

32002D0657

L 221/8

ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV

17.8.2002

ROZHODNUTIE KOMISIE

zo 14. augusta 2002,

ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov

(oznámené pod číslom dokumentu C(2002) 3044)

(Text s významom pre EHP)

(2002/657/ES)

KOMISIA EURÓPSKÝCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na zmluvu o založení európskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 96/23/ES z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a v živočíšnych produktoch, a ktorou sa zrušujú smernice 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutia 89/187/EHS a 91/664/EHS⁽¹⁾, najmä na jej druhý pododsek článku 15 ods. 1,

Keďže:

- (1) prítomnosť rezíduí v produktoch živočíšneho pôvodu je záležitosť, ktorá ovplyvňuje zdravie obyvateľstva;
- (2) rozhodnutie Komisie 98/179/ES z 23. februára 1998, ktorým sa ustanovujú podrobné pravidlá úradného odberu vzoriek na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a v živočíšnych produktoch⁽²⁾, ustanovuje, že analýzu vzoriek vykonávajú výhradne laboratória, ktoré príslušný vnútroštátny orgán schválil na úradnú kontrolu prítomnosti rezíduí;
- (3) je potrebné zabezpečiť kvalitu a porovnateľnosť analytických výsledkov, ktoré poskytujú laboratória schválené na úradné kontroly prítomnosti rezíduí; malo by sa to dosiahnuť pomocou systémov zabezpečovania kvality a osobitne uplatňovaním metód validovaných podľa spoločných postupov a pracovných kritérií a zabezpečením sledovateľnosti k všeobecným štandardom alebo spoločne odsúhlaseným štandardom;
- (4) smernica Rady 93/99/EHS z 29. októbra 1993 o predmete doplnkových opatrení týkajúcich sa úradnej kontroly potravín a rozhodnutie 98/179/ES⁽³⁾ vyžadujú, aby boli úradné kontrolné laboratória od januára 2002

akreditované podľa ISO 17025 (1). Podľa rozhodnutia 98/179/ES sa od schválených laboratórií vyžaduje, aby sa zúčastňovali na medzinárodne uznávanej schéme externého hodnotenia a akreditácie kontroly kvality. Schválené laboratória okrem toho musia preukazovať svoju spôsobilosť pravidelnou a úspešnou účasťou na primeraných schémach skúšok spôsobilosti, ktoré organizujú národné referenčné laboratória alebo referenčné laboratória spoločenstva;

- (5) sieť referenčných laboratórií spoločenstva, národných referenčných laboratórií a národných kontrolných laboratórií pracuje podľa smernice 96/23/ES s cieľom zlepšovať koordináciu;
- (6) v dôsledku pokroku analytickej chémie, ku ktorému prišlo od prijatia smernice 96/23/ES, bola koncepcia rutinných metód a referenčných metód nahradená kritériovým prístupom, v rámci ktorého sa vytvárajú pracovné kritériá a postupy validácie skriningových a konfirmačných metód;
- (7) kvôli zabezpečeniu harmonizovaného uplatňovania smernice 96/23/ES je potrebné stanoviť všeobecné kritériá interpretácie výsledkov skúšok vykonaných v úradných kontrolných laboratóriách;
- (8) kvôli zabezpečeniu harmonizovaného uplatňovania smernice 96/23/ES je potrebné ustanoviť postupné určovanie minimálnych požadovaných pracovných limitov (MRPL) analytických metód na látky, na ktoré nebol určený povolený limit, najmä na tie látky, ktorých používanie v spoločenstve nie je povolené, alebo je osobitne zakázané;

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

- (9) rozhodnutie Komisie 90/515/EHS z 26. septembra 1990, ktorým sa ustanovujú referenčné metódy zisťovania prítomnosti rezíduí ťažkých kovov a arzénu ⁽¹⁾, rozhodnutie Komisie 93/256/EHS zo 14. mája 1993, ktorým sa ustanovujú metódy používané na zisťovanie prítomnosti rezíduí látok s hormonálnymi alebo tyrostatickými účinkami ⁽²⁾, a rozhodnutie Komisie 93/257/EHS z 15. apríla 1993, ktorým sa ustanovujú referenčné metódy a zoznam národných referenčných laboratórií na zisťovanie prítomnosti rezíduí ⁽³⁾, naposledy zmenené a doplnené rozhodnutím 98/536/ES ⁽⁴⁾, boli v predchádzajúcom období znovu preskúmané s cieľom zohľadniť rozvoj vedeckých a technických znalostí, bolo zistené, že rozsah ich pôsobnosti a ustanovenia sú zastaralé, a preto by sa mali týmto rozhodnutím zrušiť;
- (10) malo by sa ustanoviť prechodné obdobie, počas ktorého bude umožnené prispôbiť metódy analýzy úradných vzoriek ustanoveniam tohto rozhodnutia;
- (11) opatrenia ustanovené v tomto rozhodnutí sú v súlade so stanoviskom Stáleho výboru pre potravinový reťazec a zdravie zvierat,

PRIJALA TOTO ROZHODNUTIE:

Článok 1

Predmet a rozsah pôsobnosti

Toto rozhodnutie ustanovuje pravidlá analytických metód používaných pri skúškach úradných vzoriek odobratých podľa článku 15 ods. 1, druhá veta, smernice 96/23/ES a stanovuje všeobecné kritériá interpretácie analytických výsledkov skúšok týchto vzoriek vykonaných v úradných kontrolných laboratóriách.

Toto rozhodnutie sa nevzťahuje na látky, pre ktoré boli v iných právnych predpisoch spoločenstva stanovené špecifickejšie pravidlá.

Článok 2

Definície

Na účel tohto rozhodnutia platia definície uvedené v smernici 96/23/ES a v prílohe k tomuto rozhodnutiu.

Článok 3

Analytické metódy

Členské štáty zabezpečia, aby sa úradné vzorky odoberané podľa smernice 96/23/ES analyzovali metódami, ktoré:

- sú zdokumentované v návodoch na vykonanie skúšok, najvhodnejšie podľa ISO 78/2 (6);
- sú v súlade s časťou 2 prílohy k tomuto rozhodnutiu;
- boli validované podľa postupov opísaných v časti 3 prílohy;

⁽¹⁾ Ú. v. ES L 286, 18.10.1990, s. 33.

⁽²⁾ Ú. v. ES L 118, 14.5.1993, s. 64.

⁽³⁾ Ú. v. ES L 251, 11.9.1998, s. 39.

⁽⁴⁾ Ú. v. ES L 118, 14.5.1993, s. 75.

- d) sú v súlade s príslušnými minimálnymi požadovanými pracovnými limitmi (MRPL) určenými v súlade s článkom 4.

Článok 4

Minimálne požadované pracovné limity

Toto rozhodnutie sa preskúma a postupne sa určia minimálne požadované pracovné limity (MRPL) analytických metód používaných na látky, pre ktoré nebol určený povolený limit.

Článok 5

Kontrola kvality

Členské štáty zabezpečia kvalitu výsledkov analýzy vzoriek odoberaných podľa smernice 96/23/ES, najmä monitorovaním skúšok a/alebo výsledkov kalibrácie podľa kapitoly 5.9 ISO 17025 (1).

Článok 6

Interpretácia výsledkov

1. Výsledok analýzy sa považuje za nezhodný, ak je prekročený rozhodovací limit konfirmačnej metódy na danú analyzovanú látku.

2. Ak bol pre niektorú látku určený povolený limit, rozhodovací limit je koncentrácia, nad ktorej hodnotou je možné so štatistickou istotou $1 - \alpha$ rozhodnúť, či bol povolený limit skutočne prekročený.

3. Ak pre niektorú látku nebol určený povolený limit, rozhodovací limit je najnižšia hodnota koncentrácie, pri ktorej je možné niektorou metódou rozoznať so štatistickou istotou $1 - \alpha$, či je daná analyzovaná látka prítomná.

4. V prípade látok uvedených v skupine A v prílohe I k smernici 96/23/ES je chyba α rovná 1 % alebo menšia. V prípade všetkých ostatných látok je chyba α rovná 5 % alebo menšia.

Článok 7

Zrušovacie ustanovenia

Rozhodnutia 90/515/EEC, 93/256/EEC a 93/257/EEC sa zrušujú.

Článok 8

Prechodné ustanovenia

Metódy analýzy úradných vzoriek látok uvedených v skupine A v prílohe I k smernici 96/23/ES, ktoré spĺňajú kritériá ustanovené v rozhodnutiach 90/515/EHS, 93/256/EHS, 93/256/EHS a 93/257/EHS, sa môžu používať do dvoch rokov po nadobudnutí účinnosti tohto rozhodnutia. V prípade metód, ktoré sa v súčasnosti používajú na látky uvedené v skupine B v prílohe I k smernici 96/23/ES, bude dosiahnutý súlad s týmto rozhodnutím najneskôr do piatich rokov odo dňa uplatnenia tohto rozhodnutia.

*Článok 9***Deň uplatnenia**

Toto rozhodnutie sa bude uplatňovať od 1. septembra 2002.

*Článok 10***Adresáti**

Toto rozhodnutie je adresované členským štátom.

V Bruseli 14. augusta 2002

Za Komisiu

David BYRNE

člen Komisie

PRÍLOHA

PRACOVNÉ KRITÉRIÁ, INÉ POŽIADAVKY A POSTUPY ANALYTICKÝCH METÓD

1. DEFINÍCIE POJMOV

- 1.1. Správnosť je blízkosť zhody medzi výsledkom skúšky a uznanou referenčnou hodnotou (2). Je určená pravdivosťou a presnosťou.
- 1.2. Alfa (α) chyba je pravdepodobnosť, že skúšaná vzorka je zhodná, aj keď bola získaná nezhodným meraním (falošné nezhodné rozhodnutie).
- 1.3. Analyzovaná látka je látka, ktorá má byť detekovaná, identifikovaná a/alebo kvantifikovaná a deriváty, ktoré vznikajú v priebehu analýzy.
- 1.4. Beta (β) chyba je pravdepodobnosť, že skúšaná vzorka je skutočne nezhodná, aj keď bola získaná zhodným meraním (falošné zhodné rozhodnutie).
- 1.5. Bias je rozdiel medzi predpokladaným výsledkom skúšky a uznanou referenčnou hodnotou (2).
- 1.6. Kalibračný štandard je prostriedok na meranie, ktorý predstavuje množstvo príslušnej látky takým spôsobom, že spája svoju hodnotu s referenčným základom.
- 1.7. Certifikovaný referenčný materiál (CRM) je materiál, ktorý má presne stanovený obsah analyzovanej látky.
- 1.8. Kochromatografia je postup, v priebehu ktorého sa extrakt pred chromatografickým krokom (krokmi) rozdelí na dve časti. Prvá časť je chromatografovaná ako taká. Druhá časť je zmiešaná so štandardnou analyzovanou látkou, ktorá sa má merať. Potom je táto zmes tiež chromatografovaná. Množstvo pridanej štandardnej analyzovanej látky má byť rovnaké ako odhadované množstvo analyzovanej látky v extrakte. Táto metóda je vytvorená tak, aby sa zlepšila identifikácia analyzovanej látky pri používaní chromatografických metód, hlavne ak nemôže byť použitý vhodný interný štandard.
- 1.9. Porovnávacia štúdia je analyzovanie rovnakej vzorky rovnakou metódou kvôli určeniu pracovných charakteristík metódy. Táto štúdia sa vzťahuje na náhodné chyby merania a laboratórny bias.
- 1.10. Konfirmačná metóda znamená metódy, ktoré poskytujú úplné alebo doplnujúce informácie umožňujúce látku jednoznačne identifikovať a podľa potreby ju kvantifikovať na príslušnej úrovni.
- 1.11. Rozhodovací limit (CCa) je limit, na ktorého hodnote a nad ňou sa môže s chybou pravdepodobnosti a dospieť k záveru, že vzorka je nezhodná.
- 1.12. Detekčná schopnosť (CC β) je najnižší obsah látky, ktorý môže byť vo vzorke detekovaný, identifikovaný a/alebo kvantifikovaný s chybou pravdepodobnosti β . V prípade látok, na ktoré nebol určený povolený limit, je detekčnou schopnosťou najnižšia koncentrácia, pri ktorej je možné metódou detekovať skutočne kontaminované vzorky so štatistickou istotou $1 - \beta$. V prípade látok s určeným povoleným limitom to znamená, že detekčná schopnosť je koncentrácia, pri ktorej je možné touto metódou detekovať povolené limitné koncentrácie so štatistickou istotou $1 - \beta$.
- 1.13. Fortifikovaný materiál vzorky je vzorka obohatená známym množstvom detekovanej analyzovanej látky.
- 1.14. Medzilaboratórne porovnanie je organizácia, vykonanie a vyhodnotenie skúšok tej istej vzorky v dvoch alebo viacerých laboratóriách v súlade s vopred určenými podmienkami určujúcimi postup skúšky. Podľa zámeru môžu byť štúdie klasifikované ako porovnávacie štúdie alebo skúšky spôsobilosti.
- 1.15. Interný štandard (IS) je látka, ktorá nie je obsiahnutá vo vzorke, s fyzikálno-chemickými vlastnosťami čo najpodobnejšími fyzikálno-chemickým vlastnostiam analyzovanej látky, ktorá má byť identifikovaná, a ktorá sa pridá do každej vzorky, ako aj do každého kalibračného štandardu.
- 1.16. Laboratórna vzorka je vzorka pripravená na zaslanie do laboratória a určená na kontrolu alebo skúšky.
- 1.17. Príslušná úroveň je koncentrácia látky alebo analyzovanej látky vo vzorke, ktorá je dôležitá na určenie jej zhody s právnymi predpismi.
- 1.18. Minimálny požadovaný pracovný limit (MRPL) je najmenší obsah analyzovanej látky vo vzorke, ktorý musí byť prinajmenšom detekovaný a potvrdený. Je určený na harmonizáciu vykonávania analytických metód pri látkach, na ktoré nebol určený povolený limit.

- 1.19. Pracovná charakteristika je funkčná vlastnosť, ktorá sa môže prísúdiť analytickej metóde. Môže to byť napríklad špecifickosť, správnosť, pravdivosť, presnosť, opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, výťažnosť, detekčná schopnosť a robustnosť.
- 1.20. Pracovné kritériá sú požiadavky na pracovné charakteristiky, podľa ktorých možno usúdiť, či je daná analytická metóda vhodná na daný účel a prináša hodnoverné výsledky.
- 1.21. Povolený limit je maximálny limit rezíduí, maximálna úroveň alebo iná maximálna prípustná odchýlka pre látku ustanovená iným právnym predpisom spoločenstva.
- 1.22. Presnosť je blízkosť zhody medzi nezávislými výsledkami skúšky získanými v stanovených (vopred určených) podmienkach. Miera presnosti sa zvyčajne vyjadruje formou nepresnosti a vypočíta sa ako smerodajná odchýlka výsledku skúšky. Nižšia presnosť je určená vyššou smerodajnou odchýlkou (2).
- 1.23. Skúška spôsobilosti je analyzovanie rovnakej vzorky, pričom laboratóriá si môžu vybrať svoje vlastné metódy za predpokladu, že tieto metódy sa používajú v bežných podmienkach. Tieto skúšky sa musia vykonávať podľa príručky ISO guide 43-1 (3) a 43-2 (4) a môžu sa použiť na hodnotenie reprodukovateľnosti metód.
- 1.24. Kvalitatívna metóda je analytická metóda, ktorou sa identifikuje látka na základe jej chemických, biologických alebo fyzikálnych vlastností.
- 1.25. Kvantitatívna metóda je analytická metóda, ktorou sa stanovuje množstvo alebo hmotnostný zlomok látky, takže sa môže vyjadriť ako číselná hodnota v príslušných jednotkách.
- 1.26. Slepý pokus je úplný analytický postup vykonaný bez skúšobného množstva alebo pomocou rovnocenného množstva vhodného rozpúšťadla namiesto skúšobného množstva.
- 1.27. Výťažnosť je percento skutočnej koncentrácie látky získanej v priebehu analytického postupu. Ak nie je k dispozícii certifikovaný referenčný materiál, určuje sa v priebehu validácie.
- 1.28. Referenčný materiál je materiál, ktorého jedna alebo viac vlastností bolo potvrdených validovanou metódou, a teda sa môže používať pri kalibrácii prístroja alebo na overenie metódy merania.
- 1.29. Opakovateľnosť je presnosť v podmienkach opakovateľnosti (2).
- 1.30. Podmienky opakovateľnosti sú podmienky, v ktorých nezávislé výsledky skúšok získa tou istou metódou na zhodných skúšobných položkách v tom istom laboratóriu ten istý operátor používajúci to isté vybavenie (2).
- 1.31. Reprodukovateľnosť je presnosť v podmienkach reprodukovateľnosti (2) (4).
- 1.32. Podmienky reprodukovateľnosti sú podmienky, v ktorých výsledky skúšok získajú tou istou metódou na zhodných skúšobných položkách v rôznych laboratóriách rôzni operátori používajúci rôzne vybavenie (2).
- 1.33. Robustnosť je citlivosť analytickej metódy na zmeny experimentálnych podmienok, ktoré sa môžu vyjadriť vo forme zoznamu materiálov vzoriek, analyzovaných látok, podmienok skladovania, podmienok prostredia a/alebo podmienok prípravy vzoriek, v ktorých je možné použiť túto metódu tak, ako je prezentovaná, alebo s presne určenými malými zmenami. Pri všetkých experimentálnych podmienkach, u ktorých môže v praxi prichádzať ku kolísaniu (napr. stabilita činidiel, zloženie vzorky, hodnota pH, teplota), by sa mali uvádzať všetky zmeny, ktoré by mohli ovplyvniť analytický výsledok.
- 1.34. Stanovenie obsahu slepej vzorky je úplný analytický postup vykonaný na skúšobnom množstve odobratom zo vzorky, v ktorej nie je prítomná analyzovaná látka.
- 1.35. Skriningová metóda znamená metódy, ktoré sa používajú na detekciu prítomnosti látky alebo skupiny látok na príslušnej úrovni. Tieto metódy majú schopnosť vysokej priepustnosti vzoriek a používajú sa na roztriedenie veľkého počtu vzoriek podľa potenciálne nezhodných výsledkov. Sú vytvorené osobitne kvôli tomu, aby sa zabránilo falošným zhodným výsledkom.
- 1.36. Vnútrolaboratórna validácia (vlastná validácia) je analytická štúdia, ktorá sa vzťahuje na jediné laboratórium používajúce jednu metódu na analýzu rovnakých alebo rôznych skúšobných materiálov v rôznych podmienkach v zdôvodnených dlhých časových intervaloch.
- 1.37. Špecifickosť je schopnosť metódy rozoznať meranú analyzovanú látku od ostatných látok. Táto charakteristika je v rozhodujúcej miere funkciou opísanej techniky merania, ale môže sa meniť v závislosti od triedy zložky alebo matrice.

- 1.38. Štandardný prídavok je postup, pri ktorom sa skúšobná vzorka rozdelí na dve (alebo viac) skúšobných množstiev. Jedno množstvo sa analyzuje ako také a do ostatných skúšobných množstiev sa pred analýzou pridajú známe množstvá štandardnej analyzovanej látky. Množstvo pridanej štandardnej analyzovanej látky musí byť dvojnásobkom až pätnásobkom odhadovaného množstva analyzovanej látky vo vzorke. Tento postup je určený na stanovenie obsahu analyzovanej látky vo vzorke, pričom sa zohľadňuje výťažnosť tohto analytického postupu.
- 1.39. Štandardná analyzovaná látka je analyzovaná látka so známym a certifikovaným obsahom a čistotou, ktorá sa pri analýze používa ako referenčná.
- 1.40. Látka je hmota s konkrétnou alebo určitou chemickou štruktúrou a jej metabolity.
- 1.41. Skúšobné množstvo je množstvo materiálu odobraté zo skúšobnej vzorky, na ktorej sa vykonáva skúška alebo pozorovanie.
- 1.42. Skúšobná vzorka je vzorka, ktorá je pripravená z laboratórnej vzorky, a z ktorej sa odoberajú skúšobné množstvá.
- 1.43. Pravdivosť je blízkosť zhody medzi priemernou hodnotou získanou z veľkých sérií výsledkov skúšok a uznanou referenčnou hodnotou. Pravdivosť sa zvyčajne vyjadruje ako bias (2).
- 1.44. Jednotky sú tie jednotky, ktoré sú opísané v norme ISO 31 (20) a v smernici 71/354/ES (19).
- 1.45. Validácia je potvrdenie vyšetrením a poskytnutie skutočného dôkazu o tom, že sú splnené príslušné požiadavky na osobitné určené použitie (1).
- 1.46. Laboratórna reprodukovateľnosť je presnosť získaná v tom istom laboratóriu v stanovených (vopred určených) podmienkach (týkajúcich sa napr. metódy, skúšobných materiálov, operátorov, prostredia) v zdôvodnených dlhých časových intervaloch.

2. PRACOVNÉ KRITÉRIÁ A INÉ POŽIADAVKY NA ANALYTICKÉ METÓDY

Iné analytické metódy alebo kombinácie metód než tie, ktoré sú opísané ďalej, sa môžu používať na skriningové alebo konfirmačné účely, len ak je možné dokázať, že spĺňajú príslušné požiadavky stanovené v tomto rozhodnutí.

2.1. VŠEOBECNÉ POŽIADAVKY

2.1.1. Manipulácia so vzorkami

Vzorky sa získavajú, manipuluje sa s nimi a spracovávajú sa takým spôsobom, aby existovala maximálna možnosť detekovať látku. Postupy manipulácie so vzorkami musia zabrániť možnosti náhodnej kontaminácie alebo straty analyzovaných látok.

2.1.2. Vykonávanie skúšok

2.1.2.1. Výťažnosť

V priebehu analýzy vzoriek sa v každej skupine vzoriek určuje výťažnosť, ak sa používa pevný koeficient korekcie na výťažnosť. Ak je hodnota výťažnosti v rámci limitov, potom sa môže použiť pevný koeficient korekcie. V opačnom prípade sa používa koeficient korekcie na výťažnosť určený pre danú osobitnú skupinu, pokiaľ sa nemá použiť osobitný koeficient korekcie na výťažnosť analyzovanej látky vo vzorke, pričom v tomto prípade sa na kvantitatívne stanovenie analyzovanej látky vo vzorke používa postup štandardného prídavku (pozri 3.5), alebo sa použije interný štandard.

2.1.2.2. Špecifickosť

Metódou sa v experimentálnych podmienkach musí dať rozlíšiť medzi analyzovanou látkou a ostatnými látkami. Musí sa urobiť odhad, do akej miery je to možné. Musia sa používať stratégie na potlačenie všetkých predpokladaných druhov interferencií s inými látkami, ku ktorému prichádza pri použití opisanej techniky merania, napr. homológy, analógy, metabolické produkty príslušného rezídua. Je veľmi dôležité, aby boli vyšetrené interferencie, ktoré by mohli pochádzať od zložiek matrice.

2.2. SKRÍNINGOVÉ METÓDY

Na účely skrínungu sa v súlade so smernicou 96/23/ES používajú len tie analytické metódy, u ktorých je možné dokumentovaným sledovateľným spôsobom preukázať, že sú validované a pri príslušnej hodnote majú mieru falošných zhodných výsledkov (chybu β) < 5 %. V prípade podozrenia na nezhodný výsledok sa tento výsledok potvrdí konfirmačnou metódou.

2.3. KONFIRMAČNÉ METÓDY PRE ORGANICKÉ REZÍDUÁ A KONTAMINANTY

Konfirmačné metódy pre organické rezíduá alebo kontaminanty poskytujú informácie o chemickej štruktúre analyzovanej látky. Z toho vyplýva, že metódy založené len na chromatografickej analýze bez využitia spektrometrickej detekcie samotné nie sú vhodné na používanie ako konfirmačné metódy. Ak však jedna technika nemá dostatočnú špecifickosť, požadovaná špecifickosť sa dosiahne analytickými postupmi pozostávajúcimi z vhodných kombinácií čistenia, chromatografickej separácie (separácií) a spektrometrickej detekcie.

Na identifikáciu organických rezíduí alebo kontaminantov v uvedených skupinách látok sa za vhodné považujú tieto metódy alebo kombinácie metód:

Tabuľka 1

Konfirmačné metódy vhodné pre organické rezíduá alebo kontaminanty

Technika merania	Látky uvedené v prílohe I k smernici 96/23/ES	Obmedzenia
LC alebo GC s hmotnostnou spektrometrickou detekciou	Skupina A a B	Len ak nasleduje po on-line alebo off-line chromatografickej separácii Len ak sa používajú techniky so záznamom celých spektier (full scan) alebo pomocou najmenej 3 (skupina B) alebo 4 (skupina A) identifikačných bodov v prípade techník, ktorými sa nezaznamenávajú celé hmotnostné spektrá
LC alebo GC s IR spektrometrickou detekciou	Skupina A a B	Musia byť splnené osobitné požiadavky na absorbciu pri IR spektrometrii
LC – full scan DAD	Skupina B	Musia byť splnené osobitné požiadavky na absorbciu pri UV spektrometrii
Fluorescenčná LC	Skupina B	Len pre molekuly, ktoré vykazujú prirodzenú fluorescenciu a pre molekuly, ktoré vykazujú fluorescenciu po transformácii alebo derivatizácii
2-D TLC – full-scan UV/VIS	Skupina B	Dvojrozmerná (HPTLC) a kochromatografia sú povinné.
Plynová chromatografia s detekciou pomocou záchytu elektrónov	Skupina B	Len ak sa používajú dva stĺpce s rôznou polaritou
LC s imunogramom	Skupina B	Len ak sa používajú najmenej dva rôzne chromatografické systémy alebo druhá, nezávislá metóda detekcie
LC-UV/VIS (jedna vlnová dĺžka)	Skupina B	Len ak sa používajú najmenej dva rôzne chromatografické systémy alebo druhá, nezávislá metóda detekcie

2.3.1. Všeobecné pracovné kritériá a požiadavky

Konfirmačné metódy poskytujú informácie o chemickej štruktúre analyzovanej látky. Ak viac než jedna zložka poskytuje rovnakú odozvu, potom daná metóda nie je schopná rozlišovať medzi týmito zložkami. Metódy, ktoré sú založené len na chromatografickej analýze bez použitia spektrometrickej detekcie, samotné nie sú vhodné na používanie ako konfirmačné metódy.

Ak sa v rámci metódy používa vhodný interný štandard, pridáva sa do skúšobného množstva na začiatku postupu extrakcie. V závislosti od dostupnosti sa používajú buď stabilné, izotopom označené formy analyzovanej látky, ktoré sú vhodné najmä na hmotnostnú spektrometrickú detekciu alebo zložky, ktoré sú štruktúrou príbuzné analyzovanej látke.

Ak nie je možné použiť žiadny vhodný interný štandard, identifikácia analyzovanej látky sa potvrdí kochromatografiou. V tomto prípade sa získa len jeden pík, pričom zväčšená výška (alebo plocha) píku je rovnocenná množstvu pridanej analyzovanej látky. Pri použití plynovej chromatografie (GC) alebo kvapalinovej chromatografie (LC) je šírka píku v polovici jeho maximálnej výšky v rozsahu 90 – 110 % rozsahu pôvodnej šírky a retenčné časy sa zhodujú v rozpätí 5 %. V prípade metód chromatografie v tenkej vrstve (TLC) sa zosilní len škvrna, o ktorej sa predpokladá, že ide o analyzovanú látku; nová škvrna sa neobjaví a vizuálny vzhľad sa nezmení.

Referenčné alebo fortifikované materiály obsahujúce známe množstvá analyzovanej látky s hodnotami na úrovni povoleného limitu alebo rozhodovacieho limitu (nehodná kontrolná vzorka) alebo v ich blízkosti, ako aj zhodné kontrolné materiály a slepé pokusy, by mali podľa možnosti prechádzať celým postupom súčasne s každou skupinou analyzovaných skúšobných vzoriek. Poradie vstrekovania extraktov do analytického prístroja: slepý pokus, zhodná kontrolná vzorka, vzorka (vzorky), ktorú treba potvrdiť, znovu zhodná kontrolná vzorka a nakoniec nehodná kontrolná vzorka. Každá zmena tejto postupnosti sa musí zdôvodniť.

2.3.2. Doplnkové pracovné kritériá a iné požiadavky na kvantitatívne analytické metódy

2.3.2.1. Právdivosť kvantitatívnych metód

V prípade opakovaných analýz certifikovaného referenčného materiálu sú smerné rozsahy odchýliek experimentálne určeného priemerného hmotnostného zlomku, korigovaného na výťažnosť, od certifikovanej hodnoty takéto:

Tabuľka 2

Mínimálna právdivosť kvantitatívnych metód

Hmotnostný zlomok	Rozsah
1 µg/kg	- 50 % až + 20 %
> 1 µg/kg až 10 µg/kg	- 30 % až + 10 %
10 µg/kg	- 20 % až + 10 %

Ak takéto certifikované referenčné materiály (CRMs) nie sú k dispozícii, je prijateľné, aby sa právdivosť meraní hodnotila prostredníctvom výťažnosti prídavkov známych množstiev analyzovanej látky (analyzovaných látok) do slepej matrice. Údaje korigované na priemernú výťažnosť sú prijateľné len vtedy, keď sa nachádzajú v rámci rozsahov uvedených v tabuľke 2.

2.3.2.2. Presnosť kvantitatívnych metód

Medzilaboratórny variačný koeficient (CV) na opakovanú analýzu referenčného alebo fortifikovaného materiálu v podmienkach reprodukovateľnosti nesmie prekročiť hodnotu vypočítanú z Horwitzovej rovnice. Rovnica vyzerá takto:

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

kde C je hmotnostný zlomok vyjadrený vo forme mocniny (exponentu) 10 (napr. 1 mg/g = 10⁻³). Príklady sú uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3

Príklady CV v podmienkach reprodukovateľnosti na kvantitatívne metódy v rozsahu hmotnostných zlomkov analyzovanej látky

Hmotnostný zlomok	CV v podmienkach reprodukovateľnosti
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Pri hmotnostných zlomkoch nižších než 100 µg/kg poskytuje použitie Horwitzovej rovnice neprijateľne vysoké hodnoty. Z tohto dôvodu majú byť hodnoty CV pri koncentráciách nižších než 100 µg/kg čo najnižšie.

V prípade analýz vykonávaných v podmienkach opakovateľnosti by sa hodnoty vnútrolaboratórneho CV typicky nachádzali medzi jednou polovicou a dvomi tretinami vyššie uvedených hodnôt. V prípade analýz vykonávaných v podmienkach vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti nesmie byť vnútrolaboratórny CV vyšší než CV v podmienkach reprodukovateľnosti.

V prípade látok s určeným povoleným limitom musí metóda dosiahnuť vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť rovnú alebo menšiu než zodpovedajúci CV v podmienkach reprodukovateľnosti pri koncentrácii 0,5 x povolený limit.

2.3.3. Pracovné kritériá a iné požiadavky na hmotnostnú spektrometrickú detekciu

Hmotnostné spektrometrické metódy sú vhodné ako konfirmačné metódy, len ak nasledujú po on-line alebo off-line chromatografickej separácii.

2.3.3.1. Chromatografická separácia

V postupoch GC-MS sa plynová chromatografická separácia vykonáva pomocou kapilárnych stĺpcov. V postupoch LC-MS sa chromatografická separácia vykonáva pomocou vhodných kvapalinových chromatografických stĺpcov. V každom prípade je minimálny prijateľný retenčný čas na vyšetrovanú analyzovanú látku dvojnásobkom retenčného času zodpovedajúceho prázdneho objemu stĺpca. Retenčný čas (alebo relatívny retenčný čas) analyzovanej látky v skúšobnom množstve sa v presne určenom rozmedzí retenčných časov zhoduje s retenčným časom kalibračného štandardu. Rozmedzie retenčných časov je primerané rozlišovacej schopnosti chromatografického systému. Pomer chromatografického retenčného času analyzovanej látky k chromatografickému retenčnému času interného štandardu, t. j. relatívny retenčný čas analyzovanej látky, zodpovedá relatívnym retenčným časom kalibračného roztoku s odchýlkou $\pm 0,5$ % pre GC a $\pm 2,5$ % pre LC.

2.3.3.2. Hmotnostná spektrometrická detekcia

Hmotnostná spektrometrická detekcia sa vykonáva využívaním techník MS, ako napríklad záznamom celých hmotnostných spektier (full scans) alebo monitorovaním vybraných iónov (SIM), ako aj technikami typu MS-MSⁿ, ako je monitorovanie vybraných reakcií (SRM) alebo inými vhodnými technikami MS alebo MS-MSⁿ v spojení s vhodnými ionizačnými režimami. V prípade hmotnostnej spektrometrie s vysokým rozlíšením (HRMS) je rozlíšenie typicky vyššie než 10000 pre celý rozsah hmotností pri 10 % sedle.

Záznam celého hmotnostného spektra (full scan): Ak sa hmotnostné spektrometrické stanovenie vykonáva záznamom celých spektier, prítomnosť všetkých meraných rozpoznávacích iónov (molekulárny ión, charakteristické adukty molekulárneho iónu, charakteristické fragmenty iónov a ióny izotopov) s relatívnou intenzitou viac než 10 % v referenčnom spektre kalibračného štandardu je povinná.

Selektívne monitorovanie iónov (SIM): Ak sa hmotnostné spektrometrické stanovenie vykonáva fragmentograficky, jedným z vybraných rozpoznávacích iónov (molekulárny ión, charakteristické adukty molekulárneho iónu, ióny charakteristických fragmentov a ióny všetkých ich izotopov) je prednostne molekulárny ión. Vybrané rozpoznávacie ióny by nemali pochádzať výhradne z tej istej časti molekuly. Pomer signálu k šumu pre každý rozpoznávací ión je 3: 1.

Záznam celého hmotnostného spektra (full scan) a selektívne monitorovanie iónov (SIM): Relatívne intenzity detekovaných iónov vyjadrené vo forme percenta intenzity iónu alebo prechodu s najvyššou intenzitou zodpovedajú relatívnym intenzitám kalibračného štandardu zisteným buď z roztokov kalibračného štandardu alebo z obohatených vzoriek pri porovnateľných koncentráciách, meraných v tých istých podmienkach s týmito odchýlkami:

Tabuľka 4

Maximálne povolené odchýlky pre relatívne intenzity iónov pri použití skupiny techník hmotnostnej spektrometrie

Relatívna intenzita (% základného píku)	(EI-GC-MS) (relatívna)	(CI-GC-MS), (GC-MS ⁿ) (LC-MS ⁿ) (relatívna)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % až 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % až 20 %	± 20 %	± 30 %
10 %	± 50 %	± 50 %

Interpretácia údajov hmotnostného spektra: Relatívne intenzity rozpoznávacích iónov a/alebo iónových párov prekursor/produkt sa musia identifikovať porovnaním spektier alebo integráciou signálov jednotlivých hmotnostných stôp. Vždy, keď sa uplatňuje korekcia na pozadie, uplatňuje sa jednotne na celú skupinu (pozri 2.3.1, odsek 4) a jasne sa označí.

Záznam celého hmotnostného spektra (full scan): Ak sa v jednotnej hmotnostnej spektrometrii zaznamenávajú celé nasnímané spektra, musia byť prítomné aspoň štyri ióny s relatívnou intenzitou 10 % základného píku. Molekulárny ión sa zahrnie, ak je prítomný v referenčnom spektre s relatívnou intenzitou 10 %. Najmenej štyri ióny sa musia nachádzať v rámci maximálnych povolených odchýlok pre relatívne intenzity iónov (tabuľka 5). Je možné používať vyhľadávanie pomocou počítačových knižníc. V tomto prípade musí byť pri porovnaní údajov z hmotnostných spektier skúšobných vzoriek s údajmi z hmotnostného spektra kalibračného roztoku prekročený kritický koeficient zhody. Hodnota tohto koeficientu sa určuje v priebehu validačného procesu pre každú analyzovanú látku na základe spektier, pre ktoré sú splnené ďalej opísané kritériá. Kontroluje sa premenlivosť spektier spôsobená maticou vzorky a činnosťou detektora.

Selektívne monitorovanie iónov (SIM): Ak sa hmotnostné fragmenty merajú pomocou iných techník než sú techniky so záznamom celých spektier, na interpretáciu údajov sa použije systém identifikačných bodov. Na potvrdenie prítomnosti látok uvedených v skupine A v prílohe I smernice 96/23ES sú potrebné minimálne 4 identifikačné body. Na potvrdenie prítomnosti látok uvedených v skupine B v prílohe I smernice 96/23/ES sú potrebné minimálne 3 identifikačné body. V nasledujúcej tabuľke sú uvedené počty identifikačných bodov, ktoré môže poskytnúť každá zo základných techník hmotnostnej spektrometrie. Aby sa však body kvalifikovali ako identifikačné body potrebné na potvrdenie a kvôli výpočtu súčtu identifikačných bodov:

- musí sa merať minimálne jeden iónový ukazovateľ a
- všetky príslušné merané iónové ukazovatele musia spĺňať vyššie opísané kritériá a
- na dosiahnutie minimálneho počtu identifikačných bodov je možné skombinovať maximálne tri rôzne techniky.

Tabuľka 5

Vzťah medzi skupinou tried hmotnostných fragmentov a získanými identifikačnými bodmi

Technika hmotnostnej spektrometrie	Získané identifikačné body na ión
Hmotnostná spektrometria s nízkym rozlíšením (LR)	1,0
LR-MS ⁿ s iónom prekurzora	1,0
LR-MS ⁿ s produktmi prechodu	1,5
HRMS	2,0
HR-MS ⁿ s iónom prekurzora	2,0
HR-MS ⁿ s produktmi prechodu	2,5

Poznámky pod čiarou:

- Každý ión sa môže započítať len raz.
- GC-MS, ktorá využíva ionizáciu nárazom elektrónov, sa považuje za techniku odlišujúcu sa od GC-MS, ktorá využíva chemickú ionizáciu.
- Na zvýšenie počtu identifikačných bodov sa môžu použiť rôzne analyzované látky iba vtedy, keď deriváty využívajú rôzne mechanizmy chemickej reakcie.
- V prípade látok zo skupiny A v prílohe I k smernici 96/23/ES, ak sa v priebehu analytického postupu používa jedna z týchto techník: HPLC spojená so spektrofotometriou pomocou diódového poľa (DAD) s úplným záznamom hmotnostných spektier; HPLC spojená s fluorescenčnou detekciou; HPLC spojená s imunogramom; dvojrozmerná TLC spojená so spektrometrickou detekciou; je možné pridať maximálne jeden identifikačný bod za predpokladu, že sú splnené príslušné kritériá pre tieto techniky.
- Medzi produkty prechodu patria dcérske aj pradcérske produkty.

Tabuľka 6

Príklady počtov identifikačných bodov získaných zo skupiny techník a ich kombinácií (n je celé kladné číslo)

Technika (techniky)	Počet iónov	Počet identifikačných bodov
GC-MS) (EI alebo CI)	N	n
GC-MS (EI a CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI alebo CI) 2 deriváty	2 (derivát A) + 2 (derivát B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prekurzor a 2 dcérske produkty	4
LC-MS-MS	1 prekurzor a 2 dcérske produkty	4
GC-MS-MS	2 ióny prekurzora, každý s 1 dcérsym produktom	5
LC-MS-MS	2 ióny prekurzora, každý s 1 dcérsym produktom	5
LC-MS-MS-MS	1 prekurzor, každá s 1 dcérsym a 2 pradcérsymi produktmi	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS a LC-MS	2 + 2	4
GC-MS a HRMS	2 + 1	4

2.3.4. Pracovné kritériá a iné požiadavky na chromatografiu spojenú s infračervenou detekciou

Adekvátne píky: Adekvátne píky sú absorbné maximá v infračervenom spektre kalibračného štandardu, ktoré spĺňajú tieto požiadavky:

2.3.4.1. Infračervená detekcia

Absorbčné maximum: Nachádza sa v pásme vlnových čísel 4000 – 500 cm^{-1} .

Intenzita absorpcie: Nesmie byť menšia než buď:

- merná molárna absorbanca 40 vzhľadom na základnú líniu píku; alebo
- relatívna absorbanca 12,5 % z absorpcie najintenzívnejšieho píku v oblasti 4 000 – 500 cm^{-1} ,

ak sú obidve merané vzhľadom na nulovú absorpciu a 5 % z absorpcie najintenzívnejšieho píku v oblasti 4 000 – 500 cm^{-1} , ak sú obidve merané vzhľadom na základnú líniu píku.

Poznámka:

I keď z teoretického hľadiska je možné uprednostniť adekvátne píky podľa bodu a), v praxi je ľahšie určovať adekvátne píky podľa bodu b).

Počet píkov v infračervenom spektre analyzovanej látky, ktorých frekvencie zodpovedajú niektorému adekvátnemu píku v spektre kalibračného štandardu, sa určuje v rozmedzí $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4.2. Interpretácia údajov z infračerveného spektra

K absorpcii prichádza vo všetkých oblastiach spektra analyzovanej látky, ktoré zodpovedajú niektorému adekvátnemu píku v referenčnom spektre kalibračného štandardu. V infračervenom spektre kalibračného štandardu sa vyžaduje minimálne šesť adekvátnych píkov. Ak existuje menej než šesť adekvátnych píkov (7), spektrum na výstupe sa nemôže používať ako referenčné spektrum. „Skóre“, t. j. percento počtu adekvátnych píkov v infračervenom spektre analyzovanej látky, musí byť najmenej 50. Ak neexistuje presná zhoda s niektorým adekvátnym píkom, príslušná oblasť spektra analyzovanej látky musí byť konzistentná s prítomnosťou zhodujúceho sa píku. Tento postup je možné uplatniť len na absorbné píky v spektre vzorky s intenzitou najmenej trikrát vyššou než hodnota šumu pik-pík.

2.3.5. Pracovné kritériá a iné požiadavky na stanovenie analyzovanej látky pomocou kvapalinovej chromatografie (LC) s inými detekčnými technikami

2.3.5.1. Chromatografická separácia

Ak je k dispozícii materiál vhodný na tento účel, používa sa interný štandard. Najvhodnejšie je, ak je to príbuzný štandard s retenčným časom blízkym retenčnému času analyzovanej látky. Analyzovaná látka sa eluje v retenčnom čase, ktorý je typický pre zodpovedajúci kalibračný štandard v rovnakých experimentálnych podmienkach. Minimálny prijateľný retenčný čas analyzovanej látky je dvojnásobkom retenčného času zodpovedajúceho prázdneho objemu stĺpca. Pomer retenčného času analyzovanej látky k retenčnému času interného štandardu, t. j. relatívny retenčný čas analyzovanej látky, je rovnaký ako relatívny retenčný čas kalibračného štandardu vo vhodnej matici, v rozmedzí $\pm 2,5 \%$.

2.3.5.2. Detekcia so záznamom celého hmotnostného spektra (full scan) v ultrafialovom svetle/vo viditeľnom svetle (UV/VIS)

Musia byť splnené pracovné kritériá metód kvapalinovej chromatografie (LC).

Absorbčné maximá v spektre analyzovanej látky musia byť na rovnakých vlnových dĺžkach ako absorbné maximá v spektre kalibračného štandardu v rozmedzí určenom rozlíšením detekčného systému. V prípade detekcie pomocou diódového poľa je to typicky v rozmedzí $\pm 2 \text{ nm}$. Pre tie časti týchto dvoch spektier, ktoré majú relatívnu absorpciu 10 %, nesmie byť spektrum analyzovanej látky nad 220 nm viditeľne odlišné od spektra kalibračného štandardu. Toto kritérium je splnené, ak, po prvé, existujú tie isté maximá a po druhé, ak rozdiel medzi týmito dvomi spektrami nie je v žiadnom pozorovanom bode väčší než 10 % absorpcie kalibračného štandardu. V prípade, že sa využíva vyhľadávanie a zisťovanie zhody pomocou počítačových knižníc, musí byť pri porovnaní údajov zo spektier skúšobných vzoriek s údajmi zo spektier kalibračného roztohu prekročený kritický koeficient zhody. Hodnota tohto koeficientu sa určuje v priebehu validačného procesu pre každú analyzovanú látku na základe spektier, pre ktoré sú splnené vyššie opísané kritériá. Kontroluje sa premenlivosť spektier spôsobená maticou vzorky a činnosťou detektora.

2.3.5.3. *Pracovné kritériá pre fluorometrickú detekciu*

Musia byť splnené pracovné kritériá pre metódy kvapalinovej chromatografie (LC).

Používa sa pre molekuly, ktoré vykazujú prirodzenú fluorescenciu a molekuly, ktoré vykazujú fluorescenciu po transformácii alebo derivatizácii. Výber budiacej a emisnej vlnovej dĺžky v spojení s chromatografickými podmienkami sa robí takým spôsobom, aby sa minimalizoval výskyt interferujúcich zložiek v extraktoch zo slepej vzorky.

Najbližšie maximum píku v chromatograme je oddelené od určeného píku analyzovanej látky najmenej jednou plnou šírkou píku v 10 % maximálnej výšky píku analyzovanej látky.

2.3.5.4 *Pracovné kritériá na stanovenie analyzovanej látky kvapalinovou chromatografiou (LC) spojenou s imunogramom*

Kvapalinová chromatografia spojená s imunogramom samotná nie je vhodná na používanie ako konfirmačná metóda.

Musia byť splnené príslušné pracovné kritériá na LC metódy.

Preddefinované parametre kontroly kvality, napr. nešpecifické väzby, relatívne väzby kontrolných vzoriek, hodnota absorpcie slepej vzorky sa musia nachádzať v rámci limitov získaných v priebehu validácie skúšky.

Imunogram sa musí zostrojiť z najmenej piatich častí.

Každá frakcia musí byť menšia než polovica šírky píku.

Frakcia s maximálnym obsahom analyzovanej látky musí byť rovnaká pre podozrivú vzorku, nezhodnú kontrolnú vzorku a štandard.

2.3.5.5. *Stanovenie analyzovanej látky pomocou kvapalinovej chromatografie (LC) s detekciou v ultrafialovom svetle/vo viditeľnom svetle (UV/VIS) (jedna vlnová dĺžka)*

Kvapalinová chromatografia s detekciou v ultrafialovom svetle/vo viditeľnom svetle (jedna vlnová dĺžka) samotná nie je vhodná na používanie ako konfirmačná metóda.

Najbližšie maximum píku v chromatograme je oddelené od určeného píku analyzovanej látky najmenej jednou plnou šírkou píku v 10 % maximálnej výšky píku analyzovanej látky.

2.3.6. **Pracovné kritériá a ostatné požiadavky na stanovenie prítomnosti analyzovanej látky dvojrozmernou chromatografiou v tenkej vrstve (2-D TLC) spojenou so spektrometrickou detekciou s úplným záznamom v ultrafialovom svetle/vo viditeľnom svetle (UV/VIS)**

Dvojrozmerná výkonná chromatografia v tenkej vrstve (HPTLC) a kochromatografia sú povinné.

Hodnoty RF analyzovanej látky súhlasia s hodnotami RF v štandardoch v rozmedzí $\pm 5\%$.

Vizuálny vzhľad analyzovanej látky je nerozlišiteľný od vizuálneho vzhľadu štandardu.

Pre škvrny rovnakej farby by mal byť stred najbližšej škvrny oddelený od stredu škvrny analyzovanej látky najmenej o vzdialenosť polovice súčtu priemerov škvŕn.

Spektrum analyzovanej látky nesmie byť vizuálne odlišné od spektra štandardu tak, ako je to opísané pre detekciu s úplným záznamom v ultrafialovom svetle/vo viditeľnom svetle (UV/VIS).

V prípade, že sa používa vyhľadávanie a zisťovanie zhody pomocou počítačových knižníc, musí byť pri porovnaní údajov zo spektier skúšobných vzoriek s údajmi zo spektier kalibračného roztoku prekročený kritický koeficient zhody. Hodnota tohto koeficientu sa určuje v priebehu validáčného procesu pre každú analyzovanú látku na základe spektier, pre ktoré sú splnené vyššie opísané kritériá. Kontroluje sa premenlivosť spektier spôsobená maticou vzoriek a činnosťou detektora.

2.3.7. **Pracovné kritériá a požiadavky na stanovenie prítomnosti analyzovanej látky plynovou chromatografiou (GC) v spojení s detekciou pomocou záchytu elektrónov (ECD)**

Ak je k dispozícii materiál vhodný na tento účel, používa sa interný štandard. Najvhodnejšie je, ak je to príbuzná látka s retenčným časom blízkym retenčnému času analyzovanej látky. Analyzovaná látka sa eluuje s retenčným časom, ktorý je typický pre zodpovedajúci kalibračný štandard v rovnakých experimentálnych podmienkach. Minimálny prijateľný retenčný čas analyzovanej látky je dvojnásobkom retenčného času zodpovedajúceho prázdneho objemu stĺpca. Pomer retenčného času analyzovanej látky k retenčnému času interného štandardu, t. j. relatívny retenčný čas analyzovanej látky, je rovnaký ako relatívny retenčný čas kalibračného štandardu vo vhodnej matici, v rozmedzí $\pm 0,5\%$. Najbližšie maximum píku v chromatograme je oddelené od určeného píku analyzovanej látky najmenej jednou plnou šírkou píku v 10 % maximálnej výšky píku analyzovanej látky. Kvôli získaniu ďalších informácií je možné použiť kochromatografiu.

2.4 KONFIRMAČNÉ METÓDY PRVKOV

Konfirmačné analýzy chemických prvkov sú založené na koncepcii jednoznačnej identifikácie a správnej, ako aj presnej kvantifikácie pomocou fyzikálno-chemických vlastností jedinečných pre príslušný chemický prvok (napr. charakteristická vlnová dĺžka emitovaného alebo absorbovaného žiarenia daného prvku, atómová hmotnosť) na príslušnej úrovni.

Na identifikáciu chemických prvkov sa považujú za vhodné tieto metódy alebo kombinácie metód:

Tabuľka 7

Vhodné konfirmačné metódy chemických prvkov

Technika	Meraný parameter
Diferenciálna impulzná anodická stripová voltametrie	Elektrický signál
Atómová absorbná spektrometria	
Plameňová	Absorbčná vlnová dĺžka
Tvorba hydridov	Absorbčná vlnová dĺžka
Odparovanie za studena	Absorbčná vlnová dĺžka
Elektrotermálna atomizácia (grafitová pec)	Absorbčná vlnová dĺžka
Atómová emisná spektrometria	
Indukčne viazaná plazma	Emisná vlnová dĺžka
Hmotnostná spektrometria	
Indukčne viazaná plazma	Pomer hmotnosti k náboju

2.4.1. Všeobecné pracovné kritériá a iné požiadavky na konfirmačné metódy

Referenčné alebo fortifikované materiály obsahujúce známe množstvá analyzovanej látky s hodnotami na úrovni povoleného limitu alebo rozhodovacieho limitu (nehodná kontrolná vzorka) alebo v ich blízkosti, ako aj vhodné kontrolné materiály a slepé pokusy, by mali podľa možnosti prechádzať celým postupom súčasne s každou skupinou analyzovaných skúšobných vzoriek. Odporúčané poradie vstrekovania extraktov do analytického prístroja: slepý pokus, vhodná kontrolná vzorka, vzorka, ktorú treba potvrdiť, vhodná kontrolná vzorka a nakoniec nehodná kontrolná vzorka. Každá zmena tejto postupnosti sa musí zdôvodniť.

Väčšina analytických techník si vo všeobecnosti vyžaduje, aby pred stanovením obsahu analyzovanej látky prišlo k úplnému rozkladu organickej matrice, čím sa získajú roztoky. Možno to dosiahnuť použitím postupov mikrovlnnej mineralizácie, ktorými sa minimalizuje riziko straty a/alebo kontaminácie príslušných analyzovaných látok. Používajú sa dekontaminované teflonové nádoby dobrej kvality. Ak sa používajú iné metódy mokrého alebo suchého rozkladu, musí byť k dispozícii dokumentovaný dôkaz, ktorým sa vylúči vznik možných javov spojených so stratami alebo kontamináciou. Ako alternatívu k rozkladu je možné za určitých okolností zvoliť postupy separácie (napr. extrakcia), ktorými sa analyzované látky separujú od zložiek matrice a/alebo sa zvyšuje koncentrácia analyzovaných látok kvôli ich zavedeniu do analytického zariadenia.

Pokiaľ ide o kalibráciu, či už vonkajšiu alebo založenú na metóde štandardného prídavku, treba dávať pozor na to, aby nebol prekročený pracovný rozsah stanovený pre analýzu. V prípade vonkajšej kalibrácie sa kalibračné štandardy povinne pripravujú v roztoku, ktorý sa čo najpresnejšie zhoduje so zložením roztoku vzorky. Ak si to vyžadujú osobitné analytické okolnosti, uplatňuje sa aj korekcia na pozadie.

2.4.2. Doplnkové pracovné kritériá a iné požiadavky na kvantitatívne analytické metódy

2.4.2.1. Pravdivosť kvantitatívnych metód

V prípade opakovaných analýz certifikovaného referenčného materiálu na prítomnosť prvkov sa odchýlka experimentálne určeného priemerného obsahu od certifikovanej hodnoty nesmie nachádzať mimo limitu $\pm 10\%$. Ak takéto certifikované referenčné materiály (CRMs) nie sú k dispozícii, je prijateľné, aby sa pravdivosť meraní hodnotila prostredníctvom výťažnosti prídavkov známych množstiev prvku do neznámych vzoriek. Treba upozorniť na skutočnosť, že pridaný prvok, na rozdiel od analyzovanej látky, nie je chemicky viazaný v skutočnej matrici, a preto výsledky získané týmto prístupom majú nižšiu platnosť než výsledky dosiahnuté použitím certifikovaných referenčných materiálov. Údaje o výťažnosti sú prijateľné, len ak sa nachádzajú v rozmedzí $\pm 10\%$ okolo cieľovej hodnoty.

2.4.2.2. *Presnosť kvantitatívnych metód*

V prípade opakovanej analýzy vzorky vykonávanej v podmienkach vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti nesmie vnútrolaboratórny variačný koeficient (CV) priemernej hodnoty prekročiť tieto hodnoty:

Tabuľka 8**CV na kvantitatívne metódy v rozmedzí hmotnostných zlomkov prvkov**

Hmotnostný zlomok	CV (%)
≥ 10 µg/kg až 100 µg/kg	25
> 100 µg/kg až 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. **Osobitné požiadavky na diferenciálnu impulznú anodickú stripovú voltometriu (DPASV)**

Pred vykonaním operácií stanovenia metódou DPASV je najdôležitejšie úplne zničiť organickú hmotu vo vzorkách. Na voltamogramoch nesmú byť vidieť žiadne široké signály spôsobené prítomnosťou organických materiálov. Výšku píkov získaných metódou DPASV môžu ovplyvňovať zložky anorganickej matrice. Z tohto dôvodu sa musí kvantifikácia vykonať metódou štandardného prídavku. Spolu s metódou sa dodávajú vzory typických voltamogramov roztoku vzorky.

2.4.4. **Osobitné požiadavky na atómovú absorbčnú spektrometriu (AAS)**

Táto technika je v zásade jednoprvková a z tohto dôvodu si vyžaduje optimalizovať nastavenie experimentálnych parametrov v závislosti od konkrétneho kvantifikovaného prvku. Výsledky sa všade, kde je to možné, kvalitatívne a kvantitatívne kontrolujú pomocou alternatívnych absorbčných čiar (ideálne je vybrať dve rôzne čiary). Kalibračné štandardy sa pripravujú v matrici roztoku, ktorá sa čo najpresnejšie zhoduje s matricou meraného roztoku vzorky (napr. koncentrácia kyseliny alebo zloženie modifikátora). Všetky činidlá majú kvôli minimalizácii slepých hodnôt najvyššiu dostupnú čistotu. V závislosti od zvoleného režimu odparovania a/alebo atomizácie vzorky je možné rozlišovať rôzne typy AAS.

2.4.4.1. *Osobitné požiadavky na plameňovú AAS*

Nastavené parametre prístroja sa optimalizujú na každý prvok. Musí sa kontrolovať najmä zloženie a prietoky plynov. Aby sa zabránilo interferenciám spôsobeným absorpciou pozadia, používa sa korektor zdroja kontinua. V prípade neznámych matric sa vykonáva kontrola, či je potrebná korekcia na pozadie alebo nie.

2.4.4.2. *Osobitné požiadavky na atómovú absorbčnú spektrometriu s grafitovou pecou*

Kontaminácia v laboratóriu často ovplyvňuje správnosť pri práci s ultra stopovými hodnotami v grafitovej peci. Z tohto dôvodu by sa na manipulácie so vzorkou a štandardom mali používať činidlá s vysokou čistotou, deionizovaná voda a inertné plastové predmety. Nastavené parametre prístroja sa optimalizujú na každý prvok. Musia sa kontrolovať najmä podmienky pedspracovania a atomizácie (teplota, čas) a zmeny matrice.

Práca v podmienkach izotermálnej atomizácie (napr. priečný ohrev grafitovej skúmavky s integrovanou Evovovou plošinou (8)) zmenší vplyv matrice týkajúci sa atomizácie analyzovanej látky. V spojení so zmenou matrice a korekciou na Zeemanovo pozadie (9) bude možná kvantifikácia prostredníctvom kalibračnej krivky založenej na meraní vodných štandardných roztokov.

2.4.5. **Osobitné požiadavky na atómovú absorbčnú spektrometriu s tvorbou hydridov**

Organické látky obsahujúce prvky ako arzén, bizmut, germánium, olovo, antimón, selén, cín a telur môžu byť veľmi stabilné a kvôli získaniu správnych výsledkov týkajúcich sa celkového obsahu prvkov je potrebné rozložiť ich oxidáciou. Z tohto dôvodu sa odporúča mikrovlnný rozklad alebo vysokotlakové spolpenie v silne oxidačných podmienkach. Najväčšia starostlivosť sa musí venovať úplnej a reprodukovateľnej premene týchto prvkov na ich príslušné hydridy.

Tvorba arzenovodíka v roztoku kyseliny chlorovodíkovej s NaBH_4 závisí od oxidačného stavu arzenu (AsIII: rýchla tvorba, As V: dlhší čas tvorby). Aby sa zabránilo strate citlivosti stanovenia prítomnosti As V technikou prietokového vstrekovania, spôsobenej krátkym reakčným časom v tomto systéme, musí sa As V po oxidačnom rozklade zredukovať na As III. Na tento účel je vhodný iodid draselný/kyselina askorbová alebo cysteín. Slepé vzorky, kalibračné roztoky a roztoky vzoriek sa ošetrujú rovnakým spôsobom. Práca s dávkovým systémom umožňuje stanoviť obidva druhy arzenu bez vplyvu na presnosť. V dôsledku spomalenej tvorby hydridu arzenu V sa kalibrácia vykonáva integráciou plochy píku. Nastavené parametre prístroja sa optimalizujú. Prietok plynu, ktorým sa hydrid prenáša do atomizéra, je zvlášť dôležitý a kontroluje sa.

2.4.6. Osobitné požiadavky na atómovú absorbnú spektrometriu s odparovaním za studena

Odparovanie za studena sa využíva len v prípade ortuti. V dôsledku strát odparovaním a adsorpciou prvkovej ortuti je v priebehu celej analýzy potrebná zvláštna opatrnosť. Starostlivo sa musí brániť kontaminácii činidlami alebo prostredím.

Organické látky obsahujúce ortuť je kvôli získaniu správnych výsledkov týkajúcich sa celkového obsahu ortuti potrebné rozložiť oxidáciou. Na rozklad je potrebné používať hermetické systémy s mikrovlnným rozkladom alebo vysokotlakový spopolňovač. Osobitnú starostlivosť je potrebné venovať čisteniu zariadenia, ktoré prišlo do styku s ortuťou.

Práca technikou prietokového vstrekovania je výhodná. Pokiaľ ide o dolné rozhodovacie limity, odporúča sa vykonať adsorpciu prvkovej ortuti na adsorbéri zo zlata/platiny, po ktorej nasleduje termálna desorpcia. Styk adsorbéra alebo komory s vlhkosťou ruší meranie a musí sa mu zabrániť.

2.4.7. Osobitné požiadavky na atómovú emisnú spektrometriu s indukčne viazanou plazmou (ICP-AES)

Atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou (10) je viacprvková metóda, ktorá umožňuje súčasne merať rôzne prvky. Kvôli použitiu metódy ICP-AES sa vzorky musia najprv rozložiť, čím sa rozložia organické matrice. Používajú sa hermetické systémy s mikrovlnným rozkladom alebo vysokotlakovým spopolňovaním. Pre zmysluplné používanie analýzy metódou ICP-AES majú základný význam kalibrácia prístroja a výber prvku alebo vlnovej dĺžky. Pokiaľ ide o kalibráciu prístroja, v prípade lineárnych kalibračných kriviek je zvyčajne potrebné merať kalibračné roztoky len so štyrmi koncentraciami, pretože kalibračné krivky pre metódu ICP-AES sú vo všeobecnosti lineárne v rozpätí štyroch až šiestich rádov hodnoty koncentrácie. Kalibrácia systému ICP-AES by sa mala za normálnych okolností vykonať viacprvkovým štandardom, ktorý sa pripravuje v roztoku obsahujúcom rovnakú koncentráciu kyseliny ako meraný roztok. V prípade lineárnej krivky sa kontrolujú koncentrácie prvkov.

Výber vlnových dĺžok pre meranie emisie z analyzovaných látok je primeraný koncentraciám prvkov, ktoré je potrebné stanoviť. Ak sa koncentrácia analyzovanej látky nachádza mimo pracovného rozsahu emisnej čiary, použije sa iná emisná čiara. Najprv sa vyberie emisná čiara najvyššej citlivosti (bez interferencie) potom čiara menšej citlivosti. Pri práci na limite detekcie alebo v jeho v blízkosti je čiara najvyššej citlivosti pre danú analyzovanú látku zvyčajne najlepšou voľbou. Najväčšie ťažkosti s metódou ICP-AES spôsobujú spektrálne interferencie a interferencie pozadia. Možnými druhmi interferencií sú napr. jednoduchý posun pozadia, posun pozadia so sklonom, priame prekrytie spektier a komplexný posun pozadia. Každý z týchto druhov interferencií má svoje vlastné príčiny a nápravné prostriedky. Korekcie interferencií a optimalizácia pracovných parametrov sa uplatňujú v závislosti od matric. Niektorým druhom interferencií je možné zabrániť zriedením alebo úpravou matric. Spolu s každou dávkou analyzovaných skúšobných vzoriek sa rovnakým spôsobom ako skúšobné vzorky spracováva referenčný a fortifikovaný materiál obsahujúci známe množstvá analyzovanej látky (analyzovaných látok), ako aj slepý materiál. V prípade skúšok posunu sa štandard kontroluje napr. po 10 vzorkách. Všetky činidlá a plazmový plyn majú najvyššiu dostupnú čistotu.

2.4.8. Osobitné požiadavky na indukčne viazanú hmotnostnú spektrometriu (ICP-MS) (11)

Stanovenie stopových prvkov strednej atómovej hmotnosti, ako je chróm, meď a nikel, môže byť vystavené silnej interferencii od ostatných izobarických a viacatómových iónov. Tomu sa dá predísť, len ak je k dispozícii rozlišovacia schopnosť s hodnotou najmenej 7000 – 8000. Medzi ťažkosti spojené s technikami hmotnostnej spektrometrie patrí prístrojový drift, účinky matrice a interferencie od molekulárnych iónov ($m/z < 80$). Na korekciu prístrojového driftu a účinkov matrice je potrebná viacnásobná interná štandardizácia vzťahujúca sa na ten istý rozsah hmotností, ako majú stanovované prvky.

Pred začiatkom meraní metódou ICP-MS je potrebné úplne rozložiť organickú hmotu vo vzorkách. Tak, ako v prípade atómovej absorbnéj spektrometrie, po rozklade v hermetických nádobách je potrebné previesť prchavé prvky, napr. jód, do stabilného oxidačného stavu. Najsilnejšie interferencie pochádzajú od kombinácií molekulárnych iónov argónu (plazmový plyn), vodíka, uhlíka, dusíka a kyslíka (rozkladné kyseliny, nečistoty v plazmovom plyne a strhávané atmosférické plyny) a od matrice vzorky. Na potlačenie týchto druhov interferencií je potrebný úplný rozklad, merania hodnôt pozadia, vhodný výber analytických hmotností niekedy súvisiacich s menším výskytom (horší limit detekcie) a rozkladných kyselín, napr. kyseliny dusičnej.

V prípade stanovovaných prvkov je potrebné vylúčiť interferencie vhodným výberom špecifických analytických hmotností vrátane potvrdenia izotopových pomerov. Pri každom meraní sa pomocou interných štandardov skontroluje odozva prístroja pri zohľadnení Fanových koeficientov.

3. VALIDÁCIA

Validáciou sa preukazuje, že daná analytická metóda spĺňa kritériá vzťahujúce sa na príslušné pracovné charakteristiky.

Rôzne kontrolné účely si vyžadujú rôzne kategórie metód. V ďalej uvedenej tabuľke je stanovené, ktoré pracovné charakteristiky sa overujú pre ktorý typ metódy.

Tabuľka 9

Klasifikácia analytických metód podľa pracovných charakteristík, ktoré je potrebné určiť

		Limit detekcie CC β	Rozhodovací limit CC α	Pravdivosť/výtťažnosť	Presnosť	Selektivita/špecifickosť	Uplatniteľnosť/robustnosť/stabilita
Kvalitatívne metódy	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvantitatívne metódy	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = skríningové metódy; C = konfirmačné metódy; + = určenie je povinné.

3.1. VALIDAČNÉ POSTUPY

V tejto kapitole sú uvedené príklady a/alebo odkazy na validačné postupy analytických metód. Je možné používať iné prístupy, ktorými sa preukáže, že daná analytická metóda spĺňa pracovné kritériá pre pracovné charakteristiky, za predpokladu, že sa nimi dosiahne rovnaká úroveň a kvalita informácií.

Validáciu je možné urobiť aj vykonaním medzilaboratórneho porovnania, ktoré je ustanovené Alimentárnym kódexom, ISO alebo IUPAC (12) alebo alternatívnymi metódami, ako sú vnútrolaboratórna validácia alebo vlastná validácia (13) (14). Táto časť sa zameriava na vnútrolaboratórnu validáciu (alebo vlastnú validáciu) pomocou modulárneho prístupu. Tento prístup pozostáva zo:

1. súboru všeobecných pracovných charakteristík nezávislých od použitého modelu validácie a
2. špecifickejších postupov závislých od modelu opísaných v tabuľke 10.

Tabuľka 10

Pracovné parametre nezávislé od modelu a závislé od modelu

Validácia		
Pracovné parametre nezávislé od modelu	Pracovné parametre závislé od modelu	
Všeobecné pracovné charakteristiky (3.1.1)	Konvenčný prístup k validácii (3.1.2)	Prístup typu vlastná validácia (3.1.3)
Špecifickosť	Výtťažnosť	Výtťažnosť
Pravdivosť	Opakovateľnosť	Opakovateľnosť
Robustnosť: malé zmeny	Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť	Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť
Stabilita	Reprodukovateľnosť	Reprodukovateľnosť
	Rozhodovací limit (CC α)	Rozhodovací limit (CC α)
	Detekčná schopnosť (CC β)	Detekčná schopnosť (CC β)
	Kalibračné krivky	Kalibračná krivka
	Robustnosť: veľké zmeny	Robustnosť

3.1.1. Pracovné charakteristiky nezávislé od modelu

Bez ohľadu na zvolený prístup k validácii sa musia určiť nasledujúce pracovné charakteristiky. Kvôli minimalizácii pracovného zaťaženia je možné využiť starostlivo navrhnutý a štatisticky správny prístup ku kombinovaniu experimentov vykonávaných s cieľom určiť rôzne parametre.

3.1.1.1. Špecifickosť

V prípade analytických metód je dôležitá rozlišovacia schopnosť medzi analyzovanou látkou a blízko príbuznými látkami (izoméry, metabolity, produkty degradácie, endogénne látky, zložky matrice atď.). Na kontrolu existencie interferencií sú potrebné dva prístupy.

Z tohto dôvodu sa vyberajú potenciálne interferujúce látky a analyzujú sa príslušné slepé vzorky s cieľom zistiť prítomnosť možných druhov interferencií a odhadnúť účinok týchto interferencií:

- vyberte skupinu chemicky príbuzných zložiek (metabolity, deriváty atď.) alebo iných látok, ktoré sa pravdepodobne vyskytujú s príslušnou zložkou, a ktoré môžu byť prítomné vo vzorkách;
- analyzujte vhodný počet reprezentatívnych slepých vzoriek ($n = 20$) a skontrolujte všetky druhy interferencií (signály, píky, stopy iónov) v príslušnej oblasti, v ktorej sa očakáva eluovanie cieľovej analyzovanej látky;
- okrem toho sa reprezentatívne slepé vzorky fortifikujú príslušnou koncentráciou látkami, ktoré pravdepodobne interferujú s identifikáciou a/alebo kvantifikáciou analyzovanej látky;
- po analýze vyšetríte, či:
 - prítomnosť interferencie môže viesť k nesprávnej identifikácii,
 - prítomnosť jedného alebo viacerých druhov interferencií bráni identifikácii cieľovej analyzovanej látky alebo
 - či je kvantifikácia značne ovplyvnená.

3.1.1.2. Pravdivosť

V tomto odseku je opísané určenie pravdivosti (jednej zložky správnosti). Pravdivosť je možné stanoviť len pomocou certifikovaného referenčného materiálu (CRM). Certifikovaný referenčný materiál sa používa vždy, keď je k dispozícii. Postup je podrobne opísaný v ISO 5725-4 (5). Ďalej je uvedený príklad:

- analyzujte šesť replikátov CRM v súlade s návodom na výkon skúšky podľa danej metódy,
- stanovte koncentráciu analyzovanej látky prítomnej v každej vzorke z replikátov,
- vypočítajte pre tieto koncentrácie priemernú hodnotu, smerodajnú odchýlku a variačný koeficient (%),
- vypočítajte pravdivosť vydelením zistenej priemernej hodnoty koncentrácie certifikovanou hodnotou (nameranou ako koncentrácia) a podiel vynásobte 100, čím vyjadrite výsledok v percentách.

Pravdivosť (%) = zistená priemerná hodnota koncentrácie korigovaná na výťažnosť $\times 100$ /certifikovaná hodnota..

Ak CRM nie je k dispozícii, namiesto pravdivosti je možné určiť výťažnosť postupom opísaným ďalej v bode 4.1.2.1.

3.1.1.3. Uplatniteľnosť/robustnosť (malé zmeny)

Pri týchto štúdiách sa využíva úmyselné zavedenie malých vhodných zmien, ktoré vykonávajú operátori v laboratóriu, a pozorovanie ich dôsledkov.

Pred vyšetrením sa musia vykonať štúdie formou výberu faktorov predbežnej úpravy vzoriek, čistenia a analýzy, ktoré môžu ovplyvniť výsledky merania. Medzi tieto faktory môže patriť analytik, zdroj a vek činidiel, rozpúšťadiel, štandardov a extraktov zo vzoriek, rýchlosť ohrevu, teplota, hodnota pH, ako aj mnoho iných faktorov, ktoré sa môžu vyskytnúť v laboratóriu. Tieto faktory by sa mali upraviť, pokiaľ ide o rád hodnoty, ktorý sa zhoduje s odchýlkami, ktoré sa zvyčajne vyskytujú medzi laboratóriami.

- Identifikujte možné faktory, ktoré by mohli ovplyvňovať výsledky.
- Každý faktor mierne zmeňte.

- Vykonajte skúšku robustnosti pomocou Youdenovho prístupu (15) (16). (Na tomto mieste je možné použiť iné schválené metódy. Youdenov prístup si však vyžaduje minimum potrebného času a práce). Youdenov prístup predstavuje frakčný faktoriálny návrh. Nie je možné zistiť interakcie medzi rôznymi faktormi.
- Ak sa nájde faktor, ktorý významne ovplyvňuje výsledky merania, vykonajte ďalšie experimenty, na základe ktorých sa rozhodne o limitoch prijateľnosti tohto faktora.
- Faktory, ktoré významne ovplyvňujú výsledky, by mali byť jasne vyznačené v protokole o postupe podľa tejto metódy.

Základnou myšlienkou je neskúmať na jeden raz jednu zmenu, ale zaviesť niekoľko zmien naraz. Uvedme príklad, nech A, B, C, D, E, F, G označujú nominálne hodnoty siedmich rôznych faktorov, ktoré by mohli ovplyvňovať výsledky, ak sa ich nominálne hodnoty mierne zmenia. Nech zodpovedajúce malé písmená a, b, c, d, e, f a g označujú ich alternatívne hodnoty. Výsledkom je 2⁽¹⁾ alebo 128 rôznych možných kombinácií.

Je možné vybrať podmnožinu pozostávajúcu z ôsmich z týchto kombinácií, u ktorých existuje rovnováha medzi veľkými a malými písmenami (tabuľka 11). Musí sa vykonať osem operácií stanovenia, pri ktorých sa využije kombinácia vybraných faktorov (A – G). Výsledky týchto operácií stanovenia sú uvedené v nasledujúcej tabuľke 11 ako S – Z.

Tabuľka 11

Návrh experimentu so skúmaním robustnosti (malé zmeny)

Hodnota faktora F	Kombinácia počtu operácií stanovenia							
	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
Pozorovaný výsledok R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Výpočty sú uvedené v príkladoch skúšok robustnosti v 3.3.

3.1.1.4. Stabilita

Bolo pozorované, že nedostatočná stabilita analyzovanej látky alebo zložiek matrice vo vzorke v priebehu skladovania alebo analýzy môže spôsobiť významné odchýlky výsledku analýzy. Okrem toho by sa mala kontrolovať aj stabilita kalibračného štandardu v roztoku. Stabilita analyzovanej látky je zvyčajne dobre charakterizovaná v rôznych podmienkach skladovania. Monitorovanie podmienok skladovania tvorí súčasť bežného akreditačného systému laboratória. Ak stabilita analyzovanej látky nie je známa, ďalej sú uvedené príklady, ako je možné určiť ju.

Stabilita analyzovanej látky v roztoku:

- Pripravte čerstvé zásobné roztoky analyzovanej látky (analyzovaných látok) a zriedte ich podľa údajov v návode na výkon skúšky tak, aby ste získali dostatočný počet alikvótnych častí (napr. 40) s každou vybranou koncentráciou (v blízkosti minimálneho požadovaného pracovného limitu v prípade látok, pre ktoré nebol určený povolený limit, alebo v blízkosti povoleného limitu v prípade ostatných látok). Pripravte obidva roztoky analyzovanej látky, ten, ktorý bude použitý na fortifikáciu, aj ten, ktorý bude použitý pri konečnej analýze roztoku a všetky ostatné roztoky, ktoré sú predmetom záujmu (napr. derivované štandardy).
- Zmerajte obsah analyzovanej látky v čerstvo pripravenom roztoku podľa návodu na výkon skúšky.
- Rozdeľte vhodné objemy do vhodných nádob, označte ich a skladujte ich podľa tejto schémy:

(¹) Výtazok: tá časť hmotnosti analyzovanej látky obsiahnutej vo vzorke, ktorá je prítomná v konečnom extrakte.

Tabuľka 12

Schéma určenia stability analyzovanej látky v roztoku

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Tmavé miesto	10 alikvótnych častí	10 alikvótnych častí	10 alikvótnych častí
Svetlé miesto			10 alikvótnych častí

- Čas skladovania by mohol byť zvolený v trvaní jedného, troch a štyroch týždňov alebo v prípade potreby dlhšie, napr. dovtedy, kým v priebehu identifikácie a/alebo kvantifikácie nebudú pozorované degradačné javy. Maximálna doba skladovania a optimálne skladovacie podmienky sa musia zaznamenať.
- Mal by sa vykonať výpočet koncentrácie analyzovanej látky (analyzovaných látok) v každej alikvótnej časti pomocou roztoku analyzovanej látky s koncentráciou 100 % čerstvo pripraveného v čase analýzy.

$$\text{Zostávajúca analyzovaná látka (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{čerstvý}}$$

C_i = koncentrácia v čase merania

$C_{\text{čerstvý}}$ = koncentrácia čerstvého roztoku

Stabilita analyzovanej látky (analyzovaných látok) v matrici

- Vždy, keď je to možné, by sa mali používať zaslané vzorky. -Ak zaslaný materiál nie je k dispozícii, mala by sa použiť matrica fortifikovaná analyzovanou látkou.
- Ak je zaslaný materiál k dispozícii, mala by sa stanoviť koncentrácia v tomto materiáli, kým je ešte čerstvý. Ďalšie alikvótné časti z materiálu by sa mali odobrať po jednom, dvoch, štyroch a 20 týždňoch a mali by sa stanoviť ich koncentrácie. Tkanivo by sa malo skladovať pri teplote najmenej mínus 20 °C alebo, v prípade potreby, nižšej.
- Ak zaslaný materiál nie je k dispozícii, odoberte trochu slepého materiálu a homogenizujte ho. Rozdeľte tento materiál na päť alikvótnych častí. Každú alikvótnu časť fortifikujte analyzovanou látkou, ktorá by mala byť pripravená pokiaľ možno v malom množstve vodného roztoku. Jednu alikvótnu časť analyzujte hneď. Ostatné alikvótné časti skladujte pri teplote najmenej mínus 20 °C alebo, v prípade potreby, nižšej a analyzujte ich po jednom, dvoch, štyroch a 20 týždňoch.

3.1.1.5. Kalibračné krivky

Ak sa na kvantifikáciu používajú kalibračné krivky:

- na zostrojenie krivky by sa malo použiť najmenej päť hodnôt (vrátane nuly),
- mal by byť opísaný pracovný rozsah krivky,
- mal by byť uvedený matematický vzorec krivky a miera zhody údajov s krivkou,
- mali by byť opísané rozsahy prijateľnosti parametrov krivky. Ak je potrebné vykonať sériovú kalibráciu založenú na štandardnom roztoku, musia byť vyjadrené prijateľné rozsahy parametrov krivky, ktoré sa môžu meniť od série k sérii.

3.1.2. Konvenčné validačné postupy

Výpočet parametrov v súlade s konvenčnými metódami si vyžaduje vykonať niekoľko jednotlivých experimentov. Pre každú veľkú zmenu (pozri vyššie uvedenú podkapitolu o uplatniteľnosti/robustnosti) sa musí určiť každá pracovná charakteristika. V prípade viacanalytových metód je možné analyzovať súčasne viac analyzovaných látok, pokiaľ sa predtým vylúčia možné príslušné druhy interferencií. Podobným spôsobom je možné určiť niekoľko pracovných charakteristík. Takže kvôli minimalizácii pracovného zaťaženia sa odporúča v čo najväčšej miere kombinovať experimenty (napr. opakovateľnosť a vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť so špecifickou, analýzu slepých vzoriek na určenie rozhodovacieho limitu a skúšky špecifickosti).

3.1.2.1. Výťažnosť

Ak CRM nie je k dispozícii, výťažnosť sa musí určiť experimentmi pomocou fortifikovanej slepej matrice, napríklad podľa tejto schémy:

- vyberte 18 alikvótnych častí slepého materiálu a fortifikujte šesť alikvótnych častí na úrovni 1, 1,5 a dvojnásobku minimálneho požadovaného pracovného limitu alebo 0,5, 1 a jedenaplnásobku povoleného limitu,
- analyzujte vzorky a vypočítajte koncentráciu prítomnú v každej vzorke,

- pomocou ďalej uvedenej rovnice vypočítajte výťažnosť každej vzorky,
- zo šiestich výsledkov na každej úrovni vypočítajte priemernú výťažnosť a CV,
- % výťažnosti = $100 \times \text{nameraný obsah/úroveň fortifikácie}$.

Táto konvenčná metóda určenia výťažnosti je variantom metódy štandardného prídavku opísanej v bode 3.5, ak

- sa za vzorku považuje slepá vzorka namiesto vzorky, ktorú treba analyzovať,
- sa predpokladá, že výťažok ⁽¹⁾ a výťažnosť ⁽²⁾ pre tieto dve skúšobné množstvá sú podobné,
- skúšobné vzorky majú rovnaké hmotnosti a extrakty z skúšobných množstiev majú rovnaké objemy,
- množstvo kalibračného štandardu, ktorý sa pridáva do druhého skúšobného množstva (obohateného) je označené ako x_{ADD} ($x_{\text{ADD}} = \rho_A \cdot V_A$),
- x_1 je hodnota nameraná v slepej vzorke a x_2 je hodnota nameraná v druhom skúšobnom množstve (obohatenom),
- potom % výťažnosti = $100 (x_2 - x_1)/x_{\text{ADD}}$.

Ak nie je splnená ktorákoľvek z vyššie uvedených podmienok (alebo ak sa to predpokladá), potom sa musí vykonať úplný postup určenia výťažnosti metódou štandardného prídavku opísanou v bode 3.5.

3.1.2.2. Opakovateľnosť

- Pripravte sadu vzoriek so zhodnými maticami fortifikovanými analyzovanou látkou tak, aby ste získali koncentrácie rovnocenné 1, 1,5 a dvojnásobku minimálneho požadovaného pracovného limitu alebo 0,5, 1 a jedenaplnásobku povoleného limitu.
- Na každej úrovni by sa mala vykonať analýza s najmenej šiestimi replikátmi.
- Analyzujte vzorky.
- Vypočítajte koncentráciu zistenú v každej vzorke.
- Vypočítajte priemernú koncentráciu, smerodajnú odchýlku a variačný koeficient (%) fortifikovaných vzoriek.
- Zopakujte tieto kroky pri najmenej dvoch iných príležitostiach.
- Vypočítajte celkové priemerné koncentrácie a CV fortifikovaných vzoriek.

3.1.2.3. Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť

- Pripravte sadu vzoriek zo špecifikovaného skúšobného materiálu (zhodné alebo rozdielne matrice) fortifikovaných analyzovanou látkou (analyzovanými látkami) tak, aby ste získali koncentrácie rovnocenné 1, 1,5 a dvojnásobku minimálneho požadovaného pracovného limitu alebo 0,5, 1 a jedenaplnásobku povoleného limitu.
- Na každej úrovni by sa mala vykonať analýza s najmenej šiestimi replikátmi.
- Podľa možnosti zopakujte tieto kroky pri najmenej dvoch iných príležitostiach s rôznymi operátormi a v rôznych podmienkach prostredia, napr. rôzne dávky činidiel, rozpúšťadiel atď., rôzne teploty miestnosti, rôzne prístroje atď.
- Analyzujte vzorky.
- Vypočítajte koncentráciu zistenú v každej vzorke.
- Vypočítajte priemernú koncentráciu, smerodajnú odchýlku a variačný koeficient (%) fortifikovaných vzoriek.

3.1.2.4. Reprodukovateľnosť

Ak sa musí overiť reprodukovateľnosť, laboratória by sa mali zúčastniť na porovnávacích štúdiách podľa ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. Rozhodovací limit (CCa)

Rozhodovací limit sa musí určiť podľa požiadaviek na identifikáciu alebo identifikáciu plus kvantifikáciu definovaných v podkapitole „Pracovné kritériá a iné požiadavky na analytické metódy“ (časť 2).

⁽¹⁾ Výťažok: tá časť hmotnosti analyzovanej látky obsiahnutej vo vzorke, ktorá je prítomná v konečnom extrakte.

⁽²⁾ Výťažnosť (v tomto rozhodnutí): tá časť hmotnosti analyzovanej látky pridanej do vzorky, ktorá je prítomná v konečnom extrakte. V celej zvyšnej časti dokumentu sa predpokladá, že výťažok a výťažnosť sú rovnaké a z tohto dôvodu sa používa len pojem výťažnosť.

V prípade látok, pre ktoré nebol určený povolený limit, je možné stanoviť CC α :

- buď postupom kalibračnej krivky podľa ISO 11843 (17) (v tomto rozhodnutí sa uvádza ako kritická hodnota čistej stavovej premennej). V tomto prípade sa použije slepý materiál fortifikovaný v ekvidištantných krokoch na hodnotu minimálneho požadovaného pracovného limitu a nad túto hodnotu. Analyzujte vzorky. Po identifikácii nakreslite graf závislosti signálu od pridanej koncentrácie. Koncentrácia zodpovedajúca úseku na osi y plus 2,33-krát smerodajná odchýlka vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti tohto úseku je rovná rozhodovaciemu limitu. Platí to len pre kvantitatívne skúšky ($\alpha = 1 \%$),
- alebo analýzou najmenej 20 slepých materiálov na maticu, aby bolo možné vypočítať pomer signálu k šumu v časovom intervale, v ktorom sa očakáva analyzovaná látka. Ako rozhodovací limit je možné použiť trojnásobok pomeru signálu k šumu. Platí to len pre kvantitatívne a kvalitatívne skúšky.

V prípade látok s určeným povoleným limitom je možné stanoviť CC α :

- buď postupom kalibračnej krivky podľa ISO 11843 (17) (v tomto rozhodnutí sa uvádza ako kritická hodnota čistej stavovej premennej). V tomto prípade sa použije slepý materiál fortifikovaný v ekvidištantných krokoch na hodnotu v blízkosti povoleného limitu. Analyzujte vzorky. Po identifikácii nakreslite graf závislosti signálu od pridanej koncentrácie. Koncentrácia zodpovedajúca povolenému limitu plus 1,64-krát smerodajná odchýlka vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti je rovná rozhodovaciemu limitu ($\alpha = 5 \%$),
- alebo analýzou najmenej 20 slepých materiálov na maticu fortifikovaných analyzovanou látkou (analyzovanými látkami) na hodnotu povoleného limitu. Koncentrácia zodpovedajúca povolenému limitu plus 1,64-krát zodpovedajúca smerodajná odchýlka je rovná rozhodovaciemu limitu ($\alpha = 5 \%$).

Pozri tiež článok 5 a bod 3.2.

3.1.2.6. Detekčná schopnosť (CC β)

Detekčná schopnosť by sa mala určiť podľa požiadaviek na screening, identifikáciu alebo identifikáciu plus kvantifikáciu podľa definície (pozri časť 2).

V prípade látok, pre ktoré nebol určený povolený limit, je možné stanoviť CC β :

- postupom kalibračnej krivky podľa ISO 11843 (17) (v tomto rozhodnutí sa uvádza ako minimálna detekovateľná hodnota čistej stavovej premennej). V tomto prípade sa používa reprezentatívny slepý materiál fortifikovaný v ekvidištantných krokoch na hodnotu minimálneho požadovaného pracovného limitu a pod túto hodnotu. Analyzujte vzorky. Po identifikácii nakreslite graf závislosti signálu od pridanej koncentrácie. Koncentrácia zodpovedajúca rozhodovaciemu limitu plus 1,64-krát smerodajná odchýlka vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti priemerného nameraného obsahu na hodnote rozhodovacieho limitu je rovná detekčnej schopnosti ($\beta = 5 \%$),
- analýzou najmenej 20 slepých materiálov na maticu fortifikovaných analyzovanou látkou (analyzovanými látkami) na hodnotu rozhodovacieho limitu. Analyzujte vzorky a identifikujte analyzované látky. Hodnota rozhodovacieho limitu plus 1,64-krát smerodajná odchýlka vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti nameraného obsahu je rovná detekčnej schopnosti ($\beta = 5 \%$),
- ak nie sú k dispozícii kvantitatívne výsledky, je možné stanoviť detekčnú schopnosť vyšetrením slepého materiálu fortifikovaného na hodnotu rozhodovacieho limitu a nad túto hodnotu. V tomto prípade sa hodnota koncentrácie, na ktorej zostáva len 5 % falošných zhodných výsledkov, rovná detekčnej schopnosti metódy. Z tohto dôvodu sa kvôli zabezpečeniu spoľahlivej základne pre toto stanovenie musí vykonať najmenej 20 vyšetrení pre najmenej jednu hodnotu koncentrácie.

V prípade látok, pre ktoré bol určený povolený limit, je možné stanoviť CC β :

- buď postupom kalibračnej krivky podľa ISO 11843 (17) (v tomto rozhodnutí sa uvádza ako minimálna detekovateľná hodnota čistej stavovej premennej). V tomto prípade sa použije reprezentatívny slepý materiál fortifikovaný v ekvidištantných krokoch na hodnotu v blízkosti povoleného limitu. Analyzujte vzorky a identifikujte analyzovanú látku (analyzované látky). Vypočítajte smerodajnú odchýlku priemerného nameraného obsahu na hodnote rozhodovacieho limitu. Koncentrácia zodpovedajúca hodnote rozhodovacieho limitu plus 1,64-krát smerodajná odchýlka vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti je rovná detekčnej schopnosti ($\beta = 5 \%$),
- alebo analýzou najmenej 20 slepých materiálov na maticu fortifikovaných analyzovanou látkou (analyzovanými látkami) na hodnotu rozhodovacieho limitu. Hodnota rozhodovacieho limitu plus 1,64-krát zodpovedajúca smerodajná odchýlka je rovná detekčnej schopnosti ($\beta = 5 \%$).

Pozri tiež podkapitolu 3.2.

3.1.2.7. *Robustnosť (veľké zmeny)*

Analytická metóda by sa mala vyskúšať v rôznych experimentálnych podmienkach, ako sú napríklad rôzne druhy, rôzne matrice alebo rôzne podmienky odberu vzoriek. Mali by byť vnesené veľké zmeny. Dôležitosť týchto zmien je možné vyhodnotiť, napríklad pomocou Youdenovho prístupu (15) (16). Pre všetky veľké zmeny, u ktorých sa ukázalo, že majú dôležitý účinok na vykonanie skúšky, by sa mala určiť každá pracovná charakteristika.

3.1.3. **Validácia podľa alternatívnych modelov**

Ak sa uplatňujú alternatívne validačné postupy, vo validačnom protokole sa uvedie základný model a stratégia s príslušnými nevyhnutnými podmienkami, predpokladmi a vzorcami, alebo sa aspoň uvedú odkazy na ich dostupnosť. V ďalšej časti je uvedený príklad alternatívneho prístupu. Pri uplatňovaní napr. modelu vlastnej validácie sa pracovné charakteristiky určujú spôsobom, ktorý umožňuje validovať veľké zmeny v rámci toho istého validačného postupu. Vyžaduje si to navrhnuť experimentálny plán validácie.

3.1.3.1. *Experimentálny plán*

Experimentálny plán musí byť navrhnutý v závislosti od počtu rôznych druhov a rôznych faktorov, ktoré sú predmetom vyšetovania. Z toho vyplýva, že v prvom kroku celého postupu sa zohľadnia počty vzoriek, ktoré budú v budúcnosti v laboratóriu analyzované, kvôli výberu najdôležitejších druhov a tých faktorov, ktoré môžu ovplyvňovať výsledky meraní. Následne sa zvolí rozsah koncentrácie spôsobom, ktorý je prispôbený účelu podľa príslušnej úrovne.

Príklad:

- súčasne s validovanou analytickou metódou je možné vyšetovať niekoľko analyzovaných látok,
- boli identifikované dve odchýlky od vedúceho faktora (A a B). Vedúce faktory vytvárajú základňu, na ktorej sa kombinujú úrovne faktorov. Medzi tieto vedúce faktory môžu patriť také faktory, ako je druh alebo matrica. V tomto prípade bol vedúci faktor zmenený na dvoch úrovniach, t. j. boli zvážené dva rôzne druhy (druh A a B). Vo všeobecnosti je možné meniť vedúce faktory na viac než dvoch úrovniach, čím sa len zvyšuje počet analýz, ktoré treba vykonať.
- vybrané faktory sa menia na dvoch úrovniach (označených ako + alebo -).

Tabuľka 13

Príklady faktorov, ktoré sa považujú za dôležité pre validačný postup

Pohlavie zvieratá	(faktor 1)
Plemeno	(faktor 2)
Podmienky prepravy	(faktor 3)
Podmienky skladovania	(faktor 4)
Čerstvosť vzorky	(faktor 5)
Podmienky výkrmu	(faktor 6)
Rôzni operátori s rôznymi skúsenosťami	(faktor 7)

Tabuľka 14

Možný experimentálny plán na uvedený príklad

Druh	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Č. vzorky
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Druh	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Č. vzorky
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Kedže každá vzorka (každá kombinácia hladín faktorov) sa musí obohatiť štyrmi rôznymi koncentraciami v blízkosti príslušnej úrovne a pre každú úroveň sa musí analyzovať jedna slepá vzorka, v rámci celého validačného experimentu sa musí vykonať $5 \times 16 = 80$ analýz.

Z týchto 80 meraní je možné vypočítať výsledky (13) (14).

Výťažnosť

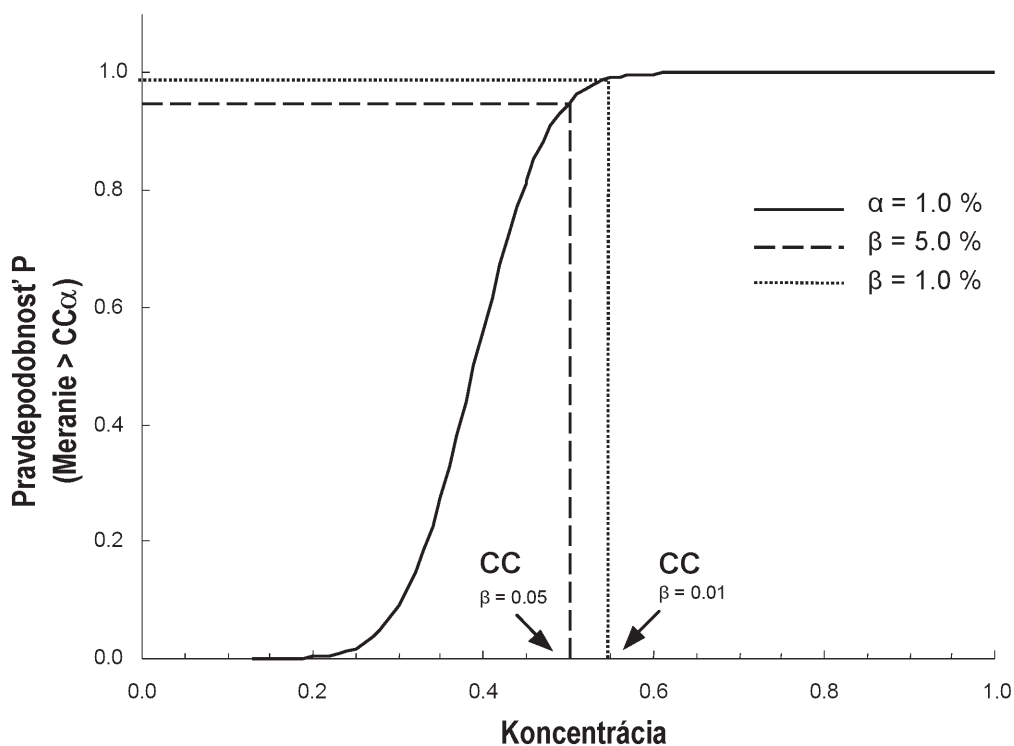
- opakovateľnosť na úroveň koncentrácie (s_{ir}),
- vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť na úroveň koncentrácie (s_{ir}),
- rozhodovací limit (CC α),
- detekčná schopnosť (CC β),
- silová krivka (závislosť b chyby od koncentrácie (pozri bod 3.1.3.2)),
- robustnosť pri veľkých zmenách, robustnosť pri malých zmenách je možné určiť podľa odseku 3.1.1.3,
- 16 kalibračných kriviek vzťahujúcich sa na vzorky,
- jedna celková kalibračná krivka,
- predikčný interval celkovej kalibračnej krivky,
- odchýlky spôsobené maticou (s_{mat}),
- odchýlky spôsobené pokusom (s_{rum}),
- účinok jednotlivých faktorov na výsledky meraní.

Tieto pracovné charakteristiky umožňujú urobiť úplné vyhodnotenie pracovnej úrovne metódy, pretože sa vyšetruje vplyv nielen jednotlivých faktorov, ale aj príslušných kombinácií týchto faktorov. Pomocou tohto návrhu experimentu je možné rozhodnúť, či má byť z celkovej kalibračnej krivky vylúčený jeden alebo druhý z vybraných faktorov, pretože sa významným spôsobom odchyľuje od smerodajných odchýlok ostatných faktorov.

3.1.3.2. Silová krivka

Silová krivka poskytuje informácie o detekčnej schopnosti metódy v rámci vybraného rozsahu koncentrácií. Pri uplatňovaní vyšetrovanej metódy sa vzťahuje na riziko chyby β . Silová krivka umožňuje počítať detekčné schopnosti príslušných kategórií metód (screeningové, konfirmačné) alebo typy metód (kvalitatívne alebo kvantitatívne) pre určitú veľkosť chyby β (napr. 5 %).

Obrázok 1
Silová krivka



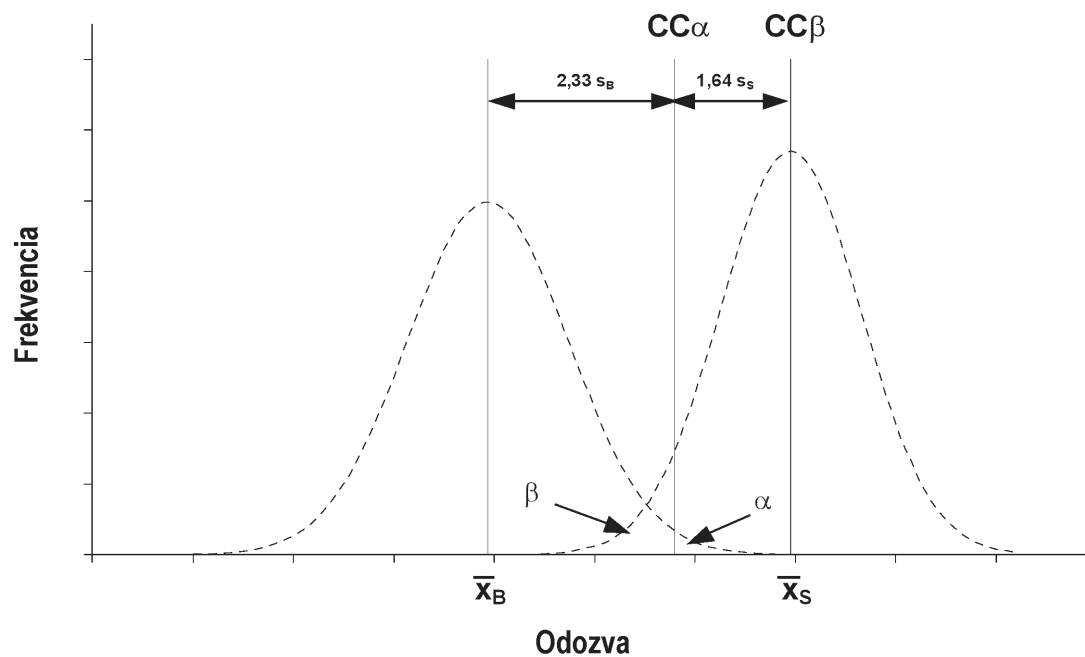
Na obrázku 1 je znázornený príklad grafického určenia detekčnej schopnosti ($CC\beta$) analytickej metódy. Táto konkrétna metóda má zvyškové riziko prijatia falošného rozhodnutia 5 % pri koncentrácii 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Pri koncentrácii 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sa riziko prijatia falošného rozhodnutia zvyšuje na 1 %.

3.1.3.3. Reprodukovateľnosť

Koncepcia určenia reprodukovateľnosti metódy vnútrolaboratórnou validáciou (vlastnou validáciou) si vyžaduje opakovanú účasť na skúškach spôsobilosti v súlade s príručkou ISO 43-1 (3) a 43-2 (4). Laboratória si môžu vybrať svoje vlastné metódy za predpokladu, že tieto metódy sa používajú v bežných podmienkach. Na vyhodnotenie reprodukovateľnosti metódy je možné využiť smerodajnú odchýlku laboratória.

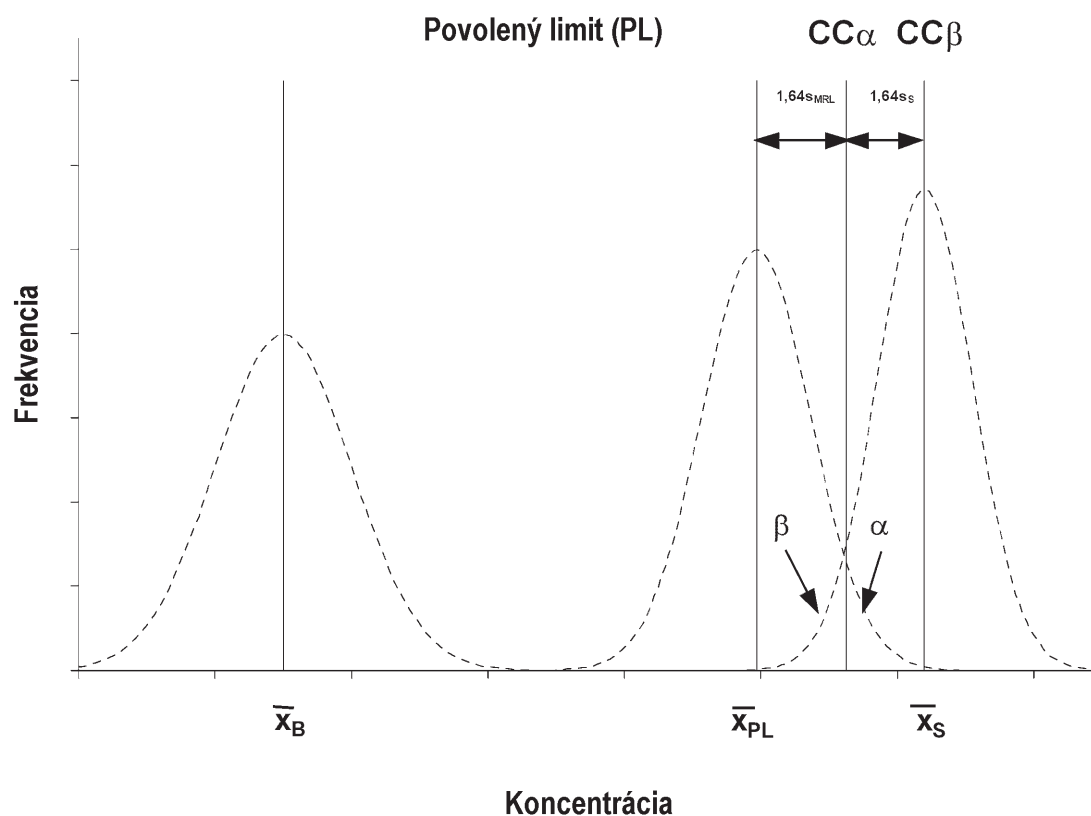
3.2. GRAFICKÉ ZNÁZORNENIE RÔZNYCH ANALYTICKÝCH LIMITOV

Obrázok 2
Látky, na ktoré nebol určený povolený limit.



- \bar{x}_S Priemerná hodnota odozvy kontaminovanej vzorky
- s_B Smerodajná odchýlka slepej vzorky (určená v podmienkach vnútro laboratórnej reprodukovateľnosti)
- s_S Smerodajná odchýlka kontaminovanej vzorky (určená v podmienkach vnútro laboratórnej reprodukovateľnosti)
- α Miera falošných nezhodných výsledkov
- β Miera falošných zhodných výsledkov
- $CC\alpha$ Odozva pri danej chybe α a 50 % chybe β
- $CC\beta$ Odozva pri veľmi malej chybe α a chybe β

Obrázok 3
Látky s určeným povoleným limitom



\bar{x}_B	Priemerná „koncentrácia“ slepej vzorky
\bar{x}_{PL}	Priemerná koncentrácia vzorky obsahujúcej analyzovanú látku na úrovni povoleného limitu
\bar{x}_S	Priemerná koncentrácia kontaminovanej vzorky
s_{PL}	Smerodajná odchýlka vzorky obsahujúcej analyzovanú látku na úrovni povoleného limitu (určená v podmienkach vnútroľaboratórnej reprodukovateľnosti)
s_S	Smerodajná odchýlka kontaminovanej vzorky (určená v podmienkach vnútroľaboratórnej reprodukovateľnosti)
α	Miera falošných nezhodných výsledkov
β	Miera falošných zhodných výsledkov
CC _α	Odozva pri danej chybe α a 50 % chybe β
CC _β	Odozva pri veľmi malej chybe α a chybe β

3.3. PRÍKLAD VÝPOČTU PRE SKÚŠKY ROBUSTNOSTI PRI MALÝCH ZMENÁCH PODĽA YOUNDENOVHO PRÍSTUPU (16)

Porovnanie priemerov (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Porovnajtie priemery označené veľkými písmenami (AA až AG) s ich zodpovedajúcimi priemermi označenými malými písmenami (Aa až Ag). Ak má faktor nejaký vplyv, jeho rozdiel bude výrazne väčší než rozdiely u ostatných faktorov.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	Robustná metóda by nemala byť ovplyvnená zmenami, ktoré takmer určite existujú medzi laboratóriami.
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	Ak neexistuje výrazný rozdiel, najrealistickejšia miera náhodnej chyby je daná siedmimi rozdielmi:
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Rozdiely (D_i)

Druhé mocniny rozdielov (D_i^2)

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

$$\begin{aligned} D_a^2 &= \text{hodnota } a \\ D_b^2 &= \text{hodnota } b \\ D_c^2 &= \text{hodnota } c \\ D_d^2 &= \text{hodnota } d \\ D_e^2 &= \text{hodnota } e \\ D_f^2 &= \text{hodnota } f \\ D_g^2 &= \text{hodnota } g \end{aligned}$$

Smerodajná odchýlka rozdielov D_i (S_{D_i}):

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

Ak je S_{D_i} výrazne väčšia než smerodajná odchýlka metódy vykonanej v podmienkach vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti podľa (pozri vyššie), je samozrejмый záver, že všetky faktory spolu majú vplyv na výsledok, aj keď každý faktor jednotlivy nevykazuje významný vplyv, a že metóda nie je dostatočne robustná voči vybraným zmenám.

3.4. PRÍKLADY VÝPOČTU NA POSTUP VLASTNEJ VALIDÁCIE

Príklady a výpočty protokolu o vlastnej validácii opísanej v podkapitole o validácii podľa alternatívnych modelov (3.1.3) (13) (14).

3.5. PRÍKLADY NA METÓDU ŠTANDARDNÉHO PRÍDAVKU

Skúšobná vzorka s obsahom analyzovanej látky T sa rozdelí na dve skúšobné množstvá 1 a 2, resp. hmotnosti m_1 a m_2 . Skúšobné množstvo 2 je obohatené roztokom analyzovanej látky s objemom V_A a koncentráciou ρ_A . Po krokoch extrakcie a čistenia, ktorú sú súčasťou metódy, sa získajú dva extrakty zo skúšobných množstiev s objemami V_1 , resp. V_2 . Predpokladá sa, že výťažnosť analyzovanej látky je rc . Obidva extrakty sa podrobia skúške metódou merania citlivosti b a poskytnú analytické odozvy x_1 , resp. x_2 .

Ak predpokladáme, že rc a b sú rovnaké pre analyzovanú látku v prirodzenej vzorke a v obohatenej vzorke, potom obsah T je možné vypočítať ako:

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

Táto metóda umožňuje určiť výťažnosť rc . Potom sa okrem vyššie opísanej skúšky obohatí časť extraktu zo skúšobného množstva 2 (objem V_3) známym množstvom analyzovanej látky ρ_B , V_B a podrobí sa skúške. Analytická odozva je x_3 a výťažnosť je:

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

Okrem toho je možné vypočítať citlivosť b ako:

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

Všetky podmienky použitia a podrobnosti boli opísané v (18).

4. POUŽITÉ SKRATKY

AAS	Atómová absorbná spektrometria
AES	Atómová emisná spektrometria
AOAC-I	Združenie úradných analytických chemikov – MEDZINÁRODNÉ
B	viazaná frakcia (imunokúšky)
CI	chemická ionizácia
CRM	Certifikovaný referenčný materiál
CV	variačný koeficient
2 D	dvojrozmerný
DAD	detekcia pomocou diódového poľa
DPASV	diferenciálna impulzná anodická stripová voltmetria
ECD	detekcia záchyтом elektrónov
EI	ionizácia nárazom elektrónov
GC	plynová chromatografia
HPLC	výkonná kvapalinová chromatografia
HPTLC	výkonná chromatografia v tenkej vrstve
HRMS	(hmotnostná spektrometria) s vysokým rozlíšením
ICP-AES	atómová emisná spektrometria s indukčne viazanou plazmou
ICP-MS	hmotnostná spektrometria s indukčne viazanou plazmou
IR	infračervený
ISO	Medzinárodná organizácia pre normalizáciu
LC	kvapalinová chromatografia
LR(MS)	(hmotnostná spektrometria) s nízkym rozlíšením
MRPL	minimálny požadovaný pracovný limit
MS	hmotnostná spektrometria
m/z	pomer hmotnosti k náboju
RF	relatívna migrácia k čelu rozpúšťadla (TLC)
RSDL	relatívne smerodajné odchýlky laboratória
SIM	monitorovanie vybraných iónov
TLC	chromatografia v tenkej vrstve
UV	ultrafialové svetlo
VIS	viditeľné svetlo

5. ODKAZY NA LITERATÚRU

- (1) ISO 17025: 1999 General requirements for the competence of calibration and testing laboratories. [ISO 17025: 1999 Všeobecné požiadavky na spôsobilosť kalibračných a skúšobných laboratórií.]
- (2) ISO 3534-1: 1993 Statistical Methods for quality control – Vol. 1 vocabulary and symbols. [ISO 3534-1: 1993 Štatistické metódy pre kontrolu kvality – Časť 1 slovník a symboly.]
- (3) ISO Guide 43-1: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes. [ISO Príručka 43-1: 1997 Skúšky spôsobilosti formou medzilaboratórneho porovnávanía – Časť 1: Tvorba a fungovanie schém skúšok spôsobilosti.]
- (4) ISO Guide 43-2: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies. [ISO Príručka 43-2: 1997 Skúšky spôsobilosti formou medzilaboratórneho porovnávanía – Časť 2: Výber a používanie schém skúšok spôsobilosti zo strany akreditačných orgánov laboratórií.]
- (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. [ISO 5725: 1994 Správnosť (pravdivosť a presnosť) meracích metód a výsledkov – Časť 1: Všeobecné princípy a definície; ISO 5725-2 Časť 2: Základná metóda stanovenia opakovateľnosti a reprodukovateľnosti štandardnej metódy merania; Časť 4: Základné metódy stanovenia pravdivosti štandardnej meracej metódy.]

- (6) ISO 78-2: 1999 Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis. [ISO 78-2: 1999 Chémia – Usporiadanie štandardov – Časť 2: Metódy chemickej analýzy.]
- (7) W.G de Ruig and J.M Weseman „A new approach to confirmation by infrared spectrometry“ J. Chemometrics 4 (1990) 61-77. [W.G.de Ruig a J.M. Weseman „Nový prístup ku konfirmácii infračervenou spektrometriou“ časopis Chemometria 4 (1990) 61-77.]
- (8) See e.g. May, T.W., Brumbaugh, W.G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Analytical Chemistry 54(7): 1032-1037 (90353). [Pozri napr. May, T.W., Brumbaugh, W.G., 1982, Modifikátor matric a Evovova plošina na vylúčení interferencie matric v analýze rybiech tkanív na prítomnosť olova atómovou absorbnou spektrometriou s grafitovou pecou: Analytická chémia 54(7): 1032-1037 (90353).]
- (9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675. [Aplikácie atómovej absorbnou spektrometrie so Zeemanovou grafitovou pecou v chemickom laboratóriu a v toxikológii, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, s. xxvi + 675.]
- (10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992. [Indukčne viazaná plazma v analytickej atómovej spektrometrii, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.]
- (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, p. 329. [Rozvoj a aplikácie hmotnostnej spektrometrie s plazmovými zdrojmi, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), Kráľovská chemická spoločnosť, 1997, s. 329.]
- (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Applied Chem, 67, 331. [IUPAC (1995), Protokol pre návrh, vykonanie a interpretáciu štúdií realizácie metód, Čistá & aplikovaná chémia, 67, 331.]
- (13) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173. [Jülicher, B., Gowik, P. a Uhlig, S. (1998) Hodnotenie detekčných metód v stopovej analýze pomocou štatisticky založenej koncepcie vlastnej validácie. Analytik, 120, 173.]
- (14) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. J. Chromatogr., 716, 221. [Gowik, P., Jülicher, B. a Uhlig, S. (1998) Viacrezíduová metóda stanovenia nesteroidných protizápalových liekov v plazme pomocou výkonnej kvapalinovej chromatografie s detekciou pomocou diódového poľa. Opis metódy a úplná vlastná validácia. časopis Chromatografia, 716, 221.]
- (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA. [OAC-I Partnersky overované metódy, Stratégie a postupy, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.]
- (16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; „Statistical Manual of the AOAC-Association of Official Analytical Chemists“, AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff. [W.J. Youden; Steiner, E.H.; „Štatistická príručka AOAC-Združenia úradných analytických chemikov“, AOAC-I, Washington DC: 1975, s. 35 ff.]
- (17) ISO 11843: 1997 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case. [ISO 11843: 1997 Detekčná schopnosť – Časť 1: Pojmy a definície, Časť 2: Metodika v prípade lineárnej kalibrácie.]
- (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, page 2 to 9. [R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: „Výťažok alebo výťažnosť: svet rozdielov“. Materiály z Osmej európskej konferencie o potravinárskej chémii, Viedeň, Rakúsko, 18. 20. septembra (1995) Federácia európskych chemických spoločností, Podujatie 206. ISBN 3-900554-17X, strana 2 až 9]
- (19) Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement, Ú. v. ES L 243, 29.10.1971, p. 29. [Smernica 71/354/ES z 18.októbra 1971 o aproximácii zákonov členských štátov týkajúcich sa meracích jednotiek, Ú. v. ES L 243, 29.10.1971, s. 29.]
- (20) ISO 31-0: 1992 Quantities and units – Part 0: General principles [ISO 31-0: 1992 Veličiny a jednotky – Časť 0: Všeobecné princípy]