

32002D0657

L 221/8

URADNI LIST EVROPSKIH SKUPNOSTI

17.8.2002

**ODLOČBA KOMISIJE****z dne 14. avgusta 2002****o izvajanju Direktive Sveta 96/23/ES glede opravljanja analitskih metod in razlage rezultatov**

(notificirano pod dokumentarno številko K(2002)3044)

(Besedilo velja za EGP)

(2002/657/ES)

KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI JE –

ob upoštevanju Pogodbe o ustanovitvi Evropske skupnosti,

ob upoštevanju Direktive Sveta 96/23/ES z dne 29. aprila 1996 o ukrepih za spremljanje določenih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in živalskih proizvodih ter razveljavitvi direktiv 85/358/EGS in 86/469/EGS ter odločb 89/187/EGS in 91/664/EGS <sup>(1)</sup> in zlasti drugega pododstavka člena 15(1) Direktive,

ob upoštevanju naslednjega:

- (1) Prisotnost ostankov v proizvodih živalskega izvora negativno vpliva na zdravje ljudi.
- (2) Odločba Komisije 98/179/ES z dne 23. februarja 1998 o določitvi podrobnih pravil uradnega vzorčenja za spremljanje nekaterih snovi in njihovih ostankov v živih živalih in živalskih proizvodih <sup>(2)</sup> določa, da morajo analizo vzorcev opravljati izključno laboratoriji, ki jih je pristojni nacionalni organ pooblastil za uradno nadzorovanje ostankov.
- (3) Treba je zagotoviti kakovost in primerljivost rezultatov analiz, ki jih pridobijo pooblaščenim laboratoriji za uraden nadzor ostankov. To je treba doseči z uporabo sistema zagotavljanja kakovosti in specifično z uporabo metod, validiranih v skladu z enotnimi postopki in merili učinkovitosti in z zagotavljanjem sledenja splošnim standardom ali skupno dogovorjenim standardom.
- (4) Direktiva Sveta 93/99/EGS z dne 29. oktobra 1993 o dodatnih ukrepih glede uradnega nadzora živil in Odločba 98/179/ES <sup>(3)</sup> zahtevata, da je treba akreditirati

uradne nadzorne laboratorije v skladu z ISO 17025(1) od januarja 2002. V skladu z Odločbo 98/179/ES se za pooblaščenim laboratoriji zahteva udeležba v mednarodno priznanem zunanjem programu za ocenjevanje nadzora kakovosti in akreditacijo. Še več, pooblaščenim laboratoriji morajo dokazati njihovo pristojnost z redno in uspešno udeležbo v ustreznih programih preskusov strokovne usposobljenosti, ki jih priznavajo ali organizirajo nacionalni referenčni laboratoriji ali referenčni laboratoriji Skupnosti.

- (5) Za izboljšanje koordinacije deluje mreža referenčnih laboratorijev Skupnosti, nacionalnih referenčnih laboratorijev in nacionalnih nadzornih laboratorijev na podlagi Direktive 96/23/ES.
- (6) Zaradi napredovanja analitske kemije od sprejetja Direktive 96/23/ES se je koncept rutinskih metod in referenčnih metod nadomestil s pristopom po merilih, v katerem se določijo merila učinkovitosti in postopki za validacijo presejevalnih in potrditvenih metod.
- (7) Za zagotavljanje usklajenega izvajanja Direktive 96/23/ES je treba določiti skupna merila za razlago rezultatov preskusov uradnih nadzornih laboratorijev.
- (8) Za zagotavljanje usklajenega izvajanja Direktive 96/23/ES je treba določiti postopno uvajanje mej najmanjše zahtevane učinkovitosti (MRPL) analitske metode za snovi, za katere ni določena nobena dovoljena meja, in zlasti za snovi, katerih uporaba ni dovoljena ali je v Skupnosti izrecno prepovedana.

<sup>(1)</sup> UL L 125, 23.5.1996, str. 10.<sup>(2)</sup> UL L 65, 5.3.1998, str. 31.<sup>(3)</sup> UL L 290, 24.11.1993, str. 14.

- (9) Zaradi upoštevanja razvoja v znanstvenem in tehnološkem znanju so se prej ponovno pregledale Odločba Komisije 90/515/EGS z dne 26. septembra 1990 o določitvi referenčnih metod za odkrivanje ostankov težkih kovin in arzena <sup>(1)</sup>, Odločba Komisije 93/256/EGS z dne 14. maja 1993 o določitvi metod, ki se uporabljajo za odkrivanje ostankov snovi s hormonalnim ali tirostatičnim delovanjem <sup>(2)</sup> in Odločba Komisije 93/257/EGS z dne 15. aprila 1993 o določanju referenčnih metod in seznamu referenčnih laboratorijev za odkrivanje ostankov <sup>(3)</sup>, kakor je bila nazadnje spremenjena z Odločbo 98/536/ES <sup>(4)</sup>, in ugotovljeno je bilo, da so zastarele glede njihovega področja in določb ter jih je torej treba ustrezno razveljaviti s to odločbo.
- (10) Zaradi omogočanja prilagajanja metod za analiziranje uradnih vzorcev določbam te odločbe je treba določiti prehodno obdobje.
- (11) Ukrepi, predvideni s to odločbo, so v skladu z mnenjem Stalnega odbora za prehranjevalno verigo in zdravje živali –

SPREJELA NASLEDNJO ODLOČBO:

#### Člen 1

##### Vsebina in področje uporabe

Ta odločba določa pravila za analitske metode, ki jih je treba uporabljati pri preskušanju uradnih vzorcev, odvzetih v skladu z drugim stavkom člena 15(1) Direktive 96/23/ES, in podrobno določa skupna merila za razlago analitskih rezultatov uradnih nadzornih laboratorijev za takšne vzorce.

Ta odločba se ne uporablja za snovi, za katere so določena podrobnejša pravila v drugi zakonodaji Skupnosti.

#### Člen 2

##### Opredelitev pojmov

Za namene te odločbe se uporabljajo opredelitve pojmov iz Direktive 96/23/ES in iz Priloge k tej odločbi.

#### Člen 3

##### Analitske metode

Države članice zagotovijo, da se uradni vzorci, odvzeti v skladu z Direktivo D 96/23/ES analizirajo z uporabo metod, ki:

- so dokumentirane v preskusnih navodilih, po možnosti v skladu z ISO 78-2(6);
- so skladne z delom 2 Priloge k tej odločbi;
- so validirane v skladu s postopkom, opisanim v delu 3 Priloge;

<sup>(1)</sup> UL L 286, 18.10.1990, str. 33.

<sup>(2)</sup> UL L 118, 14.5.1993, str. 64.

<sup>(3)</sup> UL L 118, 14.5.1993, str. 75.

<sup>(4)</sup> UL L 251, 11.9.1998, str. 39.

- upoštevajo ustrezne meje najmanjše zahtevane učinkovitosti (MRPL), ki jih je treba določiti v skladu s členom 4.

#### Člen 4

##### Meje najmanjše zahtevane učinkovitosti

Ta odločba se ponovno pregleda, da se postopoma določijo meje najmanjše zahtevane učinkovitosti analitskih metod, ki jih je treba uporabiti za snovi, za katere se ni določila dovoljena meja.

#### Člen 5

##### Kontrola kakovosti

Države članice zagotovijo kakovost rezultatov analize vzorcev, odvzetih v skladu z Direktivo 96/23/ES, zlasti z nadzorom nad preskusi in/ali rezultati umeritev v skladu s poglavjem 5.9 ISO 17025 (1).

#### Člen 6

##### Razlaga rezultatov

- Rezultat analize se šteje kot neskladen, če se za analit preseže odločitvena meja potrditvene metode.
- Če se je za snov ugotovila dovoljena meja, je odločitvena meja tista koncentracija, nad katero se da s statistično gotovostjo 1 – a sklepati, da je dovoljena meja resnično presežena.
- Če se za snov ni ugotovila dovoljena meja, je odločitvena meja najnižji nivo koncentracije, pri kateri se da z neko metodo razločiti prisotnost posameznega analita s statistično gotovostjo 1 – a.
- Za snovi na seznamu v Skupini A Priloge k Direktivi 96/23/ES, je a- napaka 1 % ali manj. Za vse druge snovi je a- napaka 5 % ali manj.

#### Člen 7

##### Razveljavitev

Odločbe 90/515/GS, 93/256/EGS in 93/257/ES se razveljavijo.

#### Člen 8

##### Prehodne določbe

Metode za analizo uradnih vzorcev snovi na seznamu v skupini A Priloge I k Direktivi 96/23/ES, ki izpolnjujejo merila, določena v odločbah 90/515/EGS, 93/256/EGS in 93/257/EGS, se lahko uporabljajo do dve leti po uveljavitvi te odločbe. Metode, ki se sedaj uporabljajo za snovi na seznamu v skupini B Priloge I k Direktivi 96/23/ES morajo biti skladne s to odločbo najmanj pet let po dnevu začetka uporabe te odločbe.

*Člen 9***Datum začetka uporabe**

Ta odločba se uporablja od 1. septembra 2002.

*Člen 10***Naslovniki**

Ta odločba je naslovljena na države članice.

V Bruslju, 14. avgusta 2002

*Za Komisijo*

David BYRNE

*Član Komisije*

---

## PRILOGA

## MERILA UČINKOVITOSTI, DRUGE ZAHTEVE IN POSTOPKI ZA ANALITSKE METODE

## 1. OPREDELITEV POJMOV

- 1.1 Točnost pomeni čim boljše ujemanje med rezultatom preskušanja in sprejeto referenčno vrednostjo (2). Določi se s določanjem pravilnosti in natančnosti.
- 1.2 Napaka alfa ( $\alpha$ ) pomeni verjetnost, da je preskusni vzorec skladen, čeprav je dobljena neustrezna meritev (lažna neskladna odločitev).
- 1.3 Analit pomeni snov, ki jo je treba odkriti, identificirati in/ali izmeriti in derivate, ki se pojavijo med njeno analizo.
- 1.4 Napaka beta ( $\beta$ ) pomeni verjetnost, da je preskusni vzorec resnično neustrezen, čeprav je bila dobljena ustrezna meritev (lažna skladna odločitev).
- 1.5 Odstopanje (bias) pomeni razliko med pričakovanim rezultatom preskusa in sprejeto referenčno vrednostjo (2).
- 1.6 Umeritveni standard pomeni merilni pripomoček, ki predstavi količino iskane snovi na način, ki veže njeno vrednost na referenčno osnovo.
- 1.7 Certificirani referenčni material (CRM) pomeni material, ki je imel specificirano vsebnost analita, ki mu je bila pripisana.
- 1.8 Vzoredna kromatografija pomeni postopek, pri katerem se izvleček pred kromatografskimi koraki razdeli na 2 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 standardnega analita mora biti podobna ocenjeni količini analita v izvlečku. Ta metoda je namenjena za izboljšanje identifikacije analita, kadar se uporabljajo kromatografske metode, zlasti, kadar se ne da uporabiti noben interni standard.
- 1.9 Sodelovalno proučevanje pomeni analiziranje istega vzorca po isti metodi, da se določijo značilnosti učinkovitosti metode. Študija obsega naključno napako merjenja in laboratorijskega odstopanja.
- 1.10 Potrditvena metoda pomeni metode, ki dajejo celovite ali dodatne informacije, ki omogočajo, da se snov nedvoumno identificira in po potrebi kvantificira glede na iskani nivo.
- 1.11 Odločitvena meja (CCa) pomeni mejo, pri kateri in nad katero se lahko sklepa z verjetnostjo  $\alpha$ -napake, da je vzorec neskladen.
- 1.12 Sposobnost odkrivanja (CCb) pomeni najmanjšo vsebnost snovi, ki se lahko zazna, prepozna in/ali izmeri v vzorcu z verjetnostjo  $\beta$ -napake. V primeru snovi, kjer ni določena nobena dovoljena meja, je sposobnost zaznavanja najnižja koncentracija, pri kateri lahko metoda zazna resnično kontaminirane vzorce z statistično gotovostjo  $1 - \beta$ . V primeru snovi z določeno dovoljeno mejo to pomeni, da je sposobnost zaznavanja tista koncentracija, pri kateri lahko metoda zazna dovoljeno mejno koncentracijo s statistično natančnostjo  $1 - \beta$ .
- 1.13 Ojačan vzorčni material pomeni vzorec, ki je obogaten z znano količino analita, ki ga je treba odkriti.
- 1.14 Medlaboratorijska študija (primerjava) pomeni organizacijo, izvedbo in ovrednotenje preskusov istega vzorca v dveh ali več laboratorijih v skladu z naprej določenimi pogoji, da se določi učinkovitost preskušanja. V skladu z namenom se lahko študija uvrsti kot sodelovalna študija ali strokovna študija.
- 1.15 Interni standard (IS) pomeni snov, ki ni vsebovana v vzorcu s fizikalno-kemičnimi lastnostmi, čimbolj podobnim tistim od analita, ki ga je treba identificirati in ki je dodan vsakemu vzorcu kot tudi vsakemu umeritvenemu standardu.
- 1.16 Laboratorijski vzorec pomeni vzorec, ki je pripravljen za pošiljanje v laboratorij in je namenjen za preiskovanje ali preskušanje.
- 1.17 Iskani nivo pomeni koncentracijo snovi ali analita v vzorcu, ki je pomembna za določitev skladnosti z zakonodajo.
- 1.18 Meja najmanjše zahtevane učinkovitosti (MRPL) pomeni najmanjšo vsebnost analita v vzorcu, ki ga je treba najmanj zaznati in potrditi. Namenjena je za uskladitev analitskega izvajanja metod za snovi, za katere se ni določila nobena dovoljena meja.

- 1.19 Značilnost učinkovitosti pomeni funkcionalno kakovost, ki se lahko pripiše analitski metodi. To je lahko na primer specifičnost, točnost, pravilnost, natančnost, ponovljivost, obnovljivost, izplen, sposobnost zaznavanja in robustnosti.
- 1.20 Merila učinkovitosti pomenijo zahteve za značilnosti učinkovitosti, v skladu s katerimi se lahko prisodi, da je analitska metoda primerna za ta namen in da daje zanesljive rezultate.
- 1.21 Dovoljena meja pomeni mejo največjega ostanka, največji nivo ali drugo največje dovoljeno odstopanje za snovi, določene drugod v zakonodaji Skupnosti.
- 1.22 Natančnost pomeni čim boljše ujemanje med neodvisnimi rezultati preskusov, dobljenimi pod nekaterimi (vnaprej določenimi) pogoji. Mera natančnosti se navadno izrazi kot netočnost in se izračuna kot standardni odmik rezultata preskusa. Manjša natančnost je določena z večjim standardnim odklikom (2).
- 1.23 Študija strokovne usposobljenosti pomeni analiziranje istega vzorca pri kateri laboratoriji izberejo svoje lastne metode, pod pogojem da se te metode uporabljajo pod rutinskimi pogoji. Študija mora biti izvedena v skladu z ISO smernicami 43-1 (3) in 43-2 (4) in se lahko uporablja za oceno metod ponovljivosti.
- 1.24 Kvalitativna metoda pomeni analitsko metodo, ki identificira snov na osnovi njenih kemičnih, bioloških ali fizikalnih lastnosti.
- 1.25 Kvantitativna metoda pomeni analitsko metodo, ki določa količino ali masni delež snovi, tako da se lahko izrazi kot številčna vrednost primernih enot.
- 1.26 Določanje slepega reagenta pomeni izvedbo celotnega analitskega postopka brez dodatka za preskus uporabljenega dela preiskovanega vzorca ali ki uporablja ekvivalentno količino primerne topila namesto za preskus uporabljenega dela preiskovanega vzorca.
- 1.27 Izplen pomeni odstotek dejanske koncentracije snovi, ki se pridobi nazaj med analitskim postopkom. Določi se med validiranjem, če ni na voljo certificiranega referenčnega materiala.
- 1.28 Referenčni material pomeni material, katerega ena ali več lastnosti se je potrdila z validirano metodo, tako da se lahko uporablja za umerjanje aparata ali za preverjanje merilne metode.
- 1.29 Ponovljivost pomeni natančnost v pogojih ponovljivosti (2).
- 1.30 Pogoji ponovljivosti pomenijo pogoje, kjer se dobijo neodvisni preskusni rezultati z isto metodo na enakih preskusnih primerkih v istem laboratoriju z istim operaterjem, ki uporablja isto opremo (2).
- 1.31 Obnovljivost pomeni natančnost v pogojih obnovljivosti (2)(4).
- 1.32 Pogoji obnovljivosti pomenijo pogoje, kjer se preskusni rezultati dobijo z isto metodo na enakih preskusnih primerkih v različnih laboratorijih z različnimi operaterji, ki uporabljajo različno opremo (2)(4).
- 1.33 Robustnost pomeni občutljivost analitske metode za spremembe v eksperimentalnih pogojih, ki se lahko izrazijo kot seznam vzorčnega materiala, analitov, skladiščnih pogojev, okoljskih pogojev in/ali pogojev priprave vzorca, v katerih se lahko metoda uporabi, kot je predstavljena ali z manjšimi podrobno podanimi spremembami. Navedeni morajo biti vsi tisti eksperimentalni pogoji, katerih sprememba bi v praksi lahko bila predmet nestabilnosti (npr. stabilnost reagenta, sestava vzorca, pH, temperatura) in bi lahko vplivala na analitski rezultat.
- 1.34 Slepo določanje vzorca pomeni celoten analitski postopek, uporabljen pri preskusnem deležu, ki je vzet iz vzorca, v katerem zanesljivo ni analita.
- 1.35 Presejalna metoda pomeni metode, ki se uporabljajo za odkrivanje prisotnosti snovi ali vrste snovi na iskanem nivoju. Te metode imajo sposobnost za visoko vzorčno prepustnost in se uporabljajo za presejanje velikega števila vzorcev zaradi potencialnih neskladnih rezultatov. Prilagojene so na nizek delež lažno skladnih rezultatov.
- 1.36 Notranja laboratorijska študija (znotraj laboratorijske validacije) pomeni analitsko študijo enega samega laboratorija, ki uporablja eno metodo za analiziranje istih ali različnih preskusnih materialov pod različnimi pogoji v utemeljenih dolgotrajnih posledicah.
- 1.37 Specifičnost pomeni sposobnost metode, da razlikuje med analitom, ki se meri in drugimi snovmi. Ta značilnost je v glavnem funkcija opisanih merilnih tehnik, vendar se lahko razlikuje v skladu z vrsto spojine ali matriksa.

- 1.38 Standardno dodajanje je postopek, pri katerem se preskusni vzorec razdeli na dva ali več preskusnih deležev. En delež se analizira kot kak, drugemu deležu preskusnega vzorca pa se pred analizo dodajo znane količine standardnega analita. Količina dodanega standardnega analita mora biti med dva do petkratno ocenjeno količino analita v vzorcu. Ta postopek je namenjen za določanje vsebnosti analita v vzorcu ob upoštevanju izplena analitskega postopka.
- 1.39 Standardni analit pomeni analit znane ali certificirane vsebnosti in čistoče, ki ga je treba uporabiti kot referenco pri analizi.
- 1.40 Snov pomeni tvarino posebne ali določene kemične sestave in njene metabolite.
- 1.41 Za preskus uporabljeni del vzorca pomeni količino materiala, odvzetega od preskusnega vzorca, na katerem se opravlja preskus ali opazovanje.
- 1.42 Vzorec pomeni vzorec, pripravljen iz laboratorijskega vzorca in od katerega bodo odvzeti za preskus uporabljeni deleži vzorca.
- 1.43 Pravilnost pomeni čim boljše ujemanje med povprečno vrednostjo, dobljeno iz velike serije rezultatov preskusov in sprejeto referenčno vrednostjo. Pravilnost se običajno izrazi kot odstopanje (2).
- 1.44 Enote pomenijo enote, opisane v ISO 31 (20) in Direktivi 71/754/ES (19).
- 1.45 Validacija pomeni potrditev s pregledovanjem in zagotavljanjem zadostnega dokaza, da so izpolnjene podrobne zahteve za posebej namenjeno uporabo (1).
- 1.46 Interna laboratorijska obnovljivost pomeni natančnost, dobljeno v istem laboratoriju pod določenimi (vnaprej določenimi) pogoji (glede npr. metode, preskusnih materialov, operaterjev, okolja) v utemeljeno dolgih časovnih presledkih.

## 2. MERILA UČINKOVITOSTI IN DRUGE ZAHTEVE ZA ANALITSKE METODE

Analitske metode ali kombinacije metod razen tistih, ki so opisane spodaj, se lahko uporabljajo le za pregledovalne ali potrditvene namene, če se lahko dokaže, da izpolnjujejo ustrezne zahteve, določene v tej odločbi.

### 2.1 SPLOŠNE ZAHTEVE

#### 2.1.1 Ravnanje z vzorci

Vzorci se pridobijo, obravnavajo in obdelajo na tak način, da obstaja največja možnost za odkrivanje snovi. Postopki za ravnanje z vzorci preprečijo možnost naključne okužbe ali izgube analitov.

#### 2.1.2 Izvajanje preskusov

##### 2.1.2.1 Izplen

Med analizo vzorcev se da izplen določiti v vsaki seriji vzorcev, če se uporabi stalni korekcijski faktor izplena. Če je izplen v mejah, se potem lahko uporablja stalni korekcijski faktor. V nasprotnem primeru se za tisto posebno serijo uporabi dobljeni faktor izplena, razen če ni treba uporabiti posebnega faktorja izplena analita v vzorcu. V tem primeru se uporabi metoda standardnega dodatka (glej 3.5) ali metoda internega standarda za kvantitativno določanje analita v vzorcu.

##### 2.1.2.2 Specifičnost

Metoda mora biti sposobna razlikovati med analitom in drugimi snovmi v eksperimentalnih pogojih. Oceno, do katere mere je to možno, je treba predvideti. Uporabiti se morajo strategije odpravljanja motenj s snovmi med uporabo opisane merilne tehnike, npr. treba je uporabiti homologne, analogne, presnovne produkte v iskanem ostanku. Prvenstveno je pomembno preiskati motnje, ki bi lahko izvirale iz sestavin matriksa.

### 2.2 PRESEJALNE METODE

Samo tiste analitske tehnike, za katere se lahko na dokumentirano sledljiv način prikaže, da so validirane in imajo stopnjo lažno skladnih rezultatov na iskanem nivoju nižjo kot 5 % (b-napaka), se lahko uporabljajo za presejalne namene v skladu z Direktivo 96/23/ES. V primeru sumljivega neskladnega rezultata se ta rezultat potrdi s potrditveno metodo.

## 2.3 POTRĐITVENE METODE ZA ORGANSKE SNOVI IN KONTAMINANTE

Potrditvene metode za ostanke organskih snovi ali kontaminantov morajo praviloma podati informacije o kemijski zgradbi analita. Zato metode, ki temeljijo samo na kromatografski analizi brez uporabe spektrometrične detekcije, same po sebi niso primerne za uporabo kot potrditvene metode. Vendar če posamezna tehnika nima zadostne specifičnosti, se želena specifičnost doseže z analitskimi postopki, ki so sestavljeni iz primernih kombinacij čiščenja, kromatografskega ločevanja in spektrometrične detekcije.

Naslednje metode ali kombinacije metod se štejejo kot primerne za identifikacijo organskih ostankov ali kontaminantov za navedene skupine snovi:

Tabela 1

## Primerne potrditvene metode za organske ostanke in kontaminante

Merilna tehnika	Snovi Priloga 1 96/23/ES	Omejitve
LC ali GC z masno spektrometrično detekcijo	Skupini A in B	Samo če sledi ali on-line ali off-line kromatografski separaciji Samo, če se uporabijo tehnike snemanjem celotnega spektra ali z uporabo najmanj 3 (skupine B) ali 4 (skupine A) identifikacijskih točk za tehnike, ki ne beležijo celotnih masnih spektrov
LC ali GC z infrardečim zaznavanjem	Skupini A in B	Izpolnjene morajo biti posebne zahteve za absorpcijo v infrardeči spektrometriji
LC snemanje celotnega spektra z detektorjem z diodnim nizom (DAD)	Skupina B	Izpolnjene morajo biti posebne zahteve za absorpcijo v spektrometriji UV
LC- fluorescenca	Skupina B	Samo za molekule, ki kažejo primarno fluorescenco in molekule, ki kažejo fluorescenco ali po preoblikovanju ali po derivatizaciji
2-D TLC- pregledovanje celotnega spektra UV/VIS	Skupina B	Obvezna sta dvodimenzionalni HTPLC in vzporedna kromatografija
GC Detekcija z zajetjem elektronov (ECD)	Skupina B	Samo, če se uporabita dve koloni različne polarnosti
LC imunogram	Skupina B	Samo, če se uporabita najmanj dva različna kromatografska sistema ali pa druga, neodvisna detekcijska metoda
LC-UV/VIS (ena valovna dolžina)	Skupina B	Samo, če se uporabita najmanj dva različna kromatografska sistema ali pa druga, neodvisna detekcijska metod

## 2.3.1 Skupna merila učinkovitosti in zahteve

Potrditvena metoda praviloma zagotavlja podatke o kemijski zgradbi analita. Kadar se več kot ena sestavina enako odziva, tedaj metoda ne more razlikovati med temi sestavinami. Metode, ki temeljijo samo na kromatografski analizi brez uporabe spektrometrične detekcije, niso primerne, za uporabo kot potrditvene metode same po sebi.

Kjer se uporablja metoda internega standarda, je le tega potrebno dodati preskušnemu deležu na začetku ekstrakcijskega postopka. Glede na razpoložljivost se uporabljajo ali analiti stabilne izotopsko označene oblike, ki so zlasti primerni za masno spektrometrično detekcijo ali sestavine, ki so strukturno sorodne z analitom.

Kjer se ne more uporabiti noben interni standard, se identifikacija analita potrdi s vzporedno kromatografijo. V tem primeru se zazna le en kromatografski vrh, povečana višina vrha (ali ploščine pod vrhom) pa je enaka količini dodanega analita. Pri uporabi plinske kromatografije (GC) ali tekočinske kromatografije (LC) je širina vrha pri polovici največje višine v obsegu 90 – 110 % prvotne širine in retencijski časi so enaki v okviru vrednosti 5 %. V primeru tankoplastne kromatografske (TLC) metode se intenzivira samo madež, za katerega se domneva, da je nastal zaradi analita; ne sme se pojaviti nov madež, vizualni izgled madeža pa se ne sme spreminjati.



Tako referenčni ali ojačani material, ki vsebuje znane količine analita na ali blizu dovoljene ali odločitvene meje (neskladen kontrolni vzorec - pozitivna kontrola), kot tudi skladni kontrolni materiali (negativna kontrola) in slepi reagenti naj po možnosti gredo skozi vse faze preskusnega postopka istočasno z vsako serijo analiziranih preskušanih vzorcev. Vrstni red za injiciranje ekstraktov v analitski instrument je naslednji: slepi reagent, skladen kontrolni vzorec, vzorec/vzorci, ki ga/jih je treba potrditi, zopet skladen kontrolni vzorec in končno neskladen kontrolni vzorec. Vsako spremembo tega zaporedja je potrebno utemeljiti.

### 2.3.2 Dodatna merila učinkovitosti in druge zahteve za kvantitativne analitske metode

#### 2.3.2.1 Pravilnost kvantitativnih metod

V primeru ponovljenih analiz potrjenega referenčnega materiala so priporočeni razponi odmika eksperimentalno določene srednje masne frakcije, korigirane z izplenom, od potrjene vrednosti naslednje:

**Tabela 2**

#### Najmanjša pravilnost kvantitativnih metod

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

Če ni na voljo nobenih takšnih CRM, je sprejemljivo, da se pravilnost meritev oceni z izplenom dodatkov znanih količin analita/analitov slepemu matriksu. Podatki, ki se korigirajo s povprečnim izplenom, so sprejemljivi samo, kadar so v razponu, prikazanem v tabeli 2.

#### 2.3.2.2 Natančnost kvantitativnih metod

Medlaboratorijski koeficient variacije (CV) za ponovljene analize referenčnega ali ojačanega materiala v pogojih obnovljivosti naj ne presega nivoja, izračunanega po Horwitzovi enačbi. Enačba je:

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

kjer je C masni delež, izražen kot potenca (eksponent) 10 (npr. 1 mg/g = 10<sup>-3</sup>). Primeri so prikazani v tabeli 3.

**Tabela 3**

#### Primeri obnovljivosti CV za kvantitativne metode v razponu masnih deležev analita

Masni delež	Obnovljivost CV (%)
1 mg/kg	(*)
10 mg/kg	(*)
100 mg/kg	23
1 000 mg/kg (1mg/kg)	16

(\*) Za masne deleže, ki so nižji od 100 mg/kg, daje uporaba Horwitzove enačbe nesprejemljivo visoke vrednosti. Zato so CV za koncentracije, nižje od 100 mg/kg, čim nižje.

Za analize, izvedene v pogojih ponovljivosti, bi znotrajlaboratorijski CV bil tipično med polovico in dvema tretjinama zgornjih vrednosti. Za analize, izvedene v pogojih znotrajlaboratorijske obnovljivosti, je znotrajlaboratorijski CV višji kot CV obnovljivosti.

V primeru snovi z določeno dovoljeno mejo, doseže metoda v internem laboratoriju obnovljivost, ki ni večja od ustrezne obnovljivosti CV pri koncentraciji 0,5 x dovoljena meja.



### 2.3.3 Merila učinkovitosti in druge zahteve za masno spektrometrično detekcijo

Masne spektrometrične metode je primerno upoštevati kot potrditvene metode le kot nadaljevanje on-line ali off-line kromatografskega ločevanja.

#### 2.3.3.1 Kromatografsko ločevanje

Za postopke GC-MS se izvede plinsko kromatografsko ločevanje z uporabo kapilarnih kolon. Za postopke LC-MS postopke se kromatografsko ločevanje izvede z uporabo primernih kolon LC. V vsakem primeru je najmanjši sprejemljivi retencijski čas za preiskovani analit dvakratni retencijski čas, ki ustreza prostemu volumnu kolone. Retencijski čas (ali relativni retencijski čas) analita v preskušanem deležu ustreza času umeritvenega standarda v specficiranem okencu retencijskega časa. Okence retencijskega časa je sorazmerno z močjo ločevanja kromatografskega sistema. Razmerje kromatografskega retencijskega časa analita proti času interne standarda, t.j. relativni retencijski čas analita, ustreza tistemu od umeritvene raztopine pri toleranci  $\pm 0,5$  % za GC in  $\pm 2,5$  % za LC.

#### 2.3.3.2 Masna spektrometrična detekcija

Masna spektrometrična detekcija se izvaja z uporabo MS tehnik, kot so snemanje celotnih masnih spektrov (full scan) ali izbrano spremljanje ionov (SIM), kakor tudi tehnike MS-MS<sup>n</sup> kot je izbrano spremljanje reakcije (SMR) ali druge primerne MS ali MS-MS<sup>n</sup> tehnike v kombinaciji z ustreznimi načini ionizacije. Pri masni spektrometriji visoke ločljivosti (HRMS), je ločljivost tipično večja od 10 000 za celotni masni razpon pri 10 % višini doline.

Snemanje celotnega spektra (Full scan): Ko se masno spektrometrično določanje izvaja s snemanjem celotnega spektra, je obvezna prisotnost vseh merjenih diagnostičnih ionov (molekularni ion, značilni adukti molekularnega iona, karakteristični fragmentni ioni in vsi njihovi izotopni ioni) z relativno intenziteto več kot 10 % v referenčnem spektru umeritvenega standarda.

SIM: Ko se masno spektrometrično določanje izvaja s fragmentografijo, je molekularni ion po možnosti eden od izbranih diagnostičnih ionov (molekularni ion, značilni adukti molekularnega iona, značilni fragmentni ioni in vsi njihovi izotopni ioni). Izbrani diagnostični ioni naj ne bi izvirali izključno iz istega dela molekule. Razmerje signal proti šumu za vsak diagnostični ion je 3:1.

Snemanje celotnega spektra in SIM: relativne intenzitete zaznanih ionov, izraženih kot odstotek intenzitete najbolj intenzivnega iona ali prehajanja, ustrezajo intenzitetam umeritvenega standarda, bodisi iz umeritvenih standardnih raztopin bodisi iz vzorcev s standardnim dodatkom, ob primerljivih koncentracijah, izmerjenih pod istimi pogoji v naslednjih tolerancah:

**Tabela 4**

#### Največje dovoljene tolerance za relativne ionske intenzitete z uporabo lestvice masnih spektrometričnih tehnik

Relativna intenziteta (% osnovnega vrha)	EI-CG-MS (relativno)	CI-GC-MS, GC-MS <sup>n</sup> LC-MS,LC-MS <sup>n</sup>
> 50 %	$\pm 10$ %	$\pm 20$ %
> 20 % do 50 %	$\pm 15$ %	$\pm 25$ %
> 10 % do 20 %	$\pm 20$ %	$\pm 30$ %
$\leq 10$ %	$\pm 50$ %	$\pm 50$ %

Razlaga masnih spektralnih podatkov: Relativne intenzitete diagnostičnih ionov in/ali prekurzorjev/produktov ionskih parov morajo biti identificirane s primerjanjem spektrov ali z integriranjem signalov posameznih masnih sledi. Kadarkoli se uporabi korekcija ozadja, se to opravi enakomerno skozi vso serijo (glej 2.3.1, odstavek 4) in se jasno označi.

Snemanje celotnega spektra: Ko se celotni spektri posnemajo z masno spektrometrijo (GC-MS), morajo biti prisotni najmanj štiri ioni z relativno intenziteto 10 % osnovnega vrha. Molekularni ion se vključi, če je prisoten v referenčnem spektru z relativno intenziteto 10 %. Najmanj štiri ioni naj ležijo v največjih dovoljenih tolerancah za relativne ionske intenzitete (tabela 5). Uporablja se lahko računalniško podprta knjižnično iskanje. V tem primeru mora primerjava masnih spektralnih podatkov v preskušanem vzorcu z tistimi v umeritveni raztopini presegati kritični faktor ujemanja. Ta faktor se določi med validacijskim postopkom za vsak analit na osnovi spektrov, za katere so izpolnjena spodaj opisana merila. Preveri se variabilnost v spektrih, ki jo povzroči matriks vzorca in učinkovitost detektorja.

SIM: Kadar se masni fragmenti merijo po drugih metodah razen s snemanjem celotnega spektra, se za razlago podatkov uporabi sistem identifikacijskih točk. Za potrditev snovi na seznamu v Skupini A Priloge I Direktive 96/23/ES se zahtevajo najmanj 4 identifikacijske točke. Za potrditev snovi na seznamu v Skupini B Priloge I Direktive 96/23/ES se zahtevajo najmanj 3 identifikacijske točke. Spodnja tabela prikazuje število identifikacijskih točk, ki jih lahko pridobi vsaka od osnovnih masnih spektrometričnih tehnik. Vendar, da bi izpolnili pogoje, ki se zahtevajo za potrditev in izračun vsote identifikacijskih točk:

- (a) se izmeri najmanj eno od ionskih razmerij in
- (b) vsa ustrezna izmerjena ionska razmerja izpolnjujejo zgoraj navedene pogoje in
- (c) se lahko kombinirajo največ tri ločene tehnike, da se doseže najmanjše število identifikacijskih točk.

Tabela 5

## Razmerje med razredno lestvico masnih fragmentov in dobljenimi identifikacijskimi točkami

MS tehnika	Identifikacijske točke pridobljene na ion
Masna spektrometrija nizke ločljivosti (LR)	1,0
Prekurzor ion LR- MS <sup>a</sup>	1,0
Prehodni proizvodi LR- MS <sup>a</sup>	1,5
HRMS	2,0
Prekurzor ion HR- MS <sup>a</sup>	2,0
Prehodni proizvodi HR- MS <sup>a</sup>	2,5

Opombe:

- (1) Vsak ion se šteje samo enkrat.
- (2) GC-MS, ki uporablja elektronsko ionizacijo, se šteje za drugačno tehniko od GC-MS, ki uporablja kemijsko ionizacijo.
- (3) Različni analiti se lahko uporabijo za povečanje identifikacijskih točk samo, če se za derivate uporabljajo različne reakcijske kemije.
- (4) Za snovi v Skupini A Priloge 1 Direktive 96/23/ES, če je uporabljena ena od naslednjih tehnik v analitskem postopku: HPLC povezano s spektrometrijo z diodnim nizom pri celotnem snemanju (full-scan diode array spectrometry, DAD); HPLC povezano s fluorescentno detekcijo; HPLC povezano z imunogramom; dvodimenzionalno TLC povezano s spektrometrično detekcijo; prispeva se lahko največ ena identifikacijska točka, če so izpolnjena ustrezna merila za te tehnike.
- (5) Prehodni proizvodi vključujejo naslednike in njihove podnaslednike.

Tabela 6

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

Tehnika(e)	Število ionov	Identifikacijske točke
GC-MS (EI ali CI)	N	n
GC-MS (EI in CI)	2(EI) + 2 (ci)	4
GC-MS (EI ali CI) 2 derivata	2 (derivat A) + 2 (derivat B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prekurzor in 2 naslednika	4
LC-MS-MS	1 prekurzor in 2 naslednika	4
GC-MS-MS	2 prekurzorja iona, vsak z enim naslednikom	5
LC-MS-MS	2 prekurzorja iona, vsak z 1 naslednikom	5
LC-MS-MS-MS	1 prekurzor, 1 naslednik in 2 podnaslednika	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS in LC-MS	2 + 2	4
GC-MS in HRMS	2 + 1	4

### 2.3.4 Merila učinkovitosti in druge zahteve za kromatografijo povezano z infrardečo detekcijo

Adekvatni vrhi: adekvatni vrhi so največje absorpcijske vrednosti v infrardečem spektru umeritvenega standarda, ki izpolnjuje naslednje zahteve.

#### 2.3.4.1 Infrardeča detekcija

Absorpcijski maksimum: je v razponu valovnega števila 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$ .

Intenziteta absorpcije: ni manjša od bodisi:

(a) specifične molske absorbance 40 glede na bazno linijo; bodisi

(b) relativne absorbance 12,5 % od absorbance najintenzivnejšega vrha v predelu 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$

kadar sta oba merjena glede na absorbanco nič, in 5 % absorbance najintenzivnejšega vrha v predelu 4 000-500  $\text{cm}^{-1}$ , kadar sta oba merjena glede na njuno bazno linijo vrha.

*Opomba:*

Čprav imajo adekvatni vrhi po (a) morda prednost s teoretičnega stališča, pa se tisti po (b) lažje določijo v praksi.

Določijo se število vrhov v infrardečem spektru analita, čigar frekvenca ustreza adekvatnemu vrhom v spektru umeritvenega standarda v mejah  $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.3.4.2 Razlaga infrardečih spektralnih podatkov

Absorpcija je prisotna v vseh predelih analita, ki ustrezajo adekvatnemu vrhu v referenčnem spektru umeritvenega standarda. V infrardečem spektru umeritvenega standarda se zahteva najmanj 6 adekvatnih vrhov. Če je manj kot šest adekvatnih vrhov (7), se sporni spekter ne more uporabiti kot referenčni spekter. „Rezultat“, t.j. odstotek adekvatnih vrhov, ugotovljenih v infrardečem spektru analita je najmanj 50. Kjer ni točnega ujemanja za adekvatni vrh, je sovisen predel spektra analita skladen s prisotnostjo ujemajočega se vrha. Postopek velja le za absorpcijske vrhe v vzorčnem spektru z najmanj trikratno intenzivnostjo razmerja šum/vrh.

### 2.3.5 Merila učinkovitosti in druge zahteve za določanje analita z uporabo LC z drugimi detekcijskimi tehnikami

#### 2.3.5.1 Kromatografsko ločevanje

Interni standard se uporablja, če je na voljo material, ki je primeren za ta namen. Če je možno, je to standard, ki ima retencijski čas blizu retencijskega časa analita. Analit se eluira v retencijskem času, ki je tipičen za ustrežni umeritveni standard pod istimi eksperimentalnimi pogoji. Najmanjši sprejemljivi retencijski čas za analit je dvakratni retencijski čas, ki ustreza prostemu volumnu kolone. Razmerje retencijskega časa analita in internega standarda, t.j. relativnega retencijskega časa analita, je enako tistemu od umeritvenega standarda v primernem matriksu v mejah  $\pm 2,5 \%$ .

#### 2.3.5.2 Detekcija s snemanjem celotnega spektra (full-scan)UV/VIS

Merila učinkovitosti za metode LC morajo biti izpolnjena.

Maksimumi absorpcije v spektru analita so pri enaki valovni dolžini, kot jih ima umeritveni standard, v mejah, določenih s ločljivostjo detekcijskega sistema. Za detekcijo z diodnim nizom (diode array detection) je to tipično v mejah  $\pm 2 \text{ nm}$ . Pri valovni dolžini nad 220 nm se spekter analita, v delih, kjer je relativna absorbanca obeh spektrov  $\geq 10 \%$ , od spektra umeritvenega standarda vidno ne razlikuje. To merilo je izpolnjeno, ko so prisotne, prvič največje vrednosti in drugič, ko razlika med obema spektroma na nobeni opazovani točki ni večja od 10 % absorbance umeritvenega standarda. V primeru uporabe računalniško podprtega knjižničnega iskanja in potrjevanja, mora primerjava spektralnih podatkov preskušanih vzorcev in umeritvene raztopine presegati kritični faktor ujemanja. Ta faktor se določi med postopkom validacije za vsak analit na osnovi spektrov, za katere so izpolnjena zgoraj opisana merila. Pregleda se variabilnost v spektrih, ki jo povzročijo vzorčni matriks in učinkovitost detekcije.

### 2.3.5.3 Merila učinkovitosti fluorimetrične detekcije

Merila učinkovitosti za metode LC morajo biti izpolnjena.

To velja za molekule, ki so same po sebi fluorescenčne in molekule, ki kažejo fluorescenco ali po preoblikovanju ali po derivaciji. Izbira vzbujalnih in emisijskih valovnih dolžin v kombinaciji s kromatografskimi pogoji se opravi na ta način, da se pojavnost motečih komponent v ekstraktih slepega vzorca spravi na najnižjo možno raven.

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

### 2.3.5.4 Merila učinkovitosti za določitev analita po imunogramu LC

Imunogram LC ni sam primeren za uporabo kot potrditvena metoda.

Izpolnjena morajo biti ustrezna merila za metode LC.

Predhodno določeni parametri za nadzor kakovosti, npr. nespecifična vezava, relativna vezava kontrolnih vzorcev, vrednost absorbance slepega vzorca morajo biti v mejah, dobljenih med validacijo preskusa.

Imunogram mora biti sestavljen iz najmanj petih frakcij.

Vsaka frakcija je manjša od polovice širine vrha.

Frakcija z največjo vsebnostjo analita mora biti enaka za sumljiv vzorec, neustrezen kontrolni vzorec in standard.

### 2.3.5.5 Določitev analita z uporabo LC z detekcijo UV/VIS (enovalovno)

LC z (enovalovno) detekcijo UV/VIS ni sama primerna za uporabo kot potrditvena metoda.

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

### 2.3.6 Merila učinkovitosti in druge zahteve za določitev analita z 2-D TLC združeno s spektrometrično detekcijo UV/VIS s snemanjem celotnega spektra

Obvezna sta dvodimenzionalna HTPLC in vzporedna kromatografija.

Vrednosti RF analita se ujemajo z vrednostmi standardov RF v  $\pm 5$  %.

Vizualni izgled analita je enak izgledu standarda.

Za madeže iste barve naj bo središče najbližjega madeža ločeno od centra madeža analita za najmanj polovico vsote premerov madeža.

Spekter analita se vizualno ne razlikuje od spektra standarda, kakor je opisan za UV/VIS detekcijo s snemanjem celotnega spektra.

V primeru uporabe računalniško podprtega knjižničnega iskanja in primerjanja, mora primerjava spektralnih podatkov v preskušanih vzorcih in podatkov umeritvene raztopine, presežati kritični faktor ujemanja. Ta faktor se določi med postopkom validacije za vsak analit na osnovi spektrov, za katere so izpolnjena zgoraj opisana merila. Pregleda se variabilnost v spektrih, ki jo povzroči vzorčni matriks in učinkovitost detekcije.

### 2.3.7 Merila učinkovitosti in zahteve za določitev analita po GC v kombinaciji z detekcijo z zajemanjem elektronov (ECD)

Interni standard se uporabi, če je na voljo material, ki je primeren za ta namen. Po možnosti je to sorodna snov z retencijskim časom, ki je blizu istemu, ki ga ima analit. Analit se izloči ob retencijskem času, ki je tipičen za ustrezni umeritveni standard pod istimi eksperimentalnimi pogoji. Najmanjši sprejemljivi retencijski čas za analit je dvakratni retencijski čas, ki ustreza prostemu volumnu kolone. Razmerje med retencijskim časom analita in tistim od internega standarda, t. j. relativnim retencijskim časom analita je isti kot čas umeritvenega standarda v ustreznem matriksu v mejah  $\pm 0,5$  %. Najbližja najvišja točka vrha v kromatogramu se loči od označenega vrha analita za najmanj eno celo širino vrha pri 10 % največje višine vrha analita. Za dodatne informacije se lahko uporabi vzporedna kromatografija.

## 2.4 POTRĐITVENE METODE ZA ELEMENTE

Potrditvene analize za kemične elemente temeljijo na konceptu nedvoumne identifikacije ter točne in natančne kvantifikacije s pomočjo fizikalno-kemičnih lastnosti, ki so edinstvene za obravnavani kemični element (npr. karakteristična valovna dolžina elementa oddanega ali prejetega sevanja, atomska masa) na iskanem nivoju..

Za identifikacijo kemičnih elementov se štejejo primerne naslednje metode ali kombinacije metod:

Tabela 7

## Primerne potrditvene metode za kemične elemente

Tehnika	Merjeni parameter
Diferenčna impulzna anodna Stripping voltametrij	Električni signal
Atomska absorpcijska spektrometrija	
Plamenska	Valovna dolžina absorpcije
Nastajanje hidridov	Valovna dolžina absorpcije
Hladilne pare	Valovna dolžina absorpcije
Elektrotermična atomizacija (grafitna peč)	Valovna dolžina absorpcije
Atomska emisijska spektrometrija	
Induktivno sklopljena plazma	Valovna dolžina sevanja
Masna spektrometrija	
Induktivno sklopljena plazma	Razmerje masa/naboj

## 2.4.1 Splošna merila učinkovitosti in druge zahteve za potrditvene metode

Tako referenčni ali ojačani material, ki vsebuje znane količine analita na ali blizu dovoljene ali odločitvene meje (neskladen kontrolni vzorec - pozitivna kontrola), kot tudi skladni kontrolni materiali (negativna kontrola) in slepi reagenti naj po možnosti gredo skozi vse faze preskusnega postopka istočasno z vsako serijo analiziranih preskušanih vzorcev.

Na splošno zahteva večina analitskih tehnik popoln razkroj organskega matriksa, da se dobijo raztopine za določevanje analita. To se lahko doseže z uporabo mikrovalovnih mineralizacijskih postopkov, ki kar najbolj zmanjšajo tveganje izgube in/ali kontaminacije iskanih analitov. Uporabljajo se dekontaminirane posode iz teflona dobre kakovosti. Če se uporabijo druge mokre ali suhe metode razkroja, se mora dokumentirano izključiti morebiten pojav izgube ali kontaminacije. Kot alternativo za razkroj, se lahko pod določenimi pogoji izberejo postopki ločevanja (npr. ekstrakcija), za ločevanje analitov od sestavin matriksa in/ali njihovega koncentriranja z namenom, da se uvedejo v analitsko opremo.

Kar se tiče umeritve, ali zunanje ali na osnovi metode standardnega dodatka, je treba paziti, da se ne preseže delovni obseg, ki je določen za analizo. V primeru zunanje umeritve, je obvezno, da so umeritveni standardi pripravljene v raztopini, ki se kar najbolj ujema z zgradbo vzorčne raztopine. Uporabi se tudi korekcija ozadja, če to zahtevajo posebne analitske okoliščine.

## 2.4.2 Dodatna merila učinkovitosti in druge zahteve za kvantitativne analitske metode

## 2.4.2.1 Pravilnost kvantitativnih metod

V primeru ponovljenih analiz certificiranih referenčnih materialov za elemente, odmik eksperimentalno določene srednje vsebnosti od potrjene vrednosti ni večji od  $\pm 10$  %. Če ustreznih CRM ni na voljo, je sprejemljivo, da se pravilnost meritev oceni preko izplena dodatkov znanih količin elementa neznanim vzorcem. Pozornost se posveti dejstvu, da se za razliko od analita, dodani element ne veže kemično v pravi matriks in da imajo rezultati, dobljeni po tem pristopu, manjšo veljavo kakor tisti, ki se dosežejo z uporabo CRM. Podatki o izplenu so sprejemljivi samo, če so v okviru  $\pm 10$  % ciljne vrednosti.

#### 2.4.2.2 Natančnost kvantitativnih metod

V primeru ponovljene analize vzorca, opravljene v znotraj laboratorijskih pogojih obnovljivosti, znotrajlaboratorijski koeficient variacije (CV) povprečja ne presega naslednjih vrednosti:

**Tabela 8**

#### CV za kvantitativne metode pri razponu masnih deležev elementa

Masni delež	CV (%)
≥ 10 mg/kg do 100 mg/kg	20
> 100 mg/kg do 1 000 mg/kg	15
≥ 1 000 mg/kg	10

#### 2.4.3 Posebne zahteve za diferenčno impulzno anodno stripping voltametrijo (DPASV)

Popoln razkroj organske snovi v vzorcih pred določitvami z DPASV je najpomembnejši. Na voltamogramih ni vidnih nobenih širokih signalov kot posledica prisotnosti organskih substanc. Sestavine anorganskega matriksa lahko vplivajo na višine vrhov v DPASV. Zato je treba izvesti kvantifikacijo z metodo standardnih dodatkov. Primerki tipičnih voltamogramov vzorčne raztopine morajo biti priloženi metodi.

#### 2.4.4 Posebne zahteve za atomsko absorpcijsko spektrometrijo (AAS)

V osnovi je ta tehnika enoelementna in zato zahteva optimizacijo eksperimentalnih nastavitvev, ki so odvisne od posameznega elementa, ki ga je treba kvantificirati. Kjerkoli je možno, se rezultati pregledajo kvalitativno in kvantitativno s prerazporeditvijo na alternativne absorpcijske črte (idealno se izbereta dve različni črti). Umeritveni standardi se pripravijo v raztopini matriksa, ki se čim bližje ujema z raztopino vzorčnega merjenja. (npr. koncentracija kisline ali zgradbe modifikatorjev). Da bi čimbolj zmanjšali slepe vrednosti, se uporabljajo reagenti z najvišjo dostopno čistočo. Odvisno od izbranega načina za vaporizacijo in/ali atomizacijo vzorca se lahko ločijo različni tipi AAS.

##### 2.4.4.1 Specifične zahteve za plamensko AAS

Nastavitve instrumenta so optimizirane za vsak element. Še posebej morajo biti kontrolirana sestava plinov in njihov pretok. Uporablja se kontinuiran korektor izvora, da se izognemo interferencam, ki jih povzročata absorpcija ozadja. V primeru neznanih matriksov se preveri, ali je potrebna korekcija ozadja ali ne.

##### 2.4.4.2 Posebne zahteve za AAS z grafitno pečjo

Kontaminacija v laboratoriju pogosto vpliva na točnost ob delu v grafitnih pečeh na nivoju ultra sledi. Za ravnanje z vzorci in standardi se morajo zato uporabljati reagenti visoke čistoče, deionizirana voda in posoda iz inertne plastike. Nastavitve instrumenta se za vsak element optimizirajo. Posebno se morajo preveriti pogoji predobdelave in atomizacije (temperatura, čas) in sprememba matriksa.

Delo pod pogoji izotermalne atomizacije (npr. prečna ogrevana grafitna cev z integrirano platformo Lvov (8) bo zmanjšalo vpliv matriksa, kar se tiče atomizacije analita. V kombinaciji s spremembo matriksa in Zeemanovo korekcijo ozadja (9) se dovoli tudi kvantifikacija s pomočjo umeritvene krivulje na osnovi meritev vodnih standardnih raztopin.

#### 2.4.5 Posebne zahteve za atomsko absorpcijsko spektrometrijo tvorbe hidridov

Organske spojine, ki vsebujejo elemente kot so arzen, bizmut, germanij, svinec, antimon, selen, kositer in telur, so lahko zelo stabilne, zato je potreben razkroj z oksidacijo, da se dobijo pravilni rezultati za celotno vsebnost elementa. Zato se priporoča mikrovvalovni razpad ali visokotlačni sežig v močnih pogojih oksidacije. Največjo pozornost se posveti popolni in ponovljivi pretvorbi elementov v njihove ustrezne hidride.

Tvorba arzenovega hidrida v solni kislini z  $\text{NaBH}_4$  je odvisna od oksidacijskega stanja arzena (As III: hitra tvorba, As V: daljši čas tvorbe). Da bi se izognili izgubi občutljivosti za določanje As V z novo pretočno injekcijsko tehniko, ki jo povzročijo krajši reakcijski čas v tem sistemu, se mora As V reducirati na As III po oksidacijski razgradnji. Za ta namen so primerni kalijev jodid/askorbinska kislina ali cistein. Slepi reagenti, umeritvene raztopine in vzorčne raztopine se obravnavane na isti način. Delo s serijskim načinom omogoča določanje obeh arzenovih vrst, ne da bi to vplivalo na točnost. Zaradi zakasnele tvorbe As V hidrida, se umerjanje izvede z integracijo površine vrha. Optimizirajo se nastavitve instrumenta. Pretok plina, ki prenese hidrid v atomizer je zlasti pomemben in se preverja.

#### 2.4.6 Posebne zahteve za atomsko absorpcijsko spektrometrijo s tehniko hladnih par

Tehnika hladne pare se uporablja samo v primeru živega srebra. Zaradi hlapljivosti in absorpcijskih izgub elementarnega živega srebra, je med celotno analizo potrebna posebna previdnost. Pazljivo se je treba izogibati kontaminacije z reagenti ali okoljem.

Za organske spojine, ki vsebujejo živo srebro, je potrebna oksidacijska razgradnja, da dobimo pravilne rezultate za celotno vsebnost živega srebra. Za razgradnjo se uporablja hermetični sistem z mikrovalovnim razkrojem ali visokotlačnim sežigalnik. Posebna pozornost se namenja preprečevanju kontaminacije opreme s čistili ali polutanti okolja.

Delo s pretočno injekcijsko tehniko je koristno. Za nižje odločitvene meje se priporoča adsorbiranje živega srebra na zlatem/platinastem adsorberju, ki mu sledi toplotna desorpcija. Stik adsorberja ali celice z vlago bo motila meritev in se ga je treba izogniti.

#### 2.4.7 Posebne zahteve za induktivno sklopljeno plazmo atomsko emisijsko spektrometrijo (ICP-AES)

Atomska emisijska spektrometrija s tehniko induktivno sklopljene plazme (10) je večelementna metoda, ki omogoča istočasno merjenje različnih elementov. Za uporabo ICP-AES je treba vzorce najprej raztopiti, da se organski matriksi razgradijo. Uporabljajo se hermetični sistemi z mikrovalovno razgradnjo ali visokotlačnim sežigom. Bistveno vlogo za ustreznost analize ICP-AES igrajo umeritev instrumenta in izbira elementa ali valovne dolžine. Za umeritev instrumenta v primeru linearnih umeritvenih krivulj je običajno potrebno izmeriti umeritvene raztopine samo štirih koncentracij, ker so umeritvene krivulje ICP-AES ponavadi linearne v obsegu nad štiri do šest velikostnih redov koncentracije. Umeritev sistema ICP-AES se naj bi normalno izvedla z večelementnim standardom, ki se pripravi v raztopini, ki ima enako koncentracijo kisline kot merilna raztopina. Za linearno umeritveno krivuljo se morajo preveriti koncentracije elementa.

Izbira valovnih dolžin za merjenje emisije iz analitov je primerna za koncentracije elementov, ki jih je treba določiti. Ko koncentracija analita izpade iz delovnega področja emisijske črte, se uporabi druga emisijska črta. Najprej se izbere najbolj občutljiva emisijska črta (nemotena), nato pa najmanj občutljiva črta. Kadar delamo blizu detekcijske meje ali na njej, je najbolj občutljiva črta za ustrezní analit običajno najboljša izbira. Interferenčne spektra ali ozadja povzročajo večje težave pri ICP-AES. Možne interferenčne so npr. preprost premik ozadja, poševen premik ozadja, spektralno prekrivanje in zapleten premik ozadja. Vsaka od te motenj ima svoje vzroke in načine odpravljanja. Odvisno od matriksov se uporabijo korekcije motenj (interferenc) in optimizacija delovnih parametrov. Nekaterim interferencam se da izogniti z razredčitvijo ali prilagoditvijo matriksov. Z vsako serijo analiziranih preskušanih vzorcev se tako referenčni in dodani material, ki vsebuje znane količine analita(tov) kakor tudi slepi vzorec, obdelujejo na isti način kakor preskušani vzorci. Za preskušanje odklona (drift), se standard preveri npr. po 10 vzorcih. Vsi reagenti in plazma plin so najvišje dostopne čistoče.

#### 2.4.8 Posebne zahteve za induktivno sklopljeno plazmo - masno spektrometrijo (ICP-MS)(11)

Določanje elementov v sledeh s povprečno atomsko maso, kot so krom, baker in nikelj, je lahko pogojeno z močnimi interferencami drugih izobaričnih in poliatomskih ionov. To se lahko prepreči samo, kadar je na voljo ločljivost najmanj 7 000-8 000. Težave, povezane s tehnikami MS vključujejo odklon instrumenta, vplive matriksa in molekularno ionsko interferenco ( $m/z < 80$ ). Potrebna je večkratna interna standardizacija, ki obsega isti masni razpon kot elementi, ki jih je treba določiti, da se korigirajo odklon instrumenta in vplivi matriksa.

Pred meritvami ICP-MS se zahteva popolna razgradnja organske snovi v vzorcih. Kot pri AAS je po razkroju v hermetičnih posodah potrebno prevesti hlapljive elemente, npr. jod, v stabilno oksidacijsko stanje. Večina resnih interferenc je posledica molekularnih ionskih kombinacij argona (plazma plin), vodika, ogljika, dušika in kisika (razgrajevalna kislina, nečistoče plazma plina in uvedeni atmosferski plini) ter vzorčnega matriksa. Da bi se izognili interferencam se zahteva popoln razkroj, meritve ozadja, primerna izbira analitskih mas, ki so včasih povezane z manjšim prebitkom (slabša mejna vrednost detekcije) in razgrajevalne kisline npr. dušikova kislina.

Za elemente, ki jih je treba določiti, se morajo motnje izključiti s primerno izbiro specifičnih analitskih mas, vključujoč potrditev izotopnih razmerij. Odziv instrumenta po Fano-faktorjih se preveri za vsako meritev z uporabo internih standardov.



## 3. VALIDACIJA

Validacija pokaže, ali se analitska metoda sklada z merili, ki veljajo za ustrezne značilnosti učinkovitosti.

Za različne nadzorne namene so potrebna različne kategorije metod. Naslednja tabela določa, katere značilnosti učinkovitosti se preverijo za vsako vrsto modela.

Tabela 9

## Razvrstitev analitskih metod po značilnosti učinkovitosti, ki jih je treba določiti

		Meja detekcije $CC\beta$	Odločitvena meja $CC\alpha$	Pravilnost/ izplen	Točnost	Selektivnost/ Specifičnost	Uporabljivost/ robustnost/ stabilnost
Kvalitativne metode	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvantitativne metode	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = presejalne metode; C = potrditvene metode; + = določen je obvezna.

## 3.1 VALIDACIJSKI POSTOPKI

To poglavje podaja primere in/ali reference za validacijske postopke analitskih metod. Lahko se uporabijo drugi pristopi, ki dokažejo, da se analitska metoda sklada z merili učinkovitosti, ki veljajo za značilnosti učinkovitosti, pod pogojem da se doseže ista raven in kakovost informacij.

Validacija se lahko izvede tudi z vodenjem medlaboratorijske študije, kakor je določena s *Codex Alimentarius*, ISO ali IUPAC (12), ali v skladu z alternativnimi metodami, kakor so posamezne laboratorijske študije ali notranje validacije (13)(14). Ta del se osredotoči na posamezne laboratorijske študije (pri notranji validaciji), ki uporabljajo modularen pristop. Ta pristop obsega:

1. serijo skupnih značilnosti učinkovitosti, ki so neodvisne od uporabljenega validacijskega modela in
2. bolj specifične, od modela odvisne postopke, kakor je opisano v tabeli 10.

Tabela 10

## Delovni parametri, ki so neodvisni in odvisni od modela

Validacija		
Delovni parametri, neodvisni od modela	Delovni parametri, odvisni od modela	
Skupne značilnosti učinkovitosti (3.1.1)	Konvencionalni validacijski pristop (3.1.2)	Interni validacijski pristop (3.1.3)
Specifičnost	Izplen	izplen
Pravilnost	Obnovljivost	Obnovljivost
Robustnost: manjše spremembe	Obnovljivost v laboratoriju	Obnovljivost v laboratoriju
Stabilnost	Obnovljivost	Obnovljivost
	Odločitvena meja ( $CC\alpha$ )	Odločitvena meja ( $CC\alpha$ )
	Sposobnost detekcije ( $CC\beta$ )	Sposobnost detekcije ( $CC\alpha$ )
	Umeritvene krivulje	Umeritvene krivulje
	Robustnost: večje spremembe	Robustnost

### 3.1.1 Značilnosti učinkovitosti, neodvisne od modela

Ne glede na izbrani validacijski pristop je treba določiti naslednje značilnosti učinkovitosti. Da se čim bolj zmanjša delovna obremenitev, se lahko uporabi skrbno oblikovan in statistično zanesljiv pristop za kombiniranih eksperimentov, izvedenih za določitev različnih parametrov.

#### 3.1.1.1 Specifičnost

Za analitske metode je pomembna sposobnost razlikovanja med analitom in snovmi, ki so tesno povezane (izomeri, metaboliti, degradacijski produkti, endogene snovi, sestavine matriksa, itd.). Za preverjanje interferenc sta potrebna dva pristopa.

Zato se izberejo potencialno moteče snovi in analizirajo ustrezni slepi vzorci, da se odkrije prisotnost možnih interferenc in oceni njihov vpliv:

- izberemo niz kemično sorodnih spojin (metabolitov, derivatov, itd.) ali drugih snovi, na katere je možno naleteti pri iskani spojini, ki je lahko prisotna v vzorcih;
- analiziramo primerno število reprezentativnih slepih vzorcev ( $n = 20$ ) in preverimo, če so motnje (signali, vrhi, sledi ionov) v predelih, kjer se pričakuje, da se bo ciljni analit eluiral;
- nadalje se reprezentativni slepi vzorci ojačajo s snovmi ustrezne koncentracije, ki verjetno motijo identifikacijo in/ali kvantifikacijo analita;
- po analizi raziskati, če:
  - lahko prisotnost vodi k napačni identifikaciji,
  - je identifikacija ciljnega analita ovirana zaradi prisotnosti ene ali več motenj, ali
  - če je opazen vpliv na kvantifikacijo.

#### 3.1.1.2 Pravilnost

V tem odstavku je podano določevanje pravilnosti (ena sestavina točnosti). Pravilnost se lahko ugotovi le s certificiranim referenčnim materialom (CRM). CMR se uporabi, kadar koli je na voljo. Postopek je podrobno opisan v ISO 5725-4 (5). Spodaj je podan primer:

- analizirati šest paralelk CRM v skladu s navodili za preskušanje za metodo,
- določiti koncentracijo prisotnega analita v vsaki paralelki vzorca,
- izračunati povprečje, standardni odmik in koeficient variacije (%) za te koncentracije,
- izračunati pravilnost z deljenjem zaznane povprečne koncentracije s certificirano vrednostjo (izmerjeno kot koncentracija) in pomnožiti s 100, da se rezultat izrazi kot odstotek.

Pravilnost (%) = povprečna odkrita koncentracija korigirana z izplenom  $\times 100$ /certificirana vrednost.

Če CRM ni na voljo, se lahko namesto pravilnosti določi izplen, kakor je opisano pod 4.1.2.1 spodaj.

#### 3.1.1.3 Uporabljivost/robustnost (manjše spremembe)

Takšne študije uporabljajo premišljeno uvajanje manjših utemeljenih sprememb v laboratoriju in opazovanje njihovih posledic.

Predhodne preiskovalne študije se morajo opraviti z izbiranjem faktorjev v postopkih pred-obdelave, čiščenja in analize vzorca, ki lahko vplivajo na rezultate merjenja. Takšni faktorji lahko vključujejo analitika, izvor in starost reagentov, topil, standardov in ekstraktov vzorca, stopnjo segrevanja, temperaturo, pH kot tudi čim več drugih faktorjev, ki lahko nastopijo v laboratoriju. Ti faktorji se naj bi spreminjali po velikostnem redu, ki se ujema z odmiki, na katere običajno naletimo med laboratoriji.

- Identificirati možne faktorje, ki bi lahko vplivali na rezultate.
- Nekoliko spremeniti vsak faktor.

- Izpeljati preskus robustnosti z uporabo Youdenovega pristopa (15)(16). (Na tej točki se lahko uporabijo druge odobrene metode. Youdenov pristop pa vzame najmanj potrebnega časa in napora). Youdenov pristop je oblika ulomka zmnožkov različnih faktorjev. Interakcije med različnimi faktorji se ne dajo določiti.
- Kjer se ugotovi, da nek faktor znatno vpliva na rezultate merjenja, izvesti nadaljnje eksperimente, da se določijo meje sprejemljivosti tega faktorja.
- Faktorji, ki znatno vplivajo na rezultate, se naj jasno identificirajo v protokolu metode.

Osnovna ideja je, da se naenkrat ne preuči le ena sprememba, temveč da se takoj uvede več sprememb. Kot primer naj A, B, C, D, E, F, G označujejo nominalne vrednosti za sedem različnih faktorjev, ki lahko vplivajo na rezultate, če se njihove nominalne vrednosti nekoliko spremenijo. Naj se njihove alternativne vrednosti označijo z ustreznimi malimi črkami a, b, c, d, e f in g. Rezultat tega je  $2^7$  ali 128 različnih možnih kombinacij.

Od teh kombinacij je možno izbrati je podsestav z osmimi kombinacijami, ki imajo ravnotežje med velikimi in malimi črkami (tabela 11). Napraviti je treba osem določitev, ki bodo uporabljale kombinacijo izbranih faktorjev (A-G). Rezultati določitev so prikazani v tabeli 11 spodaj kot S-Z.

Tabela 11

## Eksperimentalni vzorec za študije robustnosti (manjše spremembe)

Vrednost faktorja F	Kombinacije števila določitev							
	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
Opažen rezultat R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Za izračune glej primere za preskušanje robustnosti v 3.3.

## 3.1.1.4 Stabilnost

Opaženo je, da lahko nezadostna stabilnost analita ali sestavin matriksa v vzorcu med skladiščenjem ali analizo povzroči precejšnje odmike v izidu rezultata analize. Nadalje se naj pregleda stabilnost umeritvenega standarda v raztopini. Običajno je stabilnost analita značilna pod različnimi skladiščnimi pogoji. Spremljanje skladiščnega stanja bo sestavljalo del normalnega laboratorijskega akreditacijskega sistema. Kadar to ni znano, so spodaj podani primeri, kako se lahko določi stabilnost.

Stabilnost analita v raztopini:

- Pripraviti svežo zalogo raztopin analita/analitov in raztopiti po navodilih za preskušanje, da se naredi dovolj alikvotov (npr. 40) vsake izbrane koncentracije (okrog meje najmanjše zahtevane učinkovitosti za snovi, za katere ni določena nobena dovoljena meja ali okrog dovoljene meje za druge snovi). Pripraviti obe raztopini analita, uporabljenega za dodajanje in uporabljenega za raztopino končne analize in katero koli drugo raztopino, ki je zanimiva (npr. derivatizirani standardi).
- Izmeriti vsebnost analita v sveže pripravljene raztopini v skladu s navodili za preskušanje.
- Porazdeliti namenjene volumne v primerne vsebnike, označiti in shraniti v skladu s shemo:

Tabela 12

## Shema za določitev stabilnosti analita v raztopini

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

- Za čas skladiščenja se lahko izbere en, dva, tri in štiri tedne ali po potrebi več, npr. dokler se ne opazijo prvi pojavi propadanja med identifikacijo in/ali kvantifikacijo. Najdaljši čas skladiščenja in najboljši pogoji skladiščenja se morajo zabeležiti.
- Izračun koncentracije analita(-ov) v vsakem alikvotu se naj opravi z uporabo raztopine sveže pripravljene analita ob času analize kot 100 %.

$$\text{Analit, ki ostane (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{sveža}}$$

$C_i$  = koncentracija ob časovni točki

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

## Stabilnost analita/analitov v matriksu

- Kadar koli je možno, se naj uporabijo nastali vzorci. Če ni nobenega nastalega materiala, se naj uporabi matriks, ojačan z analitom.
- Če je nastali material na razpolago, se naj določi koncentracija v materialu, dokler je še svež. Nadaljnji alikvoti materiala se lahko odvzamejo po enem, dveh, štirih in 20 tednih in določijo se naj koncentracije. Tkivo se naj shrani pri najmanj minus 20 °C ali manj, če je potrebno.
- Če ni na razpolago nobenega nastalega materiala, vzemite nekaj slepega materiala in ga homogenizirajte. Razdelite material na 5 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 minus 20 °C ali manj, če je potrebno in jih analizirajte po enem, dveh, štirih in 20 tednih.

## 3.1.1.5 Umeritvene krivulje

Kadar se za kvantifikacijo uporabljajo umeritvene krivulje:

- se naj za tvorbo krivulje uporabi najmanj pet nivojev (vključno ničelni),
- opiše se naj delovno območje krivulje,
- opiše se naj matematična formula krivulje in ujemanje podatkov,
- opišejo se naj območja sprejemljivosti za parametre krivulje. Kadar je potrebna serijska umeritev na osnovi standardne raztopine, se označijo sprejemljivi parametri umeritvene krivulje, ki se lahko razlikuje od ene serije do druge.

## 3.1.2 Konvencionalni validacijski postopki

Izračun parametrov v skladu s konvencionalnimi metodami zahteva izvedbo več posameznih eksperimentov. Vsaka značilnost učinkovitosti se mora določiti za vsako večjo spremembo (glej pod uporabljivost/robustnost). Za večanalitske metode se lahko preskuša hkrati več analitov, če so prej po možnosti odpravljene ustrezne medsebojne motnje. Na isti način se lahko določi več značilnosti učinkovitosti. Da bi tako čimbolj zmanjšali delovno obremenitev, se priporoča čimveč kombinirati poskuse (npr. ponovljivost in obnovljivost znotraj laboratorija s specifičnostjo, analizo slepih vzorcev za določitev odločitvene mejne vrednosti in preskušanje glede specifičnosti).

## 3.1.2.1 Izplen

Če CRM ni na razpolago, se mora izplen določiti s poskusi z ojačanim slepim matriksom z uporabo npr. naslednje sheme:

- izberite 18 alikvotov slepega materiala in dodajte vsakič šestim alikvotom preiskani analit v enkratni, 1,5-kratni in dvakratni koncentraciji meje najmanjše zahtevane učinkovitosti ali polovični, enkratni in 1,5-kratni koncentraciji dovoljene meje,
- analizirajte vzorce in izračunajte koncentracijo, ki je prisotna v vsakem vzorcu,

- z uporabo spodnje enačbe izračunajte izplen za vsak vzorec,
- izračunajte povprečen izplen in CV za šest rezultatov z vsakega nivoja,
- % izplena =  $100 \times \text{izmerjena vsebnost/nivo ojačanja}$ .

Ta konvencionalna metoda za določitev izplena je varianta metode standardnega dodajanja, ki je opisana pod 3.5 kadar:

- se vzorec šteje kot slepi vzorec namesto vzorca, ki ga je treba analizirati,
- se šteje, da sta si izkoristek <sup>(1)</sup> in izplen <sup>(2)</sup> podobna za dva preskušana deleža,
- imajo preskušani vzorci iste mase in ekstrakti preskušanih deležev iste volumne,
- je količina umeritvenega standarda, ki se doda drugemu (z dodatkom) preskušanemu deležu zapisana  $x_{\text{ADD}}$  ( $x_{\text{ADD}} = r_A \cdot V_A$ ),
- je  $x_1$  izmerjena vrednost za slepi delež in  $x_2$  izmerjena vrednost za drugi (z dodatkom) preskušani delež,
- tedaj je % izplena =  $100 (x_2 - x_1) / x_{\text{ADD}}$ .

Kadar kateri koli od zgornjih pogojev ne (ali se domneva, da ne) bo dosežen, tedaj je treba izvesti celoten postopek za določitev izplena po metodi standardnega dodajanja, kakor je opisano pod 3.5.

### 3.1.2.2 Ponovljivost

- Pripravite komplet vzorcev z enakimi matriksi, ojačanimi z analitom, da se z upoštevanjem izkoristka v preskušanjem deležu dobijo koncentracije, ki so ekvivalentne enkratni 1,5-kratni in dvakratni najmanjši zahtevani mejni učinkovitosti ali 0,5-kratni, enkratni in 1,5-kratni dovoljeni mejni.
- Na vsakem nivoju se naj analiza izvede z najmanj šestimi paralelkami.
- Analizirajte vzorce.
- Analizirajte koncentracijo, ki ste jo odkrili v vsakem vzorcu.
- Ugotovite povprečno koncentracijo, standardni odmik in koeficient variacije (%) ojačanih vzorcev.
- Ponovite te korake še najmanj dvakrat.
- Izračunajte celotno povprečno koncentracijo in CV za ojačane vzorce.

### 3.1.2.3 Obnovljivost v laboratoriju

- Pripravite komplet vzorcev z določenim preskušanim materialom (enaki ali različni matriksi), ojačanim z analitom/analiti, da se z upoštevanjem izkoristka v preskušanjem deležu dobijo koncentracije, ki so ekvivalentne enkratni 1,5-kratni in dvakratni mejni najmanjše zahtevane učinkovitosti ali 0,5-kratni, enkratni in 1,5-kratni dovoljeni mejni.
- Na vsakem nivoju se naj analiza izvede z najmanj šestimi paralelkami.
- Ponovite te korake še najmanj dvakrat z drugimi operaterji in v drugačnih pogojih okolja, npr. različne serije reagentov, raztopin, itd., različnimi temperaturami okolja, različnimi instrumenti itd., če je mogoče.
- Analizirajte vzorce.
- Analizirajte koncentracijo, ki ste jo odkrili v vsakem vzorcu.
- Ugotovite povprečno koncentracijo, standardni odmik in koeficient variacije (%) ojačanih vzorcev.

### 3.1.2.4 Obnovljivost

Kadar je treba preveriti obnovljivost, naj bi se laboratoriji udeležili sodelovalnih študij v skladu z ISO 5725-2(5).

### 3.1.2.5 Odločitvena meja (CCa)

Odločitveno mejo je treba ugotoviti v skladu z zahtevami za identifikacijo ali identifikacijo plus kvantifikacijo, kakor je opredeljeno v „Merilih učinkovitosti in drugih zahtevah za analitske metode“ (del 2).

<sup>(1)</sup> Izkoristek: tisti delež mase analita, vsebovanega v vzorcu, ki je prisoten v končnem ekstraktu.

<sup>(2)</sup> Izplen (tukaj): tisti delež mase analita, dodanega v vzorec, ki je prisoten v končnem ekstraktu. V nadaljnjem tekstu dokumenta se dopušča, da sta izkoristek in izplen enaka in se zato uporablja le izraz „izplen“.

V primeru snovi, za katere se ni določila nobena dovoljena meja, se lahko CCa določi:

- ali s postopkom umeritvene krivulje v skladu z ISO 11843 (17) (v tem dokumentu navedena kot kritična vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi slepi material, ki se ojača na in nad najmanjšim zahtevanim nivojem delovanja v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce. Po identifikaciji zabeležite signal proti dodani koncentraciji. Ustrezna koncentracija pri y-intercept črta plus, 2,33-krat standardno odstopanje obnovljivosti znotraj laboratorija intercept je enaka odločitveni meji. To je uporabljivo samo pri kvantitativnih preskusih ( $\alpha = 1\%$ ),
- ali z analiziranjem najmanj 20 slepih materialov na matriks, da se lahko izračuna razmerje signal/šum pri časovnem okencu, v katerem se pričakuje analit. Trikratno razmerje šum/signal se lahko uporabi kot odločitvena meja. To je uporabljivo pri kvantitativnih in kvalitativnih preskusih.

V primeru snovi z določeno dovoljeno mejo se CCa ugotovi:

- ali s postopkom umeritvene krivulje v skladu z ISO 11843 (17) (v tem dokumentu naveden kot kritična vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi slepi material, ki se ojača okrog dovoljene meje v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce. Po identifikaciji, zabeležite signal proti dodani koncentraciji. Ustrezna koncentracija pri dovoljeni meji plus 1,64-krat standardni odmik obnovljivosti znotraj laboratorija je enaka odločitveni meji ( $\alpha = 5\%$ ),
- ali z analiziranjem najmanj 20 slepih materialov na matriks, ojačanim z analitom/analiti ob dovoljeni mejni vrednosti. Koncentracija pri dovoljeni meji plus 1,64-krat ustrezen standardni odmik je enaka odločitveni meji ( $\alpha = 5\%$ ).

Glej tudi člen 5 in točko 3.2.

#### 3.1.2.6 Sposobnost detekcije ( $CC\beta$ )

Sposobnost detekcije se naj določa v skladu s zahtevami za pregledovanje, identifikacijo ali identifikacijo plus kvantifikacijo, kakor je določeno (glej del 2).

V primerih snovi, za katere ni določena nobena dovoljena meja, se sposobnost detekcije določi:

- s postopkom umeritvene krivulje v skladu z ISO 11843 (17) (tu navedeno kot najmanjša detekcijska vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi reprezentativni slepi material, ki se ojača na ali pod nivo najmanjšega zahtevanega delovanja v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce. Po identifikaciji, zabeležite signal proti dodani koncentraciji. Ustrezna koncentracija pri določitveni meji plus 1,64-krat standardni odmik laboratorijske obnovljivosti povprečne izmerjene vsebnosti pri odločitveni meji je enaka sposobnosti detekcije ( $\beta = 5\%$ ),
- z analiziranjem najmanj 20 slepih materialov na matriks, ojačanim z analitom/analiti na odločitveni meji. Analizirajte vzorce in identificirajte analite. Vrednost odločitvene meje plus 1,64-krat standardni odmik laboratorijske obnovljivosti izmerjene vsebnosti je enaka sposobnosti detekcije ( $\beta = 5\%$ ),
- ko ni na razpolago nobenih kvantitativnih rezultatov, se lahko sposobnost detekcije določi s preiskavo ojačanega slepega materiala pri in nad odločitveno mejo. V tem primeru je nivo koncentracije, kjer ostane le 5 % lažnih skladnih rezultatov, enak sposobnosti detekcije te metode. Zato je treba izvesti najmanj 20 preiskav za najmanj en nivo koncentracije, da se zagotovi zanesljiva osnova za to določitev.

V primeru snovi, za katere je določena dovoljena meja, se CCb lahko določi:

- ali s postopkom umeritvene krivulje v skladu z ISO 11843 (17) (tu navedeno kot najmanjša detekcijska vrednost spremenljivke čistega stanja). V tem primeru se uporabi reprezentativni slepi material, ki se ojača okrog dovoljene meje v ekvidistančnih korakih. Analizirajte vzorce in identificirajte analit(-e). Izračunajte standardni odmik s povprečno izmerjeno vsebnostjo pri odločitveni mejni vrednosti. Ustrezna koncentracija pri vrednosti odločitvene meje plus 1,64-krat standardni odmik laboratorijske obnovljivosti je enaka sposobnosti detekcije ( $\beta = 5\%$ ),
- ali z analiziranjem najmanj 20 slepih materialov na matriks, ojačanim z analitom/analiti ob odločitveni meji. Vrednost odločitvene meje plus 1,64-krat ustrezn standardni odmik je enaka sposobnosti detekcije ( $\beta = 5\%$ ).

Glej tudi oddelek 3.2.

### 3.1.2.7 Robustnost (večje spremembe)

Analitska metoda se naj preskusi pod različnimi poskusnimi pogoji, ki vključujejo npr. različne vrste, različne matrikse ali različne pogoje vzorčenja. Uvedene spremembe naj bodo večje. Pomen teh sprememb se npr. lahko ovrednoti npr. po Youdenovem pristopu (15)(16). Vsaka značilnost učinkovitosti se naj določi za vse večje spremembe, ki so pokazale, da imajo pomemben vpliv na izvedljivost preskusa.

### 3.1.3 Validacija po alternativnih modelih

Kadar se uporabijo postopki alternativne validacije, se v validacijskem protokolu določita osnovni model in strategija z vsakokratnimi predpogoji, predpostavkami in formulami ali pa se vsaj podajo reference o njihovi razpoložljivosti. V nadaljevanju je podan primer alternativne metode. Pri uporabi npr. internega laboratorijskega modela validacije, se določijo značilnosti učinkovitosti na način, ki dovoljuje validacijo za večje spremembe v okviru istega validacijskega postopka. Za to je potrebna priprava poskusnega načrta za validacijo.

#### 3.1.3.1 Poskusni načrt

Poskusni načrt mora biti izdelan glede na število različnih vrst in različnih faktorjev v preiskavi. Zato prvi korak v celotnem postopku validacije upošteva vzorčne populacije, ki bodo v bodoče analizirane v laboratoriju z namenom, da se izbere najpomembnejša vrsta in tisti faktorji, ki lahko vplivajo na rezultate meritev. Nato se izbere območje koncentracije, ki je prilagojeno namenu v skladu z iskanim nivojem.

Primer:

- istočasno se lahko pregleda več analitov z analitsko metodo, ki je validirana,
- identificirani sta dve variaciji (A in B) vodilnega faktorja. Vodilni faktorji tvorijo osnovo, na kateri se kombinirajo nivoji faktorjev. Ti vodilni faktorji lahko vključujejo faktorje kot so vrsta ali matriks. V tem primeru je bil vodilni faktor spremenjen na dveh nivojih, t.j. upoštevali sta se dve različni vrsti (vrsti A in B). Na splošno je mogoče menjati vodilne faktorje na več kot dveh nivojih, kar samo poveča število analiz, ki jih je treba izvesti,
- izbrane faktorje je treba menjati na dveh nivojih (označenih kot + ali -).

**Tabela 13**

#### Primeri za faktorje, ki veljajo kot pomembni za validacijski postopek

Spol živali	(faktor 1)
Pasma	(faktor 2)
Transportni pogoji	(faktor 3)
Pogoji shranjevanja	(faktor 4)
Svežost vzorca	(faktor 5)
Pogoji pitanja	(faktor 6)
Različni delavci z različnimi izkušnjami	(faktor 7).

**Tabela 14**

#### Možni poskusni načrt za gornji primer

Vrsta	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Vzorec št.
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8



Vrsta	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Vzorec št.
Vrsta	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Vzorec št.
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Ker je treba vsakemu vzorcu (vsaki kombinaciji faktorskih nivojev) primešati štiri različne koncentracije okrog iskanega nivoja, in se za vsak nivo analizira slepi vzorec, mora biti izvedenih  $5 \times 16 = 80$  analiz za celotni validacijski poskus.

Od teh 80 merilnih rezultatov, je možno izračunati (13) (14).

Izpleni

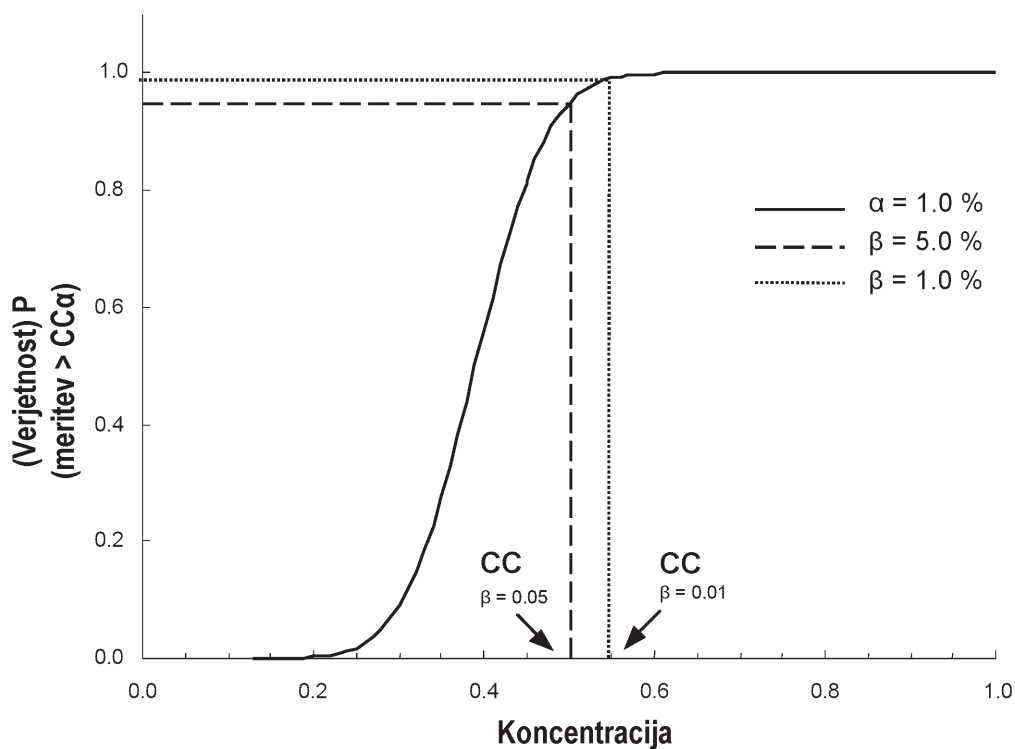
- ponovljivost na nivo koncentracije ( $s_{pr}$ ),
- znotraj laboratorijska obnovljivost na nivo koncentracije ( $s_{pr}$ ),
- odločitvena meja ( $CC\alpha$ ),
- sposobnost detekcije ( $CC\beta$ ),
- potenčna krivulja (stopnja b-napake proti koncentraciji (glej 3.1.3.2),
- robustnost večjih sprememb: robustnost na manjše spremembe se da določiti v skladu z odstavkom 3.1.1.3),
- 16 umeritvenih krivulj, vezanih na vzorce,
- ena krivulja za celotno umeritev,
- razmik predvidevanja celotne umeritvene krivulje,
- odmiki, povzročeni z matriksom ( $s_{mat}$ ),
- odmiki, povzročeni zaradi poteka ( $s_{run}$ ),
- učinek posameznih faktorjev na merilne rezultate.

Te značilnosti učinkovitosti omogočajo vsestransko ovrednotenje nivoja učinkovitosti metode, ker se ne preiskuje samo vpliv posameznih faktorjev, temveč tudi povezane kombinacije teh faktorjev. S pomočjo tega poskusnega modela se je možno odločiti, če se en ali drugi od izbranih faktorjev izključi iz celotne umeritvene krivulje, ker pomembno odstopa od standardnih odmikov drugih faktorjev.

### 3.1.3.2 Potenčna krivulja

Krivulja zmogljivosti podaja informacije o detekcijski sposobnosti te metode v okviru izbranega koncentracijskega območja. Nanaša se na tveganja b-napake, pri uporabi preiskovane metode. Krivulja zmogljivosti omogoča izračun detekcijskih sposobnosti za vsako od posameznih kategorij (presejanje, potrditev) ali vrst (kvalitativnih ali kvantitativnih) metod za določeno b-napako (npr. 5 %).

Slika 1  
Krivulja zmogljivosti



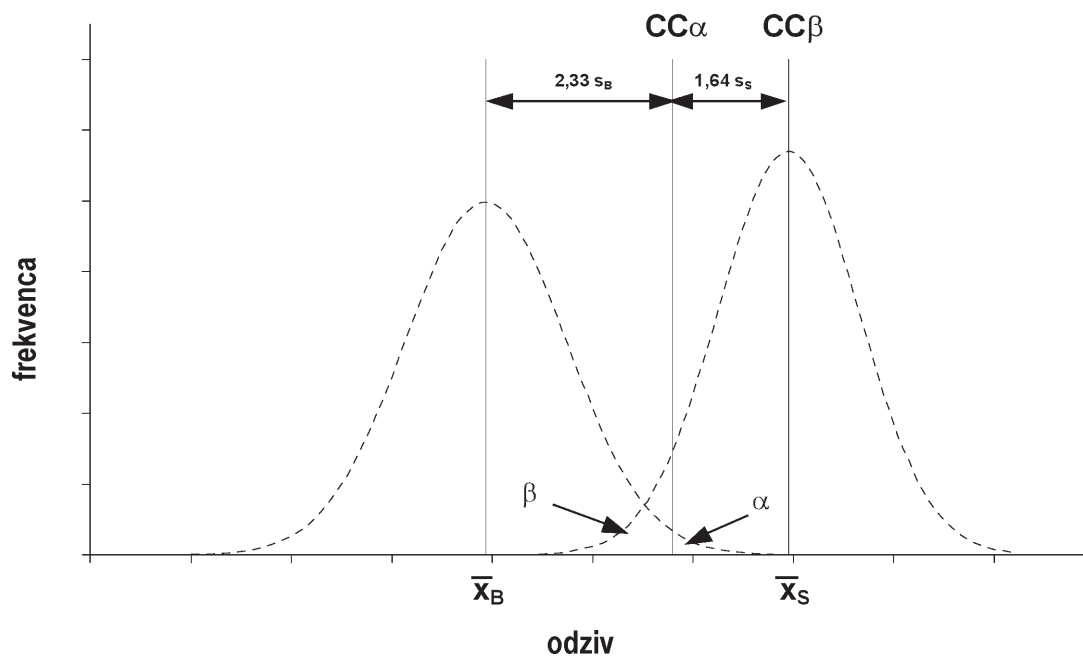
Slika 1 prikazuje primer grafičnega ugotavljanja sposobnosti detekcije ( $CC\beta$ ) analitske metode. Pri tej posebni metodi ostane tveganje napačnega odločanja 5 % pri koncentraciji 0,50 mg/kg. Pri koncentraciji 0,55 mg/kg se tveganje lažnega skladnega odločanja zniža na 1 %.

### 3.1.3.3 Obnovljivost

Določanje obnovljivosti metode po konceptu laboratorijskih študij v enem laboratoriju (interne validacije) zahteva ponovljeno udeležbo v strokovnih študijah v skladu z ISO vodili 43-1 (3) in 43-2 (4). Laboratorijem je dovoljeno, da izberejo svoje lastne metode pod pogojem, da se te metode uporabljajo pod rutinskimi pogoji. Standardni odmik laboratorija se lahko uporabi za oceno obnovljivosti te metode.

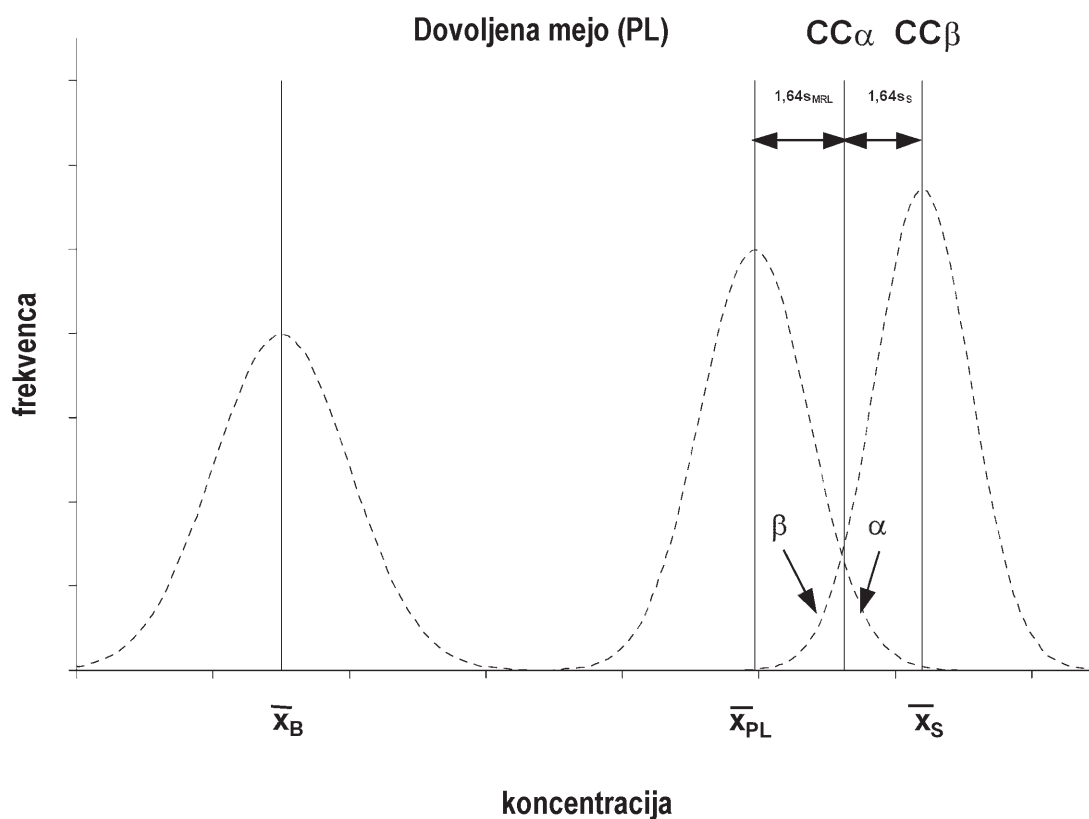
## 3.2 GRAFIČNA PREDSTAVITEV RAZLIČNIH ANALITSKIH MEJ

Slika 2  
 Snovi, za katere ni določena nobena dovoljena meja



$\bar{x}_S$	Povprečna odzivna vrednost kontaminiranega vzorca
$s_B$	Standardni odmik slepega vzorca (določenega v pogojih obnovljivosti internega laboratorija)
$s_S$	Standardni odmik kontaminiranega vzorca (določenega v pogojih obnovljivosti internega laboratorija)
$\alpha$	Stopnja lažnih neskladnih rezultatov
$\beta$	Stopnja lažnih skladnih rezultatov
$CC\alpha$	Odziv z dano $\alpha$ -napako in 50-odstotno $\beta$ -napako
$CC\beta$	Odziv z zelo majhno $\alpha$ -napako in $\beta$ -napako

Slika 3  
Snovi z določeno dovoljeno mejo



- $\bar{X}_B$  Povprečna "koncentracija" slepega vzorca
- $\bar{X}_{PL}$  povprečna koncentracija vzorca, ki vsebuje analit z dovoljeno mejo
- $\bar{X}_S$  Povprečna koncentracija kontaminiranega vzorca
- $S_{PL}$  Standardni odmik vzorca, ki vsebuje analit z dovoljeno mejo (določeno v pogojih obnovljivosti internega laboratorija)
- $S_S$  Standardni odmik vsebujočega vzorca (določenega v pogojih obnovljivosti internega laboratorija)
- $\alpha$  Stopnja lažnih neskladnih rezultatov
- $\beta$  Stopnja lažnih skladnih rezultatov
- $CC_\alpha$  Odziv z dano  $\alpha$ -napako in 50-odstotno  $\beta$ -napako
- $CC_\beta$  Odziv z zelo majhno  $\alpha$ -napako in  $\beta$ -napako

### 3.3 PRIMER IZRAČUNA ZA PRESKUŠANJE ROBUSTNOSTI MANJŠIH SPREMEMB V SKLADU Z YOUDENOVIM PRISTOPOM (16)

#### Primerjava povprečij (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Primerjajte povprečja velikih črk ( $A_A$ do $A_G$ ) s povprečji njihovih ustreznih malih črk ( $A_a$ do $A_g$ ). Če ima faktor učinek, bo razlika znatno večja, kot so razlike drugih faktorjev.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	Na robustno metodo naj ne bi vplivale spremembe, na katere skoraj z gotovostjo naletimo med laboratoriji.
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	Če ni nobene izrazite razlike, se najbolj realistična mera naključne napake poda s sedmimi razlikami.
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Razlike (D)

Kvadratne razlike ( $D_i^2$ )

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

$$D_a^2 = \text{vrednost } a$$

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

$$D_b^2 = \text{vrednost } b$$

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

$$D_c^2 = \text{vrednost } c$$

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

$$D_d^2 = \text{vrednost } d$$

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

$$D_e^2 = \text{vrednost } e$$

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

$$D_f^2 = \text{vrednost } f$$

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

$$D_g^2 = \text{vrednost } g$$

Primerjava povprečij (A)

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

Kadar je  $S_{D_i}$  znatno večji od standardnega odmika metode, izvedene pod pogoji obnovljivosti znotraj laboratorija v skladu z (glej zgoraj), je očitno, da imajo vsi faktorji skupaj učinek na rezultat, četudi vsak posamezni faktor ne kaže znatnega vpliva in da metoda ni dovolj robustna za izbrane spremembe.

### 3.4 PRIMERI IZRAČUNA ZA INTERNI VALIDACIJSKI POSTOPEK

Primeri izračunov za protokol interne validacije, kakor je opisan z validacijo v skladu z alternativnimi modeli (3.1.3) (13) (14)

### 3.5 PRIMERI ZA METODO STANDARDNEGA DODATKA

Preskušani vzorec z vsebnostjo T analita se razdeli na dva preskušana deleža 1 in 2, vsak s svojo maso  $m_1$  in  $m_2$ . Preskušanemu deležu 2 je primešan volumen  $V_A$  raztopine s koncentracijo  $r_A$  analita. Dva ekstrakta preskušanih deležev se dobata z odnosnima volumnoma  $V_1$  in  $V_2$  po ekstrakcijskih in očiščevalnih korakih metode. Predvideva se izplen analita  $rc$ . Oba ekstrakta se preskusita z merilno metodo z občutljivostjo  $b$  in podata analitski odziv  $x_1$  ali  $x_2$ .

Če se domneva, da sta  $rc$  in  $b$  ista za analit v prvotnem vzorcu in v primešanem vzorcu, tedaj se vsebnost T lahko izračuna kot:

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

Metoda bo omogočila določitev izplena  $rc$ . Nato se dodatno k zgoraj opisanim preskusom del ekstrakta preskušanelega deleža 1 (volumen  $V_3$ ) zmeša z znano količino  $\rho_B \cdot V_B$  analita in preskusi. Analitski odziv je  $x_3$  in izplen je:

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

Nadalje je možno izračunati občutljivost  $b$  kot:

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

Vsi pogoji aplikacije in podrobnosti so predhodno opisane (18).

#### 4. UPORABLJENE KRATICE

AAS	atomska absorpcijska spektrometrija
AES	atomska emisijska spektrometrija
AOAC-1	Združenje uradnih analitskih kemikov INTERNATIONAL
B	vezana frakcija
CI	kemična ionizacija
CRM	certificiran referenčni material
CV	koeficient variacije
2 D	dvodimenzionalni
DAD	detekcija z diodnim nizom
DPASV	diferenčna impulzna anodna stripping voltametrika
ECD	detekcija z zajetjem elektronov
EI	elektronska (vplivana) ionizacija
GC	plinska kromatografija
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HPTLC	tankoplastna kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
ICP-AES	induktivno sklopljena plazma – atomska emisijska spektrometrija
ICP-MS	induktivno sklopljena plazma – masna spektrometrija
IR	infrardeči
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo
LC	tekočinska kromatografija
LR(MS)	masna spektrometrija nizke ločljivosti
MRPL	meja najmanjše zahtevane učinkovitosti
MS	masna spektrometrija
m/z	razmerje masa/naboj
RF	relativna migracija na fronto topila
RSDL	relativni standardni odmiki v laboratoriju
SIM	monitoring/spremljanje izbranega iona
TLC	tankoplastna kromatografija
UV	ultravijolična svetloba
VIS	vidna svetloba

#### 5. NAPOTILA

- (1) ISO 17025: 1999 Splošne zahteve za pristojnost umerjevalnih in preskuševalnih laboratorijev.
- (2) ISO 3543-1: 1993 Statistične metode za obvladovanje kakovosti – Zvezek 1 slovar in simboli.
- (3) ISO vodilo 43-1: 1997 Strokovno preskušanje z medlaboratorijskimi primerjavami – Del 1: Razvoj in izvajanje strokovnih preskuševalnih programov
- (4) ISO vodilo 43-2: 1997 Strokovno preskušanje z medlaboratorijskimi primerjavami – Del 2: Selekcija in uporaba strokovnih preskuševalnih programov pri organih za akreditacijo laboratorijev
- (5) ISO 5725: 1994 Točnost (pravilnost in natančnost) merilnih metod in rezultatov – Del 1: Splošna načela in definicije; ISO 5725-2 Del 2: Osnovna metoda za določevanje ponovljivosti in obnovljivosti standardne merilne metode; Del 4: Osnovne metode za določanje pravilnosti standardne merilne metode.

- (6) ISO 78-2: 1999 Kemija –Načrti za standarde – Del 2: Metode kemične analize.
  - (7) W.G. de Ruig in J.M.Weseman: „A new approach to confirmation by infrared spectrometry“ J. chemometrics 4 (1990) 61-77.
  - (8) Glej npr. May, T.W., Brumbaugh, W.G., Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Analytical Chemistry 54(7): 1032-1037 (90353).
  - (9) Application of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds), Pergamon Press (Oxford), 1992, str. xxvi + 675.
  - (10) Inductively Coupled Plasmas in analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.
  - (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, str. 329.
  - (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Applied Chem. 67, 331.
  - (13) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173.
  - (14) Gowik P., Jülicher, B., and Uhlig, S (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode –array detection. Method description and comprehensive in-house validation. J. Chromatogr., 716, 221.
  - (15) OAC-I Per Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.
  - (16) W. J. Youden; Steiner, E. H.; „Statistical Manual of the AOAC-Association of Official Analytical Chemists“, AOAC-I, Washington DC: 1975, str. 35 ff.
  - (17) ISO 11843: 1997 Sposobnost detekcije – Del 1: Termini in definicije, Del 2: Metodologija v primeru linearne umeritve.
  - (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: „Yield of recovery: a world of difference“. Proceedings Eight Euro Food Chem, Vienna, Austria Septembere 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, str. 2 do 9.
  - (19) (19 Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement, OJ L 243, 29. 10. 1971. str. 29).
  - (20) ISO 31-0: 1992 Količine in enote – Del 0: Splošna načela.
-