

Το έγγραφο αυτό συνιστά βοήθημα τεκμηρίωσης και δεν δεσμεύει τα κοινοτικά όργανα

► B

ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της ► C1 14ης Αυγούστου 2002 ◀

για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2002) 3044]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2002/657/EK)

(EE L 221 της 17.8.2002, σ. 8)

Τροποποιείται από:

	Επίσημη Εφημερίδα		
	αριθ.	σελίδα	ημερομηνία
► <u>M1</u> Απόφαση 2003/181/EK της Επιτροπής της 13ης Μαρτίου 2003	L 71	17	15.3.2003
► <u>M2</u> Απόφαση 2004/25/EK της Επιτροπής της 22ας Δεκεμβρίου 2003	L 6	38	10.1.2004

Διορθώνεται από:

► C1 Διορθωτικό EE L 239 της 6.9.2002, σ. 66 (2002/657/EK)



ΑΠΟΦΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

της ►C1 14ης Αυγούστου 2002 ◀

για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων

[κοινοποιηθείσα υπό τον αριθμό E(2002) 3044]

(Κείμενο που παρουσιάζει ενδιαφέρον για τον ΕΟΧ)

(2002/657/ΕΚ)

Η ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΤΩΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΩΝ ΚΟΙΝΟΤΗΤΩΝ,

Έχοντας υπόψη:

τη συνθήκη για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Κοινότητας,

την οδηγία 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου, της 29ης Απριλίου 1996, περί λήψεως μέτρων ελέγχου για ορισμένες ουσίες και τα κατάλοιπά τους σε ζώντα ζώα και στα προϊόντα τους και περί καταργήσεως των οδηγιών 85/358/ΕΟΚ και 86/469/ΕΟΚ και των αποφάσεων 89/187/ΕΟΚ και 91/664/ΕΟΚ ⁽¹⁾, και ιδίως το άρθρο 15 παράγραφος 1,

Εκτιμώντας τα ακόλουθα:

- (1) Η παρουσία καταλοίπων στα προϊόντα ζωικής προέλευσης είναι ένα ζήτημα που αφορά τη δημόσια υγεία.
- (2) Η απόφαση 98/179/ΕΚ της Επιτροπής, της 23ης Φεβρουαρίου 1998, για τη θέσπιση λεπτομερών κανόνων όσον αφορά την επίσημη δειγματοληψία για τον έλεγχο της ανίχνευσης ορισμένων ουσιών και των καταλοίπων τους σε ζώντα ζώα και στα προϊόντα τους ⁽²⁾ προβλέπει ότι η ανάλυση των δειγμάτων πρέπει να γίνεται αποκλειστικά από εργαστήρια που έχουν εγκριθεί από την αρμόδια εθνική αρχή για τον επίσημο έλεγχο καταλοίπων.
- (3) Είναι αναγκαίο να εξασφαλιστεί η ποιότητα και η συγκρισιμότητα των αναλυτικών αποτελεσμάτων των εργαστηρίων που έχουν εγκριθεί για τον επίσημο έλεγχο καταλοίπων. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση συστημάτων διασφάλισης της ποιότητας και συγκεκριμένα με την εφαρμογή μεθόδων που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με κοινές διαδικασίες και κριτήρια επίδοσης, καθώς επίσης και με το να εξασφαλισθεί η δυνατότητα αναγωγής σε κοινά πρότυπα ή πρότυπα που έχουν συμφωνηθεί από κοινού.
- (4) Σύμφωνα με την οδηγία 93/99/ΕΟΚ του Συμβουλίου, της 29ης Οκτωβρίου 1993, σχετικά με τα πρόσθετα μέτρα που αφορούν τον επίσημο έλεγχο των τροφίμων ⁽³⁾ και την απόφαση 98/179/ΕΚ, τα εργαστήρια που διενεργούν επίσημους ελέγχους πρέπει να είναι διαπιστευμένα σύμφωνα με το πρότυπο ISO 17025 (1) από τον Ιανουάριο 2002 και μετά. Σύμφωνα με την απόφαση 98/179/ΕΚ, τα εγκεκριμένα εργαστήρια υποχρεούνται να συμμετάσχουν σε ένα διεθνώς αναγνωρισμένο σύστημα εξωτερικής αξιολόγησης του ελέγχου της ποιότητας και διαπίστευσης. Τα εγκεκριμένα εργαστήρια πρέπει να αποδείξουν την καταλληλότητά τους με κανονική και επιτυχή συμμετοχή σε κατάλληλα συστήματα δοκιμών ικανότητας τα οποία αναγνωρίζονται ή οργανώνονται από τα εθνικά ή κοινοτικά εργαστήρια αναφοράς.
- (5) Βάσει της οδηγίας 96/23/ΕΚ λειτουργεί ένα δίκτυο κοινοτικών εργαστηρίων αναφοράς, εθνικών εργαστηρίων

⁽¹⁾ ΕΕ L 125 της 23.5.1996, σ. 10.

⁽²⁾ ΕΕ L 65 της 5.3.1998, σ. 31.

⁽³⁾ ΕΕ L 290 της 24.11.1993, σ. 14.

▼B

αναφοράς και εθνικών εργαστηρίων ελέγχου με σκοπό την ενίσχυση του συντονισμού.

- (6) Ως αποτέλεσμα της προόδου που έχει συντελεσθεί στην αναλυτική χημεία μετά την έκδοση της οδηγίας 96/23/EK, η έννοια των συνήθων μεθόδων και των μεθόδων αναφοράς έχει αντικατασταθεί από την προσέγγιση βάσει κριτηρίων σύμφωνα με την οποία καθορίζονται κριτήρια επίδοσης και διαδικασίες για την επικύρωση μεθόδων διαλογής και επιβεβαιωτικών μεθόδων.
- (7) Είναι ανάγκη να καθοριστούν κοινά κριτήρια για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων των δοκιμών των εργαστηρίων επίσημου ελέγχου προκειμένου να εξασφαλισθεί η εναρμονισμένη εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK.
- (8) Είναι ανάγκη να προβλεφθεί μια διαδικασία για τον σταδιακό καθορισμό ελάχιστων απαιτούμενων ορίων επίδοσης (MRPL) των αναλυτικών μεθόδων για τις ουσίες για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο και ιδίως για εκείνες τις ουσίες των οποίων δεν επιτρέπεται η χρήση ή των οποίων η χρήση απαγορεύεται ρητώς στην Κοινότητα, ώστε να εξασφαλισθεί η εναρμονισμένη εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK.
- (9) Η απόφαση 90/515/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 26ης Σεπτεμβρίου 1990, για τη θέσπιση μεθόδων αναφοράς για την αναζήτηση καταλοίπων βαρέων μετάλλων και αρσενικού ⁽¹⁾, η απόφαση 93/256/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 14ης Απριλίου 1993, περί θεσπίσεως των μεθόδων ανίχνευσης καταλοίπων ουσιών με ορμονική δράση ή θυρεοστατική δράση ⁽²⁾, και η απόφαση 93/257/ΕΟΚ της Επιτροπής, της 15ης Απριλίου 1993, περί θεσπίσεως των μεθόδων αναφοράς και του καταλόγου των εθνικών εργαστηρίων αναφοράς για την ανίχνευση καταλοίπων ⁽³⁾, όπως τροποποιήθηκε τελευταία φορά από την απόφαση 98/536/ΕΚ ⁽⁴⁾ επανεξετάστηκαν κατά τρόπον ώστε να ληφθούν υπόψη οι επιστημονικές και τεχνικές εξελίξεις, κρίθηκαν παρωχημένες ως προς το σκοπό που εξυπηρετούν και τις διατάξεις τους και είναι συνεπώς σκόπιμο να καταργηθούν με την παρούσα απόφαση.
- (10) Για να είναι δυνατή η προσαρμογή των μεθόδων ανάλυσης για τα επίσημα δείγματα στις διατάξεις της παρούσας απόφασης, είναι σκόπιμο να προβλεφθεί μεταβατική περίοδος.
- (11) Τα μέτρα που προβλέπονται στην παρούσα απόφαση είναι σύμφωνα με τη γνώμη της μόνιμης επιτροπής για την τροφική αλυσίδα και την υγεία των ζώων,

ΕΞΕΔΩΣΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΑΠΟΦΑΣΗ:

Άρθρο 1

Αντικείμενο και πεδίο εφαρμογής

Η παρούσα απόφαση προβλέπει κανόνες για τις αναλυτικές μεθόδους που χρησιμοποιούνται κατά τις δοκιμές ανάλυσης των επίσημων δειγμάτων που λαμβάνονται σύμφωνα με το άρθρο 15 παράγραφος 1 δεύτερη πρόταση της οδηγίας 96/23/EK και καθορίζει κοινά κριτήρια για την ερμηνεία των αναλυτικών αποτελεσμάτων των εργαστηρίων επίσημου ελέγχου για αυτά τα δείγματα.

⁽¹⁾ ΕΕ L 286 της 18.10.1990, σ. 33.

⁽²⁾ ΕΕ L 118 της 14.5.1993, σ. 64.

⁽³⁾ ΕΕ L 118 της 14.5.1993, σ. 75.

⁽⁴⁾ ΕΕ L 251 της 11.9.1998, σ. 39.

▼B

Η παρούσα απόφαση δεν εφαρμόζεται στις περιπτώσεις στις οποίες έχουν θεσπιστεί ειδικότεροι κανόνες με άλλες κοινοτικές νομοθετικές πράξεις.

*Άρθρο 2***Ορισμοί**

Για τους σκοπούς της παρούσας απόφασης ισχύουν οι ορισμοί της οδηγίας 96/23/EK και του ►**M1** παραρτήματος I ◀ της παρούσας απόφασης.

*Άρθρο 3***Αναλυτικές μέθοδοι**

Τα κράτη μέλη λαμβάνουν όλα τα αναγκαία μέτρα για να εξασφαλίσουν ότι τα επίσημα δείγματα που λαμβάνονται σύμφωνα με την οδηγία 96/23/EK υποβάλλονται σε ανάλυση με μεθόδους οι οποίες:

- α) είναι τεκμηριωμένες στις οδηγίες των δοκιμών, κατά προτίμηση σύμφωνα με το ISO 78-2 (6)·
- β) είναι σύμφωνες με το κεφάλαιο 2 του ►**M1** παραρτήματος I ◀ της παρούσας απόφασης·
- γ) έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφονται στο μέρος 3 του ►**M1** παραρτήματος I ◀·
- δ) συμμορφώνονται με τα σχετικά ελάχιστα απαιτούμενα όρια επίδοσης που καθορίζονται σύμφωνα με το άρθρο 4.

▼M2*Άρθρο 4*

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν ότι οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των ουσιών που ακολουθούν συμμορφώνονται με τα ελάχιστα απαιτούμενα όρια επίδοσης (MRPL) τα οποία καθορίζονται στο παράρτημα II, ως προς τις μήτρες που αναφέρονται στο εν λόγω παράρτημα:

- α) χλωραμφενικόλη·
- β) μεταβολίτες νιτροφουρανίων·
- γ) μεδροξυπρογεστερόνη·
- δ) πράσινο του μαλαχίτη.

▼B*Άρθρο 5***Έλεγχος της ποιότητας**

Τα κράτη μέλη εξασφαλίζουν την ποιότητα των αποτελεσμάτων της ανάλυσης των δειγμάτων που λαμβάνονται σύμφωνα με την οδηγία 96/23/EK, ιδίως με δοκιμές παρακολούθησης ή/και αποτελέσματα διακρίβωσης σύμφωνα με το κεφάλαιο 5.9 του ISO 17025 (1).

*Άρθρο 6***Ερμηνεία των αποτελεσμάτων**

1. Το αποτέλεσμα μιας ανάλυσης θεωρείται μη συμμορφόμενο εάν υπάρχει υπέρβαση του ορίου απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης για την αναλυτέα ουσία.
2. Εάν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο για μια ουσία, το όριο απόφασης είναι η συγκέντρωση πέραν της οποίας μπορεί να αποφασιστεί με στατιστική βεβαιότητα $1 - \alpha$ εάν έχει υπάρξει αληθώς υπέρβαση του επιτρεπόμενου ορίου.
3. Εάν δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο για μια ουσία, το όριο απόφασης είναι η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία

▼B

μία μέθοδος μπορεί να διακρίνει με στατιστική βεβαιότητα $1 - \alpha$ εάν είναι παρούσα η συγκεκριμένη αναλυτέα ουσία.

4. Για τις ουσίες της ομάδας A του παραρτήματος I της οδηγίας 96/23/EK, το σφάλμα α είναι 1 % ή μικρότερο. Για όλες τις άλλες ουσίες το σφάλμα α είναι 5 % ή μικρότερο.

*Άρθρο 7***Κατάργηση**

Καταργούνται οι αποφάσεις 90/515/ΕΟΚ, 93/256/ΕΟΚ και 93/257/ΕΟΚ.

*Άρθρο 8***Μεταβατικές διατάξεις**

Για τις ουσίες της ομάδας A του παραρτήματος I της οδηγίας 96/23/EK, οι μέθοδοι για την ανάλυση των επίσημων δειγμάτων οι οποίες πληρούν τα κριτήρια που έχουν καθοριστεί στις αποφάσεις 90/515/ΕΟΚ, 93/256/ΕΟΚ και 93/257/ΕΟΚ μπορούν να χρησιμοποιούνται έως και δύο χρόνια μετά την έναρξη ισχύος της παρούσας απόφασης. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται σήμερα για τις ουσίες της ομάδας B του παραρτήματος I της οδηγίας 96/23/EK πρέπει να συμμορφωθούν με την παρούσα απόφαση το αργότερο πέντε χρόνια μετά την ημερομηνία εφαρμογής της παρούσας απόφασης.

*Άρθρο 9***Ημερομηνία εφαρμογής**

Η παρούσα απόφαση αρχίζει να ισχύει την 1η Σεπτεμβρίου 2002.

*Άρθρο 10***Αποδέκτες**

Η παρούσα απόφαση απευθύνεται στα κράτη μέλη.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΔΟΣΗΣ, ΑΛΛΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

1. ΟΡΙΣΜΟΙ

- 1.1. Ως ακρίβεια νοείται η εγγύτητα μεταξύ του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς (2). Προσδιορίζεται με τον προσδιορισμό ορθότητας και πιστότητας.
- 1.2. Ως σφάλμα άλφα (α) νοείται η πιθανότητα να είναι συμμορφούμενο το δοκιμασθέν δείγμα, ακόμα και αν η μέτρηση κατέληξε σε μη συμμορφούμενα αποτελέσματα («ψευδής απόφαση περί μη συμμόρφωσης»).
- 1.3. Ως αναλυτέα ουσία νοείται η ουσία που πρέπει να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί ή/και να προσδιορισθεί ποσοτικά καθώς και τα παράγωγά της που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.
- 1.4. Ως σφάλμα βήτα (β) νοείται η πιθανότητα να είναι αληθώς μη συμμορφούμενο το δοκιμασθέν δείγμα, ακόμα και αν η μέτρηση κατέληξε σε συμμορφούμενα αποτελέσματα («ψευδής απόφαση περί συμμόρφωσης»).
- 1.5. Ως συστηματικό σφάλμα νοείται η διαφορά μεταξύ του αναμενόμενου αποτελέσματος της δοκιμής και μιας αποδεκτής τιμής αναφοράς (2).
- 1.6. Ως πρότυπο βαθμονόμησης νοείται μία διάταξη μετρήσεων η οποία εκφράζει την ποσότητα της ουσίας που μας ενδιαφέρει κατά τρόπον ώστε να συνδέεται η τιμή της ουσίας με μία βάση αναφοράς.
- 1.7. Ως πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (CRM) νοείται ένα υλικό στο οποίο έχει αποδοθεί συγκεκριμένη περιεκτικότητα σε αναλυτέα ουσία.
- 1.8. Ως συγχρωματογραφία νοείται μια διαδικασία κατά την οποία το εκχύλισμα πριν από τη χρωματογραφία μοιράζεται σε δύο μέρη. Ένα μέρος υποβάλλεται σε χρωματογραφία όπως είναι. Το δεύτερο μέρος αναμειγνύεται με την πρότυπη αναλυτέα ουσία που πρόκειται να μετρηθεί. Αυτό το αναμειγμένο διάλυμα εκχυλίσματος και πρότυπης ουσίας υποβάλλεται σε χρωματογραφία. Η ποσότητα της προστιθέμενης πρότυπης αναλυτέας ουσίας πρέπει να είναι όμοια με την εκτιμώμενη ποσότητα της αναλυτέας ουσίας στο εκχύλισμα. Η μέθοδος αυτή έχει σχεδιαστεί για τη βελτίωση της ταυτοποίησης της αναλυτέας ουσίας όταν χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές μέθοδοι, ειδικά όταν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί το κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο.
- 1.9. Ως συλλογική μελέτη (collaborative study) νοείται η ανάλυση του ίδιου δείγματος με την ίδια μέθοδο ώστε να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά επίδοσης της μεθόδου. Η μελέτη καλύπτει και το τυχαίο σφάλμα μέτρησης και το συστηματικό εργαστηριακό σφάλμα.
- 1.10. Ως μέθοδος επιβεβαίωσης νοείται η μέθοδος που παρέχει πλήρη ή συμπληρωματικά στοιχεία που επιτρέπουν την αδιαφιλόνικη ταυτοποίηση της αναλυτέας ουσίας και, εάν είναι αναγκαίο, τον ποσοτικό προσδιορισμό της στο επίπεδο που ενδιαφέρει.
- 1.11. Ως όριο απόφασης (CC α) νοείται το όριο στο οποίο και πάνω από το οποίο μπορεί να αποφασισθεί ότι ένα δείγμα είναι μη συμμορφούμενο με πιθανότητα σφάλματος α .
- 1.12. Ως ικανότητα ανίχνευσης (CC β) νοείται η μικρότερη περιεκτικότητα σε ουσία που μπορεί να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί ή/και να προσδιορισθεί ποσοτικά σε ένα δείγμα με πιθανότητα σφάλματος β . Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, η ικανότητα ανίχνευσης είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση για την οποία μια μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύσει αληθώς μολυσμένα δείγματα με στατιστική βεβαιότητα 1 - β . Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα ανίχνευσης είναι η συγκέντρωση στην οποία η μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύει συγκεντρώσεις στο επιτρεπόμενο όριο με στατιστική βεβαιότητα 1 - β .

▼B

- 1.13. Ως εμβολιασμένο υλικό δείγματος νοείται ένα δείγμα εμπλουτισμένο με γνωστή ποσότητα της αναλυτέας ουσίας που πρόκειται να ανιχνευθεί.
- 1.14. Ως διεργαστηριακή μελέτη (σύγκριση) νοείται η οργάνωση, διεξαγωγή και αξιολόγηση δοκιμών επί του ίδιου δείγματος από δύο ή περισσότερα εργαστήρια σύμφωνα με προκαθορισμένους όρους για τον προσδιορισμό της επίδοσης των δοκιμών. Ανάλογα με τον σκοπό που εξυπηρετεί η μελέτη μπορεί να χαρακτηριστεί ως συλλογική μελέτη ή ως μελέτη ικανότητας.
- 1.15. Ως εσωτερικό πρότυπο (IS) νοείται μία ουσία που δεν περιέχεται στο δείγμα, με φυσικές-χημικές ιδιότητες όσο το δυνατόν παρόμοιες με εκείνες της αναλυτέας ουσίας, που πρέπει να ταυτοποιηθεί και η οποία προστίθεται σε κάθε δείγμα καθώς και σε κάθε πρότυπο βαθμονόμησης.
- 1.16. Ως εργαστηριακό δείγμα νοείται ένα δείγμα παρασκευαζόμενο για να σταλεί στο εργαστήριο προς έλεγχο ή δοκιμή.
- 1.17. Ως επίπεδο που ενδιαφέρει νοείται η συγκέντρωση ουσίας ή αναλυτέας ουσίας σε ένα δείγμα, της οποίας έχει σημασία να προσδιορισθεί η συμμόρφωση με τη νομοθεσία.
- 1.18. Ως ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης (MRPL) νοείται η ελάχιστη περιεκτικότητα ενός δείγματος σε μια αναλυτέα ουσία, η οποία πρέπει τουλάχιστον να ανιχνευθεί και να επιβεβαιωθεί. Σκοπός είναι η εναρμόνιση της αναλυτικής επίδοσης των μεθόδων που εφαρμόζονται για ουσίες για τις οποίες δεν έχει καθορισθεί επιτρεπόμενο όριο.
- 1.19. Ως χαρακτηριστικό επίδοσης νοείται η λειτουργική ιδιότητα που μπορεί να αποδοθεί σε μια αναλυτική μέθοδο. Μπορεί να είναι, για παράδειγμα, η ειδικότητα, η ακρίβεια, η ορθότητα, η πιστότητα, η επαναληψιμότητα, η αναπαραγωγιμότητα, η ανάκτηση, η ικανότητα ανίχνευσης και η ανθεκτικότητα.
- 1.20. Ως κριτήρια επίδοσης νοούνται οι απαιτήσεις για ένα χαρακτηριστικό επίδοσης σύμφωνα με το οποίο μπορεί να κριθεί ότι η αναλυτική μέθοδος είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο επελέγη και παράγει αξιόπιστα αποτελέσματα.
- 1.21. Ως επιτρεπόμενο όριο νοείται το ανώτατο όριο καταλοίπου, το ανώτατο επίπεδο ή άλλο ανώτατο όριο ανοχής για ουσίες, τα οποία έχουν καθορισθεί σε άλλα σημεία της κοινοτικής νομοθεσίας.
- 1.22. Ως πιστότητα νοείται η εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών υπό ρητά καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες. Το μέτρο της πιστότητας εκφράζεται συνήθως με όρους μη πιστότητας και υπολογίζεται ως τυπική απόκλιση του αποτελέσματος της δοκιμής. Μικρότερη πιστότητα προσδιορίζεται με μια μεγαλύτερη τυπική απόκλιση (2).
- 1.23. Ως μελέτη ικανότητας νοείται η ανάλυση του ίδιου δείγματος κατά την οποία επιτρέπεται τα εργαστήρια να επιλέξουν τις μεθόδους τους, υπό την προϋπόθεση ότι οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται υπό συνθήκες συνθήκες. Η μελέτη πρέπει να διεξάγεται σύμφωνα με τον οδηγό ISO 43-1 (3) και 43-2 (4) και μπορεί να χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αναπαραγωγιμότητας των μεθόδων.
- 1.24. Ως ποιοτική μέθοδος νοείται μια αναλυτική μέθοδος η οποία ταυτοποιεί μια ουσία βάσει των χημικών, βιολογικών ή φυσικών ιδιοτήτων της.
- 1.25. Ως ποσοτική μέθοδος νοείται μια αναλυτική μέθοδος η οποία προσδιορίζει την ποσότητα ή το κλάσμα μάζας μιας ουσίας κατά τρόπον ώστε να μπορεί να εκφραστεί ως αριθμητική τιμή στις κατάλληλες μονάδες.
- 1.26. Ως τυφλός προσδιορισμός αντιδραστηρίου νοείται η πλήρης αναλυτική διαδικασία που εφαρμόζεται χωρίς τη δόση προς ανάλυση ή με τη χρήση ισοδύναμης ποσότητας του κατάλληλου διαλύτη αντί της δόσης προς ανάλυση.
- 1.27. Ως ανάκτηση νοείται το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία. Προσδιορίζεται κατά την επικύρωση, εάν δεν διατίθεται πιστοποιημένο υλικό αναφοράς.

▼B

- 1.28. Ως υλικό αναφοράς νοείται το υλικό του οποίου μία ή περισσότερες ιδιότητες έχουν επιβεβαιωθεί με μία επικυρωμένη μέθοδο, έτσι ώστε αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βαθμολόγηση συσκευής ή για την επαλήθευση μιας μεθόδου μέτρησης.
- 1.29. Ως επαναληψιμότητα νοείται η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (2).
- 1.30. Ως συνθήκες επαναληψιμότητας νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό (2).
- 1.31. Ως αναπαραγωγιμότητα νοείται η πιστότητα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (2) (4).
- 1.32. Ως συνθήκες αναπαραγωγιμότητας νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής σε διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικούς χειριστές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό (2) (4).
- 1.33. Ως ανθεκτικότητα νοείται η επιδεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου σε αλλαγές των πειραματικών συνθηκών που μπορούν επίσης να πάρουν τη μορφή καταλόγου των υλικών του δείγματος, των αναλυτέων ουσιών, των συνθηκών αποθήκευσης, των περιβαλλοντικών συνθηκών ή/και των συνθηκών προετοιμασίας του δείγματος υπό τις οποίες η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί όπως παρουσιάστηκε ή με συγκεκριμένες ήσσονος σημασίας μεταβολές. Για όλες τις πειραματικές συνθήκες οι οποίες μπορεί στην πράξη να υπόκεινται σε διακύμανση (π.χ. σταθερότητα των αντιδραστηρίων, σύνθεση του δείγματος, pH, θερμοκρασία), πρέπει να αναφέρεται κάθε μεταβολή που θα μπορούσε να επηρεάσει το αποτέλεσμα της ανάλυσης.
- 1.34. Ως τυφλός προσδιορισμός δείγματος νοείται η πλήρης αναλυτική διαδικασία που εφαρμόζεται σε μία δόση προς ανάλυση η οποία λαμβάνεται από ένα δείγμα από το οποίο απουσιάζει η αναλυτέα ουσία.
- 1.35. Ως μέθοδοι διαλογής (screening) νοούνται οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της παρουσίας μιας ουσίας ή μιας κατηγορίας ουσιών στο επίπεδο που ενδιαφέρει. Οι μέθοδοι αυτές έχουν την ικανότητα επεξεργασίας μεγάλων ποσοτήτων και χρησιμοποιούνται για τη διαλογή μεγάλου αριθμού δειγμάτων για ενδεχόμενα μη συμμορφούμενα αποτελέσματα. Είναι ειδικά σχεδιασμένες για την αποφυγή ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων.
- 1.36. Ως μελέτη ενός μόνο εργαστηρίου (εσωτερική επικύρωση) νοείται μια αναλυτική μελέτη την οποία διενεργεί ένα μόνο εργαστήριο χρησιμοποιώντας μια μέθοδο για την ανάλυση του ίδιου ή διαφορετικών υλικών δοκιμής υπό διαφορετικές συνθήκες σε δικαιολογημένα μεγάλα χρονικά διαστήματα.
- 1.37. Ως ειδικότητα νοείται η ικανότητα μιας μεθόδου να διακρίνει μια μετρούμενη αναλυτέα ουσία από άλλες ουσίες. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι κατά κύριο λόγο συνάρτηση της χρησιμοποιούμενης τεχνικής μέτρησης, μπορεί όμως να ποικίλλει ανάλογα με την κατηγορία της ένωσης ή της μήτρας.
- 1.38. Ως μέθοδος της σταθερής προσθήκης νοείται μια διαδικασία κατά την οποία το δείγμα δοκιμής μοιράζεται σε δύο (ή περισσότερες) δόσεις προς ανάλυση. Μια δόση αναλύεται όπως είναι και γνωστές ποσότητες της πρότυπης αναλυτέας ουσίας προστίθενται στις άλλες δόσεις προς ανάλυση πριν από την ανάλυση. Η ποσότητα της πρότυπης αναλυτέας ουσίας που προστίθεται πρέπει να είναι διπλάσια έως και πενταπλάσια από την εκτιμώμενη ποσότητα της αναλυτέας ουσίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή έχει σχεδιαστεί για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας μιας αναλυτέας ουσίας σε ένα δείγμα, λαμβάνοντας υπόψη την ανάκτηση της αναλυτικής διαδικασίας.
- 1.39. Ως πρότυπη αναλυτέα ουσία νοείται μια αναλυτέα ουσία γνωστής και πιστοποιημένης περιεκτικότητας και καθαρότητας που θα χρησιμοποιηθεί ως αναφορά στην ανάλυση.
- 1.40. Ως ουσία νοείται η ύλη με ιδιαίτερη ή ορισμένη χημική σύσταση καθώς και οι μεταβολίτες της.

▼B

- 1.41. Ως δόση προς ανάλυση νοείται η ποσότητα υλικού που λαμβάνεται από το δείγμα δοκιμής επί της οποίας διεξάγεται η δοκιμή ή παρατήρηση.
- 1.42. Ως δείγμα δοκιμής νοείται δείγμα παρασκευαζόμενο από το εργαστηριακό δείγμα και από το οποίο θα ληφθούν δόσεις προς δοκιμή.
- 1.43. Ως ορθότητα νοείται η εγγύτητα μεταξύ της τιμής του μέσου όρου που λαμβάνεται από μια μεγάλη σειρά αποτελεσμάτων δοκιμών και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Η ορθότητα εκφράζεται συνήθως ως συστηματικό σφάλμα (2).
- 1.44. Ως μονάδες νοούνται οι μονάδες που περιγράφονται στο ISO 31 (20) και στην οδηγία 71/354/EΚ (19).
- 1.45. Ως επικύρωση νοείται η επιβεβαίωση κατόπιν εξέτασης και η προσκόμιση πραγματικών τεκμηρίων για το ότι πληρούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για μία συγκεκριμένη σκοπούμενη χρήση (1).
- 1.46. Ως ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα νοείται η πιστότητα στο ίδιο εργαστήριο υπό ρητώς καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες (σχετικά π.χ. με μία μέθοδο, τα υλικά δοκιμής, τους χειριστές, το περιβάλλον) σε δικαιολογημένα μεγάλα χρονικά διαστήματα.

2. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΠΙΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΓΙΑ ΤΙΣ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Οι αναλυτικές μέθοδοι ή οι συνδυασμοί μεθόδων διαφορετικών από αυτές που περιγράφονται στη συνέχεια μπορούν να χρησιμοποιούνται μόνο για διαλογή (screening) ή για επιβεβαιωτικούς σκοπούς, εάν μπορεί να αποδειχθεί ότι πληρούν τις απαιτήσεις της παρούσας απόφασης.

2.1. ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

2.1.1. Χειρισμός των δειγμάτων:

Η λήψη, ο χειρισμός και η επεξεργασία των δειγμάτων πρέπει να γίνονται κατά τρόπο ώστε η δυνατότητα ανίχνευσης της αναλυτέας ουσίας να είναι η μέγιστη. Οι διαδικασίες χειρισμού του δείγματος πρέπει να εμποδίζουν την τυχαία επιμόλυνση ή απώλεια της αναλυτέας ουσίας.

2.1.2. Εκτέλεση των δοκιμών

2.1.2.1. Ανάκτηση

Κατά την ανάλυση δειγμάτων, η ανάκτηση πρέπει να προσδιορίζεται σε καθεμία παρτίδα από τα δείγματα, εάν χρησιμοποιείται σταθερός διορθωτικός συντελεστής ανάκτησης. Εάν η ανάκτηση βρίσκεται εντός των ορίων, μπορεί τότε να χρησιμοποιηθεί ο σταθερός διορθωτικός συντελεστής. Διαφορετικά πρέπει να χρησιμοποιείται ο συντελεστής ανάκτησης που προκύπτει για τη συγκεκριμένη παρτίδα, εκτός εάν εφαρμόζεται ο ειδικός συντελεστής ανάκτησης της αναλυτέας ουσίας στο δείγμα οπότε χρησιμοποιείται η μέθοδος της σταθερής προσθήκης (βλέπε 3.5) ή ένα εσωτερικό πρότυπο για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας αναλυτέας ουσίας σε ένα δείγμα.

2.1.2.2. Ειδικότητα

Μια μέθοδος πρέπει να είναι σε θέση να διακρίνει την αναλυτέα ουσία από άλλες ουσίες υπό πειραματικές συνθήκες. Πρέπει να γίνεται εκτίμηση σχετικά με την έκταση στην οποία αυτό είναι δυνατό να συμβεί. Πρέπει να χρησιμοποιούνται στρατηγικές για την υπέρβαση τυχόν προβλεπτών παρεμποδίσεων με ουσίες όταν χρησιμοποιείται η προβλεφθείσα τεχνική μέτρησης, π.χ. ομόλογες ουσίες, ανάλογες ουσίες, μεταβολίτες του καταλοίπου που μας ενδιαφέρει. Έχει πρωταρχική σημασία να διερευνάται η παρεμπόδιση που μπορεί να προκληθεί από συστατικά της μήτρας.

2.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΑΖΙΚΗΣ ΕΞΕΤΑΣΗΣ

Μόνον εκείνες οι τεχνικές ανάλυσης για τις οποίες μπορεί να καταδειχθεί με τεκμηριωμένο και επαληθεύσιμο τρόπο ότι είναι επικυρωμένες και έχουν ψευδώς συμμορφούμενο ποσοστό < 5 % (σφάλμα - β) στο επίπεδο που ενδιαφέρει, πρέπει να εφαρμόζονται για διαλογή (screening) σύμφωνα με την οδηγία 96/23/EΚ. Στην περίπτωση που υπάρχουν υποψίες

▼B

για μη συμμορφούμενο αποτέλεσμα, το αποτέλεσμα αυτό πρέπει να επιβεβαιώνεται με μία μέθοδο επιβεβαίωσης.

2.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ ΓΙΑ ΟΡΓΑΝΙΚΑ ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ΚΑΙ ΠΡΟΣΜΕΙΞΕΙΣ

Οι μέθοδοι επιβεβαίωσης για τα οργανικά κατάλοιπα ή τις προσμείξεις πρέπει να παρέχουν πληροφορίες για τη χημική δομή της αναλυτέας ουσίας. Συνεπώς, οι μέθοδοι που βασίζονται μόνο στη χρωματογραφική ανάλυση χωρίς να χρησιμοποιούν φασματομετρική ανίχνευση δεν είναι κατάλληλες να χρησιμοποιούνται μόνες τους ως μέθοδοι επιβεβαίωσης. Ωστόσο, εάν κάποια τεχνική δεν έχει επαρκή ειδικότητα, η επιθυμητή ειδικότητα μπορεί να επιτευχθεί με αναλυτικές διαδικασίες που συνίστανται σε κατάλληλους συνδυασμούς εκκαθάρισης, χρωματογραφικού διαχωρισμού (διαχωρισμών) και φασματομετρικής ανίχνευσης.

Οι ακόλουθες μέθοδοι ή συνδυασμοί μεθόδων θεωρούνται κατάλληλες για την ταυτοποίηση των οργανικών καταλοίπων ή προσμείξεων για τις εξής ομάδες ουσιών:

Πίνακας 1

Κατάλληλες μέθοδοι επιβεβαίωσης για τα οργανικά κατάλοιπα ή τις προσμείξεις

Τεχνική μέτρησης	Ουσίες του παραρτήματος 1 96/23/EK	Περιορισμοί
LC ή GC με φασματομετρία μάζας	Ομάδα A και B	Μόνο εφόσον προηγείται είτε ένας on-line ή off-line χρωματογραφικός διαχωρισμός Μόνο εφόσον χρησιμοποιούνται τεχνικές πλήρους σάρωσης ή τουλάχιστον 3 (ομάδα B) ή 4 (ομάδα A) μονάδες ταυτοποίησης για τεχνικές οι οποίες δεν καταγράφουν φάσματα πλήρους σάρωσης
LC ή GC με φασματοφωτομετρία IR	Ομάδα A και B	Πρέπει να πληρούνται ειδικές απαιτήσεις για την απορρόφηση στη φασματοφωτομετρία IR
LC πλήρους σάρωσης (DAD)	Ομάδα B	Πρέπει να πληρούνται ειδικές απαιτήσεις για την απορρόφηση στην φασματοφωτομετρία UV
LC-φθορισμομετρία	Ομάδα B	Εφαρμόζεται στα μόρια που εμφανίζουν φυσική ικανότητα φθορισμού και σε μόρια που εμφανίζουν φθορισμό ύστερα είτε από μετατροπή είτε από παραγοντοποίηση.
2-D TLC-πλήρους σάρωσης UV/VIS	Ομάδα B	Η HPTLC δύο διαστάσεων και η συγχρωματογραφία είναι υποχρεωτικές.
GC-ανίχνευση σύλληψης ηλεκτρονίων	Ομάδα B	Μόνο εάν χρησιμοποιούνται δύο στήλες διαφορετικής πολικότητας
LC-ανοσογράφημα	Ομάδα B	Μόνο εάν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά χρωματογραφικά συστήματα ή μια δεύτερη, ανεξάρτητη μέθοδος ανίχνευσης.
LC-UV/VIS (μονής δέσμης)	Ομάδα B	Μόνο εάν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά χρωματογραφικά συστήματα ή μια δεύτερη, ανεξάρτητη μέθοδος ανίχνευσης.

2.3.1. Κοινά κριτήρια επίδοσης και απαιτήσεις

Οι μέθοδοι επιβεβαίωσης πρέπει, σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό, να παρέχουν πληροφορίες για τη χημική δομή της αναλυτέας ουσίας. Όταν περισσότερες της μίας ενώσεις δίνουν την ίδια απάντηση, τότε η μέθοδος δεν μπορεί να κάνει διάκριση μεταξύ αυτών των ενώσεων. Οι μέθοδοι που βασίζονται μόνο στη χρωματογραφική ανάλυση χωρίς να χρησιμοποιούν φασματομετρική ανίχνευση δεν είναι κατάλληλες να χρησιμοποιηθούν μόνες τους ως μέθοδοι επιβεβαίωσης.

Στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιείται στη μέθοδο ένα κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, το πρότυπο αυτό πρέπει να προστίθεται στη δόση προς ανάλυση στην αρχή της διαδικασίας εκχύλισης. Ανάλογα με το τι είναι διαθέσιμο, πρέπει να χρησιμοποιούνται είτε σταθερές ραδιοεπισημασμένες μορφές της αναλυτέας ουσίας, που είναι ιδιαιτέρως κατάλληλες για την ανίχ-

▼B

νευση με φασματομετρία μάζας, είτε ενώσεις που έχουν δομική σχέση με την αναλυτέα ουσία.

Εάν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κατάλληλο εσωτερικό πρότυπο, η ταυτοποίηση της αναλυτέας ουσίας πρέπει να επιβεβαιώνεται με συγχρωματογραφία. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να ληφθεί μία μόνο κορυφή, το δε ύψος (ή το εμβαδόν) της υψηλότερης κορυφής ισοδυναμεί με την ποσότητα της προστιθέμενης αναλυτέας ουσίας. Με την αέρια χρωματογραφία (GC) ή την υγρή χρωματογραφία (LC), το εύρος της κορυφής στο ήμισυ του μεγίστου ύψους πρέπει να κυμαίνεται στο 90-110 % του αρχικού εύρους, και οι χρόνοι κατακράτησης θα πρέπει να είναι οι ίδιοι με περιθώριο 5 %. Για τις μεθόδους TLC, μόνο η κηλίδα που υποτίθεται ότι οφείλεται στην αναλυτέα ουσία πρέπει να καθίσταται εντονότερη· νέα κηλίδα δεν πρέπει να εμφανίζεται και η εικόνα δεν πρέπει να μεταβάλλεται.

Το υλικό αναφοράς ή το εμβολιασμένο υλικό που περιέχει γνωστές ποσότητες της αναλυτέας ουσίας στο επιτρεπόμενο όριο ή στο όριο απόφασης ή πλησίον αυτών (μη συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου), καθώς και τα συμμορφούμενα υλικά ελέγχου και τα τυφλά αντιδραστήρια, πρέπει κατά προτίμηση να διοχετεύονται καθ' όλη τη διαδικασία ταυτόχρονα με κάθε παρτίδα των αναλυόμενων δειγμάτων δοκιμής. Η συνιστώμενη σειρά για την έγχυση των εκχυλισμάτων στο όργανο της ανάλυσης έχει ως εξής: τυφλό αντιδραστήριο, συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου, δείγμα (δείγματα) προς επιβεβαίωση, ξανά συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου και, τέλος, μη συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου. Κάθε παρέκκλιση από αυτήν τη σειρά πρέπει να αιτιολογείται.

2.3.2. Πρόσθετα κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τις ποσοτικές μεθόδους ανάλυσης

2.3.2.1. Ορθότητα των ποσοτικών μεθόδων

Στην περίπτωση επαναλαμβανόμενων αναλύσεων πιστοποιημένου υλικού αναφοράς, το εύρος των αποκλίσεων του πειραματικού προσδιοριζόμενου μέσου κλάσματος μάζας με διόρθωση ανάκτησης από την πιστοποιημένη τιμή είναι ως εξής:

Πίνακας 2

Ελάχιστη ορθότητα των ποσοτικών μεθόδων

Κλάσμα μάζας	Εύρος
≤ 1 μg/kg	- 50 % έως + 20 %
> 1 μg/kg έως 10 μg/kg	- 30 % έως + 10 %
≥ 10 μg/kg	- 20 % έως + 10 %

Όταν δεν υπάρχουν τέτοια CRM, είναι δεκτό να αξιολογείται η ορθότητα των μετρήσεων με την ανάκτηση προσθηκών γνωστών ποσοτήτων της αναλυτέας ουσίας (ή των αναλυτέων ουσιών) σε μία τυφλή μήτρα. Τα δεδομένα που διορθώνονται με τη μέση ανάκτηση είναι αποδεκτά μόνον όταν εμπίπτουν στις τιμές εύρους του πίνακα 2.

2.3.2.2. Πιστότητα των ποσοτικών μεθόδων

Ο διεργαστηριακός συντελεστής μεταβλητότητας (CV) για την επαναλαμβανόμενη ανάλυση ενός υλικού αναφοράς ή εμβολιασμένου υλικού, υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας, δεν πρέπει να υπερβαίνει το επίπεδο που υπολογίζεται με την εξίσωση Horwitz. Η εξίσωση είναι η εξής:

$$CV = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

όπου C το κλάσμα μάζας εκφραζόμενο ως δύναμη του 10 (π.χ. 1 mg/g = 10⁻³). Παραδείγματα στον πίνακα 3:



Πίνακας 3

Παραδείγματα CV αναπαραγωγιμότητας για ποσοτικές μεθόδους για ένα εύρος κλασμάτων μάζας της αναλυτέας ουσίας

Κλάσμα μάζας	CV αναπαραγωγιμότητας (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Για κλάσματα μάζας μικρότερα από 100 µg/kg η εφαρμογή της εξίσωσης Horwitz δίνει απαράδεκτα υψηλές τιμές. Συνεπώς οι συντελεστές μεταβλητότητας για συγκεντρώσεις μικρότερες από 100 µg/kg πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρότεροι.

Για αναλύσεις που γίνονται υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, οι τιμές του ενδοεργαστηριακού συντελεστή μεταβλητότητας κυμαίνονται τυπικά ανάμεσα στο ένα δεύτερο έως δύο τρίτα των ανωτέρω τιμών. Για τις αναλύσεις που πραγματοποιούνται υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ο ενδοεργαστηριακός συντελεστής μεταβλητότητας δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερος του συντελεστή μεταβλητότητας της αναπαραγωγιμότητας.

Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, η μέθοδος πρέπει να επιτυγχάνει ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα όχι μεγαλύτερη από τον συντελεστή μεταβλητότητας αναπαραγωγιμότητας για συγκέντρωση της τάξης του $0,5 \times$ το επιτρεπόμενο όριο.

2.3.3. Κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για την ανίχνευση με φασματομετρία μάζας

Οι μέθοδοι φασματομετρίας μάζας είναι κατάλληλες για μέθοδοι επιβεβαίωσης μόνο αφού προηγηθεί χρωματογραφικός διαχωρισμός είτε σε γραμμή (on-line) είτε εκτός γραμμής (off-line).

2.3.3.1. Χρωματογραφικός διαχωρισμός

Για τις διαδικασίες GC-MS, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός αέριας φάσης πρέπει να πραγματοποιείται με τριχοειδείς στήλες. Για τις διαδικασίες LC-MS ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πρέπει να πραγματοποιείται με τη χρήση των κατάλληλων στηλών LC. Σε κάθε περίπτωση ο ελάχιστος αποδεκτός χρόνος κατακράτησης για την αναλυτέα ουσία υπό εξέταση είναι διπλάσιος του χρόνου κατακράτησης που αντιστοιχεί στον κενό όγκο της στήλης. Ο χρόνος κατακράτησης (ή ο σχετικός χρόνος κατακράτησης) της αναλυτέας ουσίας στη δόση προς ανάλυση πρέπει να συμφωνεί με εκείνον του προτύπου βαθμονόμησης εντός συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος κατακράτησης. Το χρονικό διάστημα κατακράτησης πρέπει να είναι ανάλογο με τη διακριτική ικανότητα του χρωματογραφικού συστήματος. Ο λόγος του χρωματογραφικού χρόνου κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας προς αυτόν του εσωτερικού προτύπου, δηλαδή ο σχετικός χρόνος κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας, πρέπει να αντιστοιχεί σε αυτόν του διαλύματος βαθμονόμησης με ανοχή $\pm 0,5 \%$ για τη GC και $\pm 2,5 \%$ για τη LC.

2.3.3.2. Ανίχνευση με φασματομετρία μάζας

Η ανίχνευση με φασματομετρία μάζας μπορεί να γίνει με τεχνικές MS, όπως η καταγραφή των φασμάτων πλήρους σάρωσης ή η παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM), καθώς και με τεχνικές MS-MSⁿ, όπως η παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (SRM), ή άλλες κατάλληλες τεχνικές MS ή MS-MSⁿ σε συνδυασμό με τους κατάλληλους τρόπους ιονισμού. Στη φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS), η διακριτική ικανότητα, R πρέπει τυπικά να είναι μεγαλύτερη από 10 000 για όλο το εύρος τιμών της μάζας με διακύμανση 10 %.

Πλήρης σάρωση: Όταν ο προσδιορισμός με φασματομετρία μάζας πραγματοποιείται με την καταγραφή φασμάτων πλήρους σάρωσης, η παρουσία όλων των μετρούμενων διαγνωστικών ιόντων (το μοριακό ιόν, οι χαρακτηριστικές ενώσεις προσθήκης του μοριακού ιόντος, τα χαρακτηριστικά ιονικά θραύσματα και όλα ισότοπα ιόντα τους), με σχετική ένταση πάνω από 10 % στο

▼B

φάσμα αναφοράς του προτύπου βαθμονόμησης, είναι υποχρεωτική.

SIM: Εάν ο προσδιορισμός με φασματομετρία μάζας πραγματοποιείται με θραυσματογράφημα, το μοριακό ιόν πρέπει κατά προτίμηση να είναι ένα από τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα (το μοριακό ιόν, οι χαρακτηριστικές ενώσεις προσθήκης του μοριακού ιόντος, τα χαρακτηριστικά ιονικά θραύσματα και όλα ισότοπα ιόντα τους). Τα επιλεγμένα διαγνωστικά ιόντα δεν πρέπει να προέρχονται αποκλειστικά από το ίδιο μέρος του μορίου. Ο λόγος σήματος προς θόρυβο για κάθε διαγνωστικό ιόν πρέπει να είναι $\geq 3:1$.

Πλήρης σάρωση και SIM: Οι σχετικές εντάσεις των ανιχνευθέντων ιόντων, εκφραζόμενες ως ποσοστό της έντασης των ιόντων ή των προϊόντων της μετάπτωσης με τη μεγαλύτερη ένταση, πρέπει να αντιστοιχούν σε εκείνες του προτύπου βαθμονόμησης, είτε από διαλύματα του προτύπου βαθμονόμησης είτε από εμβολιασμένα δείγματα, σε συγκρίσιμες συγκεντρώσεις, μετρούμενες υπό τις ίδιες συνθήκες, εντός του εύρους των ακόλουθων:

Πίνακας 4

Μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές ανοχής για σχετικές εντάσεις ιόντων με τη χρήση ορισμένων τεχνικών φασματομετρίας μάζας

Σχετική ένταση (% της βασικής κορυφής)	EI-GC-MS (σχετικές)	CI-CG-MS, CG-MS ^a LC-MS, LC-MS ^a (σχετικές)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % έως 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % έως 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Ερμηνεία των δεδομένων της φασματομετρίας μάζας: Οι σχετικές εντάσεις των διαγνωστικών ιόντων ή/και τα ζεύγη μητρικό/παράγωγο ιόν πρέπει να ταυτοποιούνται με τη σύγκριση φασμάτων ή με την ενσωμάτωση των σημάτων μόνων των ιχνών μάζας. Οποτεδήποτε εφαρμόζεται η διόρθωση υπόβαθρου σήματος (διόρθωση θορύβου), αυτή πρέπει να εφαρμόζεται ομοιόμορφα σε όλη την παρτίδα (βλέπε 2.3.1 παράγραφος 4) και να δηλώνεται σαφώς.

Πλήρης σάρωση: Εάν φάσματα πλήρους σάρωσης καταγράφονται σε ένα μόνο φασματογράφημα μάζας, πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα ιόντα με σχετική ένταση ≥ 10 % της βασικής κορυφής. Το μοριακό ιόν πρέπει να περιλαμβάνεται εάν είναι παρόν στο φάσμα αναφοράς με σχετική ένταση ≥ 10 %. Τουλάχιστον τέσσερα ιόντα πρέπει να κείνται εντός των μέγιστων επιτρεπόμενων τιμών ανοχής για τις σχετικές εντάσεις ιόντων (πίνακας 5). Μπορεί να γίνει χρήση βιβλιογραφικής έρευνας με τη βοήθεια υπολογιστή. Στην περίπτωση αυτή, η σύγκριση των δεδομένων της φασματομετρίας μάζας στα δείγματα δοκιμής με τα δεδομένα του διαλύματος βαθμονόμησης πρέπει να υπερβαίνει έναν παράγοντα κρίσιμης αντιστοίχισης. Ο παράγοντας αυτός θα προσδιοριστεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επικύρωσης για κάθε αναλυτέα ουσία βάσει των φασμάτων για τα οποία πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια. Η μεταβλητότητα στα φάσματα που οφείλεται στη μήτρα του δείγματος και την επίδοση του ανιχνευτή πρέπει να ελέγχεται.

SIM: Εάν θραύσματα μάζας μετρούνται με τη χρήση τεχνικών διαφορετικών από τις τεχνικές πλήρους σάρωσης, χρησιμοποιείται ένα σύστημα μονάδων ταυτοποίησης για την ερμηνεία των δεδομένων. Για την επιβεβαίωση των ουσιών της ομάδας A του παραρτήματος I της οδηγίας 96/23/EK, απαιτούνται τουλάχιστον 4 μονάδες ταυτοποίησης. Για την επιβεβαίωση των ουσιών της ομάδας B του παραρτήματος I της οδηγίας 96/23/EK, απαιτούνται τουλάχιστον 3 μονάδες ταυτοποίησης. Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνεται ο αριθμός των μονάδων ταυτοποίησης που μπορεί να λάβει καθεμία από τις βασικές τεχνικές φασματομετρίας μάζας. Ωστόσο, προκειμένου να μπορέσουν να δοθούν

▼B

μονάδες ταυτοποίησης που απαιτούνται για την επιβεβαίωση και να υπολογιστεί το σύνολο των μονάδων ταυτοποίησης:

- α) πρέπει να μετρηθεί τουλάχιστον ένας λόγος ιόντος και
- β) όλοι οι σχετικοί μετρηθέντες λόγοι ιόντων πρέπει να πληρούν τα ανωτέρω κριτήρια και
- γ) κατ' ανώτατο όριο τρεις διαφορετικές τεχνικές μπορούν να συνδυαστούν για να επιτευχθεί ο ελάχιστος αριθμός μονάδων ταυτοποίησης.

Πίνακας 5

Σχέση μεταξύ ενός εύρους κατηγοριών θραυσμάτων μάζας και μονάδων ταυτοποίησης

Τεχνική MS	Μονάδες ταυτοποίησης ανά ιόν
Φασματομετρία μάζας χαμηλής διακριτικής ικανότητας (LR)	1,0
LR-MS ⁿ Μητρικό ιόν	1,0
LR-MS ⁿ Προϊόντα μετάπτωσης	1,5
HRMS	2,0
HR-MS ⁿ Μητρικό ιόν	2,0
HR-MS ⁿ Προϊόντα μετάπτωσης	2,5

Υποσημειώσεις:

- (1) Κάθε ιόν μπορεί να μετρηθεί μία μόνο φορά.
- (2) Η GC-MS με τη χρήση ιονισμού μορίων με σύγκρουση με ηλεκτρόνιο θεωρείται διαφορετική τεχνική από την GC-MS με χρήση χημικού ιονισμού.
- (3) Διαφορετικές αναλυτές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αυξηθεί ο αριθμός των μονάδων ταυτοποίησης μόνον εάν τα παράγωγα χρησιμοποιούν διαφορετικούς μηχανισμούς αντίδρασης.
- (4) Για τις ουσίες της ομάδας Α του παραρτήματος 1 της οδηγίας 96/23/ΕΚ, εάν χρησιμοποιείται κάποια από τις ακόλουθες τεχνικές στην αναλυτική διαδικασία: HPLC σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία πλήρους σάρωσης με συστοιχία διόδων (DAD) ή HPLC σε συνδυασμό με φθορισμομετρική ανίχνευση ή HPLC σε συνδυασμό με ανοσογράφημα ή TLC δύο διαστάσεων σε συνδυασμό με φασματομετρία· μπορούν να συνεισφέρουν στο μέγιστο μιας μονάδας ταυτοποίησης, υπό την προϋπόθεση ότι πληρούνται τα σχετικά κριτήρια για τις τεχνικές αυτές.
- (5) Τα προϊόντα μετάπτωσης περιλαμβάνουν θυγατρικά και θυγατρικά 2ης γενιάς προϊόντα.

Πίνακας 6

Παραδείγματα αριθμού μονάδων ταυτοποίησης για ένα φάσμα τεχνικών και συνδυασμών τους (n = ακέραιος)

Τεχνική	Αριθμός ιόντων	Μονάδες ταυτοποίησης
GC-MS (EI ή CI)	N	n
GC-MS (EI και CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI ή CI) 2 παράγωγα	2 (Παράγωγο Α) + 2 (Παράγωγο Β)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 μητρικό και 2 θυγατρικά	4
LC-MS-MS	1 μητρικό και 2 θυγατρικά	4
GC-MS-MS	2 μητρικά ιόντα, καθένα με 1 θυγατρικό	5
LC-MS-MS	2 μητρικά ιόντα, καθένα με 1 θυγατρικό	5
LC-MS-MS-MS	1 μητρικό, 1 θυγατρικό και 2 θυγατρικά 2ης γενιάς	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS και LC-MS	2 + 2	4
GC-MS και HRMS	2 + 1	4

▼B

2.3.4. **Κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τη χρωματογραφία σε συνδυασμό με την ανίχνευση με φασματοφωτομετρία υπερέθρου**

Κατάλληλες κορυφές: κατάλληλες κορυφές είναι τα μέγιστα απορρόφησης στο φάσμα υπερέθρου ενός προτύπου βαθμονόμησης, εφόσον πληρούνται οι ακόλουθες απαιτήσεις.

2.3.4.1. *Ανίχνευση με φασματοφωτομετρία υπερέθρου*

Μέγιστο απορρόφησης: πρέπει να βρίσκεται στο εύρος κυματαριθμών 4 000-500 cm^{-1} .

Ένταση απορρόφησης: δεν πρέπει να είναι μικρότερη είτε

- α) από την ειδική γραμμομοριακή απορρόφηση 40 σε σχέση με τη γραμμή βάσης της κορυφής· ή
- β) από τη σχετική απορρόφηση 12,5 % της απορρόφησης της πιο έντονης κορυφής στο εύρος κυματαριθμών 4 000-500 cm^{-1}

όταν και οι δύο μετρούνται με απορρόφηση μηδέν, και 5 % απορρόφηση της πιο έντονης κορυφής στην περιοχή 4 000-500 cm^{-1} όταν και οι δύο μετρούνται σε σχέση με τη γραμμή βάσης των κορυφών τους.

Σημείωση: Μολονότι θεωρητικώς είναι προτιμότερες οι κατάλληλες κορυφές σύμφωνα με το στοιχείο α), στην πράξη είναι ευκολότερος ο προσδιορισμός εκείνων σύμφωνα με το στοιχείο β).

Ο αριθμός των κορυφών στο φάσμα υπερέθρου της αναλυτέας ουσίας του οποίου οι συχνότητες αντιστοιχούν σε μία κατάλληλη κορυφή στο φάσμα του προτύπου βαθμονόμησης, προσδιορίζεται εντός περιθωρίου $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4.2. *Ερμηνεία των δεδομένων της φασματοφωτομετρίας υπερέθρου*

Η απορρόφηση πρέπει να σημειώνεται σε όλες τις περιοχές του φάσματος της αναλυτέας ουσίας, που αντιστοιχούν σε κατάλληλη κορυφή στο φάσμα αναφοράς του προτύπου βαθμονόμησης. Απαιτείται ένας ελάχιστος αριθμός έξι κατάλληλων κορυφών στο φάσμα υπερέθρου του προτύπου βαθμονόμησης. Εάν υπάρχουν λιγότερες από έξι κατάλληλες κορυφές (7), το εν λόγω φάσμα δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φάσμα αναφοράς. Το αποτέλεσμα («score»), δηλαδή το ποσοστό των κατάλληλων κορυφών που βρέθηκαν στο φάσμα υπερέθρου της αναλυτέας ουσίας πρέπει να είναι τουλάχιστον 50. Όπου δεν υπάρχει ακριβής αντιστοίχιση με μια κατάλληλη κορυφή, η σχετική περιοχή του φάσματος της αναλυτέας ουσίας πρέπει να είναι συνεπής με την παρουσία μιας αντιστοιχούσας κορυφής. Η διαδικασία εφαρμόζεται μόνον σε κορυφές απορρόφησης στο φάσμα του δείγματος με ένταση τουλάχιστον τριπλάσια από το διακορυφικό θόρυβο.

2.3.5. **Κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τον προσδιορισμό μιας αναλυτέας ουσίας με LC μαζί με άλλες τεχνικές ανίχνευσης**

2.3.5.1. *Χρωματογραφικός διαχωρισμός*

Ένα εσωτερικό πρότυπο πρέπει να χρησιμοποιείται εάν διατίθεται υλικό κατάλληλο για τον σκοπό αυτό. Πρέπει κατά προτίμηση να είναι ένα συναφές πρότυπο με χρόνο κατακράτησης που να προσεγγίζει τον χρόνο κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας. Ο χρόνος έκλουσης της αναλυτέας ουσίας πρέπει να είναι ο ίδιος με τον τυπικό χρόνο κατακράτησης του προτύπου βαθμονόμησης υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ο ελάχιστος αποδεκτός χρόνος κατακράτησης για μια αναλυτέα ουσία πρέπει να είναι διπλάσιος του χρόνου κατακράτησης που αντιστοιχεί στον κενό όγκο της στήλης. Ο λόγος του χρόνου κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας προς αυτόν του εσωτερικού προτύπου, δηλαδή ο σχετικός χρόνος κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας, πρέπει να είναι ο ίδιος με αυτόν του προτύπου βαθμονόμησης στην κατάλληλη μήτρα, εντός περιθωρίου $\pm 2,5 \%$.

2.3.5.2. *Ανίχνευση με φασματοφωτομετρία UV/VIS πλήρους σάρωσης*

Πρέπει να πληρούνται τα σχετικά κριτήρια για τις μεθόδους LC.

Τα μέγιστα απορρόφησης στο φάσμα της αναλυτέας ουσίας πρέπει να βρίσκονται στα ίδια μήκη κύματος με εκείνα του προτύπου βαθμονόμησης εντός περιθωρίου που καθορίζεται από τη διακριτική ικανότητα του συστήματος ανίχνευσης. Για την ανίχνευση με συστοιχία διόδων, το περιθώριο αυτό κυμαίνεται

▼B

χαρακτηριστικά μεταξύ ± 2 nm. Το φάσμα της αναλυτέας ουσίας σε μήκη κύματος άνω των 220 nm, για εκείνα τα τμήματα των δύο φασμάτων όπου η σχετική απορρόφηση είναι ≥ 10 %, δεν πρέπει να διαφέρει οπτικά από το φάσμα του προτύπου βαθμονόμησης. Το κριτήριο αυτό πληρούται όταν, πρώτον, υπάρχουν τα ίδια μέγιστα και, δεύτερον, η διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων δεν υπερβαίνει σε κανένα σημείο το 10 % της απορρόφησης του προτύπου βαθμονόμησης. Στην περίπτωση χρήσης βιβλιογραφικής έρευνας με τη βοήθεια του υπολογιστή και αντιστοίχισης, η σύγκριση των δεδομένων του φάσματος στα δείγματα δοκιμής με εκείνα του διαλύματος βαθμονόμησης πρέπει να υπερβαίνει έναν παράγοντα κρίσιμης αντιστοίχισης. Ο παράγοντας αυτός θα προσδιορίζεται κατά τη διαδικασία επικύρωσης για κάθε αναλυτέα ουσία βάσει των φασμάτων για τα οποία πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια. Η μεταβλητότητα στα φάσματα που οφείλεται στη μήτρα του δείγματος και την επίδοση του ανιχνευτή πρέπει να ελέγχεται.

2.3.5.3. Κριτήρια επίδοσης για την ανίχνευση με φθορισμομετρία

Πρέπει να πληρούνται τα σχετικά κριτήρια επίδοσης για τις μεθόδους LC.

Εφαρμόζεται στα μόρια που εμφανίζουν φυσική ικανότητα φθορισμού και σε μόρια που εμφανίζουν φθορισμό ύστερα είτε από μετατροπή είτε από παραγοντοποίηση. Η επιλογή των μηκών κύματος διέγερσης και εκπομπής σε συνδυασμό με τις χρωματογραφικές συνθήκες πρέπει να γίνεται κατά τρόπο ώστε να ελαχιστοποιείται η εμφάνιση παρεμποδίσεων σε εκχυλίσματα τυφλών δειγμάτων.

Το πλησιέστερο μέγιστο κορυφής στο χρωματογράφημα πρέπει να απέχει από την προκαθορισμένη κορυφή αναλυτέας ουσίας τουλάχιστον κατά ένα πλήρες πλάτος στο 10 % του μέγιστου ύψους κορυφής της αναλυτέας ουσίας.

2.3.5.4. Κριτήρια επίδοσης για τον προσδιορισμό μιας αναλυτέας ουσίας με ανοσογράφημα-LC

Το ανοσογράφημα LC δεν είναι κατάλληλο για να χρησιμοποιείται μόνο του ως μέθοδος επιβεβαίωσης.

Πρέπει να πληρούνται τα σχετικά κριτήρια για τις μεθόδους LC.

Οι προκαθορισμένες παράμετροι ελέγχου της ποιότητας, δηλαδή μη ειδική δέσμευση, η σχετική δέσμευση των δειγμάτων ελέγχου, η τιμή της απορρόφησης του τυφλού, πρέπει να βρίσκονται εντός των ορίων που ελήφθησαν κατά την επικύρωση της δοκιμασίας.

Το ανοσογράφημα πρέπει να παράγεται από πέντε τουλάχιστον κλάσματα.

Κάθε κλάσμα πρέπει να είναι μικρότερο από το μισό του εύρους της κορυφής.

Το κλάσμα με τη μέγιστη περιεκτικότητα της αναλυτέας ουσίας πρέπει να είναι ίδιο για το ύποπτο δείγμα, το μη συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου και το πρότυπο.

2.3.5.5. Προσδιορισμός μιας αναλυτέας ουσίας με LC σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία υπεριώδους — ορατού (UV/VIS) (μονής δέσμης)

Η LC μαζί με τη φασματοφωτομετρία UV/VIS (μονής δέσμης) δεν είναι κατάλληλη για να χρησιμοποιείται μόνη της ως μέθοδος επιβεβαίωσης.

Το πλησιέστερο μέγιστο κορυφής στο χρωματογράφημα πρέπει να απέχει από την προκαθορισμένη κορυφή αναλυτέας ουσίας τουλάχιστον κατά ένα πλήρες πλάτος στο 10 % του μέγιστου ύψους κορυφής της αναλυτέας ουσίας.

2.3.6. Κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τον προσδιορισμό μιας αναλυτέας ουσίας με 2-D TLC σε συνδυασμό με φασματοφωτομετρία UV/VIS πλήρους σάρωσης

Η HPTLC δύο διαστάσεων και η συγχρωματογραφία είναι υποχρεωτικές.

Οι τιμές RF της αναλυτέας ουσίας πρέπει να συμφωνούν με τις τιμές RF των προτύπων εντός περιθωρίου ± 5 %.

▼B

Η οπτική εμφάνιση της αναλυτέας ουσίας δεν πρέπει να διακρίνεται από εκείνη του πρότυπου υλικού.

Για κηλίδες του ίδιου χρώματος, το κέντρο της πλησιέστερης κηλίδας πρέπει να απέχει από το κέντρο της κηλίδας της αναλυτέας ουσίας κατά το ήμισυ τουλάχιστον του αθροίσματος των διαμέτρων των κηλίδων.

Το φάσμα της αναλυτέας ουσίας δεν πρέπει οπτικά να διαφέρει από το φάσμα της πρότυπης, όπως περιγράφεται για την ανίχνευση με UV/VIS πλήρους σύρωσης.

Στην περίπτωση χρήσης βιβλιογραφικής έρευνας με τη βοήθεια του υπολογιστή και αντιστοίχισης, η σύγκριση των δεδομένων του φάσματος στα δείγματα δοκιμής με εκείνα του διαλύματος βαθμονόμησης πρέπει να υπερβαίνει έναν παράγοντα κρίσιμης αντιστοίχισης. Ο παράγοντας αυτός θα προσδιορίζεται κατά τη διαδικασία επικύρωσης για κάθε αναλυτέα ουσία βάσει των φασμάτων για τα οποία πληρούνται τα ανωτέρω κριτήρια. Η μεταβλητότητα στα φάσματα που οφείλεται στη μήτρα του δείγματος και την επίδοση του ανιχνευτή πρέπει να ελέγχεται.

2.3.7. Κριτήρια επίδοσης και απαιτήσεις για τον προσδιορισμό μιας αναλυτέας ουσίας με GC σε συνδυασμό με την ανίχνευση σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)

Ένα εσωτερικό πρότυπο πρέπει να χρησιμοποιείται εάν διατίθεται υλικό κατάλληλο για το σκοπό αυτό. Πρέπει κατά προτίμηση να είναι μία συναφής ουσία με χρόνο κατακράτησης που να προσεγγίζει αυτόν της αναλυτέας ουσίας. Ο χρόνος έκλουσης της αναλυτέας ουσίας πρέπει να είναι ο ίδιος με τον τυπικό χρόνο κατακράτησης του πρότυπου βαθμονόμησης υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ο ελάχιστος αποδεκτός χρόνος κατακράτησης για μια αναλυτέα ουσία πρέπει να είναι διπλάσιος του χρόνου κατακράτησης που αντιστοιχεί στον κενό όγκο της στήλης. Ο λόγος του χρόνου κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας προς αυτόν του εσωτερικού πρότυπου, δηλαδή ο σχετικός χρόνος κατακράτησης της αναλυτέας ουσίας, πρέπει να είναι ο ίδιος με αυτόν του πρότυπου βαθμονόμησης στην κατάλληλη μήτρα, εντός περιθωρίου $\pm 0,5$ %. Το πλησιέστερο μέγιστο κορυφής στο χρωματογράφημα πρέπει να απέχει από την προκαθορισμένη κορυφή αναλυτέας ουσίας τουλάχιστον κατά ένα πλήρες πλάτος στο 10 % του μέγιστου ύψους κορυφής της αναλυτέας ουσίας. Για πρόσθετες πληροφορίες, πρέπει να γίνεται συγχρωματογραφία.

2.4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΟΝΤΑΙ ΓΙΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι αναλύσεις επιβεβαίωσης για τα χημικά στοιχεία πρέπει να βασίζονται στην έννοια της αδιαφιλονίκητης ταυτοποίησης και του ακριβούς και πιστού ποσοτικού προσδιορισμού με τη βοήθεια των φυσικών-χημικών ιδιοτήτων που προσιδιάζουν στο εξεταζόμενο χημικό στοιχείο (π.χ. μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ή απορροφώμενης ακτινοβολίας, ατομική μάζα) στο επίπεδο που ενδιαφέρει.

Οι ακόλουθοι μέθοδοι ή συνδυασμοί μεθόδων θεωρούνται κατάλληλοι για την ταυτοποίηση των χημικών στοιχείων.

Πίνακας 7

Κατάλληλες μέθοδοι επιβεβαίωσης για χημικά στοιχεία

Τεχνική	Μετρούμενη παράμετρος
Ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού	Ηλεκτρικό σήμα
Φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης	
Φλογοφασματομετρία	Μήκος κύματος απορρόφησης
Με σχηματισμό υβριδίων	Μήκος κύματος απορρόφησης
Ψυχρού ατμού	Μήκος κύματος απορρόφησης
Ηλεκτροθερμικής ατομοποίησης (γραφητικού κλιβάνου)	Μήκος κύματος απορρόφησης
Φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής	
Επαγωγικώς συζευγμένο πλάσμα	Μήκος κύματος εκπομπής



Τεχνική	Μετρούμενη παράμετρος
Φασματομετρία μάζας Επαγωγικός συζευγμένο πλάσμα	Λόγος μάζας προς φορτίο

2.4.1. Κοινά κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τις μεθόδους επιβεβαίωσης

Το υλικό αναφοράς ή το εμβολιασμένο υλικό που περιέχει γνωστές ποσότητες της αναλυτέας ουσίας, στο μέγιστο επιτρεπόμενο όριο ή στο όριο απόφασης ή πλησίον αυτών (μη συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου), καθώς και τα συμμορφούμενα υλικά ελέγχου και τα τυφλά αντιδραστήριου, πρέπει κατά προτίμηση να διοχετεύονται καθ' όλη τη διαδικασία ταυτόχρονα με κάθε παρτίδα των αναλυόμενων δειγμάτων δοκιμής. Η συνιστώμενη σειρά για την έγχυση των εκχυλισμάτων στο όργανο της ανάλυσης είναι η εξής: τυφλό αντιδραστήριου, συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου, δείγμα προς επιβεβαίωση, συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου και τέλος μη συμμορφούμενο δείγμα ελέγχου. Κάθε παρέκκλιση από τη σειρά αυτή πρέπει να αιτιολογείται.

Γενικά, οι περισσότερες αναλυτικές τεχνικές απαιτούν πλήρη χώνευση της οργανικής μήτρας για τη λήψη διαλυμάτων πριν από τον προσδιορισμό της αναλυτέας ουσίας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μικροκυματικών διαδικασιών αποδόμησης σε ανόργανες ύλες, που ελαχιστοποιούν τον κίνδυνο απώλειας ή/και επιμόλυνσης των αναλυτέων ουσιών που ενδιαφέρουν. Πρέπει να χρησιμοποιούνται απολυμασμένα δοχεία Teflon καλής ποιότητας. Εάν γίνει χρήση άλλης υγρής ή ξηράς μεθόδου χώνευσης, πρέπει να υπάρχουν τα κατάλληλα τεκμηριωμένα αποδεικτικά στοιχεία για να αποκλεισθεί η πιθανότητα εμφάνισης φαινομένων απώλειας ή επιμόλυνσης. Εναλλακτικά με τη χώνευση, μπορούν να επιλεγούν, υπό προϋποθέσεις, διαδικασίες διαχωρισμού (π.χ. εκχύλιση) για το διαχωρισμό αναλυτέων ουσιών από συστατικά μήτρας ή/και για τη συγκέντρωση αναλυτέων ουσιών με σκοπό την εισαγωγή τους στον αναλυτικό εξοπλισμό.

Σε ό,τι αφορά τη βαθμονόμηση, είτε είναι εξωτερική διακρίβωση είτε βασίζεται στη μέθοδο της σταθερής προσθήκης, πρέπει να λαμβάνεται μέριμνα ώστε να μην γίνεται υπέρβαση του εύρους εργασίας που έχει καθοριστεί για την ανάλυση. Στην περίπτωση εξωτερικής διακρίβωσης, είναι υποχρεωτικό τα πρότυπα βαθμονόμησης να ετοιμάζονται σε διάλυμα που αντιστοιχεί όσο το δυνατόν περισσότερο στη σύνθεση του διαλύματος του δείγματος. Διόρθωση υπόβαθρου σήματος (διόρθωση θορύβου) πρέπει επίσης να εφαρμόζεται εάν απαιτείται από ειδικές αναλυτικές περιστάσεις.

2.4.2. Πρόσθετα κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τις ποσοτικές μεθόδους ανάλυσης

2.4.2.1. Ορθότητα των ποσοτικών μεθόδων

Στην περίπτωση επαναλαμβανόμενων αναλύσεων ενός πιστοποιημένου υλικού αναφοράς για στοιχεία, η απόκλιση του πειραματικώς προσδιορισμένου μέσου όρου περιεκτικότητας από την πιστοποιημένη τιμή δεν πρέπει να βρίσκεται εκτός των ορίων $\pm 10\%$. Όταν δεν υπάρχουν τέτοια πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, γίνεται δεκτό να αξιολογείται η ορθότητα των μετρήσεων μέσω ανάκτησης των προσθηκών των γνωστών ποσοτήτων του στοιχείου σε άγνωστα δείγματα. Επιστάται η προσοχή στο γεγονός ότι το προστιθέμενο στοιχείο δεν είναι χημικώς δεσμευμένο με την πραγματική μήτρα όπως είναι η αναλυτέα ουσία και ότι συνεπώς τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την προσέγγιση αυτή έχουν μικρότερη εγκυρότητα από εκείνα που λαμβάνονται με τη χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς. Τα δεδομένα της ανάκτησης είναι αποδεκτά μόνον εντός των ορίων $\pm 10\%$ της τιμής στόχου.

2.4.2.2. Πιστότητα των ποσοτικών μεθόδων

Στην περίπτωση επαναλαμβανόμενης ανάλυσης ενός δείγματος που πραγματοποιείται υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ο ενδοεργαστηριακός συντελεστής μεταβλητότητας (CV) της μέσης τιμής δεν υπερβαίνει τις εξής τιμές:



Πίνακας 8

Συντελεστές μεταβλητότητας (CV) για ποσοτικές μεθόδους για ένα εύρος κλασμάτων μάζας στοιχείων

Κλάσμα μάζας	CV (%)
≥ 10 μg/kg έως 100 μg/kg	20
> 100 μg/kg έως 1 000 μg/kg	15
≥ 1 000 μg/kg	10

2.4.3. **Ειδικές απαιτήσεις για την ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού (DPASV)**

Η πλήρης καταστροφή της οργανικής ύλης των δειγμάτων πριν τον προσδιορισμό με DPASV είναι εξέχουσας σημασίας. Στο βολταμογράμμα δεν πρέπει να βλέπουμε σήματα ευρείας έκτασης λόγω της παρουσίας οργανικής ύλης. Τα ανόργανα συστατικά της μήτρας μπορεί να επηρεάσουν τα ύψη των κορυφών στην DPASV. Επομένως, ο ποσοτικός προσδιορισμός πρέπει να γίνει με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης. Μαζί με τη μέθοδο πρέπει να παρέχονται και δείγματα τυπικών βολταμογραμμάτων ενός διαλύματος δείγματος.

2.4.4. **Ειδικές απαιτήσεις για τη φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης (AAS)**

Η τεχνική αυτή είναι κατά βάση μονοστοιχειακή και επομένως απαιτείται αριστοποίηση των πειραματικών συνθηκών ανάλογα με το συγκεκριμένο στοιχείο που πρόκειται να προσδιοριστεί ποσοτικά. Όπου είναι δυνατόν, τα αποτελέσματα πρέπει να ελέγχονται ποιοτικά και ποσοτικά καταφεύγοντας σε εναλλακτικές γραμμές απορρόφησης (στην ιδανική περίπτωση, πρέπει να επιλέγονται δύο διαφορετικές γραμμές). Τα πρότυπα βαθμονόμησης πρέπει να παρασκευάζονται σε διάλυμα-μήτρα που να ταιριάζει όσο το δυνατόν περισσότερο με το διάλυμα μέτρησης του δείγματος (π.χ. στη συγκέντρωση του οξέος ή τη σύσταση του τροποποιητή). Για να ελαχιστοποιούνται τα σήματα υποβάθρου, όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να έχουν την υψηλότερη δυνατή καθαρότητα. Ανάλογα με τον τρόπο που έχει επιλεγεί για την εξάτμιση ή/και ατομοποίηση του δείγματος, διακρίνονται διάφορα είδη AAS.

2.4.4.1. *Ειδικές απαιτήσεις για τη φλογοφασματομετρία ατομικής απορρόφησης*

Οι ενδεδειγμένες ρυθμίσεις των οργάνων πρέπει να αριστοποιούνται για κάθε στοιχείο. Ιδιαίτερα πρέπει να ελέγχονται η σύσταση και ο ρυθμός ροής των αερίων. Για να αποφεύγονται οι παρεμποδίσεις που προκαλεί η απορρόφηση υποβάθρου πρέπει να χρησιμοποιείται διορθωτής υποβάθρου σήματος (διορθωτής θορύβου). Σε περίπτωση άγνωστων μητρών πρέπει να ελέγχεται εάν απαιτείται διόρθωση υποβάθρου ή όχι.

2.4.4.2. *Ειδικές απαιτήσεις για την AAS γραφικού κλιβάνου*

Συχνά η επιμόλυνση στο εργαστήριο επηρεάζει την ακρίβεια όταν εργαζόμαστε σε επίπεδα υπερίχνους στον γραφικό κλιβάνο. Επομένως πρέπει να χρησιμοποιούνται αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας, απιονισμένο ύδωρ και αδρανή πλαστικά σκεύη για το δείγμα καθώς και τυποποιημένοι χειρισμοί. Οι ενδεδειγμένες ρυθμίσεις των οργάνων πρέπει να αριστοποιούνται για κάθε στοιχείο. Ιδιαίτερα πρέπει να ελέγχονται οι συνθήκες προεπεξεργασίας και ατομοποίησης (θερμοκρασία, χρόνος) και η τροποποίηση της μήτρας.

Η εργασία κάτω από συνθήκες ισοθερμικής ατομοποίησης [π.χ. ο εγκάρσιος θερμαινόμενος σωλήνας γραφίτη με ενσωματωμένη πλατφόρμα L'von (8)] μειώνει την επίδραση της μήτρας σε σχέση με την ατομοποίηση της αναλυτέας ουσίας. Σε συνδυασμό με την τροποποίηση της μήτρας και τη διόρθωση Zeeman του υποβάθρου (9), επιτρέπεται ο ποσοτικός προσδιορισμός με τη βοήθεια καμπύλης βαθμονόμησης που βασίζεται στη μέτρηση προτύπων υδατικών διαλυμάτων.

▼B

2.4.5. **Ειδικές απαιτήσεις για τη φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης με σχηματισμό υδριδίων**

Οι οργανικές ενώσεις που περιέχουν στοιχεία όπως αρσενικό, βισμούθιο, γερμάνιο, μόλυβδο, αντιμόνιο, σελήνιο, κασσίτερο και τελούριο μπορεί να είναι πολύ σταθερές και χρειάζονται οξειδωτική αποσύνθεση για να ληφθούν σωστά αποτελέσματα όσον αφορά τη συνολική περιεκτικότητα του στοιχείου. Επομένως συνιστάται χώνευση με μικροκύματα ή αποτέφρωση σε υψηλή πίεση υπό ισχυρές οξειδωτικές συνθήκες. Μέγιστη προσοχή πρέπει να δοθεί στην πλήρη και αναπαραγωγίμη μετατροπή των στοιχείων στα αντίστοιχα υδρίδια.

Ο σχηματισμός υδριδίου του αρσενικού σε διάλυμα υδροχλωρικού οξέος με NaBH_4 εξαρτάται από την οξειδωτική κατάσταση του As [τρισθενές As (As III): ταχύς σχηματισμός, πεντασθενές As(As V): μακρότερη περίοδος σχηματισμού]. Για να αποφεύγεται η απώλεια ευαισθησίας κατά τον προσδιορισμό του As V με την τεχνική της έγχυσης δείγματος σε ροή αντιδραστήριου, που οφείλεται στο σύντομο χρόνο αντίδρασης στο σύστημα αυτό, το As V πρέπει να αναχθεί σε As III με οξειδωτική αποσύνθεση. Για το σκοπό αυτό είναι κατάλληλα το ιωδιούχο κάλιο/ασκορβικό οξύ ή η κυστενη. Τα τυφλά, τα διαλύματα βαθμονόμησης και τα δείγματα διαλύματος πρέπει να έχουν την ίδια μεταχείριση. Η εργασία με σύστημα παρτίδων επιτρέπει τον προσδιορισμό και των δύο ειδών As χωρίς να επηρεάζεται η ακρίβεια. Λόγω του βραδύτερου σχηματισμού του υδριδίου του πεντασθενούς As η βαθμονόμηση πρέπει να γίνεται με ολοκλήρωση του εμβადού της κορυφής. Οι ενδεδειγμένες ρυθμίσεις των οργάνων πρέπει να αριστοποιούνται. Πρέπει να ελέγχεται ιδίως η ροή αερίου, η οποία μεταφέρει το υδρίδιο στον ατομοποιητή.

2.4.6. **Ειδικές απαιτήσεις για τη φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης ψυχρού ατμού**

Ο ψυχρός ατμός χρησιμοποιείται μόνο στην περίπτωση του υδράργυρου. Λόγω των απωλειών κατά την ατμοποίηση και την προσρόφηση του στοιχειακού υδραργύρου, απαιτείται ιδιαίτερη φροντίδα σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης. Χρειάζεται προσοχή για να αποφεύγονται επιμολύνσεις από τα αντιδραστήρια ή από το περιβάλλον.

Οι οργανικές ενώσεις που περιέχουν υδράργυρο απαιτούν οξειδωτική αποσύνθεση για να λάβουμε σωστά αποτελέσματα όσον αφορά τη συνολική περιεκτικότητα σε υδράργυρο. Για την αποσύνθεση συνιστώνται σφραγισμένα συστήματα με χώνευση με μικροκύματα ή με αποτεφρωτήρα υψηλής πίεσης. Ειδική φροντίδα απαιτείται για τον καθαρισμό των οργάνων που είχαν έρθει σε επαφή με τον υδράργυρο.

Η εργασία με την τεχνική της έγχυσης δείγματος σε ροή αντιδραστήριου παρουσιάζει πλεονεκτήματα. Για τα κατώτερα όρια απόφασης συνιστάται η προσρόφηση του στοιχειακού υδραργύρου να γίνεται σε προσροφητικό μέσο από χρυσό/λευκόχρυσο ακολουθούμενη από θερμική εκρόφηση. Η επαφή του προσροφητικού ή της κυψελίδας με υγρασία διαταράσσει τη μέτρηση και πρέπει να αποφεύγεται.

2.4.7. **Ειδικές απαιτήσεις για τη φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής επαγωγικώς συζευγμένου πλάσματος (ICP-AES)**

Η φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής επαγωγικώς συζευγμένου πλάσματος (10) είναι μια πολυστοιχειακή μέθοδος, που επιτρέπει την ταυτόχρονη μέτρηση διάφορων στοιχείων. Για να χρησιμοποιηθεί η ICP-AES, τα δείγματα πρέπει πρώτα να χωνευθούν για να αποσυντεθούν οι οργανικές μήτρες. Συνιστώνται σφραγισμένα συστήματα με χώνευση μικροκυμάτων ή αποτέφρωση σε υψηλή πίεση. Για να έχει αποτέλεσμα η ανάλυση ICP-AES, η βαθμονόμηση των οργάνων και η επιλογή του στοιχείου ή του μήκους κύματος παίζουν ουσιαστικό ρόλο. Για τη βαθμονόμηση των οργάνων, στην περίπτωση γραμμικών καμπυλών βαθμονόμησης, χρειάζεται συνήθως να μετρηθούν διαλύματα βαθμονόμησης τεσσάρων μόνο συγκεντρώσεων, επειδή οι καμπύλες βαθμονόμησης ICP-AES γενικά είναι γραμμικές σε τέσσερις έως έξι τάξεις μεγέθους συγκέντρωσης. Η βαθμονόμηση του συστήματος ICP-AES κανονικά πρέπει να γίνεται με ένα πολυστοιχειακό πρότυπο, το οποίο πρέπει να ετοιμάζεται σε διάλυμα που έχει την ίδια συγκέντρωση οξέος με το διάλυμα μέτρησης. Για τη γραμμική καμπύλη πρέπει να ελέγχονται οι συγκεντρώσεις των στοιχείων.

▼B

Η επιλογή των μηκών κύματος για τη μέτρηση της εκπομπής από τις αναλυτέες ουσίες γίνεται με βάση τις συγκεντρώσεις των προς προσδιορισμό στοιχείων. Όταν η συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας δεν εμπίπτει στο εύρος εργασίας μιας γραμμής εκπομπής, πρέπει να χρησιμοποιείται διαφορετική γραμμή εκπομπής. Αρχικά πρέπει να επιλέγεται η πιο ευαίσθητη γραμμή εκπομπής (χωρίς παρεμπόδιση) και ύστερα μια λιγότερο ευαίσθητη γραμμή. Όταν εργαζόμαστε στο όριο ανίχνευσης ή κοντά σε αυτό, η πιο ευαίσθητη γραμμή για την αντίστοιχη αναλυτέα ουσία συνήθως αποτελεί την καλύτερη επιλογή. Οι φασματικές παρεμπόδισεις και οι παρεμπόδισεις του υποβάθρου προκαλούν τις κυριότερες δυσκολίες στην ICP-AES. Πιθανές παρεμπόδισεις είναι π.χ. η απλή μετατόπιση του υποβάθρου, η πλάγια μετατόπιση του υποβάθρου, η άμεση φασματική επικάλυψη και η σύνθετη μετατόπιση του υποβάθρου. Η καθεμία από τις παρεμπόδισεις αυτές έχει διαφορετική αιτία και τρόπο διόρθωσης. Ανάλογα με τις μήτρες, πρέπει να γίνουν οι κατάλληλες διορθώσεις των παρεμπόδισεων και αριστοποίηση των λειτουργικών παραμέτρων. Ορισμένες παρεμπόδισεις μπορούν να αποφευχθούν με αραίωση ή με προσαρμογή των μητρών. Με κάθε παρτίδα δειγμάτων δοκιμής που αναλύονται, το υλικό αναφοράς και το εμβολιασμένο υλικό που περιέχουν γνωστές ποσότητες της αναλυτέας ουσίας/ουσιών, καθώς και το τυφλό υλικό, πρέπει να υπόκεινται στους ίδιους χειρισμούς με τα δείγματα δοκιμής. Για τις δοκιμές ολίσθησης, το πρότυπο πρέπει να ελέγχεται π.χ. ύστερα από 10 δείγματα. Όλα τα αντιδραστήρια και το αέριο πλάσμα πρέπει να έχουν την υψηλότερη δυνατή καθαρότητα.

2.4.8. Ειδικές απαιτήσεις για τη φασματομετρία μάζας επαγωγικός συζευγμένου πλάσματος (ICP-MS) (11)

Ο προσδιορισμός ιχνοστοιχείων με μέση ατομική μάζα, όπως το χρώμιο, ο χαλκός και το νικέλιο, μπορεί να υπόκειται σε ισχυρές παρεμπόδισεις από άλλα ισοβαρή και πολυατομικά ιόντα. Αυτό μπορεί να παρακαμφθεί μόνον όταν η διακριτική ικανότητα είναι τουλάχιστον 7 000-8 000. Οι δυσκολίες που συνδέονται με τις τεχνικές της φασματομετρίας μάζας περιλαμβάνουν την ολίσθηση των οργάνων, τις επιδράσεις της μήτρας και την παρεμπόδιση μοριακών ιόντων ($m/z < 80$). Για τη διόρθωση της ολίσθησης των οργάνων και των επιδράσεων της μήτρας απαιτείται πολλαπλή εσωτερική τυποποίηση που να καλύπτει το ίδιο εύρος μαζών με τα στοιχεία που πρόκειται να προσδιοριστούν.

Απαιτείται πλήρης αποσύνθεση του οργανικού υλικού στα δείγματα πριν από τις μετρήσεις με ICP-MS. Όπως και στην AAS, ύστερα από χώνευση σε σφραγισμένα δοχεία, τα πτητικά στοιχεία όπως π.χ. το ιώδιο πρέπει να μεταπέσουν σε σταθερή κατάσταση οξειδώσεως. Οι πιο σοβαρές παρεμπόδισεις προέρχονται από συνδυασμούς μοριακών ιόντων αργού (αέριο του πλάσματος), υδρογόνου, άνθρακα, αζώτου και οξυγόνου (οξέα διαλυτοποίησης, προσμείξεις των αερίων του πλάσματος και συμπαρασυρόμενα αέρια της ατμόσφαιρας) και από τη μήτρα του δείγματος. Συνιστώνται πλήρης χώνευση, μετρήσεις υποβάθρου, σωστή επιλογή των αναλυτικών μαζών που μερικές φορές συνδέονται με μικρότερη αφθονία (χαμηλότερο όριο ανίχνευσης) και των οξέων διαλυτοποίησης π.χ. νιτρικό οξύ για να αποφεύγονται οι παρεμπόδισεις.

Όσον αφορά τα στοιχεία προς προσδιορισμό, οι παρεμπόδισεις μπορούν να αποκλειστούν με την κατάλληλη επιλογή ειδικών αναλυτικών μαζών συμπεριλαμβανομένης της επιβεβαίωσης της αναλογίας των ισotόπων. Η απόκριση των οργάνων λαμβάνοντας υπόψη τους παράγοντες Fano πρέπει να ελέγχεται για κάθε μέτρηση με τη χρήση εσωτερικών προτύπων.

3. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ

Η επικύρωση πρέπει να καταδεικνύει ότι η αναλυτική μέθοδος συμμορφώνεται με τα κριτήρια που εφαρμόζονται στα σχετικά χαρακτηριστικά επίδοσης.

Διαφορετικές κατηγορίες μεθόδων απαιτούνται για διαφορετικούς σκοπούς ελέγχου. Στον ακόλουθο πίνακα ορίζεται ποιο χαρακτηριστικό επίδοσης πρέπει να επαληθεύεται για κάθε είδος μεθόδου.



Πίνακας 9

Κατάταξη των αναλυτικών μεθόδων ανάλογα με τα χαρακτηριστικά επίδοσης τα οποία πρέπει να προσδιορίζονται

		Όριο ανίχνευσης CCβ	Όριο απόφασης CCα	Ορθότητα/Ανάκτηση	Πιστότητα	Επιλεκτικότητα/Ειδικότητα	Δυνατότητα εφαρμογής/Ανθεκτικότητα Σταθερότητα
Ποιοτικές μέθοδοι	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Ποσοτικές μέθοδοι	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = μέθοδοι διαλογής· C = μέθοδοι επιβεβαίωσης· + = ο προσδιορισμός είναι υποχρεωτικός.

3.1. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

Στο παρόν κεφάλαιο δίνονται παραδείγματα ή/και αναφορές για τις διαδικασίες επικύρωσης των αναλυτικών μεθόδων. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για να καταδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος συμμορφώνεται με τα κριτήρια που ισχύουν για τα χαρακτηριστικά επίδοσης, υπό την προϋπόθεση ότι οι διαδικασίες αυτές επιτυγχάνουν το ίδιο επίπεδο και την ίδια ποιότητα πληροφόρησης.

Η επικύρωση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη διεξαγωγή διεργασιολογικής μελέτης όπως αυτή που καθορίζει ο Codex Alimentarius, ο ISO ή ο IUPAC (12), ή σύμφωνα με εναλλακτικές μεθόδους, όπως μελέτες ενός μόνο εργαστηρίου ή εσωτερική επικύρωση (13) (14). Το παρόν κεφάλαιο επικεντρώνεται στις μελέτες ενός μόνο εργαστηρίου με τη χρήση μιας σπονδυλωτής προσέγγισης. Η εν λόγω προσέγγιση συνίσταται σε:

1. ένα σύνολο κοινών χαρακτηριστικών επίδοσης ανεξάρτητα από το μοντέλο επικύρωσης που χρησιμοποιείται και
2. περισσότερο ειδικευμένες, εξαρτώμενες από το μοντέλο, διαδικασίες όπως περιγράφεται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10

Παράμετροι επίδοσης ανεξάρτητες και εξαρτώμενες από το μοντέλο

Επικύρωση		
Παράμετροι επίδοσης ανεξάρτητες από το μοντέλο	Παράμετροι επίδοσης εξαρτώμενες από το μοντέλο	
Κοινά χαρακτηριστικά επίδοσης (3.1.1)	Προσέγγιση συμβατικής επικύρωσης (3.1.2)	Προσέγγιση εσωτερικής επικύρωσης (3.1.3)
Ειδικότητα	Ανάκτηση	Ανάκτηση
Ορθότητα	Επαναληψιμότητα	Επαναληψιμότητα
Ανθεκτικότητα: μεταβολές ήσσοнос σημασίας	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα
Σταθερότητα	Αναπαραγωγικότητα	Αναπαραγωγικότητα
	Όριο απόφασης (CCα)	Όριο απόφασης (CCα)
	Ικανότητα ανίχνευσης (CCβ)	Ικανότητα ανίχνευσης (CCβ)
	Καμπύλες βαθμονόμησης	Καμπύλες βαθμονόμησης
	Ανθεκτικότητα: μεταβολές μείζονος σημασίας	Ανθεκτικότητα

▼B

3.1.1. Χαρακτηριστικά επίδοσης ανεξάρτητα από το μοντέλο

Ανεξάρτητα από την προσέγγιση επικύρωσης που επιλέγεται, πρέπει να προσδιορίζονται τα παρακάτω χαρακτηριστικά επίδοσης. Για την ελαχιστοποίηση του φόρτου εργασίας μπορεί να χρησιμοποιείται μια προσεκτικά σχεδιασμένη και ορθή από στατιστική άποψη προσέγγιση προκειμένου να συνδυάζονται τα πειράματα που διεξάγονται για τον προσδιορισμό διαφορετικών παραμέτρων.

3.1.1.1. Ειδικότητα

Για τις αναλυτικές μεθόδους έχει σημασία η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στην αναλυτέα ουσία και σε συγγενικές ουσίες (ισομερή, μεταβολίτες, προϊόντα αποικοδόμησης, ενδογενείς ουσίες, συστατικά της μήτρας, κ.λπ.). Είναι απαραίτητες δύο προσεγγίσεις προκειμένου να ελέγξουμε για παρεμποδίσεις.

Πρέπει συνεπώς να επιλέγονται δυνητικά παρεμποδίζουσες ουσίες και να αναλύονται τα σχετικά τυφλά δείγματα για να ανιχνευτεί η παρουσία ενδεχόμενων παρεμποδίσεων και να υπολογίζεται η επίδρασή τους:

- Επιλέγετε μια σειρά χημικώς συγγενών ενώσεων (μεταβολίτες, παράγωγα κ.λπ.) ή άλλες ουσίες που ενδέχεται να απαντηθούν σε συνδυασμό με την ένωση που ενδιαφέρει και που μπορεί να υπάρχουν στα δείγματα.
- Αναλύετε τον κατάλληλο αριθμό αντιπροσωπευτικών τυφλών δειγμάτων ($n \geq 20$) και ελέγχετε για τυχόν παρεμποδίσεις (σήματα, κορυφές, ίχνη ιόντων) στην περιοχή που ενδιαφέρει όπου αναμένεται να εκλουστεί η αναλυτέα ουσία.
- Επιπλέον, τα αντιπροσωπευτικά τυφλά δείγματα πρέπει να είναι εμβολιασμένα στην κατάλληλη συγκέντρωση με μία ή περισσότερες ουσίες που μπορεί να δημιουργήσουν παρεμποδίσεις κατά την ταυτοποίηση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό της αναλυτέας ουσίας.
- Μετά την ανάλυση εξετάζετε εάν:
 - η παρουσία μπορεί να οδηγήσει σε ψευδή ταυτοποίηση,
 - η ταυτοποίηση της αναλυτέας ουσίας-στόχου εμποδίζεται από την παρουσία μιας ή περισσότερων παρεμποδίσεων ή
 - ο ποσοτικός προσδιορισμός επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό.

3.1.1.2. Ορθότητα

Στην παράγραφο αυτή περιγράφεται πώς προσδιορίζεται η ορθότητα (μία συνιστώσα της ακρίβειας). Η ορθότητα μπορεί να εξακριβωθεί μόνο μέσω πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM). Ένα CRM μπορεί να χρησιμοποιείται όπου είναι διαθέσιμο. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο ISO 5725-4 (5). Παρακάτω δίνεται ένα παράδειγμα:

- Αναλύετε 6 αντίγραφα του πιστοποιημένου υλικού αναφοράς σύμφωνα με τις οδηγίες δοκιμής για τη μέθοδο.
- Προσδιορίζετε τη συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας που υπάρχει σε κάθε δείγμα των αντιγράφων.
- Υπολογίζετε τον μέσο όρο, την τυπική απόκλιση και τον συντελεστή μεταβλητότητας (%) για τις συγκεντρώσεις αυτές.
- Υπολογίζετε την ορθότητα διαιρώντας την ανιχνευθείσα μέση συγκέντρωση με την πιστοποιημένη τιμή (που μετράται ως συγκέντρωση) και πολλαπλασιάζοντας με το 100, για να εκφράσετε το αποτέλεσμα ως ποσοστό:

Ορθότητα (%) = μέση ανιχνευθείσα συγκέντρωση διορθωμένη ως προς την ανάκτηση $\times 100$ /πιστοποιημένη τιμή

Εάν δεν υπάρχει πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, αντί για την ορθότητα, η ανάκτηση μπορεί να προσδιοριστεί όπως περιγράφεται στο σημείο 4.1.2.1.

3.1.1.3. Δυνατότητα εφαρμογής/ανθεκτικότητα (μεταβολές ήσσονος σημασίας)

Στις μελέτες αυτού του είδους τα εργαστήρια εισάγουν σκόπιμα λογικές μεταβολές ήσσονος σημασίας και παρατηρούν τις συνέπειες.

Κατά τις προερευνητικές μελέτες πρέπει να επιλέγονται οι παράγοντες προεπεξεργασίας, καθαρισμού και ανάλυσης του δείγματος, που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μέτρησης. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν τον αναλυτή, την πηγή και την ηλικία των αντιδραστηρίων, τους

▼B

διαλύτες, τα πρότυπα και τα εκχυλίσματα του δείγματος, τον ρυθμό θέρμανσης, τη θερμοκρασία, την τιμή του pH καθώς και πολλούς άλλους παράγοντες που μπορεί να εμφανιστούν στο εργαστήριο. Οι παράγοντες αυτοί πρέπει να μετατρέπονται στην τάξη μεγέθους που ταιριάζει στις αποκλίσεις που συναντάμε συνήθως ανάμεσα στα εργαστήρια.

- Εντοπίζετε τους πιθανούς παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
- Τροποποιείτε ελαφρώς τον κάθε παράγοντα.
- Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του Youden, διεξάγετε μια δοκιμή ανθεκτικότητας (15)(16). (Στο σημείο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες εγκεκριμένες μέθοδοι. Η προσέγγιση Youden, ωστόσο, περιορίζει στο ελάχιστο τον απαιτούμενο χρόνο και την απαιτούμενη προσπάθεια). Η προσέγγιση Youden είναι ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους διάφορους παράγοντες δεν μπορούν να εντοπιστούν.
- Εάν βρεθεί ότι κάποιος παράγοντας επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της μέτρησης, διεξάγετε περαιτέρω πειράματα για να αποφασίσετε ως προς τα όρια αποδοχής του παράγοντα αυτού.
- Οι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς στο πρωτόκολλο της μεθόδου.

Η βασική ιδέα δεν είναι να εξετάζουμε μία μεταβολή κάθε φορά αλλά να εισαγάγουμε πολλές μεταβολές ταυτοχρόνως. Για παράδειγμα ως υποθέσουμε ότι τα A, B, C, D, E, F, G παριστάνουν τις ονομαστικές τιμές επτά διαφορετικών παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα, εάν οι ονομαστικές τους τιμές μεταβληθούν ελαφρώς. Έστω ότι οι εναλλακτικές τους τιμές παριστάνονται από τα αντίστοιχα μικρά γράμματα a, b, c, d, e, f και g. Υπάρχουν 2⁷ ή 128 διαφορετικοί δυνατοί συνδυασμοί.

Είναι δυνατόν να επιλέξουμε ένα υποσύνολο οκτώ συνδυασμών από τους παραπάνω που περιλαμβάνουν ίσο αριθμό κεφαλαίων και μικρών γραμμάτων (πίνακας 11). Πρέπει να γίνουν οκτώ προσδιορισμοί που θα χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό των επιλεγμένων παραγόντων (A-G). Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 11 κατωτέρω ως S-Z.

Πίνακας 11

Σχεδιασμός πειράματος για μελέτες ανθεκτικότητας (μεταβολές ήσσονος σημασίας)

Τιμή παράγοντα F	Αριθμός συνδυασμού προσδιορισμών							
	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
Παρατηρούμενο αποτέλεσμα R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Για τους υπολογισμούς βλέπε παραδείγματα για τις δοκιμές ανθεκτικότητας στο σημείο 3.3.

3.1.1.4. Σταθερότητα

Έχει παρατηρηθεί ότι η ανεπαρκής σταθερότητα της αναλυτέας ουσίας ή των συστατικών της μήτρας στο δείγμα κατά την αποθήκευση ή την ανάλυση μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αποκλίσεις στο αποτέλεσμα της ανάλυσης. Επιπλέον, πρέπει να ελέγχεται η σταθερότητα του προτύπου βαθμονόμησης στο διάλυμα. Συνήθως η σταθερότητα της αναλυτέας ουσίας είναι

▼B

γνωστή για διάφορες συνθήκες αποθήκευσης. Η παρακολούθηση των συνθηκών αποθήκευσης υπάγεται στο κανονικό σύστημα διαπίστευσης του εργαστηρίου. Παρακάτω δίνονται παραδείγματα του τρόπου προσδιορισμού της σταθερότητας, όταν δεν είναι γνωστή.

Σταθερότητα του διαλύματος της αναλυτέας ουσίας

- Ετοιμάζετε φρέσκα διαλύματα παρακαταθήκης της αναλυτέας ουσίας/ουσιών και τα αραιώνετε όπως καθορίζεται στις οδηγίες δοκιμής για να δημιουργήσετε αρκετά υποπολλαπλάσια δείγματα (π.χ. 40) για κάθε επιλεγμένη συγκέντρωση (γύρω στο ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης για τις ουσίες για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο ή γύρω στο επιτρεπόμενο όριο για άλλες ουσίες. Ετοιμάζετε τα διαλύματα της αναλυτέας ουσίας που θα χρησιμοποιηθούν για τον εμβολιασμό και το τελικό διάλυμα προς ανάλυση, καθώς και οποιοδήποτε άλλο διάλυμα σάς ενδιαφέρει (π.χ. παραγοντοποιημένα πρότυπα).
- Υπολογίζετε τη συγκέντρωση της αναλυτέας ουσίας στο διάλυμα που μόλις ετοιμάσατε σύμφωνα με τις οδηγίες δοκιμής.
- Διανέμετε τους κατάλληλους όγκους σε κατάλληλα δοχεία, τοποθετείτε ετικέτες και τα αποθηκεύετε σύμφωνα με το σχέδιο:

Πίνακας 12

Σχέδιο για τον προσδιορισμό της σταθερότητας του διαλύματος της αναλυτέας ουσίας

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Σκοτάδι	10 υποπολλαπλάσια δείγματα	10 υποπολλαπλάσια δείγματα	10 υποπολλαπλάσια δείγματα
Φως			10 υποπολλαπλάσια δείγματα

- Ο χρόνος αποθήκευσης μπορεί να επιλεγεί ως 1, 2, 3 και 4 εβδομάδες ή περισσότερο εάν χρειάζεται, π.χ. μέχρι να παρατηρηθούν τα πρώτα φαινόμενα αποικοδόμησης κατά την ταυτοποίηση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης και οι άριστες συνθήκες αποθήκευσης πρέπει να καταγράφονται.
- Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της αναλυτέας ουσίας/ουσιών σε κάθε υποπολλαπλάσιο δείγμα πρέπει να γίνεται χρησιμοποιώντας ως 100 % το διάλυμα της αναλυτέας ουσίας που έχει μόλις παρασκευαστεί τη στιγμή της ανάλυσης.

$$\text{Αναλυτέα ουσία που παραμένει (\%)} = C_i \times 100/C_{\text{fresh}}$$

C_i = συγκέντρωση τη χρονική στιγμή i

C_{fresh} = συγκέντρωση του φρέσκου διαλύματος

Σταθερότητα της αναλυτέας ουσίας(-ών) μέσα στη μήτρα

- Όπου είναι δυνατόν, πρέπει να χρησιμοποιούνται δείγματα εργασίας. Εάν δεν υπάρχει υλικό εργασίας, να χρησιμοποιείται η μήτρα εμβολιασμένη με την αναλυτέα ουσία.
- Εάν υπάρχει υλικό εργασίας, η συγκέντρωση του υλικού πρέπει να καθορίζεται όταν το υλικό είναι ακόμα νοπό. Περαιτέρω υποπολλαπλάσια δείγματα του υλικού μπορούν να ληφθούν ύστερα από 1, 2, 4 και 20 εβδομάδες και οι συγκεντρώσεις πρέπει να προσδιορίζονται. Ο ιστός πρέπει να αποθηκεύεται σε τουλάχιστον μείον 20 °C ή και λιγότερο εφόσον απαιτείται.
- Εάν δεν διαθέτετε υλικό εργασίας, παίρνετε λίγο τυφλό υλικό και το ομογενοποιείτε. Μοιράζετε το υλικό σε 5 υποπολλαπλάσια δείγματα. Εμβολιάζετε κάθε υποπολλαπλάσιο δείγμα με την αναλυτέα ουσία, η οποία κατά προτίμηση πρέπει να προετοιμάζεται σε μικρή ποσότητα υδατικού διαλύματος. Αναλύετε ένα υποπολλαπλάσιο δείγμα αμέσως. Αποθηκεύετε τα υπόλοιπα υποπολλαπλάσια δείγματα σε

▼B

τουλάχιστον μείον 20 °C και τα αναλύετε ύστερα από 1, 2, 4 και 20 εβδομάδες.

3.1.1.5. *Καμπύλες βαθμονόμησης*

Όταν οι καμπύλες βαθμονόμησης χρησιμοποιούνται για ποσοτικό προσδιορισμό:

- Τουλάχιστον πέντε επίπεδα (συμπεριλαμβανομένου του μηδενός) πρέπει να χρησιμοποιούνται για τη χάραξη της καμπύλης.
- Το εύρος εργασίας της καμπύλης πρέπει να περιγράφεται.
- Ο μαθηματικός τύπος της καμπύλης και ο έλεγχος καλής προσαρμογής των στοιχείων στην καμπύλη πρέπει να περιγράφονται.
- Το εύρος αποδοχής για τις παραμέτρους της καμπύλης πρέπει να περιγράφεται.

Εάν απαιτείται βαθμονόμηση σε σειρά βάσει ενός πρότυπου διαλύματος, πρέπει να αναφέρεται το αποδεκτό εύρος των παραμέτρων της καμπύλης βαθμονόμησης, που μπορεί να ποικίλλουν από σειρά σε σειρά.

3.1.2. *Συμβατικές διαδικασίες επικύρωσης*

Ο υπολογισμός των παραμέτρων σύμφωνα με τις συμβατικές μεθόδους απαιτεί τη διεξαγωγή αρκετών ξεχωριστών πειραμάτων. Κάθε χαρακτηριστικό επίδοσης πρέπει να προσδιορίζεται για κάθε σημαντική μεταβολή (βλέπε ικανότητα εφαρμογής/ανθεκτικότητα ανωτέρω). Για τις μεθόδους πολλαπλών αναλυτέων ουσιών, αρκετές αναλυτέες ουσίες μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα, αρκεί να αποκλειστούν προηγουμένως οι πιθανές σχετικές παρεμποδίσεις. Αρκετά χαρακτηριστικά επίδοσης μπορούν να καθοριστούν με παρόμοιο τρόπο. Άρα, για την ελαχιστοποίηση του φόρτου εργασίας συνιστούμε όσο το δυνατόν περισσότερο τον συνδυασμό των πειραμάτων (π.χ. επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα μαζί με ειδικότητα, ανάλυση τυφλών δειγμάτων για τον προσδιορισμό του ορίου απόφασης και δοκιμές για ειδικότητα).

3.1.2.1. *Ανάκτηση*

Εάν δεν είναι διαθέσιμο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, η ανάκτηση πρέπει να προσδιορίζεται με πειράματα που χρησιμοποιούν εμβολιασμένη τυφλή μήτρα χρησιμοποιώντας π.χ. το εξής σχέδιο:

- επιλέγετε 18 υποπολλαπλάσια δείγματα ενός τυφλού υλικού και εμβολιάζετε κάθε φορά 6 υποπολλαπλάσια δείγματα με 1 φορά, 1,5 φορά και 2 φορές το ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης ή 0,5 φορά, 1 φορά και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο,
- αναλύετε τα δείγματα και υπολογίζετε τη συγκέντρωση που υπάρχει σε κάθε δείγμα,
- χρησιμοποιώντας την παρακάτω εξίσωση, υπολογίζετε την ανάκτηση για κάθε δείγμα,
- υπολογίζετε τη μέση ανάκτηση και τον CV από τα 6 αποτελέσματα σε κάθε επίπεδο,
- % ανάκτησης = 100 x μετρηθείσα συγκέντρωση/επίπεδο εμβολιασμού.

Αυτή η συμβατική μέθοδος για τον προσδιορισμό της ανάκτησης αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου της σταθερής προσθήκης που περιγράφεται στο σημείο 3.5 όταν:

- το δείγμα θεωρείται ως τυφλό αντί για δείγμα προς ανάλυση,
- θεωρείται ότι η απόδοση⁽¹⁾ και η ανάκτηση⁽²⁾ είναι παρόμοιες για τις δύο δόσεις προς ανάλυση,
- τα δείγματα δοκιμής έχουν ίσες μάζες και τα εκχυλίσματα των δόσεων προς ανάλυση έχουν ίσους όγκους,

(1) Απόδοση: το κλάσμα της μάζας της αναλυτέας ουσίας που περιέχεται στο δείγμα, το οποίο είναι παρόν στο τελικό εκχύλισμα.

(2) Ανάκτηση (εδώ): το κλάσμα της μάζας της αναλυτέας ουσίας που περιέχεται στο δείγμα, το οποίο είναι παρόν στο τελικό εκχύλισμα. Σε όλο το υπόλοιπο κείμενο θεωρείται ότι απόδοση και ανάκτηση είναι ίσες και συνεπώς χρησιμοποιείται μόνο ο όρος «ανάκτηση».

▼B

- η ποσότητα του προτύπου βαθμονόμησης που προστίθεται στη δεύτερη (εμβολιασμένη) δόση προς ανάλυση σημειώνεται ως x_{ADD} . ($x_{ADD} = \rho_A \cdot V_A$),
- x_1 είναι η τιμή που μετρήθηκε για το τυφλό και x_2 η τιμή που μετρήθηκε για τη δεύτερη (εμβολιασμένη) δόση προς ανάλυση,
- τότε, το % ανάκτησης = $100 (x_2 - x_1) / x_{ADD}$.

Εάν κάποια από τις παραπάνω συνθήκες δεν επιτυγχάνεται (ή θεωρηθεί ότι δεν επιτυγχάνεται), τότε πρέπει να ακολουθηθεί η πλήρης διαδικασία για τον προσδιορισμό της ανάκτησης με τη μέθοδο της σταθερής προσθήκης όπως περιγράφεται στο σημείο 3.5.

3.1.2.2. *Επαναληψιμότητα*

- Ετοιμάζετε ένα σύνολο δειγμάτων με τις ίδιες μήτρες, εμβολιασμένα με την αναλυτέα ουσία για να παράγετε συγκεντρώσεις που ισοδυναμούν με 1 φορά, 1,5 φορά και 2 φορές το ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης ή με 0,5 φορά, 1 φορά και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο.
- Σε κάθε επίπεδο η ανάλυση πρέπει να γίνεται με έξι τουλάχιστον αντίγραφα.
- Αναλύετε τα δείγματα.
- Υπολογίζετε τη συγκέντρωση που βρίσκετε σε κάθε δείγμα.
- Βρίσκετε τη μέση συγκέντρωση, την τυπική απόκλιση και τον συντελεστή μεταβλητότητας (%) των εμβολιασμένων δειγμάτων.
- Επαναλαμβάνετε τα βήματα αυτά τουλάχιστον άλλες δύο φορές.
- Υπολογίζετε τις συνολικές μέσες συγκεντρώσεις και τους CV των εμβολιασμένων δειγμάτων.

3.1.2.3. *Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα*

- Ετοιμάζετε ένα σύνολο από δείγματα συγκεκριμένων υλικών δοκιμής (με τις ίδιες ή διαφορετικές μήτρες), εμβολιασμένα με την αναλυτέα ουσία ή ουσίες για να παράγετε συγκεντρώσεις που ισοδυναμούν με 1 φορά, 1,5 φορά και 2 φορές το απαιτούμενο όριο επίδοσης ή με 0,5 φορά, 1 φορά και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο.
- Σε κάθε επίπεδο η ανάλυση πρέπει να γίνεται με έξι τουλάχιστον αντίγραφα.
- Επαναλαμβάνετε τα βήματα αυτά τουλάχιστον άλλες δύο φορές με διαφορετικούς χειριστές και διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, π.χ. διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαλυτών κ.λπ., διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, διαφορετικά όργανα, κ.λπ. εάν είναι δυνατόν.
- Αναλύετε τα δείγματα.
- Υπολογίζετε την ανιχνευθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα.
- Βρίσκετε τη μέση συγκέντρωση, την τυπική απόκλιση και τον συντελεστή μεταβλητότητας (%) των εμβολιασμένων δειγμάτων.

3.1.2.4. *Αναπαραγωγιμότητα*

Όταν πρόκειται να επαληθευτεί η αναπαραγωγιμότητα, τα εργαστήρια πρέπει να συμμετέχουν σε συλλογικές μελέτες σύμφωνα με το ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5. *Όριο απόφασης (CCa)*

Το όριο απόφασης πρέπει να καθοριστεί σύμφωνα με τις απαιτήσεις σχετικά με την ταυτοποίηση ή την ταυτοποίηση μαζί με ποσοτικό προσδιορισμό όπως ορίζονται στο «Κριτήρια επίδοσης και άλλες απαιτήσεις για τις αναλυτικές μεθόδους» (μέρος 2 ανωτέρω).

Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CCa μπορεί να καθοριστεί:

- Είτε με τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843 (17) (που εδώ ονομάζεται κρίσιμη τιμή της μεταβλητής καθαρής κατάστασης). Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί τυφλό υλικό, εμβολιασμένο στο ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο επίδοσης και επάνω από αυτό με ισοαπέχοντα βήματα. Αναλύετε τα δείγματα. Ύστερα από την ταυτοποίηση, χαράσσεται η καμπύλη «σήμα/προστεθείσα

▼B

συγκέντρωση». Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο σημείο τομής του άξονα των y συν 2,33 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας του σημείου τομής ισούται με το όριο απόφασης. Αυτό ισχύει μόνο για ποσοτικές αναλύσεις ($\alpha = 1\%$).

- Είτε αναλύοντας τουλάχιστον 20 τυφλά υλικά ανά μήτρα για να μπορέσετε να υπολογίσετε τον λόγο του σήματος προς τον θόρυβο το χρονικό διάστημα κατά το οποίο αναμένεται η αναλυτέα ουσία. Το τριπλάσιο του λόγου του σήματος προς τον θόρυβο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όριο απόφασης. Αυτό ισχύει για ποσοτικές και ποιοτικές αναλύσεις.

Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CCa μπορεί να καθοριστεί:

- Είτε με τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843 (17) (που εδώ ονομάζεται κρίσιμη τιμή της μεταβλητής καθαρής κατάστασης). Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί τυφλό υλικό, εμβολιασμένο κοντά στο επιτρεπόμενο όριο με ισοαπέχοντα βήματα. Αναλύετε τα δείγματα. Ύστερα από την ταυτοποίηση, χαράσσεται η καμπύλη «σήμα/προσθεθείσα συγκέντρωση». Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο επιτρεπόμενο όριο συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας ισούται με το όριο απόφασης ($\alpha = 5\%$).
- Είτε αναλύοντας τουλάχιστον 20 τυφλά υλικά ανά μήτρα εμβολιασμένα με την αναλυτέα ουσία ή ουσίες στο επιτρεπόμενο όριο. Η συγκέντρωση στο επιτρεπόμενο όριο συν 1,64 φορές την αντίστοιχη τυπική απόκλιση ισούται με το όριο απόφασης ($\alpha = 5\%$).

Βλέπε επίσης τα άρθρα 5 και 3.2.

3.1.2.6. Ικανότητα ανίχνευσης (CCB)

Η ικανότητα ανίχνευσης πρέπει να καθορίζεται σύμφωνα με τις απαιτήσεις για τη διαλογή, την ταυτοποίηση ή την ταυτοποίηση συν ποσοτικό προσδιορισμό, όπως ορίζονται (βλέπε κεφάλαιο 2 ανωτέρω).

Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CCB μπορεί να καθοριστεί:

- Με τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843 (17) (που εδώ ονομάζεται ελάχιστη ανιχνεύσιμη τιμή της μεταβλητής καθαρής κατάστασης). Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί αντιπροσωπευτικό τυφλό υλικό, που να είναι εμβολιασμένο στο ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο επίδοσης και κάτω από αυτό με ισοαπέχοντα βήματα. Αναλύετε τα δείγματα. Ύστερα από την ταυτοποίηση, χαράσσεται η καμπύλη «σήμα/προσθεθείσα συγκέντρωση». Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο όριο απόφασης συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μέσης μετρηθείσας περιεκτικότητας στο όριο απόφασης ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης ($\beta = 5\%$).
- Με την ανάλυση τουλάχιστον 20 τυφλών υλικών ανά μήτρα εμβολιασμένων με την αναλυτέα ουσία ή ουσίες στο όριο απόφασης. Αναλύετε τα δείγματα και ταυτοποιείτε τις αναλυτέες ουσίες. Η τιμή του ορίου απόφασης συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μετρηθείσας περιεκτικότητας ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης ($\beta = 5\%$).
- Εάν δεν διαθέτετε ποσοτικά αποτελέσματα, η ικανότητα ανίχνευσης μπορεί να προσδιοριστεί με την ανάλυση εμβολιασμένου τυφλού υλικού στο όριο απόφασης και πάνω από αυτό. Στην περίπτωση αυτή, το επίπεδο συγκέντρωσης, όπου παραμένει μόνο $\leq 5\%$ από τα ψευδώς συμμορφούμενα αποτελέσματα, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου. Επομένως πρέπει να γίνουν τουλάχιστον 20 αναλύσεις για τουλάχιστον ένα επίπεδο συγκέντρωσης προκειμένου να εξασφαλιστεί μια αξιόπιστη βάση για τον προσδιορισμό αυτό.

Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CCB μπορεί να καθοριστεί:

- Είτε με τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843 (17) (που εδώ ονομάζεται ελάχιστη ανιχνεύσιμη τιμή της μεταβλητής καθαρής κατάστασης). Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί αντιπροσωπευτικό

▼B

τυφλό υλικό, που να είναι εμβολιασμένο κοντά στο επιτρεπόμενο όριο με ισοαπέχοντα βήματα. Αναλύετε τα δείγματα και ταυτοποιείτε την αναλυτέα ουσία ή ουσίες. Υπολογίζετε την τυπική απόκλιση της μέσης μετρηθείσας περιεκτικότητας στο όριο απόφασης. Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στην τιμή του ορίου απόφασης συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης ($\beta = 5\%$).

- Είτε αναλύοντας τουλάχιστον 20 τυφλά υλικά ανά μήτρα εμβολιασμένα με την αναλυτέα ουσία ή ουσίες στο όριο απόφασης. Η τιμή του ορίου απόφασης συν 1,64 φορές την αντίστοιχη τυπική απόκλιση ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης ($\beta = 5\%$).

Βλέπε επίσης τμήμα 3.2.

3.1.2.7. Ανθεκτικότητα (μεταβολές μείζονος σημασίας)

Η αναλυτική μέθοδος πρέπει να δοκιμάζεται υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες, στις οποίες περιλαμβάνονται, για παράδειγμα, διαφορετικά είδη, διαφορετικές μήτρες ή διαφορετικές συνθήκες δειγματοληψίας. Οι αλλαγές που εισάγονται πρέπει να είναι μεγάλες. Η σημασία των μεταβολών αυτών μπορεί να αξιολογηθεί π.χ. με τη βοήθεια της προσέγγισης Youden, (15)(16). Κάθε χαρακτηριστικό επίδοσης πρέπει να προσδιορίζεται για όλες τις μεταβολές μείζονος σημασίας που βρέθηκε ότι έχουν σημαντική επίδραση στην επίδοση της ανάλυσης.

3.1.3. Επικύρωση σύμφωνα με εναλλακτικά μοντέλα

Εάν εφαρμοστούν εναλλακτικές διαδικασίες επικύρωσης, το υποκείμενο μοντέλο και η υποκείμενη στρατηγική με τις αντίστοιχες προϋποθέσεις, υποθέσεις και μαθηματικούς τύπους πρέπει να καθορίζονται στο πρωτόκολλο επικύρωσης ή τουλάχιστον πρέπει να υπάρχουν αναφορές στην ύπαρξή τους. Στη συνέχεια δίνεται ένα παράδειγμα μιας εναλλακτικής προσέγγισης. Όταν εφαρμόζουμε π.χ. το εσωτερικό μοντέλο επικύρωσης, τα χαρακτηριστικά επίδοσης καθορίζονται με τρόπο που να επιτρέπει την επικύρωση για μεταβολές μείζονος σημασίας εντός της ίδιας διαδικασίας επικύρωσης. Αυτό απαιτεί το σχεδιασμό ενός πειραματικού σχεδίου για την επικύρωση.

3.1.3.1. Πειραματικό σχέδιο

Τα πειραματικά σχέδια πρέπει να σχεδιάζονται ανάλογα με τον αριθμό των διαφορετικών ειδών και των διαφορετικών παραγόντων που εξετάζονται. Επομένως, το πρώτο βήμα ολόκληρης της διαδικασίας επικύρωσης πρέπει να είναι η εξέταση του πληθυσμού των δειγμάτων που πρόκειται να αναλυθούν μελλοντικά στο εργαστήριο, προκειμένου να επιλεγούν τα πιο σημαντικά είδη, και των συγκεκριμένων παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μέτρησης. Στη συνέχεια πρέπει να επιλεγεί το εύρος συγκεντρώσεων με τρόπο που να εξυπηρετεί τον στόχο που τίθεται, ανάλογα με το επίπεδο που ενδιαφέρει.

Παράδειγμα:

- Αρκετές αναλυτέες ουσίες μπορούν να εξεταστούν ταυτόχρονα με την αναλυτική μέθοδο που επικυρώνεται.
- Έχουν εντοπιστεί δύο παραλλαγές του κύριου παράγοντα (A και B). Οι κύριοι παράγοντες αποτελούν τη βάση για το συνδυασμό των επιπέδων παραγόντων. Οι κύριοι παράγοντες μπορεί να περιλαμβάνουν το είδος ή τη μήτρα. Στο παράδειγμά μας ο κύριος παράγοντας ποικίλλει σε δύο επίπεδα, δηλαδή εξετάζονται δύο διαφορετικά είδη (A και B). Γενικά, είναι δυνατόν οι κύριοι παράγοντες να ποικίλουν σε περισσότερα από δύο επίπεδα με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός των ανάλυσεων που πρέπει να πραγματοποιηθούν.
- Οι παράγοντες που επιλέγονται θα ποικίλλουν σε δύο επίπεδα (που σημειώνονται με + ή -).



Πίνακας 13

Παραδείγματα παραγόντων που θεωρούνται σημαντικοί για μια διαδικασία επικύρωσης

Γένος του ζώου	(παράγοντας 1)
Φυλή	(παράγοντας 2)
Συνθήκες μεταφοράς	(παράγοντας 3)
Συνθήκες αποθήκευσης	(παράγοντας 4)
Νωπότητα του δείγματος	(παράγοντας 5)
Συνθήκες πάχυνσης	(παράγοντας 6)
Διαφορετικοί χειριστές με διαφορετική εμπειρία	(παράγοντας 7)

Πίνακας 14

Πιθανό πειραματικό σχέδιο του παραπάνω παραδείγματος

Είδος	Παράγοντας 1	Παράγοντας 2	Παράγοντας 3	Παράγοντας 4	Παράγοντας 5	Παράγοντας 6	Παράγοντας 7	Αριθμός δείγματος
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8
B	+	+	+	+	+	-	+	9
B	+	+	-	-	-	+	+	10
B	+	-	+	-	+	+	-	11
B	+	-	-	+	-	-	-	12
B	-	+	+	-	-	-	-	13
B	-	+	-	+	+	+	-	14
B	-	-	+	+	-	+	+	15
B	-	-	-	-	+	-	+	16

Καθώς κάθε δείγμα (κάθε επίπεδο συνδυασμού παραγόντων) πρέπει να εμβολιασθεί με 4 διαφορετικές συγκεντρώσεις κοντά στο επίπεδο που ενδιαφέρει και πρέπει να αναλυθεί και ένα τυφλό δείγμα για κάθε επίπεδο, συνολικά πρέπει να πραγματοποιηθούν $5 \times 16 = 80$ αναλύσεις για ολόκληρο το πείραμα επικύρωσης.

Από αυτά τα 80 αποτελέσματα μέτρησης είναι δυνατόν να υπολογιστούν (13)(14):

Η ανάκτηση:

- η επαναληψιμότητα ανά επίπεδο συγκέντρωσης (s_{IR}),
- η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ανά επίπεδο συγκέντρωσης (s_{IR}),
- το όριο απόφασης (CC α),
- η ικανότητα ανίχνευσης (CC β),
- η καμπύλη ισχύος (ποσοστό σφάλματος β ως προς τη συγκέντρωση) (βλέπε 3.1.3.2.),
- η ανθεκτικότητα σε μεταβολές μείζονος σημασίας· η ανθεκτικότητα σε μεταβολές ήσσονος σημασίας μπορεί να προσδιοριστεί σύμφωνα με την παράγραφο 3.1.3.2.,
- 16 καμπύλες βαθμονόμησης που αφορούν το δείγμα,
- 1 γενική καμπύλη βαθμονόμησης,
- το διάστημα πρόβλεψης της γενικής καμπύλης βαθμονόμησης,

▼B

- οι αποκλίσεις που οφείλονται στη μήτρα (S_{mat}),
- οι αποκλίσεις που οφείλονται στην αναλυτική διαδικασία (S_{an}),
- η επίδραση των μεμονωμένων παραγόντων στα αποτελέσματα της μέτρησης.

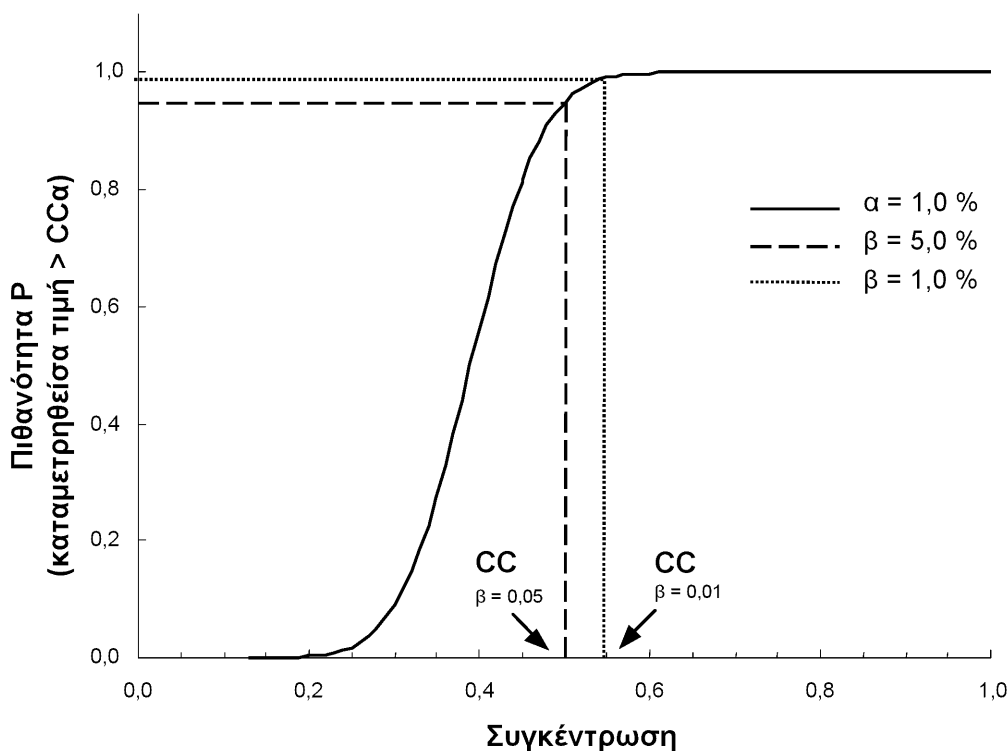
Αυτά τα χαρακτηριστικά επίδοσης επιτρέπουν τη συνολική αξιολόγηση του επιπέδου επίδοσης της μεθόδου, καθώς δεν διερευνάται μόνον η επίδραση του κάθε παράγοντα ξεχωριστά, αλλά και των σχετικών συνδυασμών αυτών των παραγόντων. Με τη βοήθεια του σχεδιασμού αυτού του πειράματος είναι δυνατόν να αποφασίσουμε εάν κάποιος από τους παράγοντες που επιλέξαμε πρέπει να εξαιρεθεί από τη γενική καμπύλη βαθμονόμησης, επειδή διαφέρει σημαντικά από τις τυπικές αποκλίσεις των άλλων παραγόντων.

3.1.3.2. *Καμπύλη ισχύος*

Η καμπύλη ισχύος παρέχει πληροφορίες σχετικά με την ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου εντός του επιλεγμένου εύρους συγκέντρωσης. Αναφέρεται στον κίνδυνο σφάλματος β κατά την εφαρμογή της μεθόδου που εξετάζεται. Η καμπύλη ισχύος μας επιτρέπει να υπολογίσουμε τις ικανότητες ανίχνευσης των αντίστοιχων κατηγοριών (διαλογή, επιβεβαίωση) ή ειδών (ποιοτικών ή ποσοτικών) μεθόδων για ένα συγκεκριμένο σφάλμα β (π.χ. 5 %).

▼B

Σχήμα 1
Καμπύλη ισχύος



Το σχήμα 1 μας δίνει ένα παράδειγμα γραφικής παράστασης της ικανότητας ανίχνευσης ($CC\beta$) μιας αναλυτικής μεθόδου. Αυτή η ιδιαίτερη μέθοδος ενέχει τον κίνδυνο να ληφθεί ψευδής απόφαση της τάξης του 5 % σε συγκέντρωση της τάξης του 0,50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Σε συγκέντρωση 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$ πιθανότητα να ληφθεί ψευδής απόφαση περί συμμόρφωσης του αποτελέσματος μειώνεται σε 1 %.

3.1.3.3. Αναπαραγωγιμότητα

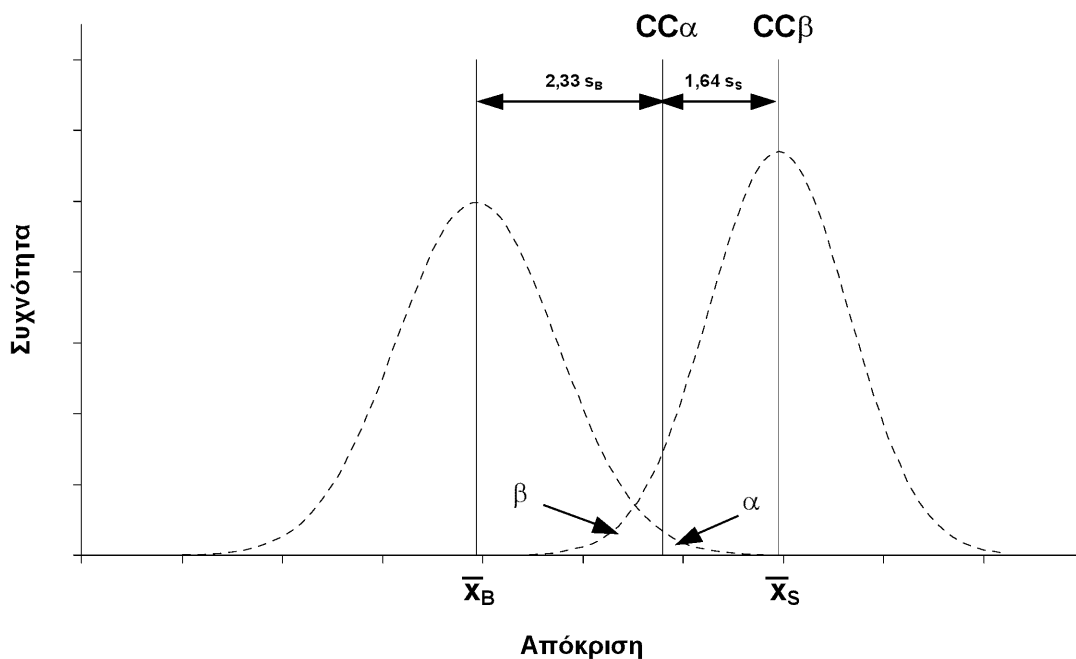
Ο προσδιορισμός της αναπαραγωγιμότητας μιας μεθόδου με την έννοια της μελέτης ενός μόνου εργαστηρίου (εσωτερική επικύρωση) απαιτεί την κατ' επανάληψη συμμετοχή σε μελέτες ικανότητας σύμφωνα με τους οδηγούς ISO 43-1 (3) και 43-2 (4). Τα εργαστήρια επιτρέπεται να επιλέξουν τις δικές τους μεθόδους, υπό την προϋπόθεση ότι οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούνται υπό συνήθεις συνθήκες. Η τυπική απόκλιση του εργαστηρίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου.

▼ B

3.2. ΓΡΑΦΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΑΝΑΛΥΤΙΚΩΝ ΟΡΙΩΝ

Σχήμα 2

Ουσίες για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο



\bar{X}_S μέση τιμή απόκρισης του μολυσμένου δείγματος

S_B τυπική απόκλιση του τυφλού δείγματος (προσδιορισμένη υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας)

S_S τυπική απόκλιση του μολυσμένου δείγματος (προσδιορισμένη υπό ενδοεργαστηριακές συνθήκες αναπαραγωγιμότητας)

α ποσοστό ψευδώς μη συμμορφούμενων αποτελεσμάτων

β ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων

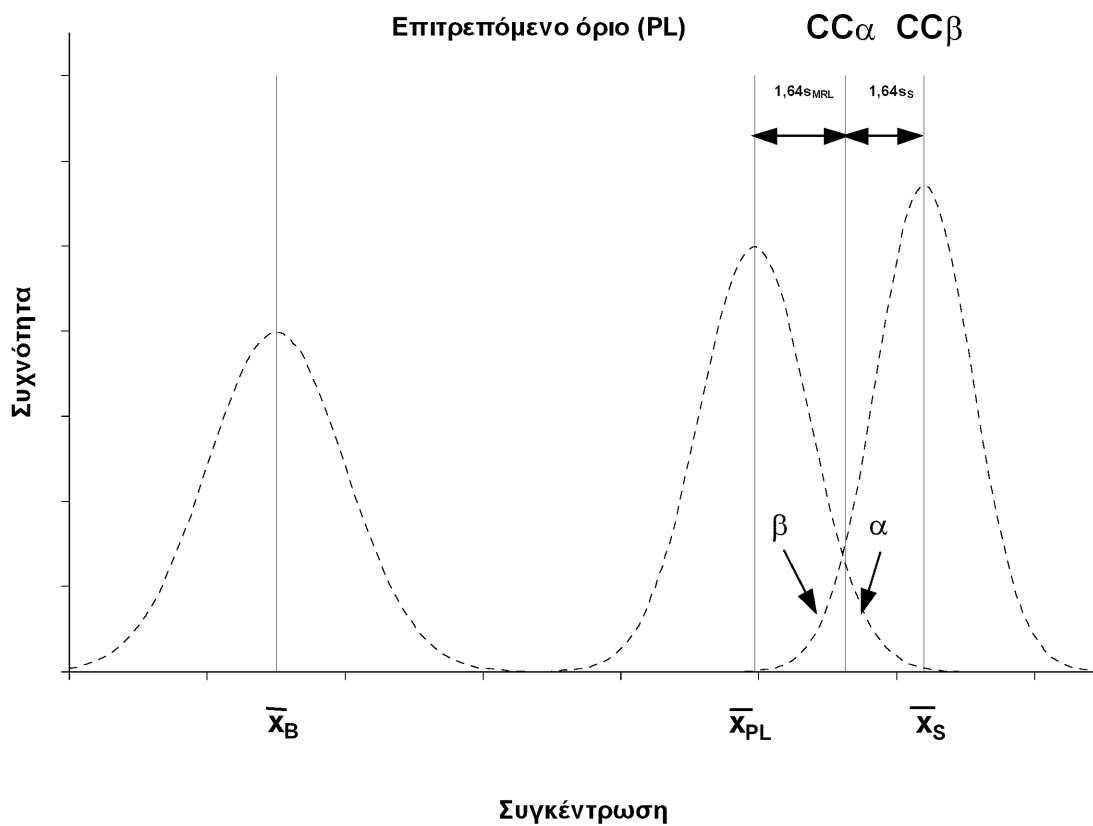
CC α απόκριση με δεδομένο σφάλμα α και 50 % σφάλμα β

CC β απόκριση με πολύ μικρό σφάλμα α και δεδομένο σφάλμα β

▼ B

Σχήμα 3

Ουσίες για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο



\bar{X}_B μέση «συγκέντρωση» του τυφλού δείγματος

\bar{X}_{PL} μέση συγκέντρωση του δείγματος που περιέχει την αναλυτέα ουσία στο επιτρεπόμενο όριο

\bar{X}_S μέση συγκέντρωση του μολυσμένου δείγματος

S_{PL} τυπική απόκλιση του δείγματος που περιέχει την αναλυτέα ουσία στο επιτρεπόμενο όριο (προσδιορισμός υπό ενδοεργαστηριακές συνθήκες αναπαραγωγιμότητας)

S_S τυπική απόκλιση του μολυσμένου δείγματος (προσδιορισμός υπό ενδοεργαστηριακές συνθήκες αναπαραγωγιμότητας)

α ποσοστό ψευδώς μη συμμορφούμενων αποτελεσμάτων

β ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων

CC α απόκριση με δεδομένο σφάλμα α και 50 % σφάλμα β

CC β απόκριση με πολύ μικρό σφάλμα α και δεδομένο σφάλμα β

▼B

3.3. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΙΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΕΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΗΣΣΟΝΟΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ YOUNDEN (16)

Σύγκριση των μέσων όρων (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Συγκρίνετε τους μέσους όρους των κεφαλαίων γραμμμάτων (A_A έως A_G) με τους μέσους όρους των αντίστοιχων μικρών γραμμμάτων (A_a έως A_g). Εάν κάποιος παράγοντας επηρεάζει, η διαφορά θα είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις διαφορές των άλλων παραγόντων.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	Μια ανθεκτική μέθοδος δεν πρέπει να επηρεάζεται από τις αλλαγές που υπάρχουν σχεδόν σίγουρα ανάμεσα στα εργαστήρια.
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	Εάν δεν υπάρχει σημαντική διαφορά, το πιο ρεαλιστικό μέτρο του τυχαίου σφάλματος δίνεται από τις επτά διαφορές.
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Διαφορές (D_i)	Τετράγωνα των διαφορών (D_i^2)
$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	$D_a^2 = \text{τιμή } a$
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	$D_b^2 = \text{τιμή } b$
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	$D_c^2 = \text{τιμή } c$
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	$D_d^2 = \text{τιμή } d$
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	$D_e^2 = \text{τιμή } e$
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	$D_f^2 = \text{τιμή } f$
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	$D_g^2 = \text{τιμή } g$

Τυπική απόκλιση των διαφορών D_i (S_{D_i}):

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

Εάν η S_{D_i} είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την τυπική απόκλιση της μεθόδου όταν διεξάγεται υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (βλέπε ανωτέρω), μπορούμε να προβλέψουμε με βεβαιότητα ότι όλοι οι παράγοντες μαζί επηρεάζουν το αποτέλεσμα ακόμα και αν ο κάθε παράγοντας από μόνος του δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση και ότι η μέθοδος δεν είναι αρκετά ανθεκτική στις μεταβολές που επιλέχθηκαν.

3.4. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΕΣΩΤΕΡΙΚΗΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

Παραδείγματα και υπολογισμοί του εσωτερικού πρωτοκόλλου επικύρωσης όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο «Επικύρωση σύμφωνα με εναλλακτικά μοντέλα» (3.1.3) (13) (14).

3.5. ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ

Ένα δείγμα δοκιμής με περιεκτικότητα T της αναλυτέας ουσίας μοιράζεται σε δύο δόσεις προς ανάλυση 1 και 2 με μάζες m_1 και m_2 αντίστοιχα. Η δόση προς ανάλυση 2 εμβολιάζεται με όγκο V_A ενός διαλύματος συγκέντρωσης ρ_A της αναλυτέας ουσίας. Δύο εκχυλίσματα της δόσης προς ανάλυση με όγκους V_1 και V_2 αντίστοιχα λαμβάνονται ύστερα από τα βήματα εκχύλισης και καθαρισμού της μεθόδου. Η ανάκτηση της αναλυτέας ουσίας θεωρείται ότι είναι rc . Τα δύο εκχυλίσματα εξετάζονται με μία μέθοδο μέτρησης ευαισθησίας b και η αναλυτική τους απόκριση είναι x_1 και x_2 αντίστοιχα.

Εάν υποθέσουμε ότι rc και b είναι τα ίδια για την αναλυτέα ουσία στο φυσικό δείγμα και στο εμβολιασμένο δείγμα, τότε η περιεκτικότητα T μπορεί να υπολογιστεί ως:

▼B

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

Η μέθοδος θα επιτρέψει τον προσδιορισμό της ανάκτησης rc . Τότε, εκτός από τη δοκιμασία που περιγράφεται παραπάνω, ένα μέρος του εκχυλίσματος της δόσης προς ανάλυση 1 (όγκος V_3) εμβολιάζεται με γνωστή ποσότητα $\rho_B \cdot V_B$ της αναλυτέας ουσίας και αναλύεται. Η αναλυτική απόκριση είναι x_3 και η ανάκτηση είναι:

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

Επιπλέον, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η ευαισθησία b , ως:

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

Περιγράφηκαν όλες οι συνθήκες εφαρμογής και όλες οι λεπτομέρειες (18).

4. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

AAS	φασματοφωτομετρία ατομικής απορρόφησης
AES	φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής
AOAC-I	Διεθνής Ένωση Αναλυτικών Χημικών
B	δεσμευμένο κλάσμα (ανοσοβιολογική δοκιμασία)
CI	χημικός ιονισμός
CRM	πιστοποιημένο υλικό αναφοράς
CV	συντελεστής μεταβλητότητας
2 D	δύο διαστάσεων
DAD	ανίχνευση συστοιχίας διόδων
DPASV	ανοδική αναδιαλυτική βολταμετρία διαφορικού παλμού
ECD	ανίχνευση σύλληψης ηλεκτρονίων
EI	ιονισμός (μορίου) με σύγκρουση με ηλεκτρόνιο
GC	αέρια χρωματογραφία
HPLC	υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HPTLC	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης
HRMS	(φασματομετρία μάζας) υψηλής διακριτικής ικανότητας
ICP-AES	φασματοφωτομετρία ατομικής εκπομπής επαγωγικός συζευγμένου πλάσματος
ICP-MS	φασματομετρία μάζας επαγωγικός συζευγμένου πλάσματος
IR	υπερύθρου
ISO	Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης
LC	υγρή χρωματογραφία
LR(MS)	(φασματομετρία μάζας) χαμηλής διακριτικής ικανότητας
MRPL	ελάχιστο απαιτούμενο όριο επίδοσης
MS	φασματομετρία μάζας
m/z	λόγος μάζας/φορτίου
RF	σχετική μετακίνηση ως προς το μέτωπο του διαλύτη (TLC)
RSDL	σχετικές τυπικές αποκλίσεις του εργαστηρίου
SIM	παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος
TLC	χρωματογραφία λεπτής στιβάδας
UV	υπεριώδες φως
VIS	ορατό φως

5. ΠΑΡΑΠΟΜΠΕΣ

- (1) ISO 17025: 1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories
- (2) ISO 3534-1: 1993 Statistics — Vocabulary and symbols — Part 1: Probability and general statistical terms
- (3) ISO Guide 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes

▼B

- (4) ISO Guide 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies
- (5) ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method
- (6) ISO 78-2:1999 Chemistry — Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis
- (7) W.G de Ruig and J.M Weseman «A new approach to confirmation by infrared spectrometry» *J. Chemometrics* 4 (1990) 61-77.
- (8) See e.g. May, T.W., Brumbaugh, W.G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: *Analytical Chemistry* 54(7):1032-1037 (90353)
- (9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675;
- (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, pp. 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. und 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. und 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 Peer 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, p. 35 ff
- (17) ISO 11843: 1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case
- (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: «Yield or recovery: a world of difference». Proceedings 8th Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, page 2-9.
- (19) Council Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement Official Journal L 243, 29/10/1971 P.29
- (20) ISO 31-0:1992 Quantities and units — Part 0: General principles

▼ M1

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Ελάχιστα απαιτούμενα όρια επίδοσης

Ουσία ή/και μεταβολίτης	Μήτρες	MRPL
Χλωραμφενικόλη	Κρέας Αυγά Γάλα Ούρα Προϊόντα υδατοκαλλιέργειας Μέλι	0,3 µg/kg
Οξική μεδροξυπρογεστερόνη	Νεφρικό χοιρινό λίπος	1 µg/kg
Μεταβολίτες νιτροφουρανίων: — Φουραζολιδόνη — Φουραλαδόνη — Νιτροφουραντοΐνη — Νιτροφουραζόνη	Κρέας πουλερικών Προϊόντα υδατοκαλλιέργειας	1 µg/kg για όλες
▼ <u>M2</u> Σύνολο του πρασίνου του μαλαχίτη και του πρασίνου του λευκομαλαχίτη	Κρέας των προϊόντων υδατοκαλλιέργειας	2 µg/kg