

To besedilo je zgolj informativne narave in nima pravnega učinka. Institucije Unije za njegovo vsebino ne prevzemajo nobene odgovornosti. Verodostojne različice zadevnih aktov, vključno z uvodnimi izjavami, so objavljene v Uradnem listu Evropske unije. Na voljo so na portalu EUR-Lex. Uradna besedila so neposredno dostopna prek povezav v tem dokumentu

► **B** **IZVEDBENA UREDBA KOMISIJE (EU) 2021/808**
z dne 22. marca 2021

o izvajanju analiznih metod za ostanke farmakološko aktivnih snovi, ki se uporabljajo pri živalih za proizvodnjo živil, o razlagi rezultatov in metodah, ki jih je treba uporabljati za vzorčenje, ter o razveljavitvi odločb 2002/657/ES in 98/179/ES

(Besedilo velja za EGP)

(UL L 180, 21.5.2021, str. 84)

spremenjena z:

	Uradni list		
	št.	stran	datum
► <u>M1</u> Izvedbena uredba Komisije (EU) 2021/810 z dne 20. maja 2021	L 180	112	21.5.2021

popravljen z:

► **C1** Popravek, UL L 186, 27.5.2021, str. 33 (2021/810)

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

z dne 22. marca 2021

o izvajanju analiznih metod za ostanke farmakološko aktivnih snovi, ki se uporabljajo pri živalih za proizvodnjo živil, o razlagi rezultatov in metodah, ki jih je treba uporabljati za vzorčenje, ter o razveljavitvi odločb 2002/657/ES in 98/179/ES

(Besedilo velja za EGP)

*Člen 1***Predmet urejanja in področje uporabe**

Ta uredba določa pravila o analiznih metodah, ki se uporabljajo za vzorčenje in laboratorijske analize v zvezi z ostanke farmakološko aktivnih snovi v živih živalih za proizvodnjo živil, njihovih telesnih delih in tekočinah, iztrebkih, tkivih, proizvodih živalskega izvora, živalskih stranskih proizvodih, krmi in vodi. Določa tudi pravila za razlago analiznih rezultatov teh laboratorijskih analiz.

Ta uredba se uporablja za uradni nadzor, namenjen preverjanju skladnosti z zahtevami glede prisotnosti ostankov farmakološko aktivnih snovi.

*Člen 2***Opredelitev pojmov**

V tej uredbi se uporabljajo opredelitve pojmov iz člena 2 Delegirane uredbe Komisije (EU) 2019/2090 ⁽¹⁾, Uredbe Komisije (EU) 2019/1871 ⁽²⁾, člena 2 Uredbe (ES) št. 470/2009 Evropskega parlamenta in Sveta ⁽³⁾ ter Uredbe Sveta (EGS) št. 315/93 ⁽⁴⁾.

⁽¹⁾ Delegirana uredba Komisije (EU) 2019/2090 z dne 19. junija 2019 o dopolnitvi Uredbe (EU) 2017/625 Evropskega parlamenta in Sveta glede primerov suma ali ugotovljene neskladnosti s pravili Unije, ki veljajo za uporabo ali ostanke farmakološko aktivnih snovi, dovoljenih v zdravilih za uporabo v veterinarskih medicini ali kot krmni dodatki, ali s pravili Unije, ki veljajo za uporabo ali ostanke prepovedanih ali nedovoljenih farmakološko aktivnih snovi (UL L 317, 9.12.2019, str. 28).

⁽²⁾ Uredba Komisije (EU) 2019/1871 z dne 7. novembra 2019 o referenčnih vrednostih za ukrepe za nedovoljene farmakološko aktivne snovi, prisotne v živilih živalskega izvora, in razveljavitvi Odločbe 2005/34/ES (UL L 289, 8.11.2019, str. 41).

⁽³⁾ Uredba (ES) št. 470/2009 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 6. maja 2009 o določitvi postopkov Skupnosti za določitev mejnih vrednosti ostankov farmakološko aktivnih snovi v živilih živalskega izvora in razveljavitvi Uredbe Sveta (EGS) št. 2377/90 in spremembi Direktive 2001/82/ES Evropskega parlamenta in Sveta ter Uredbe (ES) št. 726/2004 Evropskega parlamenta in Sveta (UL L 152, 16.6.2009, str. 11).

⁽⁴⁾ Uredba Sveta (EGS) št. 315/93 z dne 8. februarja 1993 o določitvi postopkov Skupnosti za kontaminate v hrani (UL L 37, 13.2.1993, str. 1).

▼B

Uporabljajo se tudi naslednje opredelitve pojmov:

- (1) „absolutni izkoristek“ pomeni izkoristek v končni fazi analiznega postopka za analit, deljen s količino analita v prvotnem vzorcu in izražen v odstotkih;
- (2) „točnost“ pomeni čim boljše ujemanje med rezultatom preizkušanja in sprejeto pravo referenčno vrednostjo, določeno z oceno pravilnosti in natančnosti ⁽⁵⁾;
- (3) „alfa (α) napaka“ pomeni verjetnost, da je preizkusni vzorec skladen, čeprav je dobljen neustrezen rezultat meritve;
- (4) „analit“ pomeni sestavni del sistema, ki ga je treba analizirati;
- (5) „dovoljena snov“ pomeni farmakološko aktivno snov, ki je dovoljena za uporabo pri živalih za proizvodnjo živil v skladu z Direktivo 2001/82/ES Evropskega parlamenta in Sveta ⁽⁶⁾;
- (6) „beta (β) napaka“ pomeni verjetnost, da je preizkusni vzorec resnično neskladen, čeprav je dobljen ustrezen rezultat meritve;
- (7) „odstopanje od referenčne vrednosti“ pomeni razliko med ocenjeno vrednostjo rezultata preizkusa in sprejeto referenčno vrednostjo;
- (8) „kalibracijski standard“ pomeni sledljivo referenco za meritve, ki predstavlja količino zadevne snovi, tako da njeno vrednost povezuje z referenčno osnovo;
- (9) „certificirani referenčni material“ (CRM) pomeni referenčni material, ki mu je priložena dokumentacija, ki jo je izdal pooblaščen organ in zagotavlja eno ali več določenih vrednosti lastnosti s pripadajočimi negotovostmi in sledljivostmi, pri čemer se uporabljajo veljavni postopki ⁽⁷⁾;
- (10) „kokromatografija“ pomeni tehniko, pri kateri se neznana snov nanese na kromatografski nosilec skupaj z eno ali več znanimi spojinami, ker se pričakuje, da bo relativno obnašanje neznanih in znanih snovi v pomoč pri identifikaciji neznane snovi;
- (11) „sodelovalna študija“ pomeni analiziranje istih vzorcev po isti metodi, da se določijo značilnosti učinkovitosti metode v različnih laboratorijih, pri čemer študija omogoča izračun naključne napake merjenja in laboratorijskega odstopanja od referenčne vrednosti za uporabljeno metodo;
- (12) „potrditvena metoda“ pomeni metodo, ki daje celovite ali dodatne informacije, ki omogočajo, da se snov nedvoumno identificira in po potrebi kvantificira na enega od naslednjih načinov:
 - (a) pri mejni vrednosti ostankov ali mejni vrednosti za dovoljene snovi;

⁽⁵⁾ ISO 3534-1: 2006 statistika – Slovar in simboli – del 1: Splošni statistični izrazi in izrazi v zvezi z verjetnostjo (poglavje 1).

⁽⁶⁾ Direktiva 2001/82/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 6. novembra 2001 o zakoniku Skupnosti o zdravilih za uporabo v veterinarski medicini (UL L 311, 28.11.2001, str. 1.).

⁽⁷⁾ JCGM 200:2008, International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) (Mednarodni slovar meroslovja – Osnovni in splošni koncepti ter z njimi povezani izrazi), 3. izdaja, 2008: <https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm> (Chapter 5: Measurement standards (Etalons) (poglavje 5: Merilni standardi (etaloni))).

▼B

- (b) pri referenčnih vrednostih za ukrepe (RPA) za prepovedane ali nedovoljene snovi, za katere je določena referenčna vrednost za ukrepe;
- (c) pri tako nizki koncentraciji, kot jo je razumno mogoče doseči za prepovedano ali nedovoljeno snov, za katero ni določena referenčna vrednost za ukrepe;
- (13) „faktor pokritja (k)“ pomeni številko, ki izraža želeno raven zaupanja in je povezana z razširjeno merilno negotovostjo;
- (14) „odločitvena meja za potrditev (CC α)“ pomeni mejo, pri kateri in nad katero je mogoče z verjetnostjo napake α sklepati, da je vzorec neskladen, vrednost $1 - \alpha$ pa pomeni statistično gotovost v odstotkih, da je bila dovoljena meja presežena;
- (15) „določitvena sposobnost za presejanje (CC β)“ pomeni najmanjšo vsebnost analita, ki jo je mogoče zaznati ali izmeriti v vzorcu z verjetnostjo napake β :
- (a) v primeru prepovedane ali nedovoljene farmakološko aktivne snovi je CC β najnižja koncentracija, pri kateri je mogoče z metodo zaznati ali izmeriti vzorce, ki vsebujejo ostanke prepovedanih ali nedovoljenih snovi, s statistično gotovostjo $1 - \beta$;
- (b) v primeru dovoljenih snovi je CC β koncentracija, pri kateri je mogoče z metodo zaznati koncentracije, nižje od dovoljenih, s statistično gotovostjo $1 - \beta$;
- (16) „ojačan vzorčni material“ pomeni vzorec, ki je ojačan z znano količino analita, ki ga je treba zaznati ali izmeriti;
- (17) „medlaboratorijska študija“ pomeni organizacijo, izvedbo in ovrednotenje preizkusov istega vzorca v dveh ali več laboratorijih v skladu z vnaprej določenimi pogoji, da se oceni učinkovitost preizkušanja bodisi kot sodelovalna študija bodisi kot preizkus strokovne usposobljenosti;
- (18) „interni standard (IS)“ pomeni snov, ki ni vsebovana v vzorcu in katere fizikalno-kemijske lastnosti so čim bolj podobne lastnostim analita, ki ga je treba identificirati ali izmeriti;
- (19) „koncentracijsko območje“ pomeni koncentracijo snovi ali analita v vzorcu, ki je pomembna za določitev njene skladnosti z zakonodajo glede:
- (a) mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti za dovoljene snovi v skladu z Uredbo Komisije (ES) št. 124/2009 ⁽⁸⁾ in Uredbo Komisije (EU) št. 37/2010 ⁽⁹⁾;

⁽⁸⁾ Uredba Komisije (ES) št. 124/2009 z dne 10. februarja 2009 o določitvi mejnih vrednosti kokcidiostatikov ali sredstev proti histomonijazi v živilih zaradi neizogibnega prenosa teh snovi v krmo za neciljne živali (UL L 40, 11.2.2009, str. 7).

⁽⁹⁾ Uredba Komisije (EU) št. 37/2010 z dne 22. decembra 2009 o farmakološko aktivnih snoveh in njihovi razvrstitvi glede mejnih vrednosti ostankov v živilih živalskega izvora (UL L 15, 20.1.2010, str. 1).

▼B

- (b) referenčnih vrednosti za ukrepe za prepovedane ali nedovoljene snovi, za katere je referenčna vrednost za ukrepe določena v skladu z Uredbo (EU) 2019/1871;
- (c) tako nizke koncentracije, kot jo je analitično mogoče doseči za prepovedano ali nedovoljeno snov, za katero ni določena referenčna vrednost za ukrepe;
- (20) „najnižja koncentracijska točka“ (LCL) pomeni najnižjo koncentracijo, pri kateri je bil umerjen merilni sistem;
- (21) „matriks“ pomeni material, iz katerega je odvzet vzorec;
- (22) „učinek matriksa“ pomeni razliko v analiznem odzivu med standardom, raztopljenim v topilu, in v matriksu pripravljene standarda brez popravka z uporabo internega standarda ali s popravkom z uporabo internega standarda;
- (23) „v matriksu pripravljene standard“ pomeni slepi matriks (tj. brez analita), ki se mu po obdelavi vzorca doda analit v različnih koncentracijah;
- (24) „z matriksom ojačani standard“ pomeni slepi matriks (tj. brez analita), ki se mu pred ekstrakcijo topila in obdelavo vzorca primeša analit v različnih koncentracijah;
- (25) „merjenec“ pomeni določeno veličino, ki se meri;
- (26) „merilna negotovost“ pomeni nenegativen parameter, povezan z rezultatom meritve, ki je značilen za razpršenost vrednosti, ki bi jih bilo mogoče na podlagi uporabljenih informacij razumno pripisati merjencu;
- (27) „izvedbena merila“ pomenijo zahteve za značilnost učinkovitosti, na podlagi katere se lahko oceni, da je analizna metoda primerna za predvideno uporabo in daje zanesljive rezultate;
- (28) „natančnost“ pomeni ujemanje med neodvisnimi rezultati preizkusov, dobljenimi v določenih pogojih, in je izražena kot standardni odklon ali variacijski koeficient rezultatov preizkusa;
- (29) „kvalitativna metoda“ pomeni analizno metodo, s katero se zazna ali identificira snov ali skupina snovi na podlagi njenih kemijskih, bioloških ali fizikalnih lastnosti;
- (30) „kvantitativna metoda“ pomeni analizno metodo, s katero se določi količina ali masni delež snovi, tako da jo je mogoče izraziti kot številčno vrednost ustreznih enot;
- (31) „izkoristek“ pomeni glede na izkoristek popravljeno količino analita, deljeno z ojačano količino analita v vzorcu matriksa, izraženo kot odstotek;
- (32) „popravek z izkoristkom“ pomeni uporabo internih standardov, krivulje umerjanja matriksa in uporabo faktorja popravka z izkoristkom ter tudi kombinacijo teh pristopov;

▼B

- (33) „referenčni material“ pomeni material, ki je dovolj homogen in stabilen glede na eno ali več določenih lastnosti ter za katerega je bilo ugotovljeno, da je primeren za predvideno uporabo v postopku meritve ali pri pregledu nazivnih lastnosti ⁽¹⁰⁾;
- (34) „relativni učinek matriksa“ pomeni razliko v analiznem odzivu med standardom, raztopljenim v topilu, in v matriksu pripravljenim standardom, s popravkom z uporabo internega standarda;
- (35) „ponovljivost“ pomeni natančnost v pogojih, pri katerih isti izvajalec z enako metodo na enakih preizkusnih primerkih v istem laboratoriju in v kratkih časovnih presledkih dobi rezultate neodvisnih preizkusov z isto opremo;
- (36) „obnovljivost“ pomeni natančnost v pogojih, pri katerih se preizkusni rezultati dobijo z isto metodo na enakih preizkusnih primerkih v različnih laboratorijih z različnimi izvajalci, ki uporabljajo različno opremo ⁽¹¹⁾;
- (37) „robustnost“ pomeni dovezetnost analizne metode za spremembe preizkusnih pogojev, v katerih se lahko metoda uporabi, kot je predstavljena, ali z določenimi manjšimi spremembami;
- (38) „presejalna metoda“ pomeni metodo, ki se uporablja za odkrivanje snovi ali razreda snovi v koncentracijskem območju;
- (39) „ciljna koncentracija pri presejanju (STC)“ pomeni koncentracijo, ki ni višja od CC β , pri kateri se s presejalno meritvijo vzorec šteje za potencialno neskladen („pozitivno presejanje“) in sproži potrditveno preizkušanje;
- (40) „selektivnost“ pomeni zmožnost, da se z metodo razlikuje med izmerjenim analitom in drugimi snovmi;
- (41) „študija posamičnega laboratorija“ ali „znotrajlaboratorijska validacija“ pomeni analizo študijo enega samega laboratorija, ki uporablja eno metodo za analiziranje istih ali različnih preizkusnih materialov pod različnimi pogoji v utemeljenih dolgotrajnih presledkih;
- (42) „standardna adicija“ pomeni postopek, pri katerem se del vzorca analizira kot tak, drugim preizkusnim količinam pa se pred analizo dodajo znane količine standardnega analita;
- (43) „standardni analit“ pomeni analit znane ali certificirane vsebnosti in čistoče, ki ga je treba uporabiti kot referenco pri analizi;
- (44) „snov“ pomeni tvarino s stalno sestavo, za katero so značilne enote, ki jo sestavljajo, in določene fizikalne lastnosti;
- (45) „preizkusna količina“ pomeni količino materiala, vzetega iz vzorca, na katerem se izvaja preizkus ali opazovanje;

⁽¹⁰⁾ Codex Alimentarius Commission (Komisija za standard Codex Alimentarius), Organizacija Združenih narodov za prehrano in kmetijstvo/Svetovna zdravstvena organizacija, Smernice o uporabi analitične terminologije (CAC/GL 72-2009).

⁽¹¹⁾ ISO 5725-1:1994 Točnost (pravilnost in natančnost) merilnih metod in rezultatov – del 1: Splošna načela in definicije (poglavje 3).

▼B

- (46) „pravilnost“ pomeni čim boljše ujemanje med povprečno vrednostjo, dobljeno na podlagi velikega niza rezultatov preizkusov, in sprejeto referenčno vrednostjo;
- (47) „enote“ pomenijo enote, opisane v standardu ISO 80000 ⁽¹²⁾ in Direktivi Sveta 80/181/EGS ⁽¹³⁾;
- (48) „validacija“ pomeni potrditev s preiskavo in zagotovitvijo zadostnih dokazov, da so izpolnjene posebne zahteve za konkretno predvideno uporabo ⁽¹⁴⁾, na podlagi študije posamičnega laboratorija ali sodelovalne študije;
- (49) „obnovljivost znotraj laboratorija“ ali „srednja natančnost/obnovljivost v laboratoriju“ pomeni natančnost meritve, dobljeno v istem laboratoriju v določenih internih laboratorijskih pogojih.

*Člen 3***Analizne metode**

Države članice zagotovijo, da se vzorci, odvzeti v skladu s členom 34 Uredbe (EU) 2017/625, analizirajo z metodami, ki izpolnjujejo naslednje zahteve:

- (1) dokumentirane so v navodilih za preizkušanje, po možnosti v skladu s prilogami k standardu ISO 78-2:1999 Kemija – Načrti za standarde – del 2: Metode kemične analize ⁽¹⁵⁾;
- (2) izpolnjujejo izvedbena merila in druge zahteve za analizne metode iz poglavja 1 Priloge I k tej uredbi;
- (3) validirane so bile v skladu z zahtevami iz poglavij 2 in 4 Priloge I k tej uredbi;
- (4) omogočajo uveljavitev referenčnih vrednosti za ukrepe iz Uredbe (EU) 2019/1871, ugotovitev prisotnosti prepovedanih in nedovoljenih snovi ter uveljavitev mejnih vrednosti, določenih na podlagi Uredbe (EGS) št. 315/93 in Uredbe (ES) št. 124/2009, ter mejnih vrednosti ostankov, določenih na podlagi uredb (ES) št. 1831/2003 in (ES) št. 470/2009.

*Člen 4***Nadzor kakovosti**

Države članice zagotovijo kakovost rezultatov analiz, opravljenih v skladu z Uredbo (EU) 2017/625, zlasti s spremljanjem preizkusov ali rezultatov umerjanja v skladu s standardom ISO/IEC 17025:2017 Splošne zahteve za usposobljenost preizkuševalnih in kalibracijskih laboratorijev ter z zahtevami za nadzor kakovosti med rutinsko analizo, kot je določeno v poglavju 3 Priloge I k tej uredbi.

⁽¹²⁾ ISO 80000-1:2009 Veličine in enote – del 1: Splošno (Uvod).

⁽¹³⁾ Direktiva Sveta z dne 20. decembra 1979 o približevanju zakonodaje držav članic, ki se nanašajo na merske enote, in o razveljavitvi direktive 71/354/EGS (80/181/EGS) (UL L 39, 15.2.1980, str. 40).

⁽¹⁴⁾ ISO/IEC 17025:2017 Splošne zahteve za usposobljenost preizkuševalnih in kalibracijskih laboratorijev (poglavje 3).

⁽¹⁵⁾ ISO 78-2: 1999 Kemija – Načrti za standarde – del 2: Metode kemične analize (priloge).

▼B*Člen 5***Razlaga rezultatov**

- (1) Rezultat analize se šteje za neskladen, kadar ni nižji od odločitvene meje za potrditev ($CC\alpha$).
- (2) Pri dovoljenih snoveh, za katere je bila določena mejna vrednost ostankov (MRL) ali mejna vrednost (ML), je odločitvena meja za potrditev ($CC\alpha$) tista koncentracija, pri kateri in nad katero se lahko s statistično gotovostjo številske vrednosti $1 - \alpha$ določi, da je bila dovoljena meja presežena.
- (3) Pri nedovoljenih ali prepovedanih snoveh ali dovoljenih snoveh, za katere pri posamezni vrsti ali proizvodu mejna vrednost ostankov ali mejna vrednost ni bila določena, je odločitvena meja za potrditev ($CC\alpha$) najnižja raven koncentracije, pri kateri se lahko s statistično gotovostjo številske vrednosti $1 - \alpha$ določi, da je prisoten določen analit.
- (4) Pri nedovoljenih ali prepovedanih farmakološko aktivnih snoveh je alfa (α) napaka 1 % ali manj. Za vse druge snovi je alfa (α) napaka 5 % ali manj.

*Člen 6***Metode vzorčenja**

Države članice zagotovijo, da se vzorci odvzamejo, obravnavajo in označijo v skladu s podrobnimi metodami vzorčenja iz Priloge II k tej uredbi.

▼M1*Člen 7***Razveljavitve in prehodni ukrepi**

Odločbi 2002/657/ES in 98/179/ES se razveljavita z dnem začetka veljavnosti te uredbe.

Vendar se do 10. junija 2026 zahteve iz točk 2 in 3 Priloge I k Odločbi 2002/657/ES še naprej uporabljajo za metode, ki so bile validirane pred datumom začetka veljavnosti te uredbe.

Za namene iz drugega odstavka člena 8 Uredbe (EU) 2019/1871 se Priloga II k Odločbi 2002/657/ES še naprej uporablja do 27. novembra 2022.

▼B*Člen 8***Začetek veljavnosti**

Ta uredba začne veljati dvajseti dan po objavi v *Uradnem listu Evropske unije*.

Ta uredba je v celoti zavezujoča in se neposredno uporablja v vseh državah članicah.



PRILOGA I

POGLAVJE 1

IZVEDBENA MERILA IN DRUGE ZAHTEVE ZA ANALIZNE METODE

1.1 Zahteve za presejalne metode

1.1.1 Kategorije ustreznih presejalnih metod

Kot ustrezne presejalne metode se uporabljajo kvalitativne, semikvantitativne ali kvantitativne metode.

1.1.2 Zahteve za biološke, biokemijske ali fizikalno-kemijske presejalne metode

Pri prepovedanih ali nedovoljenih snoveh je $CC\beta$ tako nizka, kot jo je razumno mogoče doseči, vsekakor pa nižja od referenčne vrednosti za ukrepe (RPA) za snovi, za katere so v skladu z Uredbo (EU) 2019/1871 določene referenčne vrednosti za ukrepe.

Pri dovoljenih farmakološko aktivnih snoveh je $CC\beta$ nižja od mejne vrednosti ostankov (MRL) ali mejne vrednosti (ML).

Za namene presejanja se uporabljajo samo tiste analizne metode, za katere je mogoče na dokumentirano sledljiv način dokazati, da so validirane in da delež lažno skladnih rezultatov ni večji od 5 % (beta (β) napaka). V primeru rezultata, za katerega se sumi, da je neskladen, se ta rezultat potrdi s potrditveno metodo.

Kvantitativne presejalne metode, ki se uporabljajo za presejanje in potrjevanje, izpolnjujejo enake zahteve glede točnosti, razpona in natančnosti, kot je opisano v točkah 1.2.2.1 in 1.2.2.2.

1.2 Zahteve za potrditvene metode

1.2.1 Splošne zahteve za potrditvene metode

Pri prepovedanih ali nedovoljenih snoveh je $CC\alpha$ tako nizka, kot jo je razumno mogoče doseči. Pri prepovedanih ali nedovoljenih snoveh, za katere je v skladu z Uredbo (EU) 2019/1871 določena referenčna vrednost za ukrepe, $CC\alpha$ ni višja od referenčne vrednosti za ukrepe.

Pri dovoljenih snoveh je $CC\alpha$ višja od mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti, vendar jima mora biti čim bližja.

Za namene potrditve se uporabljajo samo analizne metode, za katere je mogoče na dokumentirano sledljiv način dokazati, da so validirane in da znaša delež lažno neskladnih snovi (alfa (α) napaka) največ 1 % za prepovedane ali nedovoljene snovi ali največ 5 % za dovoljene snovi.

Potrditvene metode zagotavljajo informacije o strukturi kemijski sestavi analita. Zato potrditvene metode, ki temeljijo samo na kromatografski analizi brez uporabe masne spektrometrične detekcije, same po sebi niso primerne za uporabo kot potrditvene metode za prepovedane ali nedovoljene farmakološko aktivne snovi. Če masna spektrometrija ni primerna za dovoljene snovi, se lahko uporabijo druge metode, kot sta HPLC-DAD in HPLC-FLD, ali njihova kombinacija.

▼B

Kadar je to potrebno glede na potrditveno metodo, se na začetku postopka ekstrakcije preizkusni količini doda primeren interni standard. Glede na razpoložljivost se uporabijo analiti stabilne izotopsko označene oblike, ki so zlasti primerni za masno spektrometrično detekcijo, ali podobne spojine, ki so strukturno tesno povezane z analitom. Kadar ni mogoče uporabiti primerne internega standarda, se identifikacija analita po možnosti potrdi s kokromatografijo⁽¹⁾. V tem primeru se zazna le en kromatografski vrh, pri čemer povečana višina vrha (ali ploščina pod vrhom) ustreza količini dodanega analita. Če to ni izvedljivo, se uporabijo v matriksu pripravljene standardi ali z matriksom ojačani standardi.

1.2.2 *Splošna izvedbena merila za potrditvene metode*

1.2.2.1 Pravilnost glede na izkoristek

Pri ponovljenih analizah certificiranega referenčnega materiala je odklon eksperimentalno določenega glede na izkoristek popravljene povprečnega masnega deleža od certificirane vrednosti v skladu z razponi najmanjše pravilnosti, navedenimi v preglednici 1.

*Preglednica 1***Najmanjša pravilnost kvantitativnih metod**

Masni delež	Razpon
≤ 1 µg/kg	od -50 % do +20 %
od > 1 µg/kg do 10 µg/kg	od -30 % do +20 %
≥ 10 µg/kg	od -20 % do +20 %

Če certificirani referenčni materiali niso na voljo, je sprejemljivo, da se pravilnost meritev oceni na druge načine, na primer z uporabo materialov z dodeljenimi vrednostmi iz medlaboratorijskih študij ali z dodajanjem znanih količin analita(-ov) v slepi matriks.

1.2.2.2 Natančnost

Variacijski koeficient (CV) za ponovljene analize referenčnega ali ojačnega materiala v pogojih obnovljivosti znotraj laboratorija ne presega ravni, izračunane po Horwitzovi enačbi. Enačba je:

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

pri čemer je C masni delež, izražen kot potenca (eksponent) 10 (npr. 1 mg/g = 10⁻³). Pri masnih deležih pod 120 µg/kg z uporabo Horwitzove enačbe dobimo nesprejemljivo visoke vrednosti. Zato največji dovoljeni variacijski koeficient ni večji od vrednosti iz preglednice 2.

⁽¹⁾ Kokromatografija je postopek, pri katerem se izvleček vzorca pred kromatografskim(-i) korakom(-i) razdeli na dva dela. Prvi del se kromatografira kot tak. Drugi del se zmeša s standardnim analitom, ki ga je treba izmeriti. Nato se tudi ta mešanica kromatografira. Količina dodanega standardnega analita mora biti podobna ocenjeni količini analita v izvlečku. Kokromatografija se uporablja za izboljšanje identifikacije analita, kadar se uporabljajo kromatografske metode, zlasti kadar ni mogoče uporabiti nobenega primerne internega standarda.

▼B

Preglednica 2
Sprejemljivi variacijski koeficient

Masni delež	Obnovljivost CV (%)
> 1 000 µg/kg	16 (na podlagi Horwitzove enačbe)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (na podlagi Horwitzove enačbe)
10–120 µg/kg	25 (*)
< 10 µg/kg	30 (*)

(*) * Variacijski koeficient (CV, v odstotkih) je smernica in bi moral biti tako nizek, kot je to razumno mogoče.

Za analize, izvedene v pogojih ponovljivosti, variacijski koeficient pri pogojih ponovljivosti ni višji od dveh tretjin vrednosti, navedenih v preglednici 2.

1.2.3 *Zahteve za kromatografsko ločevanje*

Pri tekočinski (LC) ali plinski kromatografiji (GC) je najmanjši sprejemljivi retencijski čas za analizirane analite dvakratnik retencijskega časa, ki ustreza prostemu volumnu kolone. Retencijski čas analita v izvlečku ustreza retencijskemu času kalibracijskega standarda, v matriksu pripravljene ali z matriksom ojačanega standarda, z dovoljenim odstopanjem ±0,1 minute. Za hitro kromatografijo, pri kateri je retencijski čas krajši od dveh minut, je sprejemljiv odklon za manj kot 5 % retencijskega časa. Če se uporablja interni standard, razmerje med kromatografskim retencijskim časom analita in retencijskim časom internega standarda, tj. relativni retencijski čas analita, ustreza retencijskemu času kalibracijskega standarda, v matriksu pripravljene ali z matriksom ojačanega standarda z največjim odklonom 0,5 % pri plinski kromatografiji in 1 % pri tekočinski kromatografiji za metode, validirane od datuma začetka veljavnosti te uredbe.

1.2.4 *Posebna izvedbena merila za masno spektrometrijo*

1.2.4.1 Masna spektrometrična detekcija

Masna spektrometrična detekcija se izvede z uporabo nekaterih od naslednjih možnosti:

1. snemanje celotnih masnih spektrov (full scan);
2. spremljanje izbranega iona (SIM);
3. tehnike sekvenčne masne spektrometrije (MSⁿ), kot je spremljanje izbrane reakcije (SRM);
4. kombinacija tehnik masne spektrometrije (MS) ali sekvenčne masne spektrometrije (MSⁿ) z ustreznimi načini ionizacije.

Primerni sta masna spektrometrija nizke ločljivosti (LRMS, pri ločljivosti masne enote) in masna spektrometrija visoke ločljivosti (HRMS), vključno z dvojnimi fokusnim področjem, časom preleta (TOF) in instrumenti s krožno pastjo (Orbitrap).

▼B

Za potrditev identitete analita pri masni spektrometriji visoke ločljivosti (HRMS) je masni odklon vseh diagnostičnih ionov manjši od 5 ppm (ali v primeru $m/z < 200$ manjši od 1 mDa). Na podlagi tega bi bilo treba izbrati učinkovito ločljivost, ki ustreza svojemu namenu, pri čemer je ločljivost običajno večja od 10 000 za celotni masni razpon pri 10-odstotni višini doline ali 20 000 pri polni širini pri polovični maksimalni vrednosti (FWHM).

Kadar se masno spektrometrijsko določanje opravi z zapisovanjem celotnih masnih spektrov (LRMS in HRMS), so primerni samo diagnostični ioni z več kot 10-odstotno relativno intenziteto v referenčnem spektru kalibracijskega standarda, v matriksu pripravljenega ali z matriksom ojačanega standarda. Diagnostični ioni vključujejo molekulski ion (če je prisoten pri ≥ 10 -odstotni intenziteti osnovnega vrha) in karakteristični fragmentni ion ali produktni ion.

Izbor prekursorskega iona: ko se masno spektrometrično določanje izvaja s fragmentacijo po izboru prekursorskega iona, se izbor prekursorskega iona izvede pri ločljivosti masne enote ali boljši. Izbrani prekursorski ion pomeni molekulski ion, značilne adukte molekulskega iona, značilne produktne ione ali enega od njihovih izotopnih ionov. Če ima izbrani prekursor okence za masno izbiro z več kot enim daltonom (npr. v primeru sistema podatkovnega neodvisnega zajemanja (DIA, Data Independent Acquisition)), se tehnika šteje za potrditveno analizo snemanja celotnih masnih spektrov.

Fragmentni in produktni ioni: izbrani fragmentni ali produktni ioni so diagnostični fragmenti za merjeni analit/produkt. Neselektivni prehodi (npr. cikloheptatrienil kation ali izguba vode) se izpustijo vedno, kadar je to mogoče. Številčnost diagnostičnih ionov se določi na podlagi površine vrha ali višine integriranih ekstrahiranih ionskih kromatogramov. To velja tudi, kadar se za identifikacijo uporabijo meritve s snemanjem celotnih masnih spektrov. Razmerje med signalom in šumom (S/N) vseh diagnostičnih ionov mora biti najmanj tri proti ena (3:1).

Relativne intenzitete: relativne intenzitete diagnostičnih ionov (razmerje ionov) so izražene kot odstotek intenzitete iona z največjo zastopanostjo ali prehoda. Ionsko razmerje je treba določiti s primerjavo spektrov ali z integriranjem signalov ekstrahiranih ionskih masnih sledi. Ionsko razmerje analita, ki ga je treba potrditi, ustreza razmerjem med v matriksu pripravljenih standardov ali z matriksom ojačanih standardov ali standardnimi raztopinami pri primerljivih koncentracijah, izmerjenih pod enakimi pogoji, v območju $\pm 40\%$ relativnega odklona.

Za vse masne spektrometrične analize se določi vsaj eno ionsko razmerje. To so po možnosti ioni, dobljeni z enim samim snemanjem, vendar lahko ioni izvirajo tudi iz različnih snemanj v isti injekciji (tj. snemanje celotnega spektra in fragmentacijsko snemanje).

1.2.4.2 Identifikacija

Za izbiro ustreznih načinov pridobivanja in meril za ocenjevanje se uporablja sistem identifikacijskih točk. Za potrditev identitete snovi v matriksu, za katere je določena mejna vrednost ostankov (MRL) (dovoljena uporaba), so potrebne najmanj štiri identifikacijske točke. Pri nedovoljenih ali prepovedanih snoveh je potrebnih pet identifikacijskih točk. Ena točka lahko izvira iz kromatografskega ločevanja. V preglednici 3 je prikazano število identifikacijskih točk, ki jih dobimo z vsako od tehnik. Da se izpolnijo pogoji za identifikacijske točke, potrebne za potrditev, se lahko dodajo identifikacijske točke, pridobljene z različnimi tehnikami.

▼ B

1. Vse masne spektrometrične analize se kombinirajo s tehniko ločevanja, ki izkazuje zadostno moč ločevanja in selektivnost za specifično uporabo. Ustrezne tehnike ločevanja so med drugim tekočinska in plinska kromatografija, kapilarna elektroforeza (CE) in superkritična tekočinska kromatografija (SFC). V primeru analita, ki predstavlja katero koli izobarno ali izomerno spojino, je za potrditev njegove identitete obvezna sprejemljivost retencijskega časa (tj. $\pm 0,5\%$ pri plinski kromatografiji (GC) ter $\pm 1\%$ pri tekočinski kromatografiji (LC) in superkritični tekočinski kromatografiji (SFC)).
2. Da se doseže najmanjše število identifikacijskih točk, se lahko kombinirajo največ tri ločene tehnike.
3. Različni ionizacijski načini (npr. elektronska ionizacija in kemična ionizacija) se štejejo za različne tehnike.

Preglednica 3

Identifikacijske točke za posamezno tehniko

Tehnika	Identifikacijske točke
Ločevanje (način GC, LC, SFC, CE)	1
Ion LR-MS	1
Izbor prekursorskih ionov pri masnem razponu $< \pm 0,5$ Da	1 (posredno)
Produktni ion LR-MS ⁿ	1,5
Ion HR-MS	1,5
Produktni ion HR-MS ⁿ	2,5

Preglednica 4

Primeri števila identifikacijskih točk, dobljenih za serijo tehnik in njihovih kombinacij (n = celo število)

Tehnika(-e)	Ločevanje	Število ionov	Identifikacijske točke
GC-MS (EI ali CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI in CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
2 derivata GC-MS (EI ali CI)	GC	2 (derivat A) + 2 (derivat B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- ali LC-MS/MS	GC ali LC	1 prekursorski + 2 produktna	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- ali LC-MS/MS	GC ali LC	2 prekursorska + 2 produktna	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- ali LC-MS ³	GC ali LC	1 prekursorski + 1 produktni MS ² + 1 produktni MS ³	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- ali LC-HRMS	GC ali LC	n	1 + n × 1,5
GC- ali LC-HRMS/MS	GC ali LC	1 prekursorski (masni razpon $< \pm 0,5$ Da) + 1 produktni	1 + 1 + 2,5 = 4,5

▼ B

Tehnika(-e)	Ločevanje	Število ionov	Identifikacijske točke
GC- ali LC-HRMS in HRMS/MS	GC ali LC	1 ion pri snemanju celotnega spektra + 1 produktni ion HRMS ^(a)	1 + 1,5 + 2,5 = 5
GC- in LC-MS	GC in LC	2 iona (GCMS) + 1 ion (LCMS)	1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6

^(a) ^a Za izbor prekuzorskega iona se ne dobi nobena dodatna identifikacijska točka, če je ta prekuzorski ion isti ion (ali adukt ali izotop) kot ion HRMS, ki se spremlja s snemanjem celotnega spektra.

1.2.5 *Posebna izvedbena merila za določitev analita s tekočinsko kromatografijo z detekcijskimi tehnikami, ki niso masna spektrometrija*

Samo pri dovoljenih snoveh se lahko kot alternativa metodam, ki temeljijo na masni spektrometriji, uporabijo naslednje tehnike, če so izpolnjena ustrezna merila za te tehnike:

1. spektrofotometrija z detekcijo z diodnim nizom pri celotnem snemanju (full-scan diode array spectrometry, DAD), če se uporablja s HPLC;
2. spektrofotometrija s fluorescenčno detekcijo (FLD), če se uporablja s HPLC.

Tekočinska kromatografija z (enovalovno) detekcijo UV/VIS sama po sebi ni primerna za uporabo kot potrditvena metoda.

1.2.5.1 Izvedbena merila za spektrofotometrijo z diodnim nizom pri celotnem snemanju

Izpolnjena so izvedbena merila za kromatografsko ločevanje iz poglavja 1.2.3.

Največje absorpcijske vrednosti v UV-spektru analita so pri enaki valovni dolžini, kot jih ima kalibracijski standard v matriksu, v mejah, določenih z ločljivostjo detekcijskega sistema. Pri detekciji z diodnim nizom je ta meja običajno v območju ± 2 nm. Spekter analita nad 220 nm se za tiste dele obeh spektrov z najmanj 10-odstotno relativno absorbanco vidno ne razlikuje od spektra kalibracijskega standarda. To merilo je izpolnjeno, ko so, prvič, prisotne iste najvišje vrednosti in, drugič, ko razlika med spektroma v nobeni točki ni večja od 10 % absorbance kalibracijskega standarda. Če se uporabljajo računalniško podprta knjižnica, iskanje in ujemanje, mora primerjava spektralnih podatkov uradnih vzorcev in kalibracijske raztopine presegati kritični faktor ujemanja. Ta faktor se določi med postopkom validacije za vsak analit na podlagi spektrov, za katere so izpolnjena zgoraj opisana merila. Preveri se variabilnost v spektrih, ki jo povzročita vzorčni matriks in učinkovitost detekcije.

1.2.5.2 Izvedbena merila za spektrofotometrijo s fluorescenčno detekcijo

Izpolnjena so izvedbena merila za kromatografsko ločevanje iz poglavja 1.2.3.

Vzbujalna in emisijska valovna dolžina v kombinaciji s kromatografskimi pogoji se izbereta tako, da se čim bolj zmanjša vpliv motečih komponent v ekstraktih slepega vzorca. Med vzbujalno in emisijsko valovno dolžino mora biti najmanj 50 nm.

▼ B

Najbližja najvišja točka vrha v kromatogramu se loči od označenega vrha analita za najmanj eno celo širino vrha pri 10 % največje višine vrha analita.

To velja za molekule, ki so same po sebi fluorescenčne, in molekule, ki kažejo fluorescenco po preoblikovanju ali derivaciji.

POGLAVJE 2

VALIDACIJA

2.1 Značilnosti učinkovitosti, ki se določijo za analizne metode

Z validacijo metode se dokaže, da je analizna metoda skladna z merili, ki veljajo za ustrezne značilnosti učinkovitosti. Za različne namene nadzora so potrebne različne kategorije metod. V preglednici 5 je določeno, katero značilnost učinkovitosti je treba preveriti za katero vrsto metode, dodatno pa je vsak parameter razložen v tem poglavju.

Preglednica 5

Razvrstitev analiznih metod po značilnostih učinkovitosti, ki jih je treba določiti

Metoda	Potrjevanje		Presejanje		
	Kvalitativno	Kvantitativno	Kvalitativno	Semikvantitativno	Kvantitativno
Snovi	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identifikacija v skladu s točko 1.2	x	x			
CC α	x	x			
CC β	–		x	x	x
Pravilnost		x			x
Natančnost		x		(x)	x
Relativni učinek matriksa/absolutni izkoristek (*)		x			x
Selektivnost/specifičnost		x	x	x	x
Stabilnost (#)		x	x	x	x
Robustnost		x	x	x	x

x: Z validacijo je treba dokazati, da so izpolnjene zahteve glede značilnosti učinkovitosti.

(x) Zahtev glede natančnosti iz poglavja 1.2.2.2 ni treba izpolnjevati pri semikvantitativnih presejalnih metodah. Določi pa se natančnost, da se dokaže primernost metode za izogibanje lažno skladnim rezultatom analiz.

A: prepovedane ali nedovoljene snovi

B: dovoljene snovi

(#) Če so podatki o stabilnosti analitov v matriksu na voljo iz znanstvene literature ali drugega laboratorija, zadevnemu laboratoriju teh podatkov ni treba še enkrat določiti. Vendar je sklicevanje na razpoložljive podatke o stabilnosti analitov v raztopini sprejemljivo le, če se uporabljajo enaki pogoji.

(*) Ustrezno za metode masne spektrometrije (MS), da se z validacijo dokaže, da so izpolnjene zahteve glede značilnosti učinkovitosti. Relativni učinek matriksa metode se določi, kadar ta učinek med postopkom validacije ni bil ocenjen. Absolutni izkoristek metode se določi, če se ne uporablja interni standard ali umerjanje, ojačano z matriksom.

▼ B**2.2 Pravilnost, ponovljivost in obnovljivost znotraj laboratorija**

V tem poglavju so navedeni primeri in reference za validacijske postopke. Uporabijo se lahko tudi drugi pristopi za dokazovanje skladnosti metode z izvedbenimi merili, če dosegajo enako raven in kakovost informacij.

2.2.1 Konvencionalna validacija

Za izračun parametrov v skladu s konvencionalnimi metodami je treba izvesti več posameznih eksperimentov. Vsako značilnost učinkovitosti je treba določiti za vsako večjo spremembo (glej oddelek 2.4). Pri metodah z več analiti se lahko hkrati analizira več analitov, če se izključijo morebitne pomembne motnje. Podobno se lahko določi več značilnosti učinkovitosti. Da bi se čim bolj zmanjšala delovna obremenitev, je priporočljivo, da se poskusi čim bolj kombinirajo (npr. ponovljivost in obnovljivost znotraj laboratorija s specifičnostjo, analiza slepih vzorcev za določitev odločitvene meje za potrditev in preskušanje specifičnosti).

2.2.1.1 Pravilnost na podlagi certificiranega referenčnega materiala

Zaželeno je, da se pravilnost analizne metode določi s certificiranim referenčnim materialom (CRM). Postopek za to je opisan v standardu ISO 5725-4:1994 ⁽²⁾.

V nadaljevanju je primer:

1. analizirajte šest paralelk CRM v skladu z navodili za preskušanje za metodo;
2. določite koncentracijo analita, prisotnega v posamezni paralelki vzorca;
3. izračunajte povprečje, standardni odklon in variacijski koeficient (%) za *teh šest paralelk*;
4. izračunajte pravilnost, tako da zaznano povprečno koncentracijo delite s certificirano vrednostjo (izmerjeno kot koncentracija) in rezultat pomnožite s 100, da se izrazi kot odstotek.

Pravilnost (%) = (povprečna zaznana koncentracija, korigirana z izkoristkom) × 100 / certificirana vrednost

2.2.1.2 Pravilnost na podlagi ojačanih vzorcev

Če certificirani referenčni material ni na voljo, se pravilnost metode določi s preizkusi, pri katerih se uporabi ojačan slepi matriks, in sicer najmanj v skladu z naslednjo shemo:

1. Za metode, validirane od datuma začetka veljavnosti te uredbe, izberite slepi material in ga ojačajte s koncentracijo:

⁽²⁾ ISO 5725-4:2020 Točnost (pravilnost in natančnost) merilnih metod in rezultatov – del 4: Temeljne metode določanja pravilnosti standardne merilne metode (klavzula 3).

▼B

- (a) 0,5⁽³⁾, 1,0 in 1,5-kratnika referenčne vrednosti za ukrepe; ali
 - (b) 0,1⁽⁴⁾, 1,0 in 1,5-kratnik mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti za dovoljene snovi; ali
 - (c) 1,0-, 2,0- in 3,0-kratnik najnižje koncentracijske točke (LCL) za nedovoljene snovi (za katere referenčna vrednost za ukrepe ni bila določena).
2. Na vsakem nivoju se analiza izvede z najmanj šestimi paralelkami.
 3. Analizirajte vzorce.
 4. Izračunajte koncentracijo, zaznано v posameznem vzorcu.
 5. Izračunajte pravilnost za vsak vzorec z uporabo spodnje enačbe in nato za šest rezultatov izračunajte povprečno pravilnost in variacijski koeficient za posamezno raven koncentracije.

Pravilnost (%) = (povprečna ugotovljena koncentracija s popravkom izkoristka) × 100 / stopnja ojačitve

Pri metodah za dovoljene snovi, validirane pred datumom začetka uporabe te uredbe, zadostuje določitev pravilnosti metode s šestimi ojačanimi alikvoti pri 0,5-, 1,0- in 1,5-kratniku mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti.

2.2.1.3 Ponovljivost

1. Pri metodah, validiranih od datuma začetka veljavnosti te uredbe, se pripravi niz vzorcev identičnih slepih matriksov iste vrste. Ojačajo se z analitom, da se dosežejo koncentracije, enakovredne:
 - (a) 0,5-⁽⁵⁾, 1,0- in 1,5-kratniku referenčne vrednosti za ukrepe ali
 - (b) 0,1-⁽⁶⁾, 1,0- in 1,5-kratniku mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti pri dovoljenih snoveh ali
 - (c) 1,0-, 2,0- in 3,0-kratniku najnižje koncentracijske točke za nedovoljene ali prepovedane snovi, če se referenčna vrednost za ukrepe ne uporablja.
2. Na vsakem nivoju se analiza izvede z najmanj šestimi paralelkami.
3. Analizirajte vzorce.
4. Izračunajte koncentracijo, zaznано v posameznem vzorcu.
5. Izračunajte povprečno koncentracijo, standardni odklon in variacijski koeficient (%) ojačanih vzorcev.
6. Te korake ponovite še najmanj dvakrat.
7. Izračunajte skupne povprečne koncentracije, standardne odklone (tako da izračunate povprečje standardnega odklona, kvadriranega za posamezne ponovitve, in izračunate kvadratni koren) in variacijske koeficiente za ojačane vzorce.

⁽³⁾ Kadar pri nedovoljeni farmakološko aktivni snovi validacije koncentracije 0,5-kratnika referenčne vrednosti za ukrepe ni mogoče razumno doseči, se lahko koncentracija, ki je 0,5-kratnik referenčne vrednosti za ukrepe, nadomesti z najnižjo koncentracijo med 0,5- in 1,0-kratnikom referenčne vrednosti za ukrepe, ki jo je razumno mogoče doseči.

⁽⁴⁾ Kadar pri določeni farmakološko aktivni snovi validacije koncentracije 0,1-kratnika referenčne vrednosti za ukrepe ni mogoče razumno doseči, se lahko koncentracija, ki je 0,1-kratnik referenčne vrednosti za ukrepe, nadomesti z najnižjo koncentracijo med 0,1- in 0,5-kratnikom referenčne vrednosti za ukrepe, kot jo je mogoče razumno doseči.

⁽⁵⁾ Kadar pri nedovoljeni farmakološko aktivni snovi validacije koncentracije 0,5-kratnika referenčne vrednosti za ukrepe ni mogoče razumno doseči, se lahko koncentracija, ki je 0,5-kratnik referenčne vrednosti za ukrepe, nadomesti z najnižjo koncentracijo med 0,5- in 1,0-kratnikom referenčne vrednosti za ukrepe, ki jo je razumno mogoče doseči.

⁽⁶⁾ Kadar pri določeni farmakološko aktivni snovi validacije koncentracije 0,1-kratnika referenčne vrednosti za ukrepe ni mogoče razumno doseči, se lahko koncentracija, ki je 0,1-kratnik referenčne vrednosti za ukrepe, nadomesti z najnižjo koncentracijo med 0,1- in 0,5-kratnikom referenčne vrednosti za ukrepe, kot jo je mogoče razumno doseči.

▼ B

Pri metodah za dovoljene snovi, validirane pred datumom začetka veljavnosti te uredbe, zadostuje določitev ponovljivosti z ojačanimi matriksi v koncentracijah 0,5-, 1,0- in 1,5-kratnika mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti.

Druga možnost je, da se ponovljivost izračuna v skladu s standardom ISO 5725-2:2019 ⁽⁷⁾.

2.2.1.4 Obnovljivost znotraj laboratorija

1. Za validacije, izvedene po datumu začetka veljavnosti te uredbe, pripravite niz vzorcev določenega preizkusnega materiala (z enakimi ali različnimi matriksi), ojačanih z analitom(-i), da dobite koncentracije, enakovredne:

(a) 0,5-⁽⁵⁾, 1,0- in 1,5-kratniku referenčne vrednosti za ukrepe ali

(b) 0,1-⁽⁶⁾, 1,0- in 1,5-kratniku mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti za dovoljene snovi ali

(c) 1,0-, 2,0- in 3,0-kratniku najnižje koncentracijske točke za nedovoljene ali prepovedane snovi, če se referenčna vrednost za ukrepe ne uporablja.

2. Na vsaki ravni koncentracije analizo izvedite z najmanj šestimi paralelkami slepega materiala.

3. Analizirajte vzorce.

4. Izračunajte koncentracijo, zaznано v posameznem vzorcu.

5. Te korake ponovite vsaj dvakrat z različnimi serijami slepega materiala, različnimi izvajalci in v čim več različnih pogojih okolja, npr. z različnimi serijami reagentov in topil, pri različnih sobnih temperaturah, z različnimi instrumenti ali variacijo drugih parametrov.

6. Določite povprečno koncentracijo, standardni odklon in variacijski koeficient (%) ojačanih vzorcev.

Pri metodah za dovoljene snovi, validirane pred datumom začetka veljavnosti te uredbe, zadostuje določitev obnovljivosti znotraj laboratorija z ojačanimi matriksi v koncentracijah 0,5-, 1,0- in 1,5-kratnika mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti.

Druga možnost je, da se obnovljivost znotraj laboratorija /srednja natančnost izračuna v skladu s standardi ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 ⁽⁸⁾ in Codex CAC/GL 59-2006 ⁽⁹⁾.

2.2.2 Validacija po alternativnih modelih

Za izračun parametrov v skladu z alternativnimi modeli je treba izvesti poskusni načrt. Poskusni načrt se oblikuje glede na število različnih vrst in različnih faktorjev, ki se preiskujejo. Zato se pri prvem koraku celotnega postopka validacije upoštevajo populacije vzorcev, ki bodo v laboratoriju analizirane v prihodnosti, da se določijo najpomembnejše vrste in faktorji, ki lahko vplivajo na rezultate meritev. Faktorski pristop omogoča, da se oceni merilna negotovost rezultatov preizkusa, dobljenih

⁽⁷⁾ ISO 5725-2:2019 Točnost (pravilnost in natančnost) merilnih metod in rezultatov – del 2: Osnovna metoda za določanje ponovljivosti in obnovljivosti standardne merilne metode (klavzula 3).

⁽⁸⁾ ISO 11843-1:1997 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions (Zmožnost zaznavanja – del 1: Izrazi in opredelitve pojmov).

⁽⁹⁾ Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Guidelines on estimation of uncertainty of results (CAC/GL 59-2006).

▼B

v različnih preizkusnih pogojih v zadevnem laboratoriju, kot so različni analitiki, različni instrumenti, različne serije reagentov, različni matriksi, različni pretečeni časi preizkusa in različne temperature preizkusa. Nato je treba glede na namen izbrati razpon koncentracij v skladu z mejno vrednostjo ostanikov ali mejno vrednostjo za dovoljene snovi ali referenčno vrednostjo za ukrepe ali najnižjo koncentracijsko točko za prepovedane ali nedovoljene snovi.

Namen faktorskega pristopa je določiti zanesljive podatke o natančnosti in podatke o meritvah s hkratnim nadzorovanim spreminjanjem izbranih faktorjev. Omogoča oceno skupnega vpliva faktorskih in naključnih učinkov. Poskusna zasnova omogoča tudi preiskavo robustnosti ⁽¹⁰⁾ analize metode in določitev standardnega odklona interne obnovljivosti po matriksih.

V nadaljevanju je primer alternativnega pristopa z uporabo načrta ortogonalne poskusne zasnove.

Preučiti se lahko do sedem faktorjev (faktorji šuma). Študija je zasnovana tako, da se lahko natančnost, pravilnost (na podlagi ojačanih vzorcev), občutljivost, merilna negotovost in kritične koncentracije določijo hkrati z izvajanjem poskusnega načrta.

Preglednica 6

Primer načrta ortogonalne poskusne zasnove s sedmimi faktorji (I–VII), spremenjenimi na dveh nivojih (A/B), v validacijski študiji z osmimi ponovitvami (kombinacija faktorskih nivojev)

Faktor	I	II	III	IV	V	VI	VII
Ponovitev 01	A	A	A	A	A	A	A
Ponovitev 02	A	A	B	A	B	B	B
Ponovitev 03	A	B	A	B	A	B	B
Ponovitev 04	A	B	B	B	B	A	A
Ponovitev 05	B	A	A	B	B	A	B
Ponovitev 06	B	A	B	B	A	B	A
Ponovitev 07	B	B	A	A	B	B	A
Ponovitev 08	B	B	B	A	A	A	B

Značilnosti metode se izračunajo, kot je opisano v Jülicher in drugi ⁽¹¹⁾.

⁽¹⁰⁾ Spremembe poskusnih pogojev, na katere se to nanaša, lahko vključujejo vzorčne materiale, analite, pogoje shranjevanja, okoljske pogoje in/ali pogoje priprave vzorca. Za vse poskusne pogoje, ki bi lahko v praksi nihali (npr. stabilnost reagentov, sestava vzorca, pH, temperatura), se navedejo morebitne spremembe, ki bi lahko vplivale na rezultat analize.

⁽¹¹⁾ Jülicher, B., Gowik, P., in Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analitik*, 120, 173.

▼ B**2.2.3 Drugi validacijski pristopi**

Uporabijo se lahko tudi drugi pristopi, s katerimi se dokaže, da metoda izpolnjuje izvedbena merila za značilnosti učinkovitosti, če dosega enako raven in kakovost informacij. Validacija se lahko izvede tudi z medlaboratorijsko študijo, kot je določena v standardu Codex Alimentarius, ISO ali IUPAC ⁽¹²⁾, ali v skladu z alternativnimi metodami, kot so študije posamičnega laboratorija ali znotrajlaboratorijska validacija ⁽¹³⁾. Kadar se uporabijo postopki alternativne validacije, se v validacijskem protokolu določita osnovni model in strategija z zadevnimi osnovnimi pogoji, predpostavkami in formulami ali pa se vsaj navedejo reference o njihovi razpoložljivosti.

2.3 Selektivnost/specifičnost

Sposobnost razlikovanja med analitom in snovmi, ki so tesno povezane, se določi v največji možni meri. Določi se interferenca homologov, izomerov, degradacijskih produktov, endogenih snovi, analogov, presnovnih produktov v iskanem ostanku, spojin matriksa ali katere koli druge potencialno moteče snovi, metoda pa se po potrebi spremeni, da se preprečijo prepoznane motnje. Za določitev specifičnosti metode se uporabi naslednji pristop:

1. izberite vrsto kemijsko sorodnih spojin ali drugih snovi, ki bi se lahko pojavile z iskano spojino, ki je lahko prisotna v vzorcih, in preverite, ali bi lahko motile analizo ciljnega(-ih) analita(-ov);
2. analizirajte primerno število reprezentativnih slepih vzorcev, npr. različnih serij ali serij različnih živalskih vrst ($n \geq 20$), ter preverite morebitne motnje signalov, vrhov ali sledi ionov v predelih, kjer se pričakuje, da bo ciljni analit eluiral;
3. ojačajte reprezentativne slepe vzorce do ustrezne koncentracije s snovmi, ki bi lahko motile identifikacijo in/ali kvantifikacijo analita ter raziščite, ali dodana snov:
 - (a) lahko vodi k lažni identifikaciji;
 - (b) ovira identifikacijo ciljnega analita;
 - (c) opazno vpliva na kvantifikacijo.

2.4 Robustnost

Nadaljnja učinkovitost analizne metode se preizkusi v različnih poskusnih pogojih, ki vključujejo na primer različne pogoje vzorčenja in manjše spremembe, do katerih lahko pride pri rutinskem preskušanju. Pri preskušanju robustnosti metode bi morale biti spremembe poskusnih pogojev manjše. Oceni se pomen teh sprememb. Vsaka značilnost učinkovitosti se določi za vse manjše spremembe, za katere se je izkazalo, da pomembno vplivajo na izvedljivost preizkusa.

⁽¹²⁾ IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies (Protokol za oblikovanje, izvajanje in razlago študij učinkovitosti metode), Pure & Applied Chem. 67, 331.

⁽¹³⁾ Gowik, P., Jülicher, B., in 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.

▼ B**2.5 Stabilnost**

Določi se stabilnost kalibracijskega standarda, v matriksu pripravljenega ali z matriksom ojačanega standarda ter analita ali sestavin matriksa v vzorcu med shranjevanjem ali analizo, saj lahko nestabilnosti vplivajo na rezultate preizkusa.

Običajno je stabilnost analita značilna v različnih pogojih shranjevanja. Zahtevane informacije lahko zagotovijo poskusi, izvedeni za spremljanje pogojev shranjevanja standardov in vzorcev, ki se izvajajo v okviru običajnega laboratorijskega sistema akreditacije in nadzora kakovosti. Če so na voljo podatki o stabilnosti za analite v matriksu (npr. na podlagi informacij iz EURL, objavljenih podatkov itd.), teh podatkov ni treba določiti v vsakem laboratoriju. Vendar je sklicevanje na razpoložljive podatke o stabilnosti analizov v raztopini in v matriksu sprejemljivo le, če se uporabljajo enaki pogoji.

Če zahtevani podatki o stabilnosti niso na voljo, je treba uporabiti naslednje pristope.

2.5.1 Določanje stabilnosti analita v raztopini

1. Pripravite svežo založno raztopino analita(-ov) in razredčite po navodilih za preskušanje, da dobite dovolj alikvotov (npr. 40) vsake izbrane koncentracije. Pripravijo se vzorci:

- (a) raztopin analita, ki se uporabljajo za ojačanje;
- (b) analitnih raztopin, uporabljenih za končno analizo;
- (c) katere koli druge raztopine, ki je zanimiva (npr. derivatizirani standardi).

2. Izmerite vsebnost analita v sveže pripravljene raztopini po navodilih za preskušanje.

3. Porazdelite ustrezne volumne v primerne vsebnike, označite ter shranite pri svetlobnih in temperaturnih pogojih v skladu s shemo iz preglednice 7. Čas shranjevanja se izbere ob upoštevanju uporabljene analitne prakse, po možnosti dokler se ne opazijo prvi pojavi degradacije med identifikacijo in/ali kvantifikacijo. Če med stabilnostno študijo ni opažena degradacija, je trajanje shranjevanja pri stabilnostni študiji enako trajanju najdaljšega shranjevanja raztopine.

4. Izračunajte koncentracijo analita(-ov) v vsakem alikvotu v primerjavi s koncentracijo analita v sveže pripravljene raztopini po naslednji formuli:

$$\text{Preostanek analita (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{sveža}}$$

C_i = koncentracija ob časovni točki i

$C_{\text{sveža}}$ = koncentracija sveže raztopine

Povprečna vrednost petih raztopin paralelk, ki so bile shranjene, od povprečne vrednosti petih sveže pripravljenih raztopin paralelk ne odstopa za več kot 15 %. Povprečna vrednost petih sveže pripravljenih raztopin se uporabi kot osnova za izračun razlike v odstotkih.

▼B

Preglednica 7

Shema za določitev stabilnosti analita v raztopini

	-20 °C	+4 °C	+20 °C
Temno	10 alikvotov	10 alikvotov	10 alikvotov
Svetlo			10 alikvotov

2.5.2 *Določanje stabilnosti analita(-ov) v matriksu*

1. Če je mogoče, uporabite nastale vzorce. Če ni na voljo nobenega nastalega matriksa, se uporabi slepi matriks, ojačan z analitom.
2. Če je nastali matriks na voljo, določite koncentracijo v matriksu, dokler je matriks še svež. Nadaljnje alikvote homogeniziranega nastalega matriksa shranite pri -20 °C ali manj, če je potrebno, in določite koncentracije analita, dokler se vzorec hrani v laboratoriju.
3. Če ni na voljo nobenega nastalega matriksa, vzemite nekaj slepega matriksa in ga homogenizirajte. Matriks razdelite na pet alikvotov. Vsak alikvot ojačajte z analitom, ki naj bi bil po možnosti pripravljen v majhni količini vodne raztopine. En alikvot analizirajte takoj. Ostale alikvote shranite pri najmanj -20 °C ali manj, če je potrebno, ter jih analizirajte po kratko-, srednje- in dolgoročnem shranjevanju ob upoštevanju uporabljenih analiznih metod.
4. Zabeležite najdaljši sprejemljivi čas shranjevanja in optimalne pogoje shranjevanja.

Povprečna vrednost petih raztopin paralelek, ki so bile shranjene, od povprečne vrednosti petih sveže pripravljenih raztopin paralelek odstopa za največ interno laboratorijsko obnovljivost metode. Povprečna vrednost petih sveže pripravljenih raztopin se uporabi kot osnova za izračun razlike v odstotkih.

2.6 **Odločitvena meja za potrditev (CC α)**

CC α se določi za potrditvene metode. CC α se določi v pogojih, ki so v skladu z zahtevami za identifikacijo ali identifikacijo in kvantifikacijo, kot je opredeljeno v „Izvedbenih merilih in drugih zahtevah za analizne metode“ iz poglavja 1.

Za nadzor skladnosti vzorcev je bila kombinirana standardna merilna negotovost že upoštevana v vrednosti CC α (odločitvena meja za potrditev).

1. Za nedovoljene ali prepovedane farmakološko aktivne snovi se CC α izračuna na naslednji način:
 - (a) Metoda 1: s postopkom kalibracijske krivulje v skladu s standardom ISO 11843-1:1997 ⁽¹⁴⁾ (v nadaljevanju: kritična vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi slepi material, ki se ojača na in nad referenčno vrednost za ukrepe ali na in nad najnižjo koncentracijsko točko v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce. Po identifikaciji zabeležite signal, kjer je to mogoče, ali ponovno izračunano koncentracijo glede na dodano koncentracijo. Ustrezna koncentracija na odseku na osi

⁽¹⁴⁾ ISO 11843-1:1997 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions (Zmožnost zaznavanja – del 1: Izrazi in opredelitve pojmov).

▼ B

y plus 2,33-kratnik standardnega odklona obnovljivosti znotraj laboratorija na odseku je enaka odločitveni meji. Ta metoda se uporablja samo za kvantitativne preizkuse. Odločitvene meje, dobljene s tem pristopom, se preverijo z analizo slepega matriksa, ojačanega na izračunano odločitveno mejo.

- (b) Metoda 2: z analiziranjem najmanj 20 reprezentativnih slepih materialov na matriks, da se lahko izračuna razmerje signal/šum pri časovnem okencu, v katerem se pričakuje analit. Trikratno razmerje signal/šum se lahko uporabi kot odločitvena meja. To se uporablja za kvantitativne in kvalitativne preizkuse. Odločitvene meje, dobljene s tem pristopom, se preverijo z analizo slepega matriksa, ojačanega na izračunano odločitveno mejo.
- (c) Metoda 3: $CC\alpha = LCL + k(\text{enostransko, 99 \%}) \times (\text{kombinirana standardna merilna negotovost na najnižji koncentracijski točki (LCL)})$

Za nedovoljene ali prepovedane farmakološko aktivne snovi se lahko, odvisno od validacijskega poskusa (in stopnje njegove neoporečnosti), razumno uporabi t-porazdelitev ali – če se kot osnova vzame Gaussova porazdelitev (enostranska, $n = \infty$) – k-faktor, ki znaša 2,33.

Obnovljivost znotraj laboratorija in pravilnost sta primerni za opredelitev (kombinirane) standardne merilne negotovosti, če se ta določi ob upoštevanju vseh pomembnih vplivnih dejavnikov.

Metoda 2 za izračun $CC\alpha$ se lahko uporablja samo do 1. januarja 2026 pri metodah, validiranih pred datumom začetka veljavnosti te uredbe. Za metode, validirane po začetku veljavnosti te uredbe, se lahko uporablja samo metoda 1 ali 3.

2. Za dovoljene snovi se $CC\alpha$ izračuna na naslednji način:

- (a) Za dovoljene snovi v kombinacijah matriks/vrsta, za katere je bila določena mejna vrednost ostankov ali mejna vrednost:
- (i) Metoda 1: s postopkom kalibracijske krivulje v skladu s standardom ISO 11843-1:1997 (v nadaljevanju: kritična vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi slepi material, ki se ojača na in nad mejno vrednost ostankov ali mejno vrednost v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce. Po identifikaciji zabeležite signal, kjer je to mogoče, ali ponovno izračunano koncentracijo glede na dodano koncentracijo. Ustrezna koncentracija pri mejni vrednosti ostankov ali mejni vrednosti plus 1,64-kratnik standardnega odklona obnovljivosti znotraj laboratorija pri dovoljeni meji je enaka odločitveni meji ($\alpha = 5\%$).
- (ii) Metoda 2: $CC\alpha = MRL (\text{ali } ML) + k(\text{enostransko, 95 \%}) \times (\text{kombinirana standardna merilna negotovost pri mejni vrednosti ostankov (MRL) ali mejni vrednosti (ML)})$.

Za dovoljene snovi se lahko, odvisno od validacijskega poskusa (in stopnje njegove neoporečnosti), razumno uporabi t-porazdelitev ali – če se kot osnova vzame Gaussova porazdelitev (enostranska, $n = \infty$) – k-faktor, ki znaša 1,64.

▼B

Obnovljivost znotraj laboratorija in pravilnost sta primerni za opredelitev (kombinirane) standardne merilne negotovosti, če se ta določi ob upoštevanju vseh pomembnih vplivnih dejavnikov.

Za farmakološko aktivne snovi, za katere je določena mejna vrednost ostankov za vsoto različnih snovi, se $CC\alpha$ snovi z najvišjo koncentracijo v vzorcu uporabi kot $CC\alpha$ za oceno vsote snovi v merjenem vzorcu.

- (b) Za dovoljene snovi v kombinacijah matriks/vrsta, za katere mejna vrednost ostankov ni bila določena, ostanki ne smejo biti prisotni, razen če je bilo uvedeno dovoljeno zdravljenje v skladu s členom 11 Direktive 2001/82/ES. Za dovoljene snovi, za katere mejna vrednost ostankov ni bila določena, se za izračun $CC\alpha$ uporabi kaskadna mejna vrednost ostankov, določena z Izvedbeno uredbo Komisije (EU) 2018/470 ⁽¹⁵⁾. Uporabi se metoda 1 ali 2 iz zgornjega odstavka, vendar se „mejna vrednost ostankov“ nanaša na „0,5-kratnik kaskadne mejne vrednosti ostankov, s ciljnimi 0,1-kratnikom kaskadne mejne vrednosti ostankov, kadar je to razumno izvedljivo.“

2.7 Določitvena sposobnost za presejanje ($CC\beta$)

$CC\beta$ se določi za presejalne metode. $CC\beta$ se določi, kakor je opredeljeno v „Izvedbenih merilih in drugih zahtevah za analizne metode“ iz poglavja 1 te Priloge, in v skladu z zahtevami iz preglednice 5. Vendar za presejalne metode ni treba uporabiti vseh zahtev za identifikacijo (glej točke 1.2.3, 1.2.4 in 1.2.5).

1. Za nedovoljene ali prepovedane farmakološko aktivne snovi se zagotovi največja beta (β) napaka, ki znaša 5 %. $CC\beta$ se izračuna na naslednji način:

- (a) Metoda 1: postopek kalibracijske krivulje v skladu s standardom ISO 11843-1:1997 (v nadaljevanju: najmanjša detekcijska vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi reprezentativni slepi material, ki se ojača na in pod referenčno vrednost za ukrepe, če pa ta ni določena, okrog ciljne koncentracije pri presejanju, v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce. Zabeležite signal glede na dodano koncentracijo. Ustrezna koncentracija pri ciljni koncentraciji pri presejanju (STC) plus 1,64-kratnik standardnega odklona obnovljivosti znotraj laboratorija povprečne izmerjene vsebnosti pri ciljni koncentraciji pri presejanju je enaka določitveni sposobnosti. Ekstrapolacija, ki je precej pod najnižjim nivojem ojačanja (< 50 % najnižjega nivoja ojačanja), se potrdi s poskusnimi podatki na stopnji validacije.
- (b) Metoda 2: preiskava ojačanega slepega materiala na ravneh koncentracije pri ciljni koncentraciji pri presejanju in nad njo. Za vsako raven koncentracije je treba analizirati 20 ojačanih slepih materialov, da se zagotovi zanesljiva osnova za to določitev. Raven koncentracije, pri kateri ostane samo ≤ 5 % lažno skladnih rezultatov, je enaka določitveni sposobnosti metode.
- (c) Metoda 3: $CC\beta = STC + k(\text{enostransko, } 95\%) \times (\text{kombinirana standardna merilna negotovost pri ciljni koncentraciji pri presejanju (STC) ali nad njo.}$

Za nedovoljene ali prepovedane farmakološko aktivne snovi se lahko, odvisno od validacijskega poskusa (in stopnje njegove neoporečnosti), razumno uporabi t-porazdelitev ali – če se kot osnova vzame Gaussova porazdelitev (enostranska, $n = \infty$) – k-faktor, ki znaša 1,64.

⁽¹⁵⁾ Izvedbena uredba Komisije (EU) 2018/470 z dne 21. marca 2018 o podrobnih pravilih glede mejnih vrednosti ostankov, ki jih je treba upoštevati za nadzor živil, pridobljenih iz živali, ki se zdravijo v EU v skladu s členom 11 Direktive 2001/82/ES (UL L 79, 22.3.2018, str. 16).

▼ B

Obnovljivost znotraj laboratorija in pravilnost sta primerni za opredelitev (kombinirane) standardne merilne negotovosti, če se ta določi ob upoštevanju vseh pomembnih vplivnih dejavnikov.

2. Za dovoljene snovi se zagotovi največja beta (β) napaka, ki znaša 5 %. $CC\beta$ se izračuna na naslednji način:

(a) Metoda 1: s postopkom kalibracijske krivulje v skladu s standardom ISO 11843-1:1997 (v nadaljevanju: najmanjša detekcijska vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi reprezentativni slepi material, ki je ojačan na in pod dovoljeno mejo, začnši s ciljno koncentracijo pri presejanju, v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce in identificirajte analit(-e). Izračunajte standardni odklon povprečne izmerjene vsebnosti pri ciljni koncentraciji pri presejanju.

Ustrezna koncentracija pri ciljni koncentraciji pri presejanju plus 1,64-kratnik standardnega odklona obnovljivosti znotraj laboratorija povprečne izmerjene vsebnosti pri ciljni koncentraciji pri presejanju je enaka določiteni sposobnosti.

(b) Metoda 2: s preiskavo ojačanega slepega materiala pri ravnih koncentracije, ki so pod dovoljeno mejno vrednostjo. Za vsako raven koncentracije je treba analizirati 20 ojačanih slepih materialov, da se zagotovi zanesljiva osnova za to določitev. Raven koncentracije, pri kateri ostane samo $\leq 5\%$ lažno skladnih rezultatov, je enaka določiteni sposobnosti metode.

(c) Metoda 3: $CC\beta = STC + k(\text{enostransko, } 95\%) \times (\text{kombinirana standardna merilna negotovost pri ciljni koncentraciji pri presejanju (STC) ali nad njo.}$

Pri dovoljenih snoveh se lahko, odvisno od validacijskega poskusa (in stopnje njegove neoporečnosti), razumno uporabi t-porazdelitev ali – če se kot osnova vzame Gaussova porazdelitev (enostranska, $n = \infty$) – k-faktor, ki znaša 1,64 (ne glede na kaskadno uporabo ali redno uporabo mejne vrednosti ostankov).

Obnovljivost znotraj laboratorija in pravilnost sta primerni za opredelitev (kombinirane) standardne merilne negotovosti, če se ta določi ob upoštevanju vseh pomembnih vplivnih dejavnikov.

Za farmacevtsko aktivne snovi, za katere je določena mejna vrednost ostankov za vsoto različnih snovi, se $CC\beta$ snovi z najvišjo koncentracijo v vzorcu uporabi kot $CC\beta$, da se oceni vsota snovi v merjenem vzorcu.

2.8 Kalibracijske krivulje

Kadar se za kvantifikacijo uporabljajo kalibracijske krivulje:

- (1) bi bilo treba pri izdelavi krivulje po možnosti uporabiti najmanj pet ekvidistančnih nivojev (vključno z ničelnim nivojem);
- (2) opiše se delovno območje krivulje;
- (3) opiše se matematična formula krivulje in prileganje podatkov (determinacijski koeficient R^2) s krivuljo;

▼ B

(4) opišejo se območja sprejemljivosti za parametre krivulje.

Za kalibracijske krivulje, ki temeljijo na standardni raztopini, v matriksu pripravljenega ali z matriksom ojačanega standarda se označijo sprejemljivi parametri kalibracijske krivulje, ki se lahko razlikujejo od ene serije do druge.

2.9 Absolutni izkoristek

Absolutni izkoristek metode se določi, če se ne uporablja interni standard ali umerjanje, ojačano z matriksom.

Kadar so izpolnjene zahteve za pravilnost, določene v preglednici 1, se lahko uporabi stalni faktor popravka. V nasprotnem primeru se za zadevno serijo uporabi dobljeni faktor izkoristka. Namesto faktorja popravka z izkoristkom se lahko uporabi postopek standardne adicije ⁽¹⁶⁾ ali metoda internega standarda.

Absolutni izkoristek se izračuna za najmanj šest reprezentativnih serij matriksa.

En alikvot slepega matriksa se ojača z analitom pred ekstrakcijo, drugi alikvot slepega matriksa pa se ojača po pripravi vzorca na ustreznih ravni koncentracije in določi se koncentracija analita.

Izkoristek se izračuna kot:

$$\text{Izk (analit)} = \frac{\text{(z matriksom ojačan standard)}}{\text{(v matriksu pripravljeni standard)}} \times 100$$
2.10 Relativni učinki matriksa

Relativni učinek matriksa se določi v vseh primerih. To se lahko izvede v okviru validacije ali v ločenih poskusih. Relativni učinek matriksa se izračuna za vsaj 20 različnih slepih serij (matriksa/vrste) glede na področje uporabe metode, npr. različne vrste, ki jih je treba zajeti.

Slepi matriks bi bilo treba po ekstrakciji ojačati z analitom pri referenčni vrednosti za ukrepe, mejni vrednosti ostankov ali mejni vrednosti in ga analizirati skupaj s čisto raztopino analita.

Relativni učinek matriksa ali faktor matriksa (MF) se izračuna kot:

$$\text{MF (standard)} = \frac{\text{peak area of MMS standard}}{\text{peak area of solution standard}}$$

$$\text{MF (IS)} = \frac{\text{peak area of MMSIS}}{\text{peak area of solution IS}}$$

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

IS: interni standard

MMS: v matriksu pripravljeni standard

Variacijski koeficient za MF (standard, normaliziran za IS) ni večji od 20 %.

⁽¹⁶⁾ Količina dodanega standardnega analita je lahko na primer dvakrat do petkrat večja od ocenjene količine analita v vzorcu. S tem postopkom se določi vsebnost analita v vzorcu ob upoštevanju izkoristka analiznega postopka.



POGLAVJE 3

**NADZOR KAKOVOSTI MED RUTINSKO ANALIZO – STALNO
PREVERJANJE UČINKOVITOSTI METODE**

Izpolnjene morajo biti zahteve za zagotavljanje kakovosti analiznih rezultatov iz poglavja 7.7 standarda ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁷⁾.

Med rutinsko analizo je analiza certificiranih referenčnih materialov (CRM) najprimernejša možnost za zagotovitev dokazov o učinkovitosti metode. Ker so certificirani referenčni materiali, ki vsebujejo ustrezne analite na zahtevanih ravneh koncentracije, redko na voljo, se lahko kot alternativa uporabijo tudi referenčni materiali, ki jih zagotavljajo in označujejo EURL ali laboratoriji, akreditirani po standardu ISO/IEC 17043:2010 ⁽¹⁸⁾. Kot še ena alternativa se lahko uporabijo tudi interni referenčni materiali, ki se redno nadzirajo.

Stalno preverjanje učinkovitosti metode med rutinsko analizo bi bilo treba izvesti v fazi presejanja in fazi potrditve.

1. Faza presejanja:

Za vsako serijo (niz) opravljenih analiz se hkrati analizira serija naslednjih vzorcev za nadzor kakovosti:

- (a) kontrolni vzorec za sistemsko ustreznost instrumenta, po možnosti specifičnega za metodo;
- (b) vzorci za nadzor kakovosti, ki so ojačani s koncentracijo blizu ciljne koncentracije pri presejanju in v idealnem primeru pri $CC\beta$ za presejanje za dovoljene farmakološko aktivne snovi ter za prepovedane ali nedovoljene snovi;
- (c) skladen kontrolni vzorec (slepi vzorci) in, kadar je ustrezno, slepi reagenti.

2. Faza potrditve:

Za vsako serijo (niz) opravljenih analiz se hkrati analizira serija naslednjih vzorcev za nadzor kakovosti:

- (a) kontrolni vzorec za sistemsko ustreznost instrumenta, po možnosti specifičnega za metodo;
- (b) vzorci za nadzor kakovosti, ki so za dovoljene farmakološko aktivne snovi ojačani pri koncentraciji blizu mejne vrednosti ostankov ali mejne vrednosti, za prepovedane ali nedovoljene farmakološko aktivne snovi pa blizu referenčne vrednosti za ukrepe ali najnižje koncentracijske točke (neskladni kontrolni vzorci);
- (c) skladen kontrolni vzorec (slepi vzorci) in, kadar je ustrezno, slepi reagenti.

Za vzorce za nadzor kakovosti se priporoča naslednji vrstni red: kontrolni vzorec za sistemsko ustreznost instrumenta, skladen kontrolni vzorec, vzorec(-ci), ki ga (jih) je treba potrditi, ponovno skladen kontrolni vzorec in ojačani vzorec za nadzor kakovosti (neskladni kontrolni vzorci).

Za kvantitativne metode se z vsako serijo uradnih vzorcev pred zgoraj navedenimi vzorci ali po njih analizira in izmeri kalibracijska krivulja.

Kadar je to izvedljivo, se pravilnost (na podlagi ojačanih vzorcev) vseh ciljnih analitov v neskladnih kontrolnih vzorcih oceni s pomočjo kart za nadzor kakovosti v skladu s poglavjem 7.7 standarda ISO/IEC 17025:2017. Če je za to potrebno nesorazmerno veliko število ugotavljanj pravilnosti, se lahko število analitov zmanjša na več reprezentativnih analitov.

⁽¹⁷⁾ ISO/IEC 17025: 2017 Splošne zahteve za usposobljenost preizkuševalnih in kalibracijskih laboratorijev (poglavje 7.7).

⁽¹⁸⁾ ISO/IEC 17043:2010 Ugotavljanje skladnosti – splošne zahteve za preskušanje strokovne usposobljenosti.



POGLAVJE 4

RAZŠIRITEV VALIDIRANEGA PODROČJA UPORABE PREDHODNO VALIDIRANE METODE

Včasih je treba razširiti področje uporabe predhodno celovito validirane metode. V teh primerih bi bilo treba področje uporabe razširiti na učinkovit in analitično tehten način. To se lahko doseže z validacijo manjšega števila vzorcev (npr. polovičnega števila vzorcev) v primerjavi s popolno validacijo.

Kljub temu vrsta in število sprememb, ki jih je treba validirati v eni sami shemi omejene validacije, vedno temeljita na strokovnem znanju in predhodnih izkušnjah, na primer za spremembo tehnike detekcije bi bila v vsakem primeru potrebna popolna validacija.

Na splošno se za zagotovitev stalne veljavnosti metode njena učinkovitost nenehno spremlja in primerja s prvotno dobljenimi validacijskimi parametri. V idealnem primeru je ta stalni nadzor učinkovitosti metode zasnovan tako, da se lahko manjkajoči podatki za popolno validacijo zberejo sčasoma (npr. z nekaj podatkovnimi točkami iz vzorcev za nadzor kakovosti pri vsakem analiznem nizu).

4.1 Razširitve metod glede razpona koncentracij

Zaradi sprememb mejnih vrednosti ostankov, mejnih vrednosti in referenčnih vrednosti za ukrepe je morda treba prilagoditi območje koncentracije, za katero je metoda validirana. V tem primeru je sprejemljiva uporaba sheme omejene validacije.

Kalibracijske krivulje za spremenjeni razpon bi morale biti pripravljene v skladu z validiranim postopkom. Analizirati bi bilo treba različne serije, ojačane pri različnih ravneh koncentracije (glej točki 2.2.1 in 2.2.2). Pravilnost, ponovljivost in obnovljivost znotraj laboratorija/srednja natančnost bi morale biti znotraj sprejemljivega razpona v primerjavi s prvotno validirano metodo. Kjer je to ustrezno, bi bilo treba ponovno izračunati $CC\beta$ (presejalne metode) in $CC\alpha$ (potrditvene metode).

4.2 Razširitve metod glede dodatnih snovi

Na splošno je razširitev metode na dodatne spojine mogoča le za analite, ki imajo podobno strukturo in značilnosti kot tisti, ki so že vključeni v analizo metodo. V tem primeru je sprejemljiva uporaba sheme omejene validacije. Prav tako ni dovoljeno nikakršno odstopanje od opisa metode.

kalibracijske krivulje za dodatne snovi bi morale biti pripravljene v skladu z validiranim postopkom. Analizirati bi bilo treba različne serije materialov matriksa, ojačanega na različnih ravneh koncentracije (glej točki 2.2.1 in 2.2.2). Pravilnost, ponovljivost in obnovljivost znotraj laboratorija/srednja natančnost bi morale biti v razponu, ki je primerljiv z drugimi analiti prvotno validirane metode, in v skladu z zahtevami iz točke 1.2.2. Za nove analite je treba izračunati $CC\beta$ (presejalne metode) in $CC\alpha$ (potrditvene metode).

4.3 Razširitve metod glede matriksov/vrst

O vključitvi novih matriksov ali vrst v že validirano analizo metodo se vedno odloči za vsak primer posebej, na podlagi preteklih spoznanj in izkušenj z metodo in predhodnih poskusov za oceno morebitnih učinkov matriksa in motenj. Na splošno bo to mogoče le za matrikse s podobnimi lastnostmi in za nekritične analite (stabilnost, določljivost).

▼ B

kalibracijske krivulje (standard ali matriks) bi bilo treba pripraviti v skladu z validiranim postopkom. Analizirati bi bilo treba različne serije materiala matriksa, ojačanega na različnih ravneh koncentracije (glej točki 2.2.1 in 2.2.2). Pravilnost, ponovljivost in obnovljivost znotraj laboratorija/srednja natančnost bi morale biti v sprejemljivem razponu glede na prvotno validirano metodo in v skladu z zahtevami iz točke 1.2.2. Glede na validacijski pristop je morda potreben ponovni izračun $CC\beta$ (presejalne metode) ali $CC\alpha$ (potrditvene metode).

Če rezultati niso v sprejemljivem razponu v primerjavi z vrednostmi za prvotni matriks, je potrebna dodatna popolna validacija, da se določijo parametri učinkovitosti, značilni za matriks/vrsto.

V primerih, ko se mejne vrednosti ostankov za določeno snov pri nekaterih matriksih razlikujejo, bo področje uporabe metode najverjetneje težko prilagoditi dodatnemu matriksu/vrsti in koncentraciji, saj je v tem primeru treba upoštevati dve spremembi. V takih primerih se priporoča popolna validacija.

*PRILOGA II***POSTOPKI VZORČENJA IN URADNA OBRAVNAVA VZORCA****1. Količina vzorca**

Najmanjše količine vzorcev se določijo v nacionalnem programu nadzora ostankov. Najmanjše količine vzorcev morajo biti zadostne, da lahko pooblaščen laboratoriji izvedejo analizne postopke, potrebne za dokončanje presejalnih in potrditvenih analiz. Zlasti pri perutnini, akvakulturi, kuncih, gojeni divjadi, plazilcih in žuželkah vzorec sestavlja ena ali več živali, odvisno od zahtev analiznih metod. Pri jajcih je velikost vzorca najmanj 12 jajc ali več, odvisno od uporabljenih analiznih metod. Če je treba v enem vzorcu analizirati več kategorij snovi z različnimi analiznimi metodami, se velikost vzorca ustrezno poveča.

2. Razdelitev na podvzorce

Razen če to ni tehnično mogoče ali če se to ne zahteva z nacionalno zakonodajo, se vsak vzorec razdeli na najmanj dva enakovredna podvzorca, tako da vsak omogoča celovit analizni postopek. Razdelitev lahko poteka na mestu vzorčenja ali v laboratoriju.

3. Sledljivost

Vsak vzorec se odvzame tako, da ga je vedno mogoče izslediti do kmetije izvora in po potrebi do serije živali ali posamezne živali. Zlasti za mleko se lahko vzorci v skladu z izbiro države članice odvzamejo na katerem koli od naslednjih mest:

1. na kmetiji iz zbiralne cisterne;
2. v mlekarni pred izpraznitvijo cisterne.

4. Vsebniki za vzorce

Vzorci se zbirajo v ustreznih vsebnikih, da se ohranita celovitost in sledljivost vzorca. Vsebniki zlasti onemogočajo zamenjavo, navzkrižno kontaminacijo in razkroj. Vsebniki so uradno zapečateni.

5. Zapisnik o vzorčenju

Po vsakem postopku vzorčenja se izdela zapisnik.

Inšpektor v zapisniku o vzorčenju zbere vsaj naslednje podatke:

1. naslov pristojnih organov;
2. ime inšpektorja ali identifikacijsko kodo;
3. uradno kodno številko vzorca;
4. datum vzorčenja;
5. ime in naslov lastnika ali osebe, ki je odgovorna za živali ali živalske proizvode;
6. ime in naslov izvirnega kmetijskega gospodarstva živali (v primeru vzorčenja na kmetijskem gospodarstvu);
7. registrsko številko obrata/klavnice;

▼ B

8. identifikacijo živali ali proizvoda;
9. živalsko vrsto;
10. matriks vzorca;
11. kadar je to ustrezno, zdravljenje v zadnjih štirih tednih pred vzorčenjem (v primeru vzorčenja na kmetijskem gospodarstvu);
12. snov ali skupine snovi za preiskavo;
13. posebne opombe.

Tiskane ali elektronske kopije zapisnika je treba predložiti glede na postopek vzorčenja. Zapisnik o vzorčenju in njegove kopije se izpolnijo tako, da sta zagotovljeni njihova avtentičnost in pravna veljavnost, zato je morda potrebno, da te dokumente podpiše inšpektor. V primeru vzorčenja na kmetijskem gospodarstvu je lahko kmet ali njegov namestnik pozvan k podpisu originala zapisnika o vzorčenju.

Original zapisnika o vzorčenju obdrži pri pristojni organ, ki mora zagotoviti, da nepooblaščen osebe nimajo dostopa do njega.

Po potrebi je lahko kmet ali lastnik obrata obveščen o opravljenem vzorčenju.

6. Zapisnik o vzorčenju za laboratorij

Zapisnik o vzorčenju za laboratorij, ki ga sestavijo pristojni organi, izpolnjuje zahteve iz poglavja 7 standarda ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁾ in vsebuje vsaj naslednje informacije:

1. naslov pristojnih ali imenovanih organov;
2. ime inšpektorja ali identifikacijsko kodo;
3. uradno kodno številko vzorca;
4. datum vzorčenja;
5. živalsko vrsto;
6. matriks vzorca;
7. snovi ali skupine snovi za preiskavo;
8. posebne opombe.

Zapisnik o vzorčenju za laboratorij je priložen vzorcu, ko je ta poslan v laboratorij.

7. Prevoz in shranjevanje

Program za nadzor ostankov določa ustrezne pogoje za shranjevanje in prevoz za vsako kombinacijo analita/matriksa, da se zagotovi stabilnost analita in celovitost vzorca. Čas prevoza je čim krajši, temperatura med prevozom pa ustrezna za zagotovitev stabilnosti analita.

Posebna pozornost se nameni transportnim vsebnikom, temperaturi in času dostave v pristojni laboratorij.

V primeru kakršne koli neskladnosti z zahtevami programa za nadzor laboratorij o tem nemudoma obvesti pristojni organ.

⁽¹⁾ ISO/IEC 17025: 2017 Splošne zahteve za usposobljenost preizkuševalnih in kalibracijskih laboratorijev (poglavje 7.7).