

MINISTARSTVO POLJOPRIVREDE, ŠUMARSTVA I VODNOGA GOSPODARSTVA

16

Na temelju članka 78. stavka 3. Zakona o veterinarstvu (»Narodne novine« 70/97, 105/01 i 172/03) ministar poljoprivrede, šumarstva i vodnoga gospodarstva donosi

PRAVILNIK

O PROVOĐENJU ANALITIČKIH METODA I TUMAČENJU REZULTATA

POGLAVLJE I.

TEMELJNE ODREDBE

Članak 1.

Ovim se Pravilnikom utvrđuju mjere za analitičke metode koje se koriste u ispitivanju službenih uzoraka koji su uzeti sukladno važećem Pravilniku o mjerama za monitoring određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla, te određuju zajednički kriteriji za tumačenje analitičkih rezultata koji su za te uzorke dobiveni u ovlaštenim laboratorijima.

Definicije

Članak 2.

Za potrebe ovog Pravilnika pojedini pojmovi imaju sljedeća značenja:

- *Alfa (α) pogreška*: vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno negativan, iako su dobiveni pozitivni rezultati (lažno pozitivan rezultat).
- *Analit*: tvar koju treba dokazati, identificirati i/ili kvantificirati i njeni derivati koji se javljaju tijekom analize.
- *Baždarni (kalibracijski) standard*: mjerno sredstvo koje predstavlja količinu ispitivane tvari na način da povezuje njenu vrijednost s referentnom bazom.
- *Beta (β) pogreška*: vjerojatnost da je ispitani uzorak stvarno pozitivan, iako su dobiveni negativni mjerni rezultati (lažno negativni rezultat).
- *Dopuštena količina*: najveća granica rezidua, najveća razina ili druga najveća tolerancija.
- *Granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$)* je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerojatnost α pogreške da uzorak ne udovoljava.
- *Iskorištenje (engl. recovery)*: postotak stvarne koncentracije tvari izdvojene tijekom analitičkog postupka. Određuje se tijekom vrednovanja metode, ako potvrđeni referentni materijal nije dostupan.
- *Ispitivanje osposobljenosti*: analiziranje istog uzorka, pri čemu laboratoriji mogu primijeniti metode po vlastitom izboru, uz uvjet da se te metode primijene pod uobičajenim uvjetima. Ispitivanje se mora provesti u skladu s uputama ISO/IEC 43-1 i 43-2 i može služiti za ocjenu ponovljivosti metoda.
- *Ispitivanje unutar jednog laboratorija (unutarnje vrednovanje)*: analitičko ispitivanje u

kojemu jedan laboratorij, u različitim uvjetima i u opravdano dugim vremenskim intervalima, primjenjuje jednu metodu za analiziranje istih ili različitih ispitnih uzoraka.

- *Istinitost*: podudarnosti između srednje vrijednosti dobivene iz velikog niza rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Istinitost se obično izražava kao mjerno odstupanje (engl. bias).

- *Jedinice*: one jedinice koje su opisane u normi HRN ISO 31.

- *Ko-kromatografija*: podrazumijeva postupak u kojemu se ekstrakt uzorka, prije kromatografije, dijeli na dva dijela. Jedan dio se podvrgava kromatografiji kao takav. Drugi dio se miješa s baždarnim standardom analita koji se ispituje i potom na isti način kromatografira. Količina dodanog standardnog analita mora biti približna procijenjenoj količini analita u ekstraktu. Cilj metode je poboljšati identifikaciju analita pri uporabi kromatografske metode, pogotovo kada nije dostupan prikladni unutarnji standard.

- *Kriteriji učinkovitosti*: zahtjevi u pogledu učinkovitosti prema kojima se može ocijeniti da je analitička metoda primjerena svrsi i da daje pouzdane rezultate.

- *Kvalitativna metoda*: analitička metoda kojom se tvar identificira na temelju njenih kemijskih, bioloških i fizikalnih svojstava.

- *Kvantitativna metoda*: analitička metoda kojom se određuje količina ili maseni udio neke tvari tako da se može izraziti kao brojčana vrijednost u odgovarajućim jedinicama.

- *Laboratorijski uzorak*: je uzorak koji je pripremljen za slanje u laboratorij u svrhu pregleda ili analiziranja.

- *Međulaboratorijsko ispitivanje*: organiziranje, provedba i ocjena ispitivanja identičnog uzorka u dva ili više laboratorija prema unaprijed određenim uvjetima, kako bi se provjerili izvedbeni uvjeti ispitivanja. Ovisno o svrsi, ispitivanje se može svrstati kao poredbeno ispitivanje ili ispitivanje osposobljenosti.

- *Mjerno odstupanje (engl. bias)*: razlika između očekivanog rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti.

- *Najmanja zahtjevana granica učinkovitosti izvedbe metode (MRPL)*: najmanji udio analita u uzorku, koji se mora dokazati i potvrditi. Služi za usklađivanje izvođenja analitičkih metoda za one tvari koje ne smiju biti prisutne.

- *Obnovljivost (reproducibilnost)*: preciznost u uvjetima obnovljivosti.

- *Obnovljivost unutar laboratorija (reproducibilnost)*: preciznost dobivena u istom laboratoriju pod propisanim (unaprijed određenim) uvjetima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u opravdanim vremenskim razmacima.

- *Obogaćeni uzorak* je uzorak kojemu je dodana poznata količina analita koji treba dokazati.

- *Orijentacijska metoda (engl. screening)*: metoda koja se primjenjuje kako bi se dokazala prisutnost neke tvari ili vrste tvari na razini značajnosti. Ove metode odlikuje sposobnost brze obrade velikog broja uzoraka i koriste se za pregledavanje velikog broja uzoraka s ciljem otkrivanja mogućih pozitivnih rezultata.

- *Poduzorak za analizu*: količina materijala uzetog od uzorka za ispitivanje koji se ispituje ili promatra.

- *Ponovljivost*: preciznost u uvjetima ponovljivosti.

- *Poredbeno ispitivanje*: analiziranje istog uzorka istom metodom kako bi se provjerile izvedbene osobitosti metode uključujući ispitivanje slučajne mjerne pogreške i mjerno odstupanje laboratorija.

- *Potvrдна metoda*: metoda kojom se dobiju potpuni ili dodatni podaci na temelju kojih je određenu tvar moguće jednoznačno identificirati i po potrebi kvantificirati, na razini zna-

čajnosti.

- *Potvrđeni referentni materijal (CRM)*: materijal kojemu je utvrđen određeni udio analita.

- *Preciznost*: stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih pod unaprijed određenim propisanim uvjetima. Preciznost se obično izražava kao nepreciznost i računa se kao standardna devijacija rezultata ispitivanja. Što je manja preciznost, veća je standardna devijacija.

- *Razina značajnosti*: koncentracija tvari ili analita u uzorku koja je sukladna s važećim propisima.

- *Referentni materijal*: materijal čija su jedno ili više svojstava potvrđena vrednovanom metodom, tako da se može koristiti za baždarenje instrumenta ili potvrdu mjerne metode.

- *Robusnost*: podložnost analitičke metode na promjene uvjeta ispitivanja u odnosu na različitost vrste uzoraka, analita, uvjete pohrane, uvjeta okoliša i/ili uvjeta pripreme uzoraka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jest ili uz utvrđene manje izmjene. Na sve uvjete ispitivanja koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama, a mogu utjecati na rezultat analize (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH, temperatura), treba ukazati.

- *Slijepa proba s reagensom*: podrazumijeva primjenu cjelokupnog analitičkog postupka bez ispitnog dijela uzorka ili uz jednaku količinu odgovarajućeg otapala umjesto uzorka.

- *Slijepa proba s uzorkom*: primjena cijelog analitičkog postupka na poduzorak za analizu koji je uzet iz uzorka u kojemu nema analita.

- *Specifičnost*: svojstvo metode da se razlikuje analit koji se mjeri od drugih tvari. Ova značajka ovisi prije svega o opisanoj tehnici mjerenja, ali može varirati ovisno o vrsti spoja ili matriksu.

- *Sposobnost dokazivanja (CC β)*: najmanji udio tvari koji je moguće metodom dokazati, identificirati i/ili kvantificirati u uzorku, uz vjerojatnost β pogreške. U slučaju tvari za koje nije utvrđena dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$ u kontaminiranom uzorku. U slučaju tvari za koje je utvrđena dopuštena količina, sposobnost dokazivanja je koncentracija koja se može dokazati, sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$, uz ustanovljenu dopuštenu koncentraciju.

- *Standardni analit*: analit poznatog i potvrđenog sadržaja i čistoće koji se u analizi koristi kao referentni.

- *Standardno dodavanje*: postupak pri kojemu se uzorak za ispitivanje dijeli na dva (ili više) ispitnih poduzoraka za analizu. Jedan poduzorak se analizira kao takav, a drugome se prije analize dodaje poznata količina standardnog analita. Količina standardnog baždarnog analita koja se dodaje mora biti od dva do pet puta veća od procijenjene količine analita u uzorku. Cilj postupka je odrediti udio analita u uzorku, uzimajući u obzir iskorištenje (*engl. recovery*) analitičkog postupka.

- *Točnost*: stupanj podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Utvrđuje se utvrđivanjem istinitosti i preciznosti.

- *Tvar*: tvar posebnog ili određenog kemijskog sastava i njeni metaboliti.

- *Učinkovitost*: funkcionalna kvaliteta koja se može pripisati analitičkoj metodi. To mogu biti: specifičnost, točnost, istinitost, preciznost, ponovljivost, obnovljivost, iskorištenje (*engl. recovery*), sposobnost dokazivanja i robusnost.

- *Unutarnji standard (IS)*: podrazumijeva tvar koja nije sadržana u uzorku, čija su fizikalno-kemijska svojstva što je moguće sličnija svojstvima analita koji se treba identificirati i koji se dodaje svakom uzorku i svakom baždarnom standardu.

- *Uvjeti obnovljivosti*: uvjeti pod kojima različiti analitičari, u različitim laboratorijima koristeći različitu opremu, dobiju rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na

istovjetnim ispitivanim uzorcima.

– *Uvjeti ponovljivosti*: uvjeti pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istom laboratoriju, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima.

– *Uzorak za ispitivanje*: uzorak pripremljen iz laboratorijskog uzorka od kojega će se uzimati poduzorci za analizu.

– *Vrednovanje metode (validacija)*: potvrđivanje metode ispitivanjem i pribavljanjem stvarnih dokaza, da su ispunjeni posebni zahtjevi u pogledu specifične primjene.

Analitičke metode

Članak 3.

Službeni uzorci uzimaju se sukladno važećem propisu o kontroli rezidua i analiziraju se metodama koje:

- (a) su navedene u uputama, po mogućnosti u skladu s normom HRN ISO 78-2;
- (b) su u skladu s Prilogom 1. ovog Pravilnika;
- (c) su validirane sukladno postupcima opisanima u Prilogu 2. ovog Pravilnika;
- (d) su u skladu s najmanjim zahtijevanim granicama učinkovitosti izvedbe metode (MRPL).

Kontrola kvalitete

Članak 4.

Kvaliteta rezultata analize uzoraka osigurava se praćenjem ispitivanja i/ili rezultata baždarenja, u skladu s propisanim u normi HRN EN ISO/IEC 17025, poglavlju 5.9.

Tumačenje rezultata

Članak 5.

1) Rezultat analize smatra se pozitivnim ako je veći od granične koncentracije (količine) analita (CCa) po potvrdnoj metodi.

2) Ako je za neku tvar utvrđena dopuštena količina, granična koncentracija (količina) analita (CCa) je koncentracija iznad koje je moguće, sa statističkom sigurnošću od $1 - \alpha$, odlučiti da je dopuštena količina uistinu premašena.

3) Ako za neku tvar nije utvrđena dopuštena količina, granična koncentracija (količina) analita (CCa) je najniža razina koncentracije pri kojoj se metodom može razabrati, sa statističkom sigurnošću od $1 - \alpha$ da je ispitivani analit prisutan.

4) Za tvari koje su navedene u grupi A u prilogu Pravilnika o mjerama za monitoring određenih tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla pogreška može biti 1% ili niža. Za sve ostale tvari pogreška može biti 5% ili niža.

Članak 6.

Prilozi broj: 1. Kriteriji učinkovitosti, te drugi zahtjevi i postupci za analitičke metode

2. Vrednovanje metode (validacija)

3. Najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode

4. Kratice

tiskani su u prilogu ovog Pravilnika i čine njegov sastavni dio.

Članak 7.

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmoga dana od dana objave u »Narodnim novinama«.

Klasa: 322-1/04-1/663

Urbroj: 525-06-04-01

Zagreb, 27. prosinca 2004.

Ministar
Petar Čobanković, v. r.
PRILOG I.

KRITERIJI UČINKOVITOSTI, TE DRUGI ZAHTJEVI I POSTUPCI ZA ANALITIČKE
METODE

1. KRITERIJI UČINKOVITOSTI I DRUGI ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE METODE

Analitičke metode ili kombinacije metoda koje su drugačije od dolje opisanih mogu se koristiti kao orijentacijske ili potvrдне metode ako se može dokazati da ispunjavaju zahtjeve utvrđene ovim Pravilnikom.

1.1. OPĆI ZAHTJEVI

1.1.1. Postupci s uzorcima

Uzorci se uzimaju u skladu s važećim pravilnikom o kontroli rezidua. Uzorci se dobivaju, obrađuju i s njima se postupa na način koji pruža najveću mogućnost dokazivanja tvari. Postupci s uzorcima moraju spriječiti mogućnost slučajne kontaminacije ili gubitka analita.

1.1.2. Izvođenje ispitivanja

1.1.2.1. Iskorištenje

Tijekom analize uzoraka iskorištenje se određuje za svaku seriju uzoraka. Ako je iskorištenje unutar granica, tada se može koristiti stalni faktor korekcije. U protivnom, koristi se faktor iskorištenja koji je dobiven za određenu seriju uzoraka, osim ako se ne primjenjuje specifični faktor iskorištenja analita u uzorku, pri čemu se za kvantitativno određivanje analita u uzorku primjenjuje postupak standardnog dodavanja (vidi 2.5) ili unutarnji standard.

1.1.2.2. Specifičnost

Metodom se mora u eksperimentalnim uvjetima razlikovati analit od drugih tvari. Mora se navesti procjena te mogućnosti. Pri primjeni metode moraju se izbjegavati sve predvidljive interferencije. Od najveće je važnosti ispitati interferencije koje bi mogle uzrokovati svi sastojci matriksa.

1.2. ORIJENTACIJSKE METODE (engl. SCREENING METHODS)

U skladu s važećim pravilnikom o kontroli rezidua, kao orijentacijske metode koriste se samo oni analitički postupci za koje se može pokazati na dokumentirani sljedivi način da su vrednovani i da im je na razini koncentracije od interesa, postotak lažno negativnih rezultata manji od 5% (β pogreška). U slučaju sumnje na pozitivni rezultat, takav se rezultat mora dokazati potvrdnom metodom.

1.3. POTVRDNE METODE ZA ORGANSKE REZIDUE
I KONTAMINANTE

Potvrдне metode za organske rezidue i kontaminante daju informacije o kemijskoj strukturi analita. Dakle, metode koje se temelje isključivo na kromatografskoj analizi, bez primjene spektrometrijskog dokazivanja, nisu same po sebi prikladne za primjenu kao potvrдне metode. Međutim, ako jednoj tehnici nedostaje specifičnost, željena se specifičnost postiže analitičkim postupcima koji se sastoje od odgovarajućih kombinacija postupaka pročišćavanja, kromatografskog razdvajanja ili razdvajanja i spektrometrije.

Sljedeće metode, odnosno kombinacije metoda, smatraju se prikladnima za identifikaciju organskih rezidua ili kontaminanata za navedene skupine tvari:

Tablica 1. PRIKLADNE POTVRDNE METODE ZA ORGANSKE REZIDUE I KONTAMINANTE

Mjerni postupak	Tvari: Dodatak I Pravilnika o mjerama za monitoring tvari i njihovih rezidua u živim životinjama i proizvodima životinjskog podrijetla	Zahtjevi
LC ili GC uz dokazivanje spektrometrijom masa	skupine A i B	Jedino ako slijede nakon vezanog (on line) ili odvojenog (off line) kromatografskog razdvajanja Jedino ako se primjenjuju postupci snimanja cjelokupnog spektra (engl. full scan) ili se koriste barem 3 (grupa B) ili 4 (grupa A) identifikacijske točke za postupak koje ne bilježe cijeli maseni spektar
LC ili GC uz dokazivanje IR spektrometrijskom detekcijom	skupine A i B	Moraju biti zadovoljeni posebni zahtjevi za apsorpciju (spektrometriju) u IR spektrometriji
LC-full-scan DAD	skupina B	Moraju biti zadovoljeni posebni zahtjevi za UV apsorpcijsku spektrometriju
LC- fluorescencija	skupina B	Jedino za molekule koje pokazuju prirodnu fluorescenciju i molekule koje pokazuju fluorescenciju nakon pretvorbe ili derivatizacije
2-D TLC – full scan UV/VIS	skupina B	Dvodimenzionalna HPTLC i ko-kromatografija su obvezni
GC-elektron- apsorpcijska detekcija	skupina B	Jedino ako se primjenjuju dvije kolone različitog polariteta
LC-imunogram	skupina B	Jedino ako se primjenjuju najmanje dva različita kromatografska sustava ili druga, nezavisna metoda dokazivanja
LC-UV/VIS pojedinačna valna duljina	skupina B	Jedino ako se primjenjuju najmanje dva različita kromatografska sustava ili druga, nezavisna metoda dokazivanja

1.3.1. Zajednički kriteriji izvedbe i zahtjevi

Potvrдне metode moraju osigurati podatke o kemijskoj strukturi analita. Ako više spojeva daje isti rezultat, metoda ne može razlikovati te spojeve. Metode koje se temelje jedino na kromatografskoj analizi, bez primjene spektrometrijskog dokazivanja, nisu same po sebi prikladne za primjenu kao potvrдне metode.

Ako se u metodi primjenjuje odgovarajući unutarnji standard, on se dodaje poduzorku za analizu na početku postupka ekstrakcije. Ovisno o raspoloživosti, upotrebljavaju se bilo

stabilni oblici analita obilježeni izotopom, koji su posebice prikladni za dokazivanje spektrometrijom masa, bilo spojevi koji su po svojoj strukturi slični analitu.

Ako se ne može upotrijebiti odgovarajući unutarnji standard, identifikacija analita potvrđuje se ko-kromatografijom. U tom slučaju, dobiva se samo jedan pik, pri čemu visina ili površina pika odgovara količini dodanog analita. Za plinsku kromatografiju (GC) ili tekućinsku kromatografiju (LC), širina pika na polovici visine mora biti između 90 – 110% raspona izvorne širine pika, a vremena zadržavanja moraju biti jednaka uz toleranciju od 5%.

Za metode tankoslojne kromatografije (TLC) povećava se samo mrlja za koju se pretpostavlja da je analit. Ne smije se pojaviti nova mrlja i izgled se ne smije promijeniti.

Referentni ili obogaćeni materijal koji sadrži poznate količine analita na ili u blizini dopuštene granice ili granične koncentracije (pozitivni kontrolni uzorak) kao i negativni kontrolni materijali i slijepe probe s reagensom, trebali bi biti podvrgnuti cijelom postupku istodobno sa svakom serijom analiziranih uzoraka za ispitivanje. Redoslijed ubacivanja ekstrakta u analitički instrument je sljedeći: slijepa proba s reagensom, negativni kontrolni uzorak, uzorak ili uzorci koji se potvrđuju, negativni kontrolni uzorak i na kraju pozitivni kontrolni uzorak. Svaka izmjena ovog redoslijeda mora se opravdati.

1.3.2. Dodatni kriteriji izvedbe i drugi zahtjevi za kvantitativne metode analize

1.3.2.1. Istinitost kvantitativnih metoda

U slučaju višekratnih analiza potvrdnog referentnog materijala, odstupanje prosječnog masenog udjela, koji je eksperimentalno određen i ispravljen iskorištenjem, od potvrđene vrijednosti mora biti unutar sljedećih granica:

Tablica 2. NAJMANJA (IZRAZENO KAO Odstupanje) ISTINITOST KVANTITATIVNE METODE

Udio mase	Granice
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	- 50% do + 20%
$> 1 \mu\text{g/kg}$ do $10 \mu\text{g/kg}$	- 30% do +10%
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	- 20% do + 10%

Ako potvrđeni referentni materijali (CRM) nisu dostupni, istinitost mjerenja se može ocijeniti analizom slijepih uzoraka u koje je dodana poznata količina analita. Podaci korigirani prosječnim iskorištenjem prihvatljivi su jedino ako su u granicama koje su navedene u Tablici 2.

1.3.2.2. Preciznost kvantitativne metode

Međulaboratorijski koeficijent varijacije (CV) za opetovane analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uvjetima obnovljivosti, ne smije biti veći od razine izračunate Horwitzovom jednadžbom. Jednadžba glasi:

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

gdje je C maseni udio izražena kao potencija (eksponent) s bazom 10 (npr. $1 \text{ mg/g} = 10^{-3}$). Primjeri su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. PRIMJERI KOEFICIJENATA VARIJACIJE (CV) OBNOVLJIVOSTI ZA KVANTITATIVNE METODE KOD ODREĐENIH MASENIH UDJELA ANALITA

Udio Mase	CV obnovljivosti (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg	16
(*) Za masene udjele niže od 100 µg/kg Horwitzova jednadžba daje neprihvatljivo visoke vrijednosti. Stoga CV za koncentracije niže od 100 µg/kg moraju biti što je moguće manji.	

Za analize izvedene pod uvjetima ponovljivosti, unutarlaboratorijski CV (koeficijent varijacije) obično bi trebao iznositi između jedne polovine i dvije trećine gornjih vrijednosti navedenih u tablici 3. Za analize izvedene pod unutarlaboratorijskim uvjetima obnovljivosti unutarlaboratorijski CV ne smije biti veći od CV obnovljivosti.

Kod tvari za koje je utvrđena dopuštena količina, metoda mora postići unutarlaboratorijsku obnovljivost koja nije veća od odgovarajućeg CV obnovljivosti kod 50 % koncentracije x dopuštena količina.

1.3.3. Kriteriji učinkovitosti i drugi zahtjevi za dokazivanje spektrometrijom masa

Metode spektrometrije masa mogu se uzeti u obzir kao potvrdne metode jedino ako slijede nakon što je provedeno vezano (on-line) ili odvojeno (off-line) kromatografsko razdvajanje.

1.3.3.1. Kromatografsko razdvajanje

Za GC-MS postupke, separacija plinskom kromatografijom izvodi se primjenom kapilarnih kolona. Za LC-MS postupke, kromatografsko razdvajanje izvodi se primjenom odgovarajućih LC kolona. U svakom slučaju, najmanje prihvatljivo vrijeme zadržavanja analita koji se ispituje mora biti jednako dvostrukom vremenu zadržavanja koje vrijedi za prazni volumen kolone. Vrijeme zadržavanja (relativno vrijeme zadržavanja) analita u poduzorku za analizu mora odgovarati vremenu zadržavanja baždarnog standarda unutar određenog intervala vremena zadržavanja. Interval vremena zadržavanja mora biti razmjerni sposobnosti razlučivanja kromatografskog sustava. Omjer između kromatografskog vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutarnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora odgovarati vremenu zadržavanja baždarne otopine uz toleranciju od $\pm 0,5$ % za GC i $\pm 2,5$ % za LC.

1.3.3.2. Dokazivanje spektrometrijom masa

Dokazivanje spektrometrijom masa mora se provoditi uporabom MS tehnika, kao što je snimanje cjelokupnih spektara masa (full scan) ili praćenje odabranih iona (SIM), kao i uporabom MS-MSⁿ tehnika, kao što je praćenje odabranih reakcija (SRM) ili drugih prikladnih MS ili MS-MSⁿ tehnika u kombinaciji s odgovarajućim načinima ionizacije. Kod spektrometrije masa s visokim razlučivanjem (HRMS), razlučivost mora općenito biti veća od 10000 za cijelo područje snimanja masa na 10% razdvojenosti doline pika.

Snimanje cjelokupnih spektara (full scan): kad se određivanje spektrometrijom masa provodi snimanjem cjelokupnih spektara, moraju obavezno biti prisutni svi izmjereni dijagnostički ioni s relativnim intenzitetom većim od 10% u referentnom spektru baždarnog standarda (molekularni ion, karakteristične izvedenice molekularnog iona, karakteristični fragmenti i izotopni ioni).

Praćenje odabranih iona (SIM): kad se određivanje spektrometrijom masa provodi fragmentografijom, molekularni ion bi trebao biti jedan od odabranih dijagnostičkih iona (molekularni ion, karakteristične izvedenice molekularnog iona, karakteristični fragmenti i svi njihovi izotopni ioni). Odabrani dijagnostički ioni ne bi smjeli potjecati isključivo od istog dijela molekule. Omjer signal-šum za svaki dijagnostički ion treba biti (jednak ili veći) $\geq 3:1$.

Snimanje cjelokupnih spektara (full scan) i praćenje odabranih iona (SIM): relativna zastupljenost dokazanih iona, izražena kao postotak prema najzastupljenijem ionu ili najzastupljenijem prijelaznom ionu, mora odgovarati zastupljenosti baždarnog standarda, bilo iz otopina baždarnog standarda ili obogaćenih uzoraka, na usporedivim koncentracijama, mjerenim pod istim uvjetima i uz sljedeće tolerancije:

Tablica 4. NAJVIŠE DOPUŠTENE TOLERANCIJE ZA RELATIVNU ZASTUPLJENOST IONA KOD RAZNIH TEHNIKA SPEKTROMETRIJE MASA

Relativna zastupljenost (% baznog pika)	EI-GC-MS (relativni)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativni)
> 50 %	$\pm 10 \%$	$\pm 20 \%$
> 20 % do 50 %	$\pm 15 \%$	$\pm 25 \%$
> 10 % do 20 %	$\pm 20 \%$	$\pm 30 \%$
$\leq 10 \%$	$\pm 50 \%$	$\pm 50 \%$

Tumačenje podataka dobivenih spektrometrijom masa: relativna zastupljenost dijagnostičkih iona i/ili ionskih parova prekursor/produkt moraju se identificirati uspoređivanjem spektara ili integriranjem signala pojedinačnih tragova masa. Kad god se primjenjuje korekcija osnovnog šuma (engl. background), ona se mora primijeniti podjednako na cijelu seriju (vidi 1.3.1., stavak 4.) i mora biti jasno naznačena.

Snimanje cjelokupnih spektara (full scan): ako se snimanje cjelokupnih spektara bilježi u jednostrukoj spektrometriji masa, najmanje četiri iona moraju biti prisutni s relativnom zastupljenošću jednakom ili većom od 10 % u odnosu na bazni pik. Molekularni ion se uključuje ako je prisutan u referentnom spektru s intenzitetom većim ili jednakim od 10%. Najmanje četiri iona moraju biti unutar najviših dopuštenih tolerancija za relativnu zastupljenost iona (Tablica 5.) Pretraživanje baza podataka uz pomoć računala može se primijeniti.

U tom slučaju, rezultat usporedbe podataka o spektru masa u ispitnom uzorku s onima iz baždarne otopine mora biti veći od kritičnog faktora podudarnosti. Taj faktor se određuje tijekom postupka vrednovanja za svaki analit na temelju spektara za koje su ispunjeni dolje opisani uvjeti.

Moraju se provjeriti eventualne promjene spektara uzrokovane matriksom i/ili

osobitostima detektora.

Praćenje odabranih iona (SIM): ako se fragmenti mase mjere drugim tehnikama osim snimanja cjelokupnih spektara, za tumačenje podataka primjenjuje se sustav identifikacijskih točaka. Za potvrdu tvari koje su navedene u grupi A spojeva potrebne su najmanje 4 identifikacijske točke. Za potvrdu tvari koje su navedene u grupi B spojeva potrebne su najmanje 3 identifikacijske točke. Tablica 5 pokazuje broj identifikacijskih točaka koje pripadaju svakoj pojedinoj temeljnoj tehnici spektrometrije masa. Da bi identifikacijska točka potrebna za potvrdu bila kvalificirana i ukupni broj identifikacijskih točaka mora se izračunati:

- (a) omjer najmanje jednog iona,
- (b) svi odgovarajući izmjereni omjeri iona moraju zadovoljavati navedene zahtjeve,
- (c) mogu se kombinirati najviše tri odvojene tehnike kako bi se postigao najmanji broj identifikacijskih točaka.

Tablica 5. ODNOS IZMEĐU RAZLIČITIH VRSTA FRAGMENTATA MASA I POSTIGNUTIH IDENTIFIKACIJSKIH TOČAKA

Tehnika spektrometrije masa	Identifikacijske točke postignute po ionu
Spektrometrija masa niskog razlučivanja	1,0
MR-MS ⁿ prethodni ion (prekursor)	1,0
LR- MS ⁿ prijelazni produkti	1,5
HRMS	2,0
HR- MS ⁿ prethodni ion (prekursor)	2,0
HR- MS ⁿ prijelazni produkti	2,5

Napomene:

- (1) Svaki ion može se brojiti samo jednom.
- (2) GC-MS uz ionizaciju snopom elektrona smatra se različitom od tehnike GC-MS s kemijskom ionizacijom.
- (3) Da bi se povećao broj identifikacijskih točaka, mogu se koristiti različiti analiti jedino ako derivati koriste različite kemijske reakcije.
- (4) Za tvari iz grupe A ako se tijekom analitičkog postupka primjenjuje jedna od ovih tehnika:
 - HPLC u kombinaciji sa spektrometrijom uz dokazivanje nizom dioda (engl. diode array detection) uz snimanje cjelokupnog spektra;
 - HPLC u kombinaciji s fluorescencijskim dokazivanjem;
 - HPLC u kombinaciji s imunogramom; dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija (TLC) u kombinaciji sa spektrometrijskom detekcijom.Ove tehnike mogu pridonijeti najviše s jednom identifikacijskom točkom, uz uvjet da su ispunjeni svi zahtjevi koji se primjenjuju za te tehnike.
- (5) Produkti nastali tijekom prijelaza uključuju potomke prve generacije i potomke druge generacije.

Tablica 6. PRIMJERI BROJA IDENTIFIKACIJSKIH TOČAKA KOJE SE DOBIVAJU ZA RAZLIČITE TEHNIKE I NJIHOVE KOMBINACIJE (N=CIJELI BROJ)

Tehnika/tehnike	Broj iona	Identifikacijske točke
GC-MS (EI ili CI)	N	n
GC-MS (EI i CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI ili CI) 2 derivata	2 (derivat A) + 2 (derivat B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prethodni ion i 2 potomka prve generacije	4
LC-MS-MS	1 prethodni ion i 2 potomka prve generacije	4
GC-MS-MS	2 prethodna iona, svaki s jednim potomkom prve generacije	5
LC-MS-MS	2 prethodna iona, svaki s jednim potomkom prve generacije	5
LC-MS-MS-MS	1 prethodni ion, 1 potomak prve generacije i 2 potomka druge generacije	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS i LC-MS	2 + 2	4
GC-MS i HRMS	2 + 1	4

1.3.4. Izvedbeni kriteriji i drugi zahtjevi za kromatografiju u kombinaciji s dokazivanjem u infracrvenom području

Odgovarajući pikovi: odgovarajući pikovi su maksimumi apsorpcije u infracrvenom spektru baždarnog standarda ako ispunjavaju sljedeće zahtjeve:

1.3.4.1. Infracrveno dokazivanje

Apsorpcijski maksimum: mora biti u rasponu valnog broja 4000-500 cm^{-1} .

Intenzitet apsorpcije ne smije biti manji od:

- (a) specifične molarne apsorpcije od 40 u odnosu na baznu liniju pika, ili od
- (b) relativne apsorpcije od 12,5 % od apsorpcije najintenzivnijeg pika u području 4000-500 cm^{-1}

ako su oba mjerena u odnosu na nultu apsorpciju, i 5 % od apsorpcije najintenzivnijeg vrha u području 4000-500 cm^{-1} ako su oba mjerena u odnosu na baznu liniju pika.

Napomena: Iako bi se s teoretske točke gledišta mogla dati prednost odgovarajućim pikovima određenim prema točki (a), u praksi je lakše odrediti pikove prema točki (b).

Određuje se broj pikova u infracrvenom spektru analita čije frekvencije odgovaraju odgovarajućem piku u spektru baždarnog standarda, uz toleranciju od $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

1.3.4.2. Tumačenje podataka o infracrvenom spektru

Apsorpcija mora biti prisutna u svim područjima spektra analita koja se slažu s odgovarajućim pikom u referentnom spektru baždarnog standarda. Potrebno je najmanje šest

odgovarajućih pikova u infracrvenom spektru baždarnog standarda. Ako ima manje od šest odgovarajućih pikova, razmatrani spektar se ne može koristiti kao referentni spektar. Rezultat ispitivanja sličnosti odnosno postotak odgovarajućih pikova pronađenih u infracrvenom spektru analita, mora biti najmanje 50. Ako za odgovarajući pik ne postoji točno poklapanje, odgovarajuće područje spektra analita mora odgovarati prisutnosti pika za usporedbu. Postupak se može primijeniti jedino na pikove apsorpcije u spektru uzorka čiji je intenzitet najmanje trostruk u odnosu na šum između jednog i drugog vrha.

1.3.5. Izvedbeni kriteriji i drugi zahtjevi za određivanje analita uporabom LC uz druge tehnike dokazivanja

1.3.5.1. Kromatografsko razdvajanje

Uvijek treba koristiti unutarnji standard ako je u tu svrhu dostupna primjerena tvar. Prednost u primjeni imaju srodni spojevi s vremenom zadržavanja blizu analita. Vrijeme zadržavanja analita mora biti u dopuštenim granicama prema odgovarajućem baždarnom standardu uz iste uvjete ispitivanja. Najmanje prihvatljivo vrijeme zadržavanja za analit mora biti dvostruko veće od vremena zadržavanja koje odgovara praznom volumenu kolone. Omjer između vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutarnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora biti jednako vremenu zadržavanja baždarnog standarda u odgovarajućem matriksu, uz toleranciju od $\pm 2,5$ %.

1.3.5.2. UV/VIS dokazivanje uz snimanje spektra u cijelom području

Izvedbeni zahtjevi za metode tekućinske kromatografije moraju u potpunosti biti ispunjeni.

Apsorpcijski maksimumi u spektru analita moraju biti na istim valnim duljinama kao i oni baždarnog standarda uz toleranciju koja ovisi o razlučivosti sustava dokazivanja. Za dokazivanje pomoću niza dioda, tolerancija je obično unutar ± 2 nm. Za one dijelove dvaju spektara čija je relativna apsorbanacija jednaka ili veća od 10 %, spektar analita iznad 220 nm ne smije se vidljivo razlikovati od spektra baždarnog standarda. Ovaj je zahtjev zadovoljen kada su, prvo, prisutni isti maksimumi i, drugo, kada razlika između dva spektra ni u jednoj od promatranih točaka nije veća od 10 % od apsorbanacije baždarnog standarda. U slučaju računalnog pretraživanja i uspoređivanja spektara ispitnih uzoraka s onima iz baždarne otopine, rezultat usporedbe mora biti veći od kritičnog faktora podudarnosti. Taj faktor se određuje tijekom postupka vrednovanja za svaki analit, na temelju spektara za koje su ispunjeni gore opisani uvjeti. Moraju se provjeriti eventualne promjene spektara uzrokovane matriksom i/ili osobitostima detektora.

1.3.5.3. Izvedbeni zahtjevi za fluorometrijsko dokazivanje

Izvedbeni zahtjevi za metode tekućinske kromatografije u potpunosti moraju biti ispunjeni.

Ovo se odnosi na molekule koje pokazuju prirodnu fluorescenciju i molekule koje pokazuju fluorescenciju nakon pretvorbe ili derivatizacije. Valne duljine podražaja i emisije, u kombinaciji s kromatografskim uvjetima, moraju se odabrati tako da se pojava interferencijskih komponenata u ekstraktima slijepog uzorka svede na najmanju moguću mjeru.

Najbliži maksimum pika u kromatogramu mora biti odvojen od utvrđenog pika analita za najmanje jednu punu širinu pika izmjerenu na 10 % od maksimalne visine pika analita.

1.3.5.4. Izvedbeni zahtjevi za određivanje analita pomoću LC imunograma

LC imunogram se ne može sam za sebe koristiti kao potvrdna metoda.

Odgovarajući kriteriji za metode tekućinske kromatografije moraju u potpunosti biti ispunjeni.

Unaprijed utvrđeni parametri kontrole kvalitete, npr. nespecifično vezivanje, relativno vezivanje kontrolnih uzoraka, vrijednost apsorpcije slijepog uzorka, moraju biti unutar granica dobivenih tijekom vrednovanja probe.

Imunogram se mora sastojati od najmanje pet frakcija.

Svaka frakcija mora biti manja od polovice širine pika.

Frakcija s najvećim udjelom analita mora biti ista za uzorak koji se ispituje, za pozitivni kontrolni uzorak i standard.

1.3.5.5. Određivanje analita tekućinskom kromatografijom (LC) uz UV/VIS dokazivanje (jedna valna duljina)

Tekućinska kromatografija (LC) uz dokazivanje u UV/VIS području (jedna valna duljina) ne može se sama za sebe koristiti kao potvrdna metoda.

Najbliži maksimum pika u kromatogramu mora biti odvojen od utvrđenog pika analita za najmanje jednu punu širinu pika izmjerenu na 10 % od maksimalne visine pika analita.

1.3.6. Izvedbeni kriteriji i drugi zahtjevi za određivanje analita uporabom 2-D TLC uz spektrometrijsko UV/VIS dokazivanje sa snimanjem cijelog spektra

Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (HPTLC) i ko-kromatografija su obavezni.

R_f vrijednosti analita moraju se podudarati s R_f vrijednostima standarda uz toleranciju od $\pm 5\%$.

Izgled analita ne smije se razlikovati od izgleda standarda.

Kod mrlja iste boje, središte najbliže mrlje mora biti odvojeno od središta mrlje analita za najmanje polovicu zbroja promjera mrlja.

Spektar analita ne smije se vizualno razlikovati od spektra standarda, kao što je opisano za UV/VIS detekciju uz snimanje cijelog spektra.

U slučaju računalnog pretraživanja baza podataka i uspoređivanja, usporedba podataka o spektru u uzorku za ispitivanje s onima baždarne otopine mora biti veća od kritičnog faktora podudarnosti. Taj faktor se određuje tijekom postupka validacije za svaki analit na temelju spektara za koje su ispunjeni gore opisani uvjeti. Mora se provjeriti varijabilnost spektara uzrokovana matricom i funkcioniranje detektora.

1.3.7. Izvedbeni kriteriji i zahtjevi za određivanje analita plinskom kromatografijom uz elektronapsorpcijsko dokazivanje (ECD)

Uvijek treba koristiti unutarnji standard kada je u tu svrhu dostupna primjerena tvar.

To bi prvenstveno trebao biti srodni spoj čije je vrijeme zadržavanja blizu vremena zadržavanja analita. Vrijeme zadržavanja analita mora biti u dopuštenim granicama prema odgovarajućem baždarnom standardu uz iste uvjete ispitivanja. Minimalno prihvatljivo vrijeme zadržavanja za analit mora biti jednako dvostrukom vremenu zadržavanja koje odgovara praznom volumenu kolone. Omjer između vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutarnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora biti jednako vremenu zadržavanja baždarnog standarda u odgovarajućem matriksu, uz toleranciju od $\pm 0,5\%$. Najbliži maksimum pika u kromatogramu mora biti odvojen od utvrđenog pika analita za najmanje jednu punu širinu pika izmjerenu na 10 % od maksimalne visine pika analita. Za dobivanje dodatnih podataka može se primijeniti ko-kromatografija.

1.4. POTVRDNE METODE ZA KEMIJSKE ELEMENTE

Potvrdne metode analize kemijskih elemenata moraju se temeljiti na principu nedvosmislene identifikacije i točne i precizne kvantifikacije, uz pomoć fizikalno-kemijskih svojstava koji su jedinstveni za dotični element na razini koncentracije od interesa (npr. karakteristična valna duljina emitiranog ili apsorbiranog zračenja, atomska masa).

Sljedeće metode ili kombinacije metoda smatraju se prikladnim za identifikaciju kemijskih elemenata.

Tablica 7. PRIKLADNE POTVRDNE METODE ZA KEMIJSKE ELEMENTE

Tehnika	Mjereni pokazatelj
Diferencijalna pulsna voltametrija	Električni signal
Atomska apsorpcijska spektrometrija	
Plamena	Duljina vala apsorpcije
Tehnika tvorbe hidrida	Duljina vala apsorpcije
Tehnika hladnih para	Duljina vala apsorpcije
Elektrotoplinska atomizacija (grafitna peć)	Duljina vala apsorpcije
Atomska emisijska spektrometrija Induktivno spregnuta plazma	Duljina vala emisije
Spektrometrija masa Induktivno spregnuta plazma	Omjer mase i naboja

1.4.1. Zajednički kriteriji izvedbe i drugi zahtjevi za potvrdne metode

Referentni uzorak ili obogaćeni uzorak koji sadrži poznatu količinu analita na ili u blizini dopuštene granice ili granične koncentracije (pozitivni kontrolni uzorak) kao i negativni kontrolni materijali i slijepe probe s reagensom trebali bi biti podvrgnuti cijelom postupku istodobno sa svakom serijom ispitivanih uzoraka. Preporučeni redoslijed ubacivanja ekstrakta u analitički instrument je sljedeći: slijepa proba s reagensom, negativni kontrolni uzorak, uzorak koji se ispituje, negativni kontrolni uzorak i na kraju pozitivni kontrolni uzorak. Svaka izmjena ovog redoslijeda mora se opravdati.

Općenito, kod većine analitičkih postupaka nužna je potpuna razgradnja (digestija) organskog matriksa kako bi se dobila otopina prije određivanja analita. To se može postići primjenom postupaka mikrovalne mineralizacije, koji rizik od gubitka i/ili kontaminacije ispitivanog analita svode na najmanju mjeru. Mora se upotrijebiti dekontaminirano teflonsko posuđe dobre kvalitete. Za primjenu drugih postupaka vlažne ili suhe digestije, moraju postojati dokumentirani dokazi koji isključuju moguću pojavu gubitka ili kontaminacije. Kao alternativa za digestiju, u određenim okolnostima se mogu primijeniti postupci razdvajanja (npr. ekstrakcija) u cilju odvajanja analita od sastojaka matriksa i/ili u cilju koncentriranja analita prije uvođenja u analitički uređaj.

Što se tiče baždarenja, bilo pomoću potvrđenog standardnog materijala ili postupkom standardnog dodavanja, mora se paziti da se ne prekorači radno područje utvrđeno za analizu. Baždarni standardi se moraju obavezno pripremiti u otopini koja se, što je moguće više, podudara sa sastavom otopine uzorka. Ako to zahtijevaju specifične analitičke okolnosti, primjenjuje se i korekcija nespecifičnog signala (engl. background korekcija).

1.4.2. Dodatni kriteriji učinkovitosti i drugi zahtjevi za kvantitativne analitičke metode

1.4.2.1. Istinitost kvantitativnih metoda

Kod višekratnog analiziranja ovjerenog referentnog materijala za kemijske elemente, odstupanje eksperimentalno utvrđene srednje vrijednosti udjela analita od ovjerene vrijednosti, ne smije biti izvan granice od $\pm 10\%$. Ako ne postoje takvi ovjereni referentni materijali, prihvatljivo je da se istinitost mjerenja ocijeni određivanjem poznate količine elementa dodane u nepoznati uzorak koji se ispituje, uz izračun iskorištenja. Skreće se

pozornost na činjenicu da, za razliku od analita, dodana količina elementa nije kemijski vezana u ispitivanom matriksu te da stoga tako dobiveni rezultati imaju manju valjanost od rezultata dobivenih uporabom ovjerenog referentnog materijala. Podaci o iskorištenju prihvatljivi su jedino ako je njihova vrijednost unutar $\pm 10\%$ ciljne vrijednosti.

1.4.2.2. Preciznost kvantitativnih metoda

Međulaboratorijski koeficijent varijacije (CV) za opetovane analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uvjetima obnovljivosti, ne smije biti veći od sljedećih vrijednosti:

Tablica 8. CV ZA KVANTITATIVNE METODE KOD ODREĐENIH RASPONA UDJELA MASE ELEMENTA

Udio mase	CV (%)
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$ do $100 \mu\text{g/kg}$	20
$> 100 \mu\text{g/kg}$ do $1000 \mu\text{g/kg}$	15
$\geq 1000 \mu\text{g/kg}$	10

1.4.3. Specifični zahtjevi za diferencijalnu pulsnu voltametriju (DPASV)

Od najveće je važnosti da organska tvar u uzorcima bude potpuno raščinjena prije DPASV određivanja. Na voltamogramu se ne smije vidjeti niti jedan široki signal nastao zbog prisutnosti organske tvari. Anorganski sastojci matriksa mogu utjecati na visinu pikova pri DPASV postupku. Stoga se kvantifikacija mora obaviti metodom standardnog dodavanja. Primjerci tipičnih voltamograma otopine uzorka moraju biti dostavljeni uz metodu.

1.4.4. Specifični zahtjevi za atomsku apsorpcijsku spektrometriju (AAS)

Ova se tehnika u osnovi koristi za određivanje jednog elementa i stoga zahtijeva da eksperimentalni parametri budu optimalno podešeni za određeni element koji se kvantificira. Kad je god to moguće, rezultati se moraju provjeriti kvalitativno i kvantitativno uz pomoć alternativnih apsorpcijskih linija (idealno je da se odaberu dvije različite valne duljine). Baždarni standard se priprema u otopini matriksa čiji je sastav što je moguće sličniji sastavu otopine ispitivanog uzorka (npr. koncentracija kiselina ili sastav modifikatora). Kako bi se vrijednosti slijepe probe svele na najmanju moguću mjeru, svi reagensi moraju biti najvećeg mogućeg stupnja čistoće. Ovisno o načinu uparavanja i/ili atomizacije uzorka, mogu se razlikovati različiti tipovi atomske apsorpcijske spektrometrije.

1.4.4.1. Specifični zahtjevi za plamenu atomsku apsorpcijsku spektrometriju

Uređaj mora biti optimalno podešen za svaki element. Posebice se mora provjeriti sastav plina i brzina protoka. Kako bi se izbjegle interferencije uzrokovane nespecifičnom apsorpcijom, mora se kao korektor koristiti izvor energije s kontinuiranim spektrom. U slučaju nepoznatih matriksa, mora se provjeriti da li je potrebna korekcija nespecifične apsorpcije (background korekcija).

1.4.4.2. Specifični zahtjevi za atomsku apsorpcijsku spektrometriju s grafitnom peći

Kontaminacija u laboratoriju često utječe na točnost pri radu sa grafitnom peći na razinama ultra tragova. Stoga se pri radu s uzorkom i standardom moraju upotrebljavati reagensi visoke čistoće, deionizirana voda i posuđe od inertne plastike. Instrument se mora optimalno podesiti za svaki element. Moraju se posebice provjeriti uvjeti prethodne obrade uzorka, atomizacije (temperatura, vrijeme) i modifikacija matriksa.

Rad pod izotermnim uvjetima atomizacije (npr. poprečna zagrijana grafitna cijev s

ugrađenom Lžvovom platformom) smanjuje utjecaj matriksa pri atomizaciji analita. Kombinacija modifikacije matriksa i Zeemanove korekcije nespecifične apsorpcije, dopušta kvantifikaciju pomoću baždarnе krivulje koja se temelji na mjerenju vodene otopine standarda.

1.4.5. Specifični zahtjevi za atomsku apsorpcijsku spektrometriju uz tvorbu hidrida

Organski spojevi koji sadrže elemente kao što su arsen, bizmut, germanij, olovo, antimon, selen, kositar i telurij mogu biti vrlo stabilni i mogu zahtijevati oksidacijsku razgradnju, kako bi se dobile točne vrijednosti ukupnog sadržaja elementa. Stoga se preporučuje mikrovalno razaranje ili visokotlačno spaljivanje uz oštre oksidacijske uvjete. Najveća se pažnja mora posvetiti potpunom i reproducibilnom prijetvoru elemenata u njihove hidride.

Tvorba arsenova hidrida u otopini solne kiseline s NaBH_4 ovisi o oksidacijskom stupnju arsena (As III: brza tvorba, As V: dugotrajniji prijelaz). Kako bi se izbjegao gubitak osjetljivosti u određivanju As V pomoću protočno-injekcijske tehnike, koji je posljedica kratkog vremena reakcije u tom sustavu, As V se mora reducirati na As III nakon oksidacijske razgradnje. U tu svrhu je prikladan kalijev jodid/askorbinska kiselina ili cistein. Na isti način se mora postupati sa slijepim probama, baždarnim otopinama i otopinama uzorka. Rad sa serijama uzoraka omogućuje, ne dovodeći u pitanje točnost, određivanje obje vrste arsena. Radi sporije reakcije AS V sa NaBH_4 , baždarenje se provodi integracijom površina ispod pikova. Uređaj mora biti optimalno podešen. Protok plina, kojim se hidrid prenosi u atomizator, posebno je važan i mora se kontrolirati.

1.4.6. Specifični zahtjevi za atomsku apsorpcijsku spektrometriju metodom hladnih para

Tehnika hladnih para se upotrebljava jedino u slučaju žive. Zbog gubitaka elementarne žive uzrokovanih isparavanjem i adsorpcijom, potrebna je posebna pozornost tijekom cijelog postupka. Mora se pozorno izbjegavati kontaminacija reagensom ili iz okoliša.

Organski spojevi koji sadrže živu zahtijevaju oksidacijsku razgradnju, kako bi se odredio ukupni sadržaj žive u uzorku. Za razgradnju se upotrebljavaju zatvoreni sustavi s mikrovalnim razaranjem ili visokotlačnim spaljivanjem. Oprema koja je došla u doticaj sa živom mora se posebno pomno očistiti.

Uporaba protočno-injekcijske tehnike pruža određene prednosti. Za niže vrijednosti granične koncentracije preporučuje se adsorpcija elementarne žive na adsorbens od zlata/platine i potom toplinsko otpuštanje. Doticaj adsorbensa ili radnog dijela uređaja s vlagom smeta mjerenju i mora se izbjegavati.

1.4.7. Specifični zahtjevi za atomsku emisijsku spektrometriju s induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES)

Atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom je metoda koja omogućuje istodobno mjerenje više različitih elemenata. Da bi se primijenila metoda ICP-AES, u uzorcima se najprije mora razgraditi organska tvar. U tu se svrhu primjenjuju zatvoreni sustavi mikrovalnog razaranja ili visokotlačnog spaljivanja. Da bi ICP-AES analiza bila učinkovita, od ključne su važnosti baždarenje uređaja i odabir elementa odnosno valne duljine. U slučaju linearnih baždarnih krivulja, obično je dovoljno izmjeriti samo četiri koncentracije baždarnе otopine, jer su baždarnе krivulje kod ICP-AES postupka uglavnom linearne duž četiri do šest redova veličina koncentracije. Baždarenje ICP-AES sustava uglavnom se obavlja standardom koji sadrži više elemenata, a koji se priprema u otopini sa istom koncentracijom kiseline kao i mjerna otopina. Radi linearnosti baždarnе krivulje treba provjeriti koncentracije elemenata.

Odabir valnih duljina za mjerenje emisije analita mora biti sukladan koncentracijama elemenata koji se određuju. Ako je koncentracija analita izvan djelatnog raspona jedne emisijske linije, mora se primijeniti druga emisijska linija. Najprije se bira najosjetljivija

emisijnska linija (bez smetnji), potom manje osjetljiva linija. Kod analize na granici detekcije, ili u blizini te granice, obično je najbolje odabrati najosjetljiviju liniju za dotični analit. Spektralne i pozadinske interferencije predstavljaju najveće poteškoće kod ICP-AES postupka. Moguće interferencije su npr, jednostavni pozadinski pomak, kosi pozadinski pomak, izravno spektralno preklapanje i složeni pozadinski pomak. Svaka ova smetnja ima vlastiti uzrok i lijekove. Interferencije se ispravljaju, a radni parametri optimiziraju, ovisno o matriksima. Neke se smetnje mogu izbjeći razrjeđivanjem ili prilagodbom matriksa. Sa svakom serijom ispitivanih uzoraka, na isti način kao i uzorci, mora se obraditi i referentni i obogaćeni materijal koji sadrži poznate količine jednog ili više analita. Za provjeru eventualnog pomaka, standard se mora ubacivati, primjerice, nakon 10 uzoraka. Svi reagensi i plazma plin moraju biti najveće moguće čistoće.

1.4.8. Posebni zahtjevi za spektrometriju masa s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS)

Određivanje elemenata u tragovima prosječne atomske mase, kao što su krom, bakar i nikal može biti podložno jakim smetnjama od drugih izobarnih ili/i višeatomskih iona. To se može spriječiti jedino ako je snaga razlučivanja najmanje 7000-8000. Poteškoće vezane za postupke spektrometrije masa uključuju instrumentalni pomak, utjecaj matriksa i interferencije molekulskih iona ($m/z < 80$). Da bi se ispravio instrumentalni pomak i učinci matriksa treba pripremiti više unutarnjih standarda koji pokrivaju isti maseni raspon kao i elementi koji se ispituju.

Prije mjerenja postupkom ICP-MS, nužna je potpuna razgradnja organske tvari u uzorcima. Kao i kod atomske apsorpcijske spektrometrije (AAS), hlapljivi elementi, npr. jod, moraju se nakon razaranja u zatvorenim posudama prevesti u stabilno oksidacijsko stanje. Najjače smetnje uzrokovane su kombinacijama molekulskih iona s argonom (plazma plin), vodikom, ugljikom, dušikom i kisikom (podrijetlom iz kiselina za otapanje, iz atmosfere, ili kao nečistoće plazmenog plina) s matriksom. Kako bi se izbjegle interferencije, nužno je potpuno raščinjivanje, korekcija osnovnog šuma te odgovarajući odabir analitičkih masa i ponekad manja količina analita i posljedično viša granica detekcije te odabir kiselina za otapanje, npr. dušične kiseline.

Da bi se odredili elementi, interferencije se moraju isključiti odgovarajućim odabirom specifičnih analitičkih masa, uključujući provjeru omjera izotopa. Za svako mjerenje se mora, upotrebom unutarnjih standarda, provjeriti odziv instrumenta na Fano faktore.

PRILOG II.

2. VREDNOVANJE METODE (VALIDACIJA)

Vrednovanjem se mora pokazati da analitička metoda udovoljava kriterijima koji se odnose na odgovarajuće značajke učinkovitosti.

Različiti ciljevi kontrole zahtijevaju različite kategorije metoda. Sljedeća tablica pokazuje koje se značajke izvedbe provjeravaju za svaku vrstu metode.

Tablica 9. KLASIFIKACIJA ANALITICKIH METODA PREMA ZNACAJKAMA IZVEDBE KOJE SE MORAJU ODREDITI

		Sposobnost detekcije CC β	Granična koncentracija (količina)	Istinitost/iskorištenje	Preciznost	Selektivnost/specifičnost	Primjenljivost i robustnost
--	--	------------------------------------	-----------------------------------	-------------------------	------------	---------------------------	-----------------------------

			analita CC α				stabilnost
Kvalitativne metode	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvantitativne metode	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+
S=Orijentacijska (engl.screening) metoda; C= potvrдна metoda; += određivanje je obvezno							

2.1. POSTUPCI VREDNOVANJA

U ovom poglavlju su navedeni primjeri i/ili upućivanja za postupke vrednovanja analitičkih metoda. Mogu se primijeniti i drugi postupci kako bi se pokazalo da analitička metoda udovoljava kriterijima učinkovitosti, uz uvjet da pružaju istu razinu i kvalitetu informacija.

Vrednovanje se, također, može obaviti provođenjem međulaboratorijskog ispitivanja prema Codex-u Alimentarius-u, ISO-u ili IUPAC-u, ili prema alternativnim metodama kao što su ispitivanja u jednom laboratoriju odnosno unutarnje vrednovanje. Ovaj se dio usredotočuje na studije unutar jednog laboratorija (unutarnje vrednovanje) uz modularni postupak. Ovaj se postupak sastoji od:

1. skupa zajedničkih značajki učinkovitosti koje su neovisne o primijenjenom modelu vrednovanja i
2. specifičnijih postupaka ovisnih o modelu, kao što je opisano u tablici 10.

Tablica 10. IZVEDBENI PARAMETRI NEOVISNOG MODELA I OVISNOG MODELA

Vrednovanje		
Izvedbeni parametri neovisnog modela	Izvedbeni parametri ovisnog modela	
Zajedničke značajke učinkovitosti (2.1.1.)	Uobičajen postupak (2.1.2.) vrednovanja	Unutarnji postupak vrednovanja (2.1.3.)

Specifičnost	Iskorištenje	Iskorištenje
Istinitost	Ponovljivost	Ponovljivost
Robusnost: manje promjene	Unutarlaboratorijska obnovljivost	Unutarlaboratorijska obnovljivost
Stabilnost	Obnovljivost	Obnovljivost
	Granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$)	Granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$)
	Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)	Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)
	Baždarna krivulja	Baždarna krivulja
	Robusnost: veće promjene	Robusnost

2.1.1. Značajke učinkovitosti neovisne o modelu

Bez obzira koji se postupak vrednovanja primjenjuje, moraju se odrediti sljedeće značajke učinkovitosti. Da bi se smanjio opseg posla, može se primijeniti pažljivo osmišljeni i statistički utemeljeni postupak u kojemu će se kombinirati ispitivanja obavljena u cilju određivanja različitih parametara.

2.1.1.1. Specifičnost

Za analitičke metode je važna sposobnost razlučivanja između analita i njima srodnih tvari (izomera, metabolita, produkata razgradnje, endogenih tvari, sastojaka matriksa, itd.). Nužno je provesti dva postupka kako bi se provjerile interferencije.

Stoga se odabiru tvari koje bi mogle izazvati interferencije i analiziraju se slijepi uzorci za dokazivanje prisutnosti mogućih interferencija i procjenjuje se njihov učinak:

- odabere se niz kemijski srodnih spojeva (metabolita, derivata, itd.) ili drugih tvari koje bi mogle interferirati sa spojem koji se dokazuje u uzorku;
- analizira se odgovarajući broj reprezentativnih slijepih uzoraka ($n \geq 20$) i provjere interferencije (signali, pikovi, tragovi iona) u području u kojemu očekujemo otpuštanje dokazivanog analita;
- osim toga, reprezentativni slijepi uzorci moraju se obogatiti do odgovarajuće koncentracije tvarima koje bi mogle ometati identifikaciju i/ili kvantifikaciju analita.

Nakon analize, ispita se:

- je li prisutnost mogla dovesti do pogrešne identifikacije,
- je li prisutnost jedne ili više interferencija otežala identifikaciju dokazivanog analita, ili
- postoji li značajni utjecaj na kvantifikaciju.

2.1.1.2. Istinitost

U ovome se stavku opisuje određivanje istinitosti (jedne komponente točnosti). Istinitost se može utvrditi jedino pomoću potvrđenog referentnog materijala (CRM). Kad god je na raspolaganju potvrđeni referentni materijal, isti se mora upotrijebiti. Postupak je подробно opisan u normi HRN ISO 5725-4. U nastavku navodimo primjer:

- analizira se šest replika potvrđenog referentnog materijala, u skladu s uputama za izvođenje ispitivanja koja vrijede za određenu metodu,
- odredi se koncentracija analita koji je prisutan u svakom uzorku replika,
- izračuna se srednja vrijednost, standardna devijacija i koeficijent varijacije (%) za te koncentracije,

– izračuna se istinitost podjelom dokazane srednje vrijednosti s potvrđenom vrijednošću (mjerenom kao koncentracija) i množenjem sa 100, da bi se rezultat izrazio u postotku.

Istinitost (%) = srednja vrijednost dokazane koncentracije korigirana iskorištenjem x 100 / potvrđena vrijednost

Ako ne postoji potvrđeni referentni materijal, umjesto istinitosti može se odrediti iskorištenje.

2.1.1.3. Primjenjivost/robusnost (manje promjene)

Ova provjera podrazumijeva namjerno uvođenje manjih razumnih varijacija od strane laboratorija i promatranje njihovih posljedica.

Prije samog ispitivanja mora se izvršiti odabir čimbenika koji sudjeluju u pripremnoj obradi, pročišćavanju i analizi uzoraka, a koji bi mogli utjecati na rezultate mjerenja. Ti čimbenici mogu uključivati analitičara, izvor i starost reagensa, otapala, standarde i ekstrakte uzoraka, brzinu zagrijavanja, temperaturu, pH vrijednost, kao i mnoge druge čimbenike koji se mogu javiti u laboratoriju. Ove bi čimbenike trebalo modificirati po redu veličine koji odgovara odstupanjima do kojih obično dolazi između laboratorija.

– odrede se čimbenici koji bi mogli utjecati na rezultate,

– neznatno se promijeni svaki faktor,

– test robusnosti provodi se prema Youdenovom postupku. (U ovoj se fazi mogu primijeniti i druge priznate metode. Međutim, Youdenov postupak svodi potrebno vrijeme i napor na minimum). Youdenov postupak je frakcionirani faktorski model. Uzajamna djelovanja među različitim faktorima ne mogu se dokazati,

– ako se otkrije da neki faktor značajno utječe na rezultate mjerenja, provode se daljnja ispitivanja kako bi se odredile granice prihvatljivosti tog faktora,

– u protokolu izvođenja metode trebaju biti jasno navedeni faktori koji značajno utječu na rezultate.

Osnovna ideja nije u tomu da se ispituje jedna po jedna promjena, već nekoliko promjena odjednom. Kao primjer neka A, B, C, D, E, F, G označujući nominalne vrijednosti za sedam različitih faktora koji bi, u slučaju da se njihove nominalne vrijednosti neznatno promijene, mogli utjecati na rezultate. Označimo njihove alternativne vrijednosti odgovarajućim malim slovima a, b, c, d, e, f, g. Time dobivamo 2^7 odnosno 128 mogućih različitih kombinacija.

Moguće je odabrati podskup od osam kombinacija kod kojih postoji ravnoteža između malih i velikih slova (Tablica 11). Mora se odabrati osam kombinacija koje će sadržavati odabrane faktore (A-G). Rezultat odabranih kombinacija pokazan je u Tablici 11 kao S-Z.

Tablica 11. PLAN ISPITIVANJA ZA ISPITIVANJE ROBUSNOSTI (MANJE PROMJENE)

Vrijednost faktora F	Kombinacije							
	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
Opaženi rezultat R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Za izračunavanje, vidi primjere ispitivanja robusnosti pod točkom 2.3.								

2.1.1.4. Stabilnost

Zapaženo je da nedovoljna stabilnost analita ili sastojaka matriksa u uzorku tijekom pohrane ili analize može dovesti do značajnih odstupanja u konačnom rezultatu analize. Osim toga, trebalo bi provjeriti stabilnost baždarnog standarda u otopini. Stabilnost analita u različitim uvjetima pohrane obično je dobro poznata. Praćenje uvjeta pohrane sastavni je dio uobičajenog sustava ovlašćivanja laboratorija. Ako stabilnost nije poznata, može se odrediti prema primjerima navedenim u daljnjem tekstu.

Stabilnost analita u otopini:

- pripremiti svježe temeljne otopine jednog ili više analita (stock) i razrijediti ih prema uputama za ispitivanje, kako bi dobili dovoljno alikvota (npr. 40) svake odabrane koncentracije (otprilike na razini najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode za tvari za koje nije utvrđena dopuštena količina, odnosno oko dopuštene granice za ostale tvari). Pripremiti otopinu analita koji je upotrijebljen za obogaćivanje kao i onoga koji će se upotrijebiti u konačnoj otopini za analizu, te bilo koju drugu značajnu otopinu (npr. derivatizirani standardi),
- izmjeriti udio analita u svježe pripremljenoj otopini prema uputama za ispitivanje,
- rasporediti odgovarajuće volumene u prikladno laboratorijsko posuđe, označiti i pohraniti prema sljedećoj shemi:

Tablica 12. SHEMA ZA ODREĐIVANJE STABILNOSTI ANALITA U OTOPINI

	– 20°C	+ 4°C	+ 20°C
Tama Svjetlo	10 alikvota	10 alikvota	10 alikvota 10 alikvota

- vrijeme pohrane može iznositi jedan, dva, tri i četiri tjedna, ili po potrebi dulje, npr. dok se ne primijete prve pojave degradacije tijekom identifikacije i/ili kvantifikacije. Mora se zabilježiti maksimalno vrijeme pohrane i optimalni uvjeti pohrane,

– koncentraciju analita u svakom alikvotu treba izračunati uzimajući kao 100%-tnu vrijednost otopinu koja je svježe pripremljena u trenutku analize.

$$\text{Preostali analit (\%)} = \frac{C_1 \times 100}{C_{\text{svježa}}}$$

C_1 = trenutačna koncentracija

$C_{\text{svježa}}$ = koncentracija svježe otopine

Stabilnost analita u matriksu

– kad god je moguće, treba upotrijebiti prirodno kontaminirane uzorke. Ako prirodno kontaminirani materijal nije na raspolaganju, treba upotrijebiti matriks obogaćen s analitom,

– ako je na raspolaganju prirodno kontaminirani materijal, koncentraciju u materijalu treba odrediti dok je materijal još svjež. Ostali alikvoti materijala mogu se uzeti nakon 1, 2, 4 i 20 tjedana te treba izmjeriti koncentracije. Tkivo bi trebalo pohraniti na temperaturi od najmanje minus 20°C ili, po potrebi, nižoj,

– ako prirodno kontaminirani materijal nije na raspolaganju, uzeti materijal koji ne sadrži analit i homogenizirati ga. Podijeliti materijal u pet alikvota. Obogatiti svaki alikvot s analitom, koji bi trebao biti pripremljen u maloj količini vodene otopine. Odmah analizirati jedan alikvot. Ostale alikvote pohraniti na temperaturi od najmanje minus 20°C ili, po potrebi, nižoj, te ih analizirati nakon 1, 2, 4 i 20 tjedana.

2.1.1.5. Baždarna krivulja

Kad se baždarne krivulje primjenjuju u svrhu kvantifikacije:

- pri njihovoj izradi treba upotrijebiti najmanje pet razina (uključujući nultu),
- treba opisati operativni raspon krivulje,
- treba opisati matematičku formulu krivulje i primjerenost podataka krivulji,
- treba opisati raspone prihvatljivosti parametara krivulje.

Ako je potrebno serijsko baždarenje na temelju standardne otopine, treba naznačiti prihvatljive raspone parametara baždarne krivulje, koji mogu varirati od serije do serije.

2.1.2. Uobičajeni postupak vrednovanja (validacije)

Izračunavanje parametara u skladu s uobičajenim metodama zahtijeva izvođenje nekoliko pojedinačnih ispitivanja. Mora se odrediti svaka značajka učinkovitosti za svaku veću promjenu (vidi »robusnost«). Metodama za ispitivanje više analita moguće je istodobno analizirati nekoliko analita, uz uvjet da su prethodno isključene interferencije koje bi mogle biti značajne. Na isti način se može odrediti nekoliko značajki učinkovitosti. Dakle, da bi se smanjila količina posla, preporučljivo je kombinirati ispitivanja u što je moguće većoj mjeri (npr. ponovljivost i unutarlaboratorijsku obnovljivost sa specifičnošću i analizom negativnog slijepog uzorka kako bi se odredila CC α i provjerila specifičnost.

2.1.2.1. Iskorištenje (engl. recovery)

Ako ne postoji potvrdni referentni materijal, iskorištenje se mora odrediti ispitivanjem, uporabom obogaćenog matriksa, primjenjujući sljedeće postupke:

– odabrati 18 alikvota kontrolnog uzorka i podijeliti ih u tri skupine po šest alikvota, pa svakoj skupini dodati analita u količini koja je 1, 1,5 i 2 puta veća od najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode, odnosno koja je 0,5, 1 i 1,5 puta veća od dopuštene količine,

- analizirati uzorke i izračunati koncentraciju u svakom uzorku,
- uz pomoć donje jednadžbe izračunati iskorištenje za svaki uzorak,
- izračunati srednje iskorištenje i CV iz šest rezultata u svakoj skupini,

$$\text{– \% iskorištenja } i = \frac{100 \times \text{izmjereni udio}}{\text{razina obogaćenja}}$$

Uobičajena metoda za određivanje iskorištenja inačica je metode standardnog dodavanja koja je opisana pod točkom 2.5 ako:

- se uzorak smatra kontrolnim uzorkom, umjesto uzorkom za analizu,
- se smatra da su konačni maseni udio ¹ i iskorištenje ² slični za oba poduzorka,
- uzorci za ispitivanje imaju iste mase, a ekstrakti poduzoraka za analizu iste volumene,
- količina baždarnog standarda koja je dodana drugom (obogaćenom) poduzorku za analizu iznosi x_{ADD} . ($x_{ADD} = \rho_A \cdot V_A$)

– x_1 je izmjerena vrijednost za slijepi uzorak, a x_2 izmjerena vrijednost drugog (obogaćenog) poduzorka,

$$\text{– dakle, iskorištenje \%} = \frac{100 (x_2 - x_1)}{x_{ADD}}$$

Ako bilo koji od gore navedenih uvjeta nije (ili se pretpostavlja da nije) ispunjen, onda se mora primijeniti cijeli postupak određivanja iskorištenja pomoću standardnog dodavanja, kao što je opisano pod točkom 2.5.

¹ Konačni maseni udio (yield): onaj maseni udio analita iz uzorka koji je prisutan u konačnom ekstraktu.

² Iskorištenje (ovdje): maseni udio analita dodan uzorku, a koji je prisutan u konačnom ekstraktu. U ostatku ovog dokumenta pretpostavlja se da su konačni maseni udio i iskorištenje isti, pa se stoga upotrebljava jedino izraz »iskorištenje«.

2.1.2.2. Ponovljivost

Pripremiti određeni broj uzoraka identičnih matriksa, kojima je dodan analit tako da se dobiju koncentracije koje iznose 1, 1,5 i 2 puta veće od najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode odnosno 0,5, 1 i 1,5 puta veće od dopuštene količine.

- za svaku razinu analita, analizu treba obaviti s najmanje šest replika,
- analizirati uzorke,
- izračunati koncentraciju dokazanu u svakom uzorku,
- pronaći srednju koncentraciju, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) obogaćenih uzoraka,
- ponoviti ove korake još najmanje dva puta,
- izračunati ukupne srednje koncentracije i koeficijente varijacije za obogaćene uzorke.

2.1.2.3. Unutarlaboratorijska obnovljivost (reproducibilnost)

Pripremiti određeni broj uzoraka za analizu (identičnih ili različitih matriksa), kojima je dodan analit ili više analita, tako da se dobiju koncentracije 1, 1,5 i 2 puta veće od granične koncentracije učinkovitosti metode odnosno 0,5, 1 i 1,5 puta veće od dopuštene količine.

- za svaku razinu koncentracije, analizu treba obaviti s najmanje šest ponavljanja,
- ponoviti ove korake još najmanje dva puta, s različitim analitičarima i u različitim uvjetima okoliša, npr. s različitim serijama reagensa, otapala, itd., pri različitim sobnim temperaturama, s različitim instrumentima, itd., ako je moguće,
- analizirati uzorke,
- izračunati koncentraciju u svakom uzorku,
- izračunati srednju koncentraciju, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) obogaćenih uzoraka.

2.1.2.4. Obnovljivost (reproducibilnost)

Ako se mora provjeriti obnovljivost (reproducibilnost), laboratoriji bi trebali sudjelovati u međulaboratorijskim usporedbenim ispitivanjima prema normi HRN ISO 5725-2.

2.1.2.5. Granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$)

U slučaju tvari za koje nije utvrđena dopuštena količina, $CC\alpha$ utvrđuje se:

- postupkom s baždarnom krivuljom prema normi HRN ISO 11843 (ovdje nazvana kao kritična vrijednost net varijable stanja). U tom slučaju, koristi se slijepi uzorak koji se obogaćuje na razinu MRPL ili iznad nje, u jednakim razmacima. Analizirati uzorke. Nakon identifikacije, grafički prikazati odnos signala i dodane koncentracije. $CC\alpha$ jednaka je pripadajućoj koncentraciji u točki sjecišta s ordinatom y uvećana za 2,33 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti. Ovo je primjenjivo jedino za kvantitativna ispitivanja ($\alpha = 1\%$),

- ili analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, kako bi izračunali omjer signal-šum u vremenskom intervalu u kojemu se očekuje analit. Kao $CC\alpha$ može se uzeti trostruka vrijednost omjera signal-šum. Ovo je primjenjivo i za kvantitativna i kvalitativna ispitivanja.

U slučaju tvari za koje je utvrđena dopuštena količina, $CC\alpha$ utvrđuje se:

- postupkom s baždarnom krivuljom prema normi HRN ISO 11843 (ovdje nazvana kao kritična vrijednost net varijable stanja). U tom slučaju, koristi se slijepi uzorak koji se obogaćuje oko dopuštene količine, u jednakim razmacima. Analizirati uzorke. Nakon identifikacije, grafički prikazati odnos signala i dodane koncentracije. $CC\alpha$ jednaka je koncentraciji na dopuštenoj granici uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti ($\alpha = 5\%$).

- ili analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, obogaćenih jednim ili više analita na razinu dopuštene granice. Granica odlučivanja jednaka je koncentraciji na dopuštenoj granici uvećanoj za 1,64 odgovarajuće standardne devijacije ($\alpha = 5\%$).

2.1.2.6. Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)

U slučaju tvari za koje nije propisana granična koncentracija, $CC\beta$ utvrđuje se:

- postupkom s baždarnom krivuljom prema normi HRN ISO 11843 (ovdje nazvana kao najmanja određena vrijednost net varijable stanja). U tom slučaju, koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji je obogaćen na razinu ili ispod najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode u jednakim razmacima. Analizirati uzorke. Nakon identifikacije, grafički prikazati odnos signala i dodane količine analita.

$CC\beta$ jednaka je odgovarajućoj $CC\alpha$ uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti za razinu srednje vrijednosti $CC\alpha$ ($\beta = 5\%$).

- analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, obogaćenih s jednim ili više analita na razinu granične koncentracije (količine) analita $CC\alpha$. Analizirati uzorke i identificirati analite. Sposobnost dokazivanja jednaka je vrijednosti $CC\alpha$ uvećane za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti za izmjereni udio ($\beta = 5\%$),

- ako ne postoje kvantitativni rezultati, sposobnost dokazivanja se može odrediti analizom slijepog uzorka koji je obogaćen na ili iznad $CC\alpha$. U tom slučaju, sposobnost dokazivanja metode jednaka je razini koncentracije kod koje ima samo 5 % ili manje lažno negativnih rezultata. Stoga je potrebno obaviti najmanje 20 ispitivanja za najmanje jednu razinu koncentracije, kako bi se osigurala pouzdana osnova za ovo određivanje.

U slučaju tvari za koje je utvrđena dopuštena količina, $CC\beta$ utvrđuje se:

- postupkom s baždarnom krivuljom prema normi HRN ISO 11843 (ovdje nazvana kao najmanja određena vrijednost net varijable stanja). U tom slučaju, koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji se obogaćuje analitom oko dopuštene granice u jednakim razmacima.

Analizirati uzorke i identificirati analit ili analite. Izračunati standardnu devijaciju srednjeg udjela izmjerene na razini granične koncentracije (količine) analita CC α . Granica dokazivanja jednaka je odgovarajućoj graničnoj koncentraciji uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti ($\beta = 5\%$),

– ili analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, obogaćenih jednim ili više analita na razini granične koncentracije analita CC α . Sposobnost dokazivanja jednaka je vrijednosti CC α uvećanoj za 1,64 odgovarajuće standardne devijacije ($\beta = 5\%$).

Vidi, točku 2.2.

2.1.2.7. Robusnost (značajne promjene)

Analitičku metodu bi trebalo ispitati pod različitim eksperimentalnim uvjetima koji uključuju npr. različite vrste, različite matrikse ili različite uvjete uzorkovanja. Uvedene promjene moraju biti značajne. Značaj tih promjena može se procijeniti npr. Youdenovim postupkom. Za sve veće promjene za koje se pokazalo da značajno utječu na provedbu ispitivanja trebalo bi odrediti svaku značajku učinkovitosti.

2.1.3. Vrednovanje prema alternativnim modelima

Ako se primjenjuju alternativni postupci vrednovanja, u protokolu izvođenja validacije potrebno je utvrditi temeljni model i strategiju s odgovarajućim preduvjetima, pretpostavkama i formulama ili barem na njih uputiti. U daljnjem tekstu se navodi primjer alternativne metode. Primjenjuje li se npr. model unutarnjeg vrednovanja, značajke učinkovitosti se utvrđuju na način koji omogućava vrednovanje značajnih promjena unutar istog postupka vrednovanja. To zahtijeva izradu plana ispitivanja u svrhu vrednovanja.

2.1.3.1. Plan ispitivanja

Plan ispitivanja mora biti napravljen tako da uzme u obzir broj različitih životinjskih vrsta i različitih čimbenika koji se ispituju. Stoga se kao prvi korak u cijelom postupku vrednovanja razmatraju populacijski uzorci koji će se u budućnosti analizirati u laboratoriju, kako bi se odabrale najvažnije vrste i oni čimbenici koji bi mogli utjecati na rezultate mjerenja. Nakon toga, odabire se raspon koncentracije koji je prilagođen svrsi u skladu s razinom značajnosti.

Primjer:

- pomoću metode koja se vrednuje moguće je istodobno ispitati nekoliko analita,
- utvrđene su dvije varijacije vodećeg čimbenika (A i B). Vodeći čimbenici su osnova na kojoj se kombiniraju razine čimbenika. Ti vodeći čimbenici mogu uključivati čimbenike kao što su vrsta uzorka ili matriks. U ovom primjeru je vodeći čimbenik promijenjen na dvije razine, tj. razmatrane su dvije različite vrste (A i B). Općenito, moguće je promijeniti vodeće čimbenike na više od dvije razine, čime se samo povećava broj analiza koje treba obaviti,
- odabrane čimbenike treba promijeniti na dvije razine (označene kao + ili –).

Tablica 13. PRIMJERI CIMBENIKA KOJI SE SMATRAJU ZNACAJNIMA ZA POSTUPAK VREDNOVANJA

Spol životinje Pasma Uvjeti transporta Uvjeti čuvanja/skladištenja Svježina uzorka Uvjeti tova Različiti operatori s različitim iskustvom	(čimbenik 1) (čimbenik 2) (čimbenik 3) (čimbenik 4) (čimbenik 5) (čimbenik 6) (čimbenik 7)
---	--

Tablica 14. MOGUĆI PLAN ISPITIVANJA ZA GORNJI PRIMJER

Vrsta	Čimbenik 1	Čimbenik 2	Čimbenik 3	Čimbenik 4	Čimbenik 5	Čimbenik 6	Čimbenik 7	
A	+	+	+	+	-	+	-	
A	+	+	-	-	+	-	-	
A	+	-	+	-	-	-	+	
A	+	-	-	+	+	+	+	
A	-	+	+	-	+	+	+	
A	-	+	-	+	-	-	+	
A	-	-	+	+	+	-	-	
A	-	-	-	-	-	+	-	
B	+	+	+	+	+	-	+	
B	+	+	-	-	-	+	+	
B	+	-	+	-	+	+	-	
B	+	-	-	+	-	-	-	
B	-	+	+	-	-	-	-	
B	-	+	-	+	+	+	-	
B	-	-	+	+	-	+	+	
B	-	-	-	-	+	-	+	

S obzirom da se svaki uzorak (svaka kombinacija razine čimbenika) mora pomiješati s četiri različite koncentracije oko razine značajnosti, a za svaku razinu se mora analizirati jedan slijepi uzorak, za cijeli postupak vrednovanja mora se obaviti $5 \times 16 = 80$ analiza.

Na temelju ovih 80 rezultata mjerenja moguće je izračunati sljedeće:

Iskorištenje

- ponovljivost po razini koncentracije (S_{ir}),
- unutarlaboratorijska obnovljivost po razini koncentracije (S_{ir}),
- granična koncentracija (količina) analita ($CC\alpha$),
- sposobnost dokazivanja ($CC\beta$),
- krivulja djelotvornosti (postotak β -pogreške u odnosu na koncentraciju (vidi točku 2.1.3.2.)),
- robusnost u odnosu na značajne promjene; robusnost u odnosu na manje promjene može se odrediti prema točki 2.1.1.3.,
- 16 baždarnih krivulja vezanih za uzorke,
- jedna ukupna baždarna krivulja,
- interval očekivanja sveobuhvatne baždarne krivulje,
- devijacije uzrokovane matriksom (S_{mat}),
- devijacije uzrokovane procesom analize (S_{run}),
- utjecaj pojedinačnih čimbenika na rezultate mjerenja.

Ove značajke učinkovitosti omogućuju iscrpnu ocjenu učinkovitosti metode, s obzirom da se ne ispituje utjecaj samo pojedinačnih čimbenika, nego i odgovarajuća kombinacija tih čimbenika. Uz pomoć ovakvog plana ispitivanja moguće je odrediti hoće li se neki od odabranih čimbenika isključiti iz ukupne baždarne krivulje zbog značajnog odstupanja od standardnih devijacija ostalih čimbenika.

2.1.3.2. Krivulja djelotvornosti

Krivulja djelotvornosti pruža informacije o sposobnosti dokazivanja metode unutar odabranog raspona koncentracije. Upućuje na rizik od β -pogreške pri primjeni ispitivane metode. Krivulja djelotvornosti omogućuje izračun sposobnosti dokazivanja za odgovarajuće kategorije metoda (probiranje, potvrda) ili tipove metoda (kvalitativna ili kvantitativna) za određenu β -pogrešku (npr. 5%).

Slika 1. KRIVULJA DJELOTVORNOSTI

Koncentracija

Slika 1. prikazuje primjer grafičkog prikaza sposobnosti dokazivanja (CC β) analitičke metode. Kod ovdje prikazane metode postoji stalni rizik od donošenja pogrešne odluke od 5% kod koncentracije od 0,50 $\mu\text{g/kg}$. Kod koncentracije od 0,55 $\mu\text{g/kg}$ rizik od lažno negativnog rezultata opada na 1%.

2.1.3.3. Obnovljivost

Utvrđivanje obnovljivosti metode putem unutarlaboratorijskog ispitivanja (interna validacija) zahtjeva opetovana sudjelovanja u ispitivanjima osposobljenosti u skladu s uputama ISO/IEC 43-1 i 43-2.

Laboratoriji mogu primjenjivati metode po vlastitom izboru, uz uvjet da se te metode primjenjuju pod rutinskim uvjetima. Standardna devijacija laboratorija može se upotrijebiti za ocjenu obnovljivosti metode.

2.2. GRAFIČKI PRIKAZ RAZLIČITIH ANALITIČKIH GRANICA

Slika 2. TVARI ZA KOJE NIJE UTVRĐENA DOPUŠTENA KOLIČINA

Odgovor

X_S	srednja vrijednost rezultata kontaminiranog uzorka
S_B	standardna devijacija slijepog uzorka (utvrđena u uvjetima unutarlaboratorijske obnovljivosti)
S_S	standardna devijacija kontaminiranog uzorka (utvrđena u uvjetima unutarlaboratorijske obnovljivosti)
α	>postotak lažno pozitivnih rezultata
β	postotak lažno negativnih rezultata
CC α	odgovor s određenom α -pogreškom i β -pogreškom od 50%
CC β	odgovor s vrlo malom α -pogreškom i β -pogreškom

Slika 3. TVARI ZA KOJE JE UTVRĐENA DOPUŠTENA KOLIČINA

Koncentracija

X_B	srednja »koncentracija« slijepog uzorka
X_{PL}	srednja koncentracija uzorka koji sadrži analit na dopuštenoj granici
X_S	srednja koncentracija kontaminiranog uzorka
S_{PL}	standardna devijacija uzorka koji sadrži analit na dopuštenoj granici (utvrđena u uvjetima međulaboratorijske obnovljivosti)
S_S	standardna devijacija kontaminiranog uzorka (utvrđena u uvjetima međulaboratorijske obnovljivosti)
α	postotak lažno pozitivnih rezultata
β	postotak lažno negativnih rezultata
$CC\alpha$	odgovor s određenom α -pogreškom i β -pogreškom od 50%
$CC\beta$	odgovor s vrlo malom α -pogreškom i određenom β -pogreškom

2.3. PRIMJER IZRAČUNA KOD ISPITIVANJA ROBUSNOSTI U ODNOSU NA MANJE PROMJENE PREMA YOUTENOVOM METODU

Usporedba prosjeka (A)

$$A_A = \Sigma(A_i)/4$$

$$A_B = \Sigma(B_i)/4$$

$$A_C = \Sigma(C_i)/4$$

$$A_D = \Sigma(D_i)/4$$

$$A_E = \Sigma(E_i)/4$$

$$A_F = \Sigma(F_i)/4$$

$$A_G = \Sigma(G_i)/4$$

$$A_a = \Sigma(a_i)/4$$

$$A_b = \Sigma(b_i)/4$$

$$A_c = \Sigma(c_i)/4$$

$$Ad = \Sigma(di)/4$$

$$Ae = \Sigma(ei)/4$$

$$Af = \Sigma(fi)/4$$

$$Ag = \Sigma(gi)/4$$

Usporedite prosjeke velikih slova (A_A do A_G) s prosjecima njima pripadajućih malih slova (A_a do A_g). Ako čimbenik ima neki učinak, razlika će biti značajno veća nego razlika kod drugih čimbenika.

Razlike/varijacije koje skoro sigurno postoje između laboratorija ne bi smjele utjecati na robusnu metodu.

Ako nema značajne razlike, sedam razlika su najrealnija mjera slučajne pogreške.

Razlike (D_i) Kvadrati razlika (D_i^2)

$$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i) \quad D_a^2 = \text{vrijednost } a$$

$$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i) \quad D_b^2 = \text{vrijednost } b$$

$$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i) \quad D_c^2 = \text{vrijednost } b$$

$$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i) \quad D_d^2 = \text{vrijednost } b$$

$$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i) \quad D_e^2 = \text{vrijednost } b$$

$$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i) \quad D_f^2 = \text{vrijednost } b$$

$$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i) \quad D_g^2 = \text{vrijednost } b$$

Standardna devijacija razlika D_i (S_{Di})

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

Ako je vrijednost S_{Di} značajno veća od standardne devijacije metode izvedene pod unutarlaboratorijskim uvjetima obnovljivosti (vidi gore), neizbježan je zaključak da svi čimbenici zajedno utječu na rezultat, čak i ako svaki pojedini čimbenik ne pokazuje značajni utjecaj, te da metoda nije dovoljno robusna u odnosu na odabrane modifikacije.

2.4. PRIMJER IZRAČUNA ZA UNUTARNJI POSTUPAK VREDNOVANJA

Primjeri i izračuni za protokol unutarnjeg vrednovanja kako su opisani u poglavlju o vrednovanju prema alternativnim modelima (2.1.3.).

2.5. PRIMJERI ZA METODU STANDARDNOG DODAVANJA

Uzorak za ispitivanje s T udjelom analita podijeli se na dva poduzorka 1 i 2, čije su mase m_1 odnosno m_2 . Poduzorku 2 doda se Volumen V_A otopine koncentracije analita ρ_A . Postupcima ekstrakcije i pročišćavanja koji su propisani metodom, dobivena su dva ekstrakta poduzorka, volumena V_1 odnosno V_2 . Pretpostavlja se da je iskorištenje analita rc . Oba ekstrakta se ispituju metodom mjerenja osjetljivosti b i daju analitički odgovor x_1 odnosno x_2 .

Ako se pretpostavi da su rc i b isti za analit u izvornom uzorku i u obogaćenom uzorku, onda se udio T može izračunati kao:

$$T = \frac{x_1 \times V_1 \times \rho_A \times V_A}{(x_2 \times V_2 \times m_1 - x_1 \times V_1 \times m_2)}$$

Ovom se metodom može odrediti iskorištenje rc . Potom, osim gore opisanog ispitivanja, dijelu ekstrakta poduzorka 1 (volumena V_3) dodaje se poznata količina $\rho_B \times V_B$ analita te se testira. Analitička reakcija je x_1 , a iskorištenje je:

$$rc = x_2 \times V_1 \times V_2 \times \rho_B \times V_B / [x_3 \times V_1 \times V_3 (T \times m_2.5pt^{>+rA} \times V_A) - x_2.V_2 \times T \times m_1 (V_3 - V_B)]$$

Osim toga, može se izračunati osjetljivost b , kao:

$$b = x_1.V_1/rc.T.m_1$$

Opisani su svi uvjeti primjene i detalji.

Analitičke metode koje se primjenjuju za dokazivanje sljedećih tvari moraju zadovoljiti najmanje zahtijevane granice učinkovitosti izvedbe metode navedene u tablici 15:

Tablica 15. NAJMANJE ZAHTEJEVANE GRANICE UČINKOVITOSTI IZVEDBE METODE

Tvar i/ili metaboliti	Matriks	MRPL
Kloramfenikol	Meso Jaja Mlijeko Urin Proizvodi akvakulture Med	0,3 µg/kg
Medroxyprogesteron acetat	Svinjska bubrežna mast	1 µg/kg
Metaboliti nitrofurana: – furazolidone – furaltadone – nitrofurantoin – nitrofurazone	Meso peradi Proizvodi akvakulture	1 µg/kg za sve
Malahitno zelenilo i leukomalahitno zelenilo	Proizvodi akvakulture	2 µg/kg

PRILOG IV

KRATICE

AAS	(engl. Atomic absorption spectrometry) atomska apsorpcijska spektrometrija
AES	(engl. Atomic emission spectrometry) atomska emisijska spektrometrija
AOAC-I	(engl. Association of Official Analytical Chemists INTERNATIONAL) Međunarodno udruženje službenih analitičkih kemičara
B	(engl. bound fraction (immunoassays)) vezana frakcija (imunotest)
CI	(engl. chemical ionisation) kemijska ionizacija
CRM	(engl. Certified reference material) potvrdni referentni materijal
CV	(engl. coefficient of variation) koeficijent varijacije
2D TLC	(engl. two dimensional thin layer chromatography) dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija
DAD	(engl. diode array detection) dokazivanje nizom dioda
DPASV	(engl. differential pulse anodic stripping voltametry) diferencijalna pulsna voltametrija s anodnim otapanjem
ECD	(engl. electron capture detection) elektronapsorpcijska detekcija
EI	(engl. electronic impact ionisation) elektronska ionizacija
GC	(engl. gas chromatography) plinska kromatografija
HPLC	(engl. high performance liquid chromatography) tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
HPTLC	(engl. high performance thin layer chromatography) tankoslojna kromatografija visoke djelotvornosti (učinkovitosti)
HRMS	(engl. high resolution mass spectrometry) spektrometrija masa visoke razlučivosti
ICP-AES	(engl. inductively coupled plasma-mass spectrometry) atomska emisijska spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom
ICP-MS	(engl. inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry) spektrometrija masa s induktivno spregnutom plazmom
IR	(engl. infrared) infracrveni
ISO	International Standard Organisation, Međunarodna organizacija za norme
LC	(engl. liquid chromatography) tekućinska kromatografija

LR(MS)	(engl. low resolution (mass spectrometry) (masena spektrometrija) niske razlučivosti
MRPL	(engl. Minimum required performance limit) najmanja zahtjevana granica učinkovitosti izvedbe metode
MS	(engl. mass spectrometry) spektrometrija masa
n	eksponent – broj generacija iona izvedenih iz prekursora
m/z	(engl. mass/charge ratio) omjer masa/naboj
R _f	(engl. relative migration to the solvent front) relativna migracija prema fronti otapala (TLC)
RSDL	(engl. relative standard deviation of the laboratory) relativna standardna devijacija laboratorija
SIM	(engl. selected ion monitoring) praćenje odabranih iona
TLC	(engl. thin layer chromatography) tankoslojna kromatografija
UV	(engl. ultraviolet light) ultraljubičasto zračenje
VIS	(engl. visible light) vidljivo zračenje