako widoczna zawartość odpowiadająca trzykrotnej wysokości dźwięku szumu tła pomiędzy szczytami.

1.1.11. *Granica oznaczania*

Jest to najmniejsza zawartość analitu, dla której metoda ta została zatwierdzona z określoną dokładnością i precyzją.

1.1.12. *Wrażliwość*

Jest to miara zdolności metody do dyskryminacji różnic w zawartości analitu. W niniejszej decyzji, wrażliwość jest obliczana jako nachylenie krzywej wzorcowej na dowolnym poziomie.

1.1.13. *Praktyczność*

Jest to cecha procedury analitycznej, która zależy od zakresu danej metody i jest określona poprzez takie wymagania, jak wydajność próbki i koszty.

1.1.14. *Zastosowanie*

Jest to wykaz próbek materiałowych oraz/lub analitów, przy których dana metoda może być stosowana w prezentowanej postaci lub z określonymi, drobnymi zmianami.

1.1.15. *Interpretacja wyników*

1.1.15.1. *Wynik pozytywny*

Według procedur analitycznych, obecność analitu w próbce jest udowodniona, jeżeli spełnione są kryteria ogólne oraz kryteria określone dla indywidualnej metody wykrywania.

a) W przypadku substancji o zerowej tolerancji, wynik analizy jest „pozytywny”, jeżeli została udowodniona jednoznacznie tożsamość analitu występującego w próbce;

b) W przypadku substancji z ustaloną maksymalną granicą pozostałości, wynik analizy jest „pozytywny”, jeżeli określona eksperymentalnie zawartość analitu w próbce (po zastosowaniu poprawki na regenerację), jest większa niż ustalona maksymalna granica pozostałości, która uwzględni dopuszczalne prawdopodobieństwo otrzymania fałszywych pozytywnych lub fałszywych negatywnych wyników.

1.1.15.2. *Wynik negatywny*

Zgodnie z procedurą analityczną, wynik analizy uznany jest za „negatywny”, jeżeli spełnione są kryteria ogólne oraz kryteria określone dla indywidualnej metody wykrywania, w przypadku odpowiednich materiałów odniesienia oraz próby zerowej, oraz:

a) w przypadku substancji o tolerancji zerowej, tożsamość analitu nie została udowodniona jednoznacznie; lub

- b) w przypadku substancji z ustaloną maksymalną granicą pozostałości, pomierzona zawartość analitu w próbce jest poniżej poziomu określonego w punkcie 1.1.15.1 powyżej.

Uwaga: Negatywny wynik nie udowadnia w przypadku a), że analit nie występuje w próbce, ani też, jak w przypadku b), że rzeczywista zawartość analitu jest poniżej maksymalnej granicy pozostałości.

1.1.16. *Kochromatografia*

Jest to procedura, w której oczyszczony roztwór testowy, przed zastosowaniem chromatografu, zostaje podzielony na dwie części i:

- a) jedna z części jest badana chromatografem;
- b) analit wzorcowy, który ma być zidentyfikowany, zostaje dodany do drugiej części, a następnie ta mieszanina roztworu i analitu wzorcowego jest badana chromatografem. Ilość dodanego analitu wzorcowego musi być podobna do szacunkowej ilości analitu w roztworze testowym.

1.1.17. *Immunogram*

W niniejszej decyzji, immunogram jest określony jako wykres graficzny reakcji immunochemicznej w odniesieniu do czasu zatrzymania lub objętości wymywania, uzyskanej z oddzielenia chromatograficznego, z immunochemicznym wykryciem składników ekstraktu próbki.

1.2. **Wymagania ogólne**

1.2.1. *Kryteria*

Zgodnie z Załącznikiem do dyrektywy Rady 85/591/EWG, poniższe kryteria mają zastosowanie do badania metod analizy.

1.2.2. *Metody klasyfikacyjne*

Dla metod klasyfikacji nie ma ustalonych wymagań. Najważniejszym aspektem wykonania jest to, że wystąpienie fałszywych negatywnych wyników musi być minimalne.

1.2.2.1. Właściwość musi być określona.

1.2.2.2. Dokładność i precyzja:

Kwantyfikacja może nie być konieczna. W zależności od tego, czy użycie substancji jest zakazane, czy też dozwolone, metoda klasyfikacji może być jakościowa lub ilościowa. Fałszywe pozytywne wyniki są dopuszczalne, ale fałszywe negatywne wyniki, na dowolnym poziomie, powinny być minimalne.

1.2.2.3. Granica wykrywania:

Zależy ona od celu. Dla substancji o ustalonej, maksymalnej granicy pozostałości, musi być dostatecznie niska, aby można było wykryć pozostałości na tym poziomie. W przypadku substancji, które nie są dozwolone do stosowania przy zwierzętach służących do produkcji żywności, granica wykrywania powinna być możliwie jak najniższa.

1.2.2.4. Praktyczność:

Pożądana jest wysoka wydajność próbki, a koszty powinny być niskie.

1.2.3. *Metody potwierdzające*

1.2.3.1. Właściwość:

Metody potwierdzające powinny zapewniać, w takim stopniu, jak jest to możliwe, jednoznaczną informację dotyczącą składu chemicznego analitu. Jeżeli więcej niż jeden składnik wywołuje taką samą reakcję, wówczas metoda ta nie może rozróżniać tych składników.

Metody oparte jedynie na analizie chromatograficznej, bez zastosowania molekularnego, spektrometrycznego wykrywania, nie są odpowiednie jako metody potwierdzające.

Jeżeli pojedyncza technika nie posiada dostatecznej właściwości, wówczas żądane właściwości można osiągnąć przez zastosowanie procedur analitycznych składających się z odpowiedniej kombinacji oczyszczenia, oddzielania chromatograficznego oraz spektrometrycznego lub immunochemicznego wykrywania, tj. GC-MS, LC-MS, IAC/GC-MS, GC-IR, LC-IR, LC/IMG.

1.2.3.2. Dokładność

W przypadku powtarzanych analiz materiału odniesienia, granice odchyłki wartości średniej zawartości, określonej eksperymentalnie (po zastosowaniu poprawki na regenerację), od rzeczywistej wartości są następujące:

Rzeczywista zawartość (frakcja masy)	Zakres
1 µg kg ⁻¹	- 50 % do +20 %
> 1 µg kg ⁻¹ do 10 µg kg ⁻¹	- 30 % do +10 %
> 10 µg kg ⁻¹	- 20 % do +10 %

1.2.3.3. Precyzja

W przypadku powtarzanej analizy materiału odniesienia w warunkach odtwarzalności, typowe wartości laboratoryjnego współczynnika zmiany (CV), obliczone według równania Horwitz $[(CV(\%)) = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$, gdzie C jest zawartością wyrażoną jako wykładnik potęgi z 10], są następujące:

Zawartość (frakcja masy)	CV
1 µg kg ⁻¹	45 %
10 µg kg ⁻¹	32 %
100 µg kg ⁻¹	23 %
1 µg kg ⁻¹	16 %

Dla analiz wykonywanych w warunkach powtarzalności, laboratoryjne CV mieściłyby się zazwyczaj pomiędzy jedną drugą do dwóch trzecich z powyższych wartości.

1.2.3.4. Granica wykrywania:

Stosowna do danego celu (zob. 1.2.6.1)

1.2.3.5. Granica oznaczania:

Stosowna do danego celu (zob. 1.2.6.2)

1.2.3.6. Wrażliwość:

Stosowna do danego celu (zob. 1.2.6.2)

1.2.3.7. Praktyczność:

Prędkość i koszt są mniej ważne w porównaniu z metodami klasyfikacyjnymi.

Dla metod potwierdzających, większość aspektów praktyczności ma małe znaczenie w porównaniu z pozostałymi kryteriami, określonymi w niniejszej decyzji. Zazwyczaj wystarczy, aby były dostępne wymagane odczynniki i sprzęt.

1.2.4. Krzywe wzorcowe

Jeżeli dana metoda zależy od krzywej wzorcowej, wówczas muszą być podane następujące informacje:

- wzór matematyczny opisujący daną krzywą wzorcową,
- dopuszczalny zakres, wewnątrz którego parametry krzywej wzorcowej mogą się zmieniać w zależności od dnia,
- zakres roboczy krzywej wzorcowej.

W miarę możliwości, do kontroli krzywych wzorcowych metod potwierdzających, powinny być stosowane odpowiednie wewnętrzne standardy i materiały odniesienia, i powinny być podane szczególnie wariacji zmiennych, zatwierdzonej przynajmniej dla zakresu roboczego krzywej wzorcowej.

1.2.5. Podatność na interferencję

1.2.5.1.

W warunkach eksperymentalnych, które w praktyce podlegałyby wahaniom (tj. trwałość odczynnika, skład próbki, pH, temperatura), jakiegokolwiek zmiany, które mogłyby mieć wpływ na wynik analityczny, powinny być wskazane. Opis metody zawiera sposób pokonania przewidywalnej interferencji. W razie konieczności, należy opisać alternatywne zasady wykrywania odpowiednie dla potwierdzenia.

- 1.2.5.2. Jeżeli jest wykonywana kochromatografia, wówczas powinno się uzyskać tylko jeden szczyt, przy czym uwydatniona wartość (lub obszar) szczytu odpowiada ilości danego analitu. Przy GC lub LC, szerokość szczytu w połowie maksymalnej wysokości, powinna się zawierać w przedziale 90 -110 % pierwotnej szerokości, a czasy zatrzymania powinny być identyczne w granicach 5 %. Przy metodach TLC, punkt odpowiadający prawdopodobnie analitowi, powinien być jedynie pogrubiony; nowy punkt nie powinien się pojawić, a wygląd optyczny nie powinien się zmienić.
- 1.2.5.3. Bardzo ważne jest, aby zbadać interferencję, która może powstać ze składników matrycy.
- 1.2.6. *Związek pomiędzy poziomem dopuszczalnej pozostałości a granicami analitycznymi*
- 1.2.6.1. Dla substancji, które nie są dozwolone do używania przy zwierzętach służących do produkcji żywności, granica wykrywania w metodzie analitycznej musi być wystarczająco niska, aby poziom pozostałości, którego należałoby się spodziewać przy nielegalnym użyciu, był wykryty z co najmniej 95 % prawdopodobieństwem.
- 1.2.6.2. Dla substancji o ustalonej maksymalnej granicy pozostałości, granica oznaczania w danej metodzie plus trzykrotna odchyłka standardowa powstała w tej metodzie dla próbki o maksymalnej granicy pozostałości, nie może przekraczać ustalonej maksymalnej granicy pozostałości.
- 1.2.6.3. Dla substancji o ustalonej maksymalnej granicy pozostałości, dana metoda powinna być zatwierdzona dla tej granicy oraz dla połowy i dwukrotności tej granicy.

2. **KRYTERIA IDENTYFIKACJI I KWANTYFIKACJI POZOSTAŁOŚCI**

2.1. **Wymagania ogólne**

Laboratoria przeprowadzające analizę, celem ostatecznego potwierdzenia obecności pozostałości substancji organicznych o małej wadze molekularnej, zapewniają, aby spełnione były kryteria interpretacji wyników, zgodnie z wymaganiami tego rozdziału. Kryteria te zostały ustalone w celu identyfikacji analitu i mają zapobiegać fałszywym pozytywnym wynikom. Dla pozytywnej konkluzji, wyniki analityczne muszą spełniać kryteria ustalone dla konkretnej metody analitycznej.

2.2. **Uwagi ogólne dotyczące całej metody analitycznej**

2.2.1. *Przygotowanie próbki*

Próbka powinna być pozyskana, przemieszczana i przetwarzana w sposób zapewniający maksymalną szansę na wykrycie analitu, jeżeli istnieje.

2.2.2. *Podatność na interferencję*

Dotyczy informacji podanej w punkcie 1.2.5. (Podatność na interferencję)

2.2.3. *Kryteria ogólne dla całej procedury*

- 2.2.3.1. Należy znać właściwość (1.1.7), granice wykrywania (1.1.10) oraz granice oznaczania analitu w badanej próbce materiałowej w danej metodzie.

Uwaga: Informację tę można uzyskać z danych eksperymentalnych oraz/lub z teoretycznych rozważań.

- 2.2.3.2. Dla pozytywnego wyniku, zachowanie analitu, fizyczne i chemiczne, podczas analizy powinno być nieodróżnialne od zachowania odpowiadającego mu analitu wzorcowego w odpowiedniej próbce materiałowej.

- 2.2.3.3. Wynik pozytywny i negatywny analizy będzie znajdował się jedynie w granicach właściwości oraz wykrywania i oznaczania metody stosowanej do analitu i badanej próbki materiałowej.

- 2.2.3.4. Materiał odniesienia lub materiał wzmocniony, zawierający znane ilości analitu, powinien być prowadzony przez całą procedurę równocześnie z każdą partią analizowanych próbek do badań. Alternatywnie, do próbek do badań może być dodany standard wewnętrzny.

2.2.4. *Kryteria autonomicznego, fizycznego i chemicznego, wstępnego zagęszczania, oczyszczania i oddzielania*

- 2.2.4.1. Dany analit powinien mieć frakcję typową dla odpowiadającego mu analitu wzorcowego w odpowiedniej próbce materiałowej, w takich samych warunkach eksperymentalnych.

- 2.2.4.2. Dane dotyczące retencji dla wzorów, próbek kontrolnych oraz próbek analitycznych, powinny być przedłożone razem z końcowymi wynikami: pozytywnymi lub negatywnymi.

- 2.2.5. *Kryteria pomiarów ilościowych*
- 2.2.5.1. We wszystkich pomiarach ilościowych musi być pomierzona i określona regeneracja
- 2.2.5.2. Różnice wewnątrzlaboratoryjne w regeneracji powinny być możliwie jak najmniejsze.
- 2.2.5.3. Musi być jasno powiedziane, czy wyniki końcowe zostały skorygowane ze względu na regenerację. Jeżeli zostały, musi być opisana metoda tej korekty.
- 2.3. **Kryteria metod analizy, które można zastosować do celów potwierdzenia jedynie w połączeniu z innymi metodami**
- 2.3.1. *Wymagania jakościowe dla oznaczania analitu za pomocą IA*
- 2.3.1.1. Musi być określony zakres roboczy krzywej wzorcowej, który powinien obejmować w sposób ogólny zakres zagęszczenia przynajmniej jednej dekady.
- 2.3.1.2. Wymagane jest co najmniej sześć punktów wzorcowych, rozłożonych odpowiednio wzdłuż krzywej wzorcowej.
- 2.3.1.3. Odpowiednie parametry kontroli jakości powinny być na równi z poprzednimi oznaczeniami, tj. NSB. i parametry krzywej wzorcowej.
- 2.3.1.4. Próbkę kontrolną muszą być uwzględnione w każdym oznaczeniu. Poziomy zagęszczenia: zero oraz w niższej, środkowej i wyższej części zakresu roboczego. Ich wyniki powinny być na równi z poprzednimi oznaczeniami.
- Nieprzetworzone dane dotyczące próbek kontrolnych oraz próbki analitycznej powinny być przedłożone wraz z wynikiem końcowym: pozytywnym lub negatywnym.
- 2.3.2. *Kryteria oznaczenia analitu za pomocą GC lub LC, z zastosowaniem nieokreślonego wykrywania*
- 2.3.2.1. Dany analiz powinien ulec wymyciu w czasie zatrzymania, typowym dla odpowiadającego mu analitu wzorcowego, w takich samych warunkach eksperymentalnych.
- 2.3.2.2. Najbliższy, maksymalny szczyt w chromatogramie, powinien być oddzielony od wyznaczonego szczytu analitu, przynajmniej o jedną, pełną szerokość, na poziomie 10 % maksymalnej wysokości.
- 2.3.2.3. W celu uzyskania dodatkowej informacji, można zastosować kochromatografię i chromatografię, używając przynajmniej dwóch kolumn o różnej biegunowości.
- 2.3.3. *Kryteria oznaczenia analitu za pomocą TLC*
- 2.3.3.1. Wartość(wartości) R_f danego analitu powinna być zgodna z wartością(ami) typową(yami) R_f analitu wzorcowego. Wymaganie to jest spełnione, gdy wartość R_f wynosi ± 3 % wartości R_f analitu wzorcowego, w takich samych warunkach eksperymentalnych.
- 2.3.3.2. Wygląd optyczny analitu powinien być nieodróżnialny od analitu wzorcowego.
- 2.3.3.3. Środek punktu najbliższego do tego, gdzie powinien być analiz, powinien być od niego oddzielony przynajmniej o połowę sumy wymiarów tego punktu.
- 2.3.3.4. W celu uzyskania dodatkowej informacji, można zastosować kochromatografię oraz/lub dwuwymiarowe TLC.
- 2.4. **Kryteria metod analizy, które mogą być zastosowane do potwierdzenia**
- 2.4.1. *Kryteria oznaczenia analitu za pomocą LC/IA lub LC/IMG*
- 2.4.1.1. Przy LC/IMG, szczyt analitu w IMG powinien się składać przynajmniej z pięciu frakcji LC.
- 2.4.1.2. Muszą być spełnione kryteria 2.2.4.1 oraz 2.2.4.2
- 2.4.1.3. *Odczynniki*
- Powinno być określone źródło oraz cech antyciała oraz innych odczynników.
- 2.4.1.4. *Krzywa wzorcowa*
- Metoda ta zależy od krzywej wzorcowej, a więc muszą być podane informacje zawarte w p. 1.2.4 (Krzywe wzorcowe).
- Muszą być spełnione wymagania dotyczące jakości, podane dla IA (2.3.1.1 do 2.3.1.4)

- 2.4.1.5. W celu potwierdzenia, jeżeli dana metoda nie jest stosowana w połączeniu z innymi metodami, wówczas należy wykonać dwa różne rozdzielania LC lub dwa immunogramy, stosując antyciała o różnych właściwościach.
- 2.4.2. *Kryteria oznaczenia analitu LC-SP*
- 2.4.2.1. Powinny być spełnione kryteria 2.3.2.1 oraz 2.3.2.2
- 2.4.2.2. Absorpcja maxima w spektrum analitu powinna mieć takie same długości fal, jak analit wzorcowy, z marginesem wyznaczonym przez rozkład systemu wykrywania. Dla diodowego układu wykrywania wynosi on zazwyczaj ± 2 nm.
- 2.4.2.3. Spektrum analitu powyżej 220 nm nie powinno się różnić optycznie od spektrum analitu wzorcowego, dla tych części obu spektra, które mają wartości absorpcji 10 %. Kryterium to jest spełnione, gdy te same maxima są obecne, a różnica pomiędzy jednym i drugim spektrum nie jest większa niż 10 % wartości absorpcji analitu wzorcowego, w żadnym obserwowanym punkcie.
- 2.4.2.4. W celu potwierdzenia, jeżeli dana metoda nie jest stosowana w połączeniu z innymi metodami, wówczas konieczne jest wykonanie kochromatografii w LC. Wymagania w przypadku kochromatografii opisano w p. 1.2.5.2.
- 2.4.3. *Kryteria oznaczenia analitu za pomocą TLC-SP*
- 2.4.3.1. Metoda ta powinna spełniać kryteria określone w TLC (2.3.3.1 do 2.3.3.3)
- 2.4.3.2. Absorpcja maxima w spektrum analitu powinna mieć takie same długości fal, jak analit wzorcowy, z marginesem wyznaczonym przez rozkład systemu wykrywania.
- 2.4.3.3. Spektrum danego analitu nie powinno się różnić optycznie od spektrum analitu wzorcowego.
- 2.4.3.4. W celu potwierdzenia, jeżeli dana metoda nie jest stosowana w połączeniu z innymi metodami, wówczas konieczne jest wykonanie kochromatografii w TLC. Wymagania przy kochromatografii opisano w p. 1.2.5.2.
- 2.4.4. *Kryteria oznaczenia analitu za pomocą GC-MS*
- 2.4.4.1. *Kryteria GC*
- 2.4.4.1.1. Powinny być spełnione kryteria 2.3.2.1 oraz 2.3.2.2
- 2.4.4.1.2. Powinno się zastosować wewnętrzny standard, jeżeli jest dostępny materiał odpowiedni do tego celu. Najlepiej, gdyby to była stateczna forma analitu, oznakowana izotopem, a w przypadku jej braku, pokrewny standard, o czasie zatrzymania zbliżonym do danego analitu.
- 2.4.4.1.3. Stosunek czasu zatrzymania analitu w GC do czasu w wewnętrznym standardzie, tj. względny czas zatrzymania, powinien być taki sam, jak w analizie wzorcowym w odpowiedniej matrycy, z marginesem ± 5 %.
- 2.4.4.1.4. W metodzie potwierdzającej, jeżeli nie jest stosowany standard wewnętrzny, wówczas do identyfikacji analitu powinna być również zastosowana kochromatografia.
- 2.4.4.2. *Kryteria dla LRMS*
- 2.4.4.2.1. W metodzie klasyfikacyjnej, powinna być przynajmniej pomierzona intensywność najbardziej obfitego jonu diagnostycznego.
- 2.4.4.2.2. W metodzie potwierdzającej powinna być pomierzona intensywność przynajmniej czterech jonów diagnostycznych. Jeżeli dany związek nie wydał czterech jonów diagnostycznych przy zastosowanej metodzie, wówczas identyfikacja analitu powinna się opierać na wynikach co najmniej dwóch niezależnych metod GC-LMRS, z różnymi związkami pochodnymi oraz/lub technikami jonizacji, każda produkująca dwa lub trzy jony diagnostyczne.
- Jon molekularny powinien być jednym z selekcionowanych jonów diagnostycznych.
- 2.4.4.2.3. Względne rozprzestrzenianie wszystkich jonów diagnostycznych monitorowanych z analitu, powinno pasować do tych z analitu wzorcowego, najlepiej w granicach ± 10 % (mod EI) lub ± 20 % (mod CI).
- 2.4.5. *Kryteria oznaczenia analitu za pomocą IR*
- 2.4.5.1. *Definicja odpowiednich szczytów*
- Odpowiednie szczyty stanowią maxima absorpcji w spektrum promieniowania podczerwonego analitu wzorcowego, spełniając poniższe wymagania.
- 2.4.5.1.1. Maximum absorpcji znajduje się w przedziale fali 1 800–500 cm^{-1}

- 2.4.5.1.2. Intensywność absorpcji nie jest mniejsza niż:
- specyficzna absorpcja molowa 40 w odniesieniu do zerowej absorpcji oraz 20 w odniesieniu do linii odniesienia szczytu;
lub
 - absorpcja względna stanowiąca 12,5 % absorpcji najbardziej intensywnego szczytu, w okolicy 1800 – 500 cm^{-1} , gdy obie są mierzone w odniesieniu do absorpcji zerowej, oraz 5 % wartości absorpcji najbardziej intensywnego szczytu, w okolicy 1800 – 500 cm^{-1} , gdy obie są mierzone w odniesieniu do ich linii odniesienia szczytu.
- Uwaga:* Chociaż z teoretycznego punktu widzenia mogą być preferowane odpowiednie szczyty zgodnie z a), ale te zgodne z b) są w praktyce łatwiejsze do wyznaczenia.
- 2.4.5.2. Określona jest liczba szczytów spektrum promieniowania podczerwonego analitu, których częstotliwości są zgodne z odpowiednim szczytem spektrum analitu wzorcowego, w granicach $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.
- 2.4.5.3. Kryteria IR
- 2.4.5.3.1. Absorpcja musi być obecna we wszystkich miejscach spektrum analitu, które są zgodne z odpowiednim szczytem spektrum wzorcowego w analizie wzorcowym.
- 2.4.5.3.2. Wymagane jest co najmniej sześć odpowiednich szczytów w spektrum promieniowania podczerwonego analitu wzorcowego. Jeżeli jest mniej niż sześć odpowiednich szczytów, wówczas dane spektrum nie może być użyte jako spektrum wzorcowe.
- 2.4.5.3.3. „Rezultat”, tj. procent odpowiednich szczytów znalezionych w spektrum promieniowania podczerwonego analitu, wynosi co najmniej 50.
- 2.4.5.3.4. Jeżeli nie ma dokładnego odpowiednika odpowiedniego szczytu, wówczas odpowiedni rejon spektrum analitu musi być zgodny z pasującym szczytem.
- 2.4.5.3.5. Procedura ta ma zastosowanie jedynie przy szczytach absorpcji w spektrum próbki, o intensywności przynajmniej trzykrotnej wysokości dźwięku szumu tła pomiędzy szczytami.
- 2.5. **Inne metody analizy**
- Metody analityczne lub połączenia metod innych niż te uwzględnione w rozdziałach 2.3 oraz 2.4 (np. LC-MS, MS-MS, GC-IR), mogą być stosowane do celów klasyfikacji i potwierdzenia, pod warunkiem że spełniają one kryteria pozwalające na jednoznaczną identyfikację analitu na danym poziomie.

DODATEK

Wykaz skrótów i symboli

CI	= jonizacja chemiczna
EI	= jonizacja uderzeniowa elektronu
g	= gramy
GC	= chromatografia gazowa
IA	= oznaczanie immunologiczne
IAC	= pokrewieństwo immunologiczne
IMG	= immunogram
IR	= spektrometria promieniowania podczerwonego
kg	= kilogramy (10^3 g)
l	= litr
LC	= chromatografia cieczowa
LRMS	= spektrometria masy o niskim rozkładzie
mg	= miligramy (10^{-3} g)
MS	= spektrometria mas
ng	= nanogramy (10^{-9} g)
NB.	= nieokreślone wiązanie
Rf	= odległość przesunięta do przodu rozpuszczalnika
SP	= spektrometria, np. z wykrywającym układem diodowym
TLC	= chromatografia cienkowarstwowa
μg	= mikrogramy (10^{-6} g)
/	= autonomiczne techniki łącznikowe
–	= bezpośrednie techniki łącznikowe
	np. LC/GC-MC = LC autonomiczne, po GC z bezpośrednim MS