

Na osnovu člana 33. stav 5. Zakona o veterinarstvu u Bosni i Hercegovini ("Službeni glasnik BiH", broj 34/02) i člana 17. Zakona o Vijeću ministara Bosne i Hercegovine ("Službeni glasnik BiH", br. 30/03, 42/03, 81/06, 76/07, 81/07, 94/07 i 24/08), Vijeće ministara Bosne i Hercegovine, na prijedlog Ureda za veterinarstvo Bosne i Hercegovine, na 135. sjednici održanoj 19. oktobra 2010. godine, donosi

PRAVILNIK O PROVOĐENJU ANALITIČKIH METODA I TUMAČENJU REZULTATA

POGLAVLJE I. OSNOVNE ODREDBE

Član 1. (Predmet)

Ovim Pravilnikom utvrđuju se mjere za analitičke metode koje se koriste u ispitivanju službenih uzoraka, koji su uzeti u skladu s Odlukom o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", br. 1/04 i 40/09), te određuju zajednički kriteriji za tumačenje analitičkih rezultata koji su za te uzorke dobijeni u ovlaštenim laboratorijama.

Član 2. (Definicije)

Za potrebe ovog Pravilnika pojedini pojmovi imaju slijedeća značenja:

- a) *alfa (α) pogreška*: vjerovatnost da je ispitani uzorak stvarno negativan, iako su dobijeni pozitivni rezultati (lažno pozitivni rezultat);
- b) *analit*: supstanca koju treba dokazati, identificirati i/ili kvantificirati i njeni derivati koji se javе tokom analize;
- c) *beta (β) pogreška*: vjerovatnost da je ispitani uzorak stvarno pozitivan, iako su dobijeni negativni mjerni rezultati (lažno negativni rezultat);
- d) *dopuštena količina*: je maksimalno dozvoljena količina (MDK), maksimalna granica rezidua, maksimalan nivo ili druga najveša tolerancija za supstance ustanovljene legislativom koja je na snazi u BiH;
- e) *granična koncentracija analita (CCa)* je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerovatnost α pogreške da ispitivani uzorak ne udovoljava;
- f) *Iskorištenje (engl. recovery)*: postotak stvarne koncentracije supstance utvrđene tokom analitičkog postupka. Određuje se tokom vrjednovanja metode, ako potvrđeni referentni materijal nije dostupan;
- g) *ispitivanje osposobljenosti*: analitičko ispitivanje istog uzorka, pri čemu laboratorije mogu primijeniti metode po vlastitom izboru, uz uslov da se te metode primijene pod uobičajenim uslovima. Analitičko ispitivanje se mora provesti u skladu s uputama BAS ISO/IEC Vodiča 43-1 i 43-2 i može služiti za ocjenu ponovljivosti metoda;
- h) *ispitivanje unutar jedne laboratorije (unutrašnje vrjednovanje)*: analitičko ispitivanje u kojem jedna laboratorija, u različitim uslovima i u opravdano dugim vremenskim intervalima, primjenjuje jednu metodu za analiziranje istih ili različitih ispitnih uzoraka;
- i) *ispitivani uzorak*: pripremljeni laboratorijski uzorak od kojega će se uzimati poduzorci za analizu;

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

k) *jedinice*: one jedinice koje su opisane u normi BAS ISO 31-0;

l) *kalibracijski standard*: mjerno sredstvo koje predstavlja količinu ispitivane supstance na način da povezuje njenu vrijednost s referentnom bazom;

m) *ko-hromatografija*: podrazumijeva postupak u kojem se ekstrakt ispitivanog uzorka, prije hromatografije, dijeli na dva dijela. Jedan dio se podvrgava hromatografiji kao takav. Drugi dio se miješa s kalibracijskim standardom analita koji se ispituje i potom na isti način hromatografira. Količina dodanog standardnog analita mora biti približna procijenjenoj količini analita u ekstraktu. Cilj metode je poboljšati identifikaciju analita pri upotrebi hromatografske metode, pogotovo kada nije dostupan prikladan unutrašnji standard;

n) *kriteriji efikasnosti*: zahtjevi u pogledu efikasnosti prema kojima se može ocijeniti da je analitička metoda primjerena svrsi i da daje pouzdane rezultate;

o) *kvalitativna metoda*: analitička metoda kojom se supstanca identificira na osnovu njenih hemijskih, bioloških i fizikalnih svojstava;

p) *kvantitativna metoda*: analitička metoda kojom se određuje količina ili maseni udio neke supstance tako da se može izraziti kao brojčana vrijednost u odgovarajućim jedinicama;

r) *laboratorijski uzorak*: je uzorak koji je pripremljen za slanje u laboratoriju u svrhu pregleda ili analiziranja;

s) *međulaboratorijsko ispitivanje*: organiziranje, provedba i ocjena ispitivanja identičnog ispitivanog uzorka u dvije ili više laboratorija prema unaprijed određenim uslovima, kako bi se provjerili izvedbeni uslovi ispitivanja. Ovisno o svrsi, ispitivanje se može svrstati kao poredbeno ispitivanje ili ispitivanje osposobljenosti;

t) *mjerno odstupanje (engl. bias)*: razlika između očekivanog rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti;

u) *najmanja zahtijevana granica efikasnosti izvedbe metode (MRPL)*: najmanji udio analita u ispitivanom uzorku, koji se mora dokazati i potvrditi. Služi za usklađivanje izvođenja analitičkih metoda za one supstance za koje nisu ustanovljene dozvoljene granice;

v) *obnovljivost (reproducibilnost)*: preciznost u uslovima obnovljivosti;

z) *obnovljivost unutar laboratorija (reproducibilnost)*: preciznost dobijena u istoj laboratoriji pod propisanim (unaprijed određenim) uslovima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okoliš) u opravdanim vremenskim razmacima;

aa) *obogañeni uzorak* je uzorak kojem je dodata poznata količina analita koji treba dokazati;

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

cc) *poduzorak za analizu*: količina materijala uzetog od ispitivanog uzorka koji se ispituje ili promatra;

dd) *ponovljivost*: preciznost u uslovima ponovljivosti;

ee) *poredbeno ispitivanje*: analiziranje istog uzorka istom metodom kako bi se provjerile izvedbene osobitosti metode uključujući ispitivanje slučajne mjerne pogreške i mjerno odstupanje laboratorije;

ff) *potvrđna metoda*: metoda kojom se dobiju potpuni ili dodatni podaci na osnovu kojih je određenu supstancu moguće jednoznačno identificirati i po potrebi kvantificirati, na nivou značajnosti;

gg) *potvrđeni referentni materijal (CRM)*: je materijal kojem je utvrđen određeni udio analita.

hh) *preciznost*: stepen podudarnosti između neovisnih rezultata ispitivanja dobijenih pod unaprijed određenim propisanim uslovima. Preciznost se obično izražava kao nepreciznost i

računa se kao standardna devijacija rezultata ispitivanja. Što je manja preciznost, veća je standardna devijacija;

ii) *nivo značajnosti*: koncentracija supstanci ili analita u uzorku koja je u skladu s važećim propisima;

jj) *referentni materijal*: materijal čija su jedno ili više svojstava potvrđena vrjednovanom metodom, tako da se može koristiti za provjeru instrumenta ili provjeru mjerne metode;

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

ll) *slijepa proba reagensa*: podrazumijeva primjenu cjelokupnog analitičkog postupka bez ispitnog dijela uzorka ili uz jednaku količinu odgovarajućeg rastvarača umjesto uzorka;

mm) *slijepa proba uzorka*: primjena cijelog analitičkog postupka na poduzorak za analizu koji je uzet iz uzorka u kojem nema analita;

nn) *službeni uzorak*: uzorak kojeg uzima službeni veterinar, prema propisanom postupku i koji se na analizu dostavlja s priloženim propisanim obrascem, u skladu s važećim propisima za kontrolu rezidua u Bosni i Hercegovini;

oo) *specifičnost*: svojstvo metode da se razlikuje analit koji se mjeri od drugih supstanci. Ova karakteristika je prije svega funkcija opisane tehnike mjerenja, ali može varirati ovisno od vrste spoja ili matriksa;

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

rr) *standardni analit*: analit poznatog i potvrđenog sadržaja i čistoće koji se u analizi koristi kao referentni;

ss) *standardno dodavanje*: postupak pri kojem se ispitivani uzorak dijeli na dva (ili više) ispitnih poduzoraka za analizu. Jedan poduzorak se analizira kao takav, a drugom se prije analize dodaje poznata količina standardnog analita. Količina standardnog 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;

tt) *tačnost*: stepen podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti. Utvrđuje se utvrđivanjem istinitosti i preciznosti;

uu) *supstanca*: supstanca posebnog ili određenog hemijskog sastava i njeni metaboliti;

vv) *efikasnost*: funkcionalni kvalitet koji se može pripisati analitičkoj metodi. To mogu biti: specifičnost, tačnost, istinitost, preciznost, ponovljivost, obnovljivost, iskorištenje (engl. recovery), sposobnost dokazivanja i robusnost;

zz) *unutrašnji standard (IS)*: podrazumijeva supstancu koja nije sadržana u uzorku, čija su fizikalno-hemijska svojstva što je moguće sličnija svojstvima analita koji se treba identificirati i koji se dodaje svakom uzorku i svakom kalibracijskom standardu;

aaa) *uslovi obnovljivosti*: uslovi pod kojima različiti analitičari, u različitim laboratorijama koristeći različitu opremu, dobiju rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima;

bbb) *uslovi ponovljivosti*: uslovi pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istoj laboratoriji, dobije neovisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istovjetnim ispitivanim uzorcima;

ccc) vrjednovanje metode (validacija): potvrđivanje metode ispitivanjem i pribavljanjem objektivnih dokaza da su ispunjeni posebni zahtjevi za predviđenu specifičnu upotrebu zadovoljeni;

ddd) ovlaštena laboratorija - je laboratorija ovlaštena za provedbu laboratorijskog ispitivanja od strane nadležnog organa za ovlašćivanje na način propisan Odlukom o uslovima koje moraju ispunjavati ovlaštene dijagnostičke laboratorije ("Službeni glasnik BiH", br. 25/04, 16/05 i 43/09).

Član 3. (Analitičke metode)

Službeni uzorci uzimaju se u skladu s važećim propisom o kontroli rezidua i analiziraju se metodama koje su:

- a) navedene u uputama, po mogućnosti u skladu s normom ISO 78-2;
- b) u skladu s Prilogom I ovog Pravilnika;
- c) potvrđene u skladu s postupcima opisanim u Prilogu II ovog Pravilnika;
- d) u skladu s najmanjim zahtijevanim granicama efikasnosti izvedbe metode (MRPL).

Član 4. (Najmanje zahtijevane granice efikasnosti)

Analitičke metode korištene za detektiranje slijedećih supstanci moraju biti u skladu s najmanjim zahtijevanim granicama efikasnosti (MPRLs) za matrikse navedene u Prilogu III, Tabela 15.:

- a) hloramfenikol;
- b) metaboliti nitrofurana;
- c) medroksiprogesteron;
- d) malahit zelena.

Član 5. (Kontrola kvaliteta)

Kvalitet rezultata analize uzoraka osigurava se praćenjem ispitivanja i/ili rezultata kalibracija, u skladu s propisanim u normi BAS EN ISO/IEC 17025, poglavlju 5.9.

Član 6. (Tumačenje rezultata)

- (1) Rezultat analize smatra se pozitivnim ako je veći od granične koncentracije analita (CCa) po potvrdnoj metodi.
- (2) Ako je za neku supstancu utvrđena dopuštena količina, granična koncentracija 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 supstancu nije utvrđena dopuštena količina, granična koncentracija analita (CCa) je najniži nivo koncentracije pri kojem se metodom može odrediti, sa statističkom sigurnošću od $1 - \alpha$ da je ispitivani analit prisutan.
- (4) Za supstance koje su navedene u grupi A u Prilogu I Odluke o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla greška može biti 1% ili niža. Za sve ostale supstance greška može biti 5% ili niža.

Član 7.
(Prilozi Pravilnika)

Prilozi broj I (Kriteriji efikasnosti, te drugi zahtjevi i postupci za analitičke metode), II (Vrjednovanje metode (validacija)), III (Najmanje zahtijevane granice efikasnosti izvedbe metode) i IV (Skraćenice), su sastavni dio ovog Pravilnika.

Član 8.
(Preuzimanje standarda)

Danom preuzimanja adekvatnih BAS ISO standarda od strane Instituta za akreditaciju Bosne i Hercegovine, prestaje važenje ISO standarda 78-2 i 11843 navedenih u ovom Pravilniku.

Član 9.
(Stupanje na snagu)

Ovaj Pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom glasniku BiH", a primjenjivat će se od 01.01.2012. godine.

VM broj 270 /10
19. oktobra 2010. godine
Sarajevo
Predsjedavajući
Vijeća ministara BiH
Dr. Nikola Špirić, s. r.

PRILOG I

KRITERIJI EFIKASNOSTI, TE DRUGI ZAHTJEVI I POSTUPCI ZA ANALITIČKE METODE

1. KRITERIJI EFIKASNOSTI I DRUGI ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE METODE

Analitičke metode ili kombinacije metoda koje su drugačije od dolje opisanih mogu se koristiti kao orijentacijske ili potvrdne 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 važećom Odlukom o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", broj 1/04 i 40/09). Uzorci se dobijaju, obrađuju i s njima se postupa na način koji pruža najveću mogućnost dokazivanja supstanci. Postupci s uzorcima moraju spriječiti mogućnost slučajne kontaminacije ili gubitka analita.

1.1.2. Izvođenje ispitivanja

1.1.2.1. Iskorištenje

Tokom analize uzoraka iskorištenje se određuje za svaku seriju uzoraka. Ako je iskorištenje unutar granica, tada se može koristiti stalni faktor korekcije. U suprotnom, koristi se faktor iskorištenja koji je dobijen 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 unutrašnji standard.

1.1.2.2. Specifičnost

Metodom se mora u eksperimentalnim uslovima razlikovati analit od drugih supstanci. 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 važećom Odlukom o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla ("Službeni glasnik BiH", broj 1/04 i 40/09), kao orijentacijske metode koriste se samo oni analitički postupci za koje se može pokazati na dokumentirani sljedivi način da su vrjednovani i da im je na nivou 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

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

Slijedeće metode, odnosno kombinacije metoda, smatraju se prikladnim za identifikaciju organskih rezidua ili kontaminanata za navedene grupe supstanci:

Tabela 1.
Odgovarajuće potvrđne metode za organske rezidue ili kontaminante

Tehnika mjerenja	Supstance iz Dodatka I Odluke o praćenju rezidua određenih supstanci u živim životinjama i proizvodima životinjskog porijekla („Sl. glasnik BiH“, br. 01/04 i 40/09)	Ograničenja
LC ili GC s masenom-spektrometrijskom detekcijom	Grupe A i B	Samo u slučaju da je bila on-line ili off-line, hromatografska separacija Samo ako su korištene tehnike za puno skeniranje ili se koriste najmanje 3 (grupa B) ili 4 (grupa A) identifikacijske tačke za tehnike koje ne snimaju cijeli maseni spektar
LC ili GC sa IR spektrometrijskom detekcijom	Grupe A i B	Posebni zahtjevi za apsorpciju kod IR spektrometrije moraju biti ispunjeni
LC-full-scan DAD	Grupa B	Posebni zahtjevi za apsorpciju kod UV spektrometrije moraju biti ispunjeni
LC-fluorescencija	Grupa B	Samo za molekule koje emitiraju prirodnu fluorescenciju i za molekule koje emitiraju fluorescenciju nakon transformacije ili derivatizacije
2-D TLC full-scan UV/VIS	Grupa B	Dvodimezionalni HPTLC i ko-hromatografija su obavezni
GC-detekcija hvatanjem elektrona	Grupa B	Samo ako se koriste dvije kolone različite polarnosti
LC-imunogram	Grupa B	Samo ako se koriste najmanje dva različita hromatografska sistema ili kao druga, neovisna detekcijska metoda
LC-UV/VIS (jedna valna dužina)	Grupa B	Samo ako se koriste najmanje dva različita hromatografska sistema ili kao druga, neovisna detekcijska metoda

1.3.1. Zajednički kriteriji izvedbe i zahtjevi

Potvrđne metode moraju osigurati podatke o hemijskoj strukturi analita. Ako više spojeva daje isti rezultat, metoda ne može razlikovati te spojeve. Metode koje se zasnivaju jedino na hromatografskoj analizi, bez primjene spektrometrijskog dokazivanja, nisu same po sebi prikladne za primjenu kao potvrđne metode.

Ako se u metodi primjenjuje odgovarajući unutrašnji standard, on se dodaje poduzorku za

analizu na početku postupka ekstrakcije. Ovisno od raspoloživosti, upotrebljavaju se bilo stabilni oblici analita obilježeni izotopom, koji su posebno prikladni za dokazivanje spektrometrijom masa, bilo spojevi koji su po svojoj strukturi slični analitu.

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

Za metode tankoslojne hromatografije (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 istovremeno sa svakom serijom analiziranih uzoraka za ispitivanje. Redoslijed ubacivanja ekstrakta u analitički instrument je slijedeći: 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 slijedećih granica:

Tabela 2.
Minimum istinitosti za kvantitativne metode

Masa	Raspon
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	-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 dodata poznata količina analita. Podaci korigirani prosječnim iskorištenjem prihvatljivi su jedino ako su u granicama koje su navedene u Tabeli 2.

1.3.2.2. Preciznost kvantitativne metode

Medulaboratorijski koeficijent varijacije (CV) za opetovane analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uslovima obnovljivosti, ne smije biti veći od nivoa izračunate Horwitzovom jednačinom. Jednačina 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 Tabeli 3.

Tabela 3.
Primjeri obnovljivosti CV-a za kvantitativne metode u rasponu frakcija masa

Masa	Obnovljivost CV (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1000 µg/kg	16
(*) Za mase manje od 100 µg/kg primjena Horwitzove jednačine daje neprihvatljivo visoke vrijednosti. Radi toga, CV za koncentracije manje od 100 µg/kg trebaju biti što je moguće niže.	

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

Kod supstanci za koje je utvrđena dopuštena količina, metoda mora postići unutarlaboratorijsku obnovljivost koja nije veća od odgovarajuće obnovljivosti CV pri koncentraciji od 0,5 pomnoženo s dopuštenom količinom (0,5 x dopuštena količina).

1.3.3. Kriteriji efikasnosti 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) hromatografsko razdvajanje.

1.3.3.1. Hromatografsko razdvajanje

Za GC-MS postupke, separacija plinskom hromatografijom izvodi se primjenom kapilarnih kolona. Za LC-MS postupke, hromatografsko 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 kalibracijskog standarda unutar određenog intervala vremena zadržavanja. Interval vremena zadržavanja mora biti razmjernan sposobnosti razlučivanja hromatografskog sistema. Omjer između hromatografskog vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja unutrašnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora odgovarati vremenu zadržavanja kalibracijskog rastvora 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 upotrebom MS tehnika, kao što je snimanje cjelokupnih spektara masa (full scan) ili praćenje odabranih iona (SIM), kao i upotrebom 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 kalibracijskog 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 poticati 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 kalibracijskog standarda, bilo iz rastvora kalibracijskog standarda ili obogaćenih uzoraka, na uporedivim koncentracijama, mjerenim pod istim uslovima i uz slijedeće tolerancije:

Tabela 4.
Maksimalne dozvoljene dopuštenosti za relativne jačine iona koristeći raspon masenih spektrometrijskih tehnika

Relativna jačina (% od osnovnog pika)	EI-GC-MS (relativno)	CI-GC-MS, GC-MS ^a , LC-MS, LC-MS ^a (relativno)
> 50%	± 10%	± 20%
> 20% do 50 %	± 15%	± 25%
>10% do 20%	± 20%	± 30%
≤ 10%	± 50%	± 50%

Tumačenje podataka dobijenih spektrometrijom masa: relativna zastupljenost dijagnostičkih iona i/ili ionskih parova prekursor/produkt moraju se identificirati upoređivanjem 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., stav 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 (Tabela 5.) Pretraživanje baza podataka uz pomoć kompjutera može se primijeniti.

U tom slučaju, rezultat upoređivanja podataka o spektru masa u ispitnom uzorku s onima iz kalibracijskog rastvora mora biti veći od kritičnog faktora podudarnosti. Taj faktor se određuje tokom postupka vrjednovanja za svaki analit na osnovu spektara za koje su ispunjeni dolje opisani uslovi.

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 sistem identifikacijskih tački. Za potvrdu supstanci koje su navedene u grupi A spojeva potrebne su najmanje 4 identifikacijske tačke. Za potvrdu supstanci koje su navedene u grupi B spojeva potrebne su najmanje 3 identifikacijske tačke. Tabela 5. pokazuje broj identifikacijskih tački koje pripadaju svakoj pojedinoj osnovnoj tehnici spektrometrije masa. Da bi identifikacijska tačka potrebna za potvrdu bila kvalificirana i ukupni broj identifikacijskih tački 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 tački.

Tabela 5.
Odnos između raspona klasa masa i dobijenih identifikacijskih bodova

MS tehnike	Identifikacijski bodovi po ionu
Masena spektrometrija male rezolucije (LR)	1,0
LR-MS ^a prekursor ion	1,0
LR-MS ^a prijelazni proizvodi	1,5
HRMS	2,0
HR-MS ^b prekursor ioni	2,0
HR-MS ^b prijelazni proizvodi	2,5
<i>Napomene:</i> (1) Svaki ion može se brojiti samo jednom. (2) GC-MS uz ionizaciju snopom elektrona smatra se različitim od tehnike GC-MS s hemijskom ionizacijom. (3) Da bi se povećao broj identifikacijskih tački, mogu se koristiti različiti analiti jedino ako derivati koriste različite hemijske reakcije. (4) Za supstance iz grupe A ako se tokom 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 hromatografija (TLC) u kombinaciji sa spektrometrijskom detekcijom. Ove tehnike mogu pridonijeti najviše s jednom identifikacijskom tačkom, uz uslov da su ispunjeni svi zahtjevi koji se primjenjuju za te tehnike. (5) Produkti nastali tokom prijelaza uključuju potomke prve generacije i potomke druge generacije.	

Tabela 6.
Primjeri brojeva identifikacijskih tački dobijenih u rasponu tehnika i njihovih kombinacija (n=cijeli broj)

Metoda(e)	Broj iona	Identifikacijski bodovi
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 prethodnik i 2 potomka prve generacije	4
LC-MS-MS	1 prethodnik i 2 potomka prve generacije	4
GC-MS-MS	2 iona prethodnika, svaki sa jednim potomkom prve generacije	5
LC-MS-MS	2 iona prethodnika, svaki sa jednim potomkom prve generacije	5
LC-MS-MS-MS	1 prethodnik, 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 hromatografiju u kombinaciji s dokazivanjem u infracrvenom području

Odgovarajući pikovi: odgovarajući pikovi su maksimumi apsorpcije u infracrvenom spektru kalibracijskog standarda ako ispunjavaju slijedeće 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 tačke gledišta mogla dati prednost odgovarajućim pikovima određenim prema tački (a), u praksi je lakše odrediti pikove prema tački (b).

Određuje se broj pikova u infracrvenom spektru analita čije frekvencije odgovaraju odgovarajućem piku u spektru kalibracijskog 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 kalibracijskog standarda. Potrebno je najmanje šest odgovarajućih pikova u infracrvenom spektru kalibracijskog 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 tačno poklapanje, odgovarajuće područje spektra analita mora odgovarati prisutnosti pika za upoređivanje. 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 upotrebom LC uz druge tehnike dokazivanja

1.3.5.1. Hromatografsko razdvajanje

Uvijek treba koristiti unutrašnji standard ako je u tu svrhu dostupna primjerena supstanca. Prednost u primjeni imaju srodni spojevi s vremenom zadržavanja blizu analita. Vrijeme zadržavanja analita mora biti u dopuštenim granicama prema odgovarajućem kalibracijskom standardu uz iste uslove 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 unutrašnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora biti jednako vremenu zadržavanja kalibracijskog 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 hromatografije moraju u potpunosti biti ispunjeni.

Apsorpcijski maksimumi u spektru analita moraju biti na istim valnim dužinama kao i oni kalibracijskog standarda uz toleranciju koja ovisi od razlučivosti sistema dokazivanja. Za dokazivanje pomoću niza dioda, tolerancija je obično unutar $\pm 2 \text{ nm}$. Za one dijelove dva spektra čija je relativna apsorpcija jednaka ili veća od 10 %, spektar analita iznad 220 nm ne smije se vidljivo razlikovati od spektra kalibracijskog standarda. Ovaj je zahtjev zadovoljen kada su, prvo, prisutni isti maksimumi i, drugo, kada razlika između dva spektra ni u jednoj od posmatranih tačaka nije veća od 10 % od apsorpcije kalibracijskog standarda. U slučaju računarskog pretraživanja i upoređivanja spektara ispitnih uzoraka s onima iz kalibracijskog rastvora, rezultat upoređivanja mora biti veći od

kritičnog faktora podudarnosti. Taj faktor se određuje tokom postupka vrjednovanja za svaki analit, na osnovu spektara za koje su ispunjeni gore opisani uslovi. 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 hromatografije u potpunosti moraju biti ispunjeni.

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

Najbliži maksimum pika u hromatogramu 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 hromatografije 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 dobijenih tokom vrjednovanja probe.

Imunogram se mora sastojati od najmanje pet frakcija.

Svaka frakcija mora biti manja od polovine 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 hromatografijom (LC) uz UV/VIS dokazivanje (jedna valna dužina)

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

Najbliži maksimum pika u hromatogramu 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 upotrebom 2-D TLC uz spektrometrijsko UV/VIS dokazivanje sa snimanjem cijelog spektra

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

Rf vrijednosti analita moraju se podudarati s Rf 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 polovinu zbira promjera mrlja.

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

U slučaju računarskog pretraživanja baza podataka i upoređivanja, upoređivanje podataka o spektru u uzorku za ispitivanje s onima kalibracijskog rastvora mora biti veća od kritičnog faktora podudarnosti. Taj faktor se određuje tokom postupka validacije za svaki analit na osnovu spektara za koje su ispunjeni gore opisani uslovi. Mora se provjeriti varijabilnost spektara uzrokovana matricom i funkcioniranje detektora.

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

Uvijek treba koristiti unutrašnji standard kada je u tu svrhu dostupna primjerena supstanca.

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 kalibracijskom standardu uz iste uslove 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 unutrašnjeg standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora biti jednako vremenu zadržavanja kalibracijskog standarda u odgovarajućem matriksu, uz toleranciju od $\pm 0,5 \%$. Najbliži maksimum pika u hromatogramu mora biti odvojen od utvrđenog pika analita za najmanje jednu punu širinu pika izmjerenu na 10 % od maksimalne visine pika analita. Za dobijanje dodatnih podataka može se primijeniti ko-hromatografija.

1.4. POTVRDNE METODE ZA HEMIJSKE ELEMENTE

Potvrдне metode analize hemijskih elemenata moraju se zasnivati na principu nedvosmislene identifikacije i tačne i precizne kvantifikacije, uz pomoć fizikalno-hemijskih svojstava koji su jedinstveni za dotični element na nivou koncentracije od interesa (npr. karakteristična valna dužina emitiranog ili apsorbiranog zračenja, atomska masa).

Slijedeće metode ili kombinacije metoda smatraju se odgovarajućim za identifikaciju hemijskih elemenata.

Tabela 7.
Odgovarajuće potvrдне metode za hemijske elemente

Tehnike	Mjerljivi parametri
Diferencijska pulsna anodna voltimetrija	Električni signal
Atomska apsorpcijska spektrometrija	
Plamen	
Obnova hidrida	
Hladna para	
Elektrotermna atomizacija (grafitna peć)	Apsorpcijska valna dužina
Atomska emisiona spektrometrija	
Provodna plazma	
Masena spektrometrija	
Provodna plazma	
	Emisijska valna dužina
	Odnos masa-napon

1.4.1. Zajednički kriteriji izvođenja i drugi zahtjevi za potvrдне 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 reagensa trebali bi biti podvrgnuti cijelom postupku istovremeno sa svakom serijom ispitivanih uzoraka. Preporučeni redoslijed ubacivanja ekstrakta u analitički instrument je slijedeći: slijepa proba reagensa, 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 dobio rastvor 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 posude dobrog kvaliteta. 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 kalibracije, bilo pomoću potvrđenog standardnog materijala ili postupkom standardnog dodavanja, mora se paziti da se ne prekorači radno područje utvrđeno za analizu. Kalibracijski standardi se moraju obavezno pripremiti u rastvoru koji se, što je moguće više, podudara sa sastavom rastvora uzorka. Ako to zahtijevaju specifične analitičke okolnosti, primjenjuje se i korekcija nespecifičnog signala (engl. background korekcija).

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

1.4.2.1. Istinitost kvantitativnih metoda

Kod višekratnog analiziranja ovjerenog referentnog materijala za hemijske 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 dodate u nepoznati uzorak koji se ispituje, uz izračun iskorištenja. Skreće se pažnja na činjenicu da, za razliku od analita, dodata količina elementa nije hemijski vezana u ispitivanom matriksu te da stoga tako dobijeni rezultati imaju manju valjanost od rezultata dobijenih upotrebom 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

Medulaboratorijski koeficijent varijacije (CV) za opetovane analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uslovima obnovljivosti, ne smije biti veći od slijedećih vrijednosti:

Tabela 8.
CV za kvantitativne metode poredane po frakcijskoj masi elemenata

Frakcijska masa	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 supstanca u uzorcima bude potpuno raščinjena prije DPASV određivanja. Na voltamogramu se ne smije vidjeti niti jedan široki signal nastao zbog prisutnosti organske supstance. Anorganski sastojci matriksa mogu uticati na visinu pikova pri DPASV postupku. Stoga se kvantifikacija mora obaviti metodom standardnog dodavanja. Primjerci tipičnih voltamograma rastvora 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 zbog toga 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 dužine). Kalibracijski standard se priprema u rastvoru matriksa čiji je sastav što je moguće sličniji sastavu rastvora 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 stepena čistoće. Ovisno od načina 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. Posebno 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 laboratoriji često utiče na tačnost pri radu s grafitnom peći na nivoima ultra tragova. Stoga se pri radu s uzorkom i standardom moraju upotrebljavati reagensi visoke čistoće, deionizirana voda i posude od inertne plastike. Instrument se mora optimalno podešiti za svaki element. Moraju se posebno provjeriti uslovi prethodne obrade uzorka, atomizacije (temperatura, vrijeme) i modifikacija matriksa.

Rad pod izotermnim uslovima atomizacije (npr. popriječna zagrijana grafitna cijev s ugrađenom Lžvovom (Lvov) platformom) smanjuje uticaj matriksa pri atomizaciji analita. Kombinacija modifikacije matriksa i Zeemanove korekcije nespecifične apsorpcije, dopušta kvantifikaciju pomoću kalibracijske krive koja se zasniva na mjerenju vodenog rastvora standarda.

1.4.5. Specifični zahtjevi za atomsku apsorpcijsku spektrometriju uz stvaranje 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 tačne vrijednosti ukupnog sadržaja elementa. Zbog toga se preporučuje mikrovalno razaranje ili spaljivanje pod visokim pritiskom uz oštre oksidacijske uslove. Najveća se pažnja mora posvetiti potpunom i reproducibilnom pretvaranju elemenata u njihove hidride.

Stvaranje arsenova hidrida u rastvoru solne kiseline s NaBH_4 ovisi od oksidacijskog stepena arsena (As III: brza stvaranje, 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 sistemu, 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, kalibracijskim rastvorima i rastvorima uzorka. Rad sa serijama uzoraka omogućava, ne dovodeći u pitanje tačnost, određivanje obje vrste arsena. Radi sporije reakcije AS V sa NaBH_4 , kalibracija 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 pažnja tokom cijelog postupka. Mora se pažljivo 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 sistemi s mikrovalnim razaranjem ili spaljivanjem pod visokim pritiskom. Oprema koja je došla u doticaj sa živom mora se posebno pažljivo očistiti.

Upotreba 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 omogućava istovremeno mjerenje više različitih elemenata. Da bi se primijenila metoda ICP-AES, u uzorcima se najprije mora razgraditi organska supstanca. U tu se svrhu primjenjuju zatvoreni sistemi mikrovalnog razaranja ili spaljivanja pod visokim pritiskom. Da bi ICP-AES analiza bila efikasna,

od ključne su važnosti kalibriranje uređaja i odabir elementa odnosno valne dužine. U slučaju linearnih kalibracijskih krivih, obično je dovoljno izmjeriti samo četiri koncentracije kalibracijskog rastvora, jer su kalibracijske krive kod ICP-AES postupka uglavnom linearnе duž četiri do šest redova veličina koncentracije. Kalibracija ICP-AES sistema uglavnom se obavlja standardom koji sadrži više elemenata, a koji se priprema u rastvoru s istom koncentracijom kiseline kao i mjerni rastvor. Radi linearnosti kalibracijske krive treba provjeriti koncentracije elemenata.

Odabir valnih dužina za mjerenje emisije analita mora biti u skladu s koncentracijama elemenata koji se određuju. Ako je koncentracija analita izvan raspona djelovanja jedne emisijske linije, mora se primijeniti druga emisijska linija. Najprije se bira najosjetljivija emisijska 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, direktno spektralno preklapanje i složeni pozadinski pomak. Svaka ova smetnja ima vlastiti uzrok i lijekove. Interferencije se ispravljaju, a radni parametri optimiziraju, ovisno od matriksa. 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, na primjer, 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 hrom, 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, uticaj matriksa i interferencije molekulskih iona ($m/z < 80$). Da bi se ispravio instrumentalni pomak i učinci matriksa treba pripremiti više unutrašnjih standarda koji pokrivaju isti maseni raspon kao i elementi koji se ispituju.

Prije mjerenja postupkom ICP-MS, neophodna je potpuna razgradnja organske supstance 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), vodonikom, ugljenikom, azotom i kiseonikom (porijeklom iz kiselina za otapanje, iz atmosfere, ili kao nečistoće plazmenog plina) s matriksom. Kako bi se izbjegle interferencije, neophodno 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. azotne 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 unutrašnjih standarda, provjeriti odziv instrumenta na Fano faktore.

PRILOG II

2. VRJEDNOVANJE METODE (VALIDACIJA)

Vrjednovanjem se mora pokazati da analitička metoda udovoljava kriterijima koji se odnose na odgovarajuće karakteristike efikasnosti.

Različiti ciljevi kontrole zahtijevaju različite kategorije metoda. Slijedeća tabela pokazuje koje se karakteristike izvedbe provjeravaju za svaku vrstu metode.

Tabela 9.

Klasifikacija analitičkih metoda u odnosu na dobijene karakteristike efikasnosti

		Sposobnost dokazivanja $CC\beta$	Granična koncentracija analita $CC\alpha$	Tačnost/ oporavak	Preciznost	Selektivnost/ specifičnost	Primjenjivost/ robusnost/stabilnost
Kvalitativne metode	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvantitativne metode	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+
S= screening metoda; C = potvrdna metoda; + = determinacija je obavezna							

2.1. POSTUPCI VRJEDNOVANJA

U ovom poglavlju su navedeni primjeri i/ili upućivanja za postupke vrjednovanja analitičkih metoda. Mogu se primijeniti i drugi postupci kako bi se pokazalo da analitička metoda udovoljava kriterijima efikasnosti, uz uslov da pružaju isti nivo i kvalitet informacija.

Vrjednovanje 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 jednoj laboratoriji odnosno unutrašnje vrjednovanje. Ovaj se dio usredotočuje na studije unutar jedne laboratorije (unutrašnje vrjednovanje) uz modularni postupak. Ovaj se postupak sastoji od:

1. skupa zajedničkih karakteristika efikasnosti koje su neovisne o primijenjenom modelu vrjednovanja i
2. specifičnijih postupaka ovisnih od modela, kao što je opisano u tabeli 10.

Tabela 10.

Model-ovisni i model-neovisni parametri efikasnosti

Validacija		
Model-neovisni parametri efikasnosti	Model-ovisni parametri efikasnosti	
Zajedničke karakteristike efikasnosti (2.1.1)	Konvencionalni pristup validaciji (2.1.2)	Kućni pristup validaciji (2.1.3)

Specifičnost	Obnavljanje	Obnavljanje
Tačnost	Ponavljanje	Ponavljanje
Robusnost: manje promjene	Obnovljivost unutar laboratorije	Obnovljivost unutar laboratorije
Stabilnost	Obnovljivost	Obnovljivost
	Granična koncentracija analita (CC α)	Granična koncentracija analita (CC α)
	Sposobnost dokazivanja (CC β)	Sposobnost dokazivanja (CC β)
	Kalibracijske krive	Kalibracijske krive
	Robusnost: manje promjene	Robusnost

2.1.1. Karakteristike efikasnosti neovisne od modela

Bez obzira koji se postupak vrjednovanja primjenjuje, moraju se odrediti sljedeće karakteristike efikasnosti. Da bi se smanjio obim posla, može se primijeniti pažljivo osmišljeni i statistički utemeljeni postupak u kojem 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 supstanci (izomera, metabolita, produkata razgradnje, endogenih supstanci, sastojaka matriksa, itd.). Neophodno je provesti dva postupka kako bi se provjerile interferencije.

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

- odabere se niz hemijski srodnih spojeva (metabolita, derivata, itd.) ili drugih supstanci 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 kojem očekujemo otpuštanje dokazivanog analita;
- osim toga, reprezentativni slijepi uzorci moraju se obogatiti do odgovarajuće koncentracije supstancama 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 uticaj na kvantifikaciju.

2.1.1.2. Istinitost

U ovome se stavu opisuje određivanje istinitosti (jedne komponente tačnosti). Istinitost se može utvrditi jedino pomoću potvrđenog referentnog materijala (CRM). Kad god je na raspolaganju potvrđeni referentni materijal, isti se mora upotrijebiti. Postupak je detaljno opisan u normi BAS 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 s 100, da bi se rezultat izrazio u postotku.

Istinitost (%) = srednja vrijednost dokazane koncentracije korigirana iskorištenjem $\times 100$ / 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 posmatranje njihovih posljedica.

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

- odrede se faktori koji bi mogli uticati 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 utiče 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 utiču na rezultate.

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

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

Tabela 11.
Dizajn eksperimenta za studije robusnosti (manje promjene)

Faktor vrijednosti F	Kombinacija broja determinacija							
	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
Posmatrani rezultat R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Za procjene vidi primjer testiranja robusnosti u 2.3.								

2.1.1.4. Stabilnost

Zapaženo je da nedovoljna stabilnost analita ili sastojaka matriksa u uzorku tokom pohrane ili analize može dovesti do značajnih odstupanja u konačnom rezultatu analize. Osim toga, trebalo bi

provjeriti stabilnost kalibracijskog standarda u rastvoru. Stabilnost analita u različitim uslovima skladištenja obično je dobro poznata. Praćenje uslova skladištenja sastavni je dio uobičajenog sistema ovlašćivanja laboratorija. Ako stabilnost nije poznata, može se odrediti prema primjerima navedenim u daljnjem tekstu.

Stabilnost analita u rastvoru:

- pripremiti svježeg osnovnog rastvora jednog ili više analita (stock) i razrijediti ih prema uputama za ispitivanje, kako bi dobili dovoljno alikvota (npr. 40) svake odabrane koncentracije (otprilike na naivou najmanje zahtijevane granice efikasnosti izvođenja metode za supstance za koje nije utvrđena dopuštena količina, odnosno oko dopuštene granice za ostale supstance). Pripremiti rastvor analita koji je upotrijebljen za obogaćivanje kao i onoga koji će se upotrijebiti u konačnom rastvoru za analizu, te bilo koji drugi značajan rastvor (npr. derivatizirani standardi),
- izmjeriti udio analita u svježe pripremljenom rastvoru prema uputama za ispitivanje,
- rasporediti odgovarajuće volumene u prikladno laboratorijsko posude, označiti i pohraniti prema slijedećoj šemi:

Tabela 12.
Šema određivanja stabilnosti analita u rastvoru

	-20°C	+4°C	+20°C
Tama	10 alikvota	10 alikvota	10 alikvota
Svijetlo			10 alikvota

– vrijeme skladištenja može iznositi jedan, dva, tri i četiri sedmice, ili po potrebi duže, npr. dok se ne primijete prve pojave degradacije tokom identifikacije i/ili kvantifikacije. Mora se zabilježiti maksimalno vrijeme skladištenja i optimalni uslovi skladištenja,

– koncentraciju analita u svakom alikvotu treba izračunati uzimajući kao 100%-tnu vrijednost rastvora koji je svježe pripremljen u trenutku analize.

$$C_1 \times 100$$

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

C_1 = trenutna koncentracija

$C_{\text{svježa}}$ = koncentracija svježeg rastvora

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 sedmica te treba izmjeriti koncentracije. Tkivo bi trebalo skladištiti 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 vodenog rastvora. 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 sedmica.

2.1.1.5. Kalibracijska kriva

Kad se kalibracijske krive primjenjuju u svrhu kvantifikacije:

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

Ako je potrebno serijsko kalibriranje na osnovu standardnog rastvora, treba naznačiti prihvatljive raspone parametara kalibracijske krive, koji mogu varirati od serije do serije.

2.1.2. Uobičajeni postupak vrjednovanja (validacije)

Izračunavanje parametara u skladu s uobičajenim metodama zahtijeva izvođenje nekoliko pojedinačnih ispitivanja. Mora se odrediti svaka karakteristika efikasnosti za svaku veću promjenu (vidi »robusnost«). Metodama za ispitivanje više analita moguće je istovremeno analizirati nekoliko analita, uz uslov da su prethodno isključene interferencije koje bi mogle biti značajne. Na isti način se može odrediti nekoliko karakteristika efikasnosti. 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, uopotrebu obogaćenog matriksa, primjenjujući slijedeće postupke:

- odabrati 18 alikvota kontrolnog uzorka i podijeliti ih u tri grupe po šest alikvota, pa svakoj grupi dodati analita u količini koja je 1, 1,5 i 2 puta veća od najmanje zahtijevane granice efikasnosti izvođenja 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 jednačine izračunati iskorištenje za svaki uzorak,
- izračunati srednje iskorištenje i CV iz šest rezultata u svakoj grupi,

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

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

- se uzorak smatra kontrolnim uzorkom, umjesto uzorkom za analizu,
- se smatra da su konačni maseni udio¹ i iskorištenje^{2,2} slični za oba poduzorka,
- uzorci za ispitivanje imaju iste mase, a ekstrakti poduzoraka za analizu iste volumene,
- količina kalibracijskog standarda koja je dodata drugom (obogaćenom) poduzorku za analizu iznosi x_{ADD} . ($x_{ADD} = \rho_A V_A$)

- 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 uslova nije (ili se pretpostavlja da nije) ispunjen, onda se mora primijeniti cijeli postupak određivanja iskorištenja pomoću standardnog dodavanja, kao što je opisano pod tačkom 2.5.

2.1.2.2. Ponovljivost

Pripremiti određeni broj uzoraka identičnih matriksa, kojima je dodat analit tako da se dobiju koncentracije koje iznose 1, 1,5 i 2 puta veće od najmanje zahtijevane granice efikasnosti izvođenja 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,

¹ Maseni udio: je udio mase analita sadržanog u uzorku, koji je prisutan u konačnom ekstraktu.

² Iskorištenje (ovdje): je udio mase analita dodatog u uzorak, a koji je prisutan i u konačnom ekstraktu. Kroz ostatak dokumenta podrazumijeva se da su maseni udio i iskorištenje jednaki, pa je zbog toga u upotrebi termin »iskorištenje«.

- 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 dodat analit ili više analita, tako da se dobiju koncentracije 1, 1,5 i 2 puta veće od granične koncentracije efikasnosti metode odnosno 0,5, 1 i 1,5 puta veće od dopuštene količine.

- za svaki nivo koncentracije, analizu treba obaviti s najmanje šest ponavljanja,
- ponoviti ove korake još najmanje dva puta, s različitim analitičarima i u različitim uslovima okoliša, npr. s različitim serijama reagensa, rastvarači, 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), laboratorije bi trebale sudjelovati u međulaboratorijskim uporednim ispitivanjima prema normi BAS ISO 5725-2.

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

Granične koncentracije moraju biti uspostavljene u skladu sa zahtjevima za identifikaciju ili identifikaciju plus kvantifikaciju kako je opisano u Prilogu I - „Kriteriji efikasnosti i drugi zahtjevi za analitičke metode“.

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

- postupkom s kalibracijskom krivuljom prema normi ISO 11843 (ovdje nazvana kao kritična vrijednost net varijable stanja). U tom slučaju, koristi se slijepi uzorak koji se obogaćuje na nivou MRPL ili iznad njega, u jednakim razmacima. Analizirati uzorke. Nakon identifikacije, grafički prikazati odnos signala i dodate koncentracije. $CC\alpha$ jednaka je pripadajućoj koncentraciji u tački 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 kojem 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 supstanci za koje je utvrđena dopuštena količina, $CC\alpha$ utvrđuje se:

- postupkom s kalibracijskom krivuljom prema normi ISO 11843 (ovdje nazvana 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 dodate 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 nivo dopuštene granice. Granica odlučivanja jednaka je koncentraciji na dopuštenoj granici uvećanoj za 1,64 odgovarajuće standardne devijacije ($\alpha = 5\%$).

Također, vidi član 5. i tačku 2.2.

2.1.2.6. Sposobnost dokazivanja ($CC\beta$)

Granične koncentracije moraju biti uspostavljene u skladu sa zahtjevima za identifikaciju ili identifikaciju plus kvantifikaciju kako je opisano u Prilogu I - „Kriteriji efikasnosti i drugi zahtjevi za analitičke metode“.

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

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

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

- analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, obogaćenih s jednim ili više analita na nivo granične koncentracije analita CC α . Analizirati uzorke i identificirati analite. Sposobnost dokazivanja jednaka je vrijednosti CC α 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 α . U tom slučaju, sposobnost dokazivanja metode jednaka je nivou koncentracije kod koje ima samo 5 % ili manje lažno negativnih rezultata. Zbog toga je potrebno obaviti najmanje 20 ispitivanja za najmanje jedan nivo koncentracije, kako bi se osigurala pouzdana osnova za ovo određivanje.

U slučaju supstanci za koje je utvrđena dopuštena količina, CC β utvrđuje se:

- postupkom s kalibracijskom krivom prema normi ISO 11843 (ovdje nazvana kao najmanja određena vrijednost net varijable stanja). U tom slučaju, koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji se obogaćuje analizom oko dopuštene granice u jednakim razmacima. Analizirati uzorke i identificirati analit ili analite. Izračunati standardnu devijaciju srednjeg udjela izmjerenog na nivou 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 nivou granične koncentracije analita CC α . Sposobnost dokazivanja jednaka je vrijednosti CC α uvećanoj za 1,64 odgovarajuće standardne devijacije ($\beta = 5\%$).

Vidi, tačku 2.2.

2.1.2.7. Robusnost (značajne promjene)

Analitičku metodu bi trebalo ispitati pod različitim eksperimentalnim uslovima koji uključuju npr. različite vrste, različite matrikse ili različite uslove 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 utiču na provođenje ispitivanja trebalo bi odrediti svaku karakteristiku efikasnosti.

2.1.3. Vrednovanje prema alternativnim modelima

Ako se primjenjuju alternativni postupci vrednovanja, u protokolu izvođenja validacije potrebno je utvrditi osnovni model i strategiju s odgovarajućim preduslovima, pretpostavkama i formulama ili barem na njih uputiti. U daljnjem tekstu se navodi primjer alternativne metode. Primjenjuje li se npr. model unutrašnjeg vrednovanja, karakteristike efikasnosti 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 faktora koji se ispituju. Zbog toga se kao prvi korak u cijelom postupku vrednovanja razmatraju populacijski uzorci koji će se u budućnosti analizirati u laboratoriji, kako bi se odabrale najvažnije vrste i oni faktori koji bi mogli uticati na rezultate mjerenja. Nakon toga, odabire se raspon koncentracije koji je prilagođen svrsi u skladu s nivoom značajnosti.

Primjer:

- pomoću metode koja se vrednuje moguće je istovremeno ispitati nekoliko analita,
- utvrđene su dvije varijacije vodećeg faktora (A i B). Vodeći faktori su osnova na kojoj se

kombiniraju nivoi faktora. Ti vodeći faktori mogu uključivati faktore kao što su vrsta uzorka ili matriks. U ovom primjeru je vodeći faktor promijenjen na dva nivoa, tj. razmatrane su dvije različite vrste (A i B). Općenito, moguće je promijeniti vodeće faktore na više od dva nivoa, čime se samo povećava broj analiza koje treba obaviti,

- odabrane faktore treba promijeniti na dva nivoa (označene kao + ili –).

Tabela 13.
Primjeri faktora koji se smatraju važni za proces validacije

Pol životinje	(faktor 1)
Rasa	(faktor 2)
Uslovi transporta	(faktor 3)
Uslovi skladištenja	(faktor 4)
Svježina uzorka	(faktor 5)
Uslovi tova	(faktor 6)
Različiti operateri s različitim iskustvom	(faktor 7)

Tabela 14.
Mogući eksperimentalni plan za gornji primjer

Vrsta	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Uzorak br.
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

Obzirom da se svaki uzorak (svaka kombinacija nivoa faktora) mora pomiješati s četiri različite koncentracije oko nivoa značajnosti, a za svaki nivo se mora analizirati jedan slijepi uzorak, za cijeli postupak vrjednovanja mora se obaviti $5 \times 16 = 80$ analiza.

Na osnovu ovih 80 rezultata mjerenja moguće je izračunati slijedeće:

Iskorištenje

- ponovljivost po nivou koncentracije (S_{tr}),
- unutarlaboratorijska obnovljivost po nivou koncentracije (S_{tr}),
- granična koncentracija analita ($CC\alpha$),
- sposobnost dokazivanja ($CC\beta$),
- kriva djelotvornosti (postotak β -pogreške u odnosu na koncentraciju (vidi tačku 2.1.3.2.),
- robusnost u odnosu na značajne promjene; robusnost u odnosu na manje promjene može se odrediti prema tački 2.1.1.3.,
- 16 kalibracijskih krivi vezanih za uzorke,
- jedna ukupna kalibracijska kriva,
- interval očekivanja sveobuhvatne kalibracijske krive,
- devijacije uzrokovane matriksom (S_{mat}),
- devijacije uzrokovane procesom analize (S_{mb}),
- uticaj pojedinačnih faktora na rezultate mjerenja.

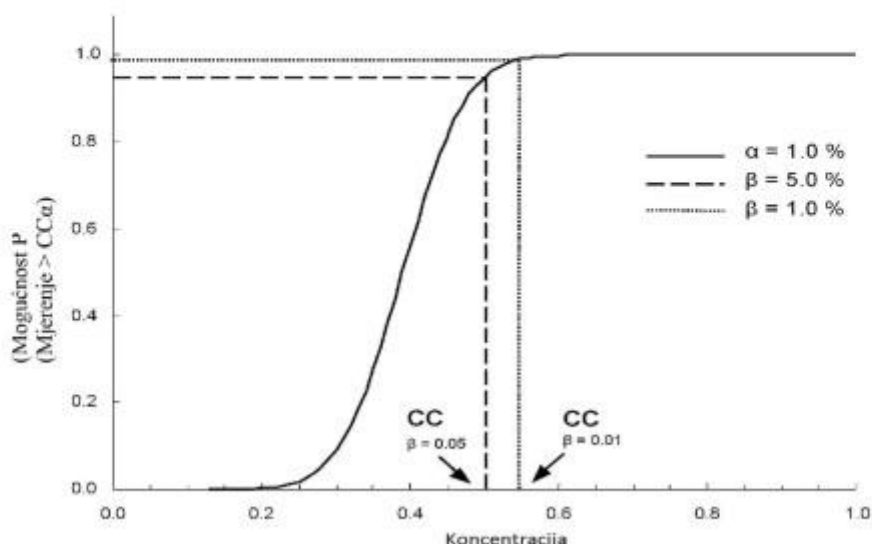
Ove karakteristike efikasnosti omogućavaju iscrpnu ocjenu efikasnosti metode, obzirom da se ne ispituje uticaj samo pojedinačnih faktora, nego i odgovarajuća kombinacija tih faktora. Uz pomoć ovakvog plana ispitivanja moguće je odrediti hoće li se neki od odabranih faktora isključiti iz ukupne kalibracijske krive zbog značajnog odstupanja od standardnih devijacija ostalih faktora.

2.1.3.2. Kriva djelotvornosti

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

Slika 1.

Kriva djelotvornosti



Slika 1. prikazuje primjer grafičkog prikaza sposobnosti dokazivanja (CCB) 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

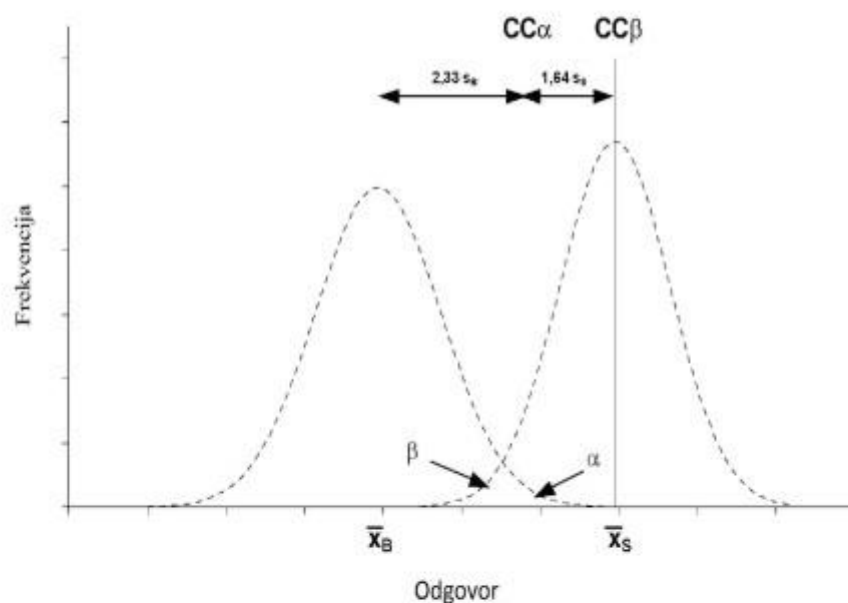
Utvrđivanje obnovljivosti metode putem unutarlaboratorijskog ispitivanja (interna validacija) zahtjeva opetovana sudjelovanja u ispitivanjima osposobljenosti u skladu s uputama BAS ISO/IEC Vodiča 43-1 i 43-2.

Laboratorije mogu primjenjivati metode po vlastitom izboru, uz uslov da se te metode primjenjuju pod rutinskim uslovima. Standardna devijacija laboratorije može se upotrijebiti za ocjenu obnovljivosti metode.

2.2. GRAFIČKI PRIKAZ RAZLIČITIH ANALITIČKIH GRANICA

Slika 2.

Supstance za koje nije utvrđena dopuštena količina



$\bar{x}_S$ srednja vrijednost rezultata kontaminiranog uzorka

S_B standardna devijacija slijepog uzorka (utvrđena u uslovima unutarlaboratorijske obnovljivosti)

S_S standardna devijacija kontaminiranog uzorka (utvrđena u uslovima unutarlaboratorijske obnovljivosti)

α postotak lažno pozitivnih rezultata

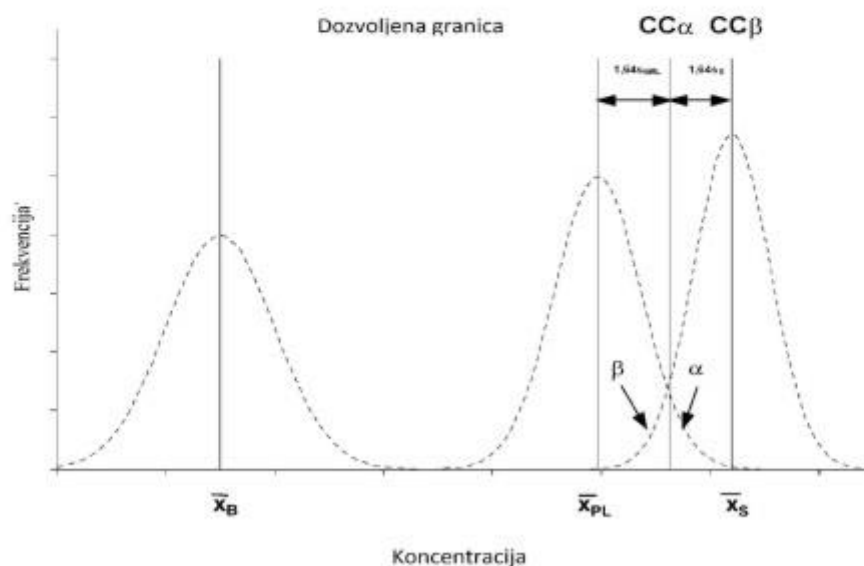
β postotak lažno negativnih rezultata

$CC\alpha$ odgovor s određenom α -pogreškom i β -pogreškom od 50%

$CC\beta$ odgovor s vrlo malom α -pogreškom i β -pogreškom

Slika 3.

Supstance za koje je utvrđena dopuštena količina



$\bar{x}_B$ srednja »koncentracija« slijepog uzorka

$\bar{x}_{PL}$ srednja koncentracija uzorka koji sadrži analit na dopuštenoj granici

$\bar{x}_S$ srednja koncentracija kontaminiranog uzorka

s_{PL} standardna devijacija uzorka koji sadrži analit na dopuštenoj granici (utvrđena u uslovima međulaboratorijske obnovljivosti)

s_S standardna devijacija kontaminiranog uzorka (utvrđena u uslovima međulaboratorijske 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 određenom β -pogreškom

2.3. PRIMJER IZRAČUNA KOD ISPITIVANJA ROBUSNOSTI U ODNOSU NA MANJE PROMJENE PREMA YOUDENOVJOJ METODI

Upoređivanje prosjeka (A)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$A_d = \Sigma(d_i)/4$$

$$A_e = \Sigma(e_i)/4$$

$$A_f = \Sigma(f_i)/4$$

$$A_g = \Sigma(g_i)/4$$

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

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

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

Razlike (D_i)

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

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

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

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

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

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

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

Kvadrati razlika (D_i^2)

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

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

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

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

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

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

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

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 uslovima obnovljivosti (vidi gore), neizbježan je zaključak da svi faktori zajedno utiču na rezultat, čak i ako svaki pojedini faktor ne pokazuje značajni uticaj, te da metoda nije dovoljno robusna u odnosu na odabrane modifikacije.

2.4. PRIMJER IZRAČUNA ZA UNUTRAŠNJI POSTUPAK VRJEDNOVANJA

Primjeri i izračuni za protokol unutrašnjeg vrjednovanja kako su opisani u poglavlju o vrjednovanju 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 rastvora koncentracije analita ρ_A . Postupcima ekstrakcije i pročišćavanja koji su propisani metodom, dobijena su dva ekstrakta poduzoraka, 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:

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

Ovom se metodom može odrediti iskorištenje rc . Zatim, osim gore opisanog ispitivanja, dijelu ekstrakta poduzorka 1 (volumena V_3) dodaje se poznata količina $\rho_B \cdot V_B$ analita te se testira. Analitička reakcija je x_3 , a iskorištenje je:

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

Osim toga, može se izračunati osjetljivost b , kao:

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

Opisani su svi uslovi primjene i detalji.

PRILOG III
NAJMANJE ZAHTIJEVANE GRANICE EFIKASNOSTI IZVOĐENJA METODA

Analitičke metode koje se primjenjuju za dokazivanje slijedećih supstanci moraju zadovoljiti najmanje zahtijevane granice efikasnosti izvođenja metode navedene u tabeli 15:

Tabela 15.
Najmanje zahtijevane granice efikasnosti

Supstance i/ ili metaboliti	Matriksi	MRPL
Hloramfenikol	Meso Jaja Mlijeko Urin Proizvodi akvakulture med	0,3 µg/kg
Medroksiprogesteron acetat	Svinjsko bubrežno masno tkivo	1 µg/kg
Metaboliti nitrofurana: - furazolidon - furaltadon - nitrofurantoin - nitrofurazon	Meso peradi Proizvodi akvakulture	1 µg/kg za sve
Zbir malahit zelene i leukomalahit zelene	Meso do proizvoda akvakulture	2 µg/kg

PRILOG IV

SKRAĆENICE

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 hemičara
B	(engl. bound fraction (immunoassays)) vezana frakcija (imunotest)
CI	(engl. chemical ionisation) hemijska 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 hromatografija
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 hromatografija
HPLC	(engl. high performance liquid chromatography) tekućinska hromatografija visoke djelotvornosti
HPTLC	(engl. high performance thin layer chromatography) tankoslojna hromatografija 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 hromatografija
LR(MS)	(engl. low resolution (mass spectrometry) (masena spektrometrija) niske razlučivosti
MRPL	(engl. Minimum required performance limit) najmanja zahtijevana granica efikasnosti izvođenja 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 laboratorije
SIM	(engl. selected ion monitoring) praćenje odabranih iona
TLC	(engl. thin layer chromatography) tankoslojna hromatografija
UV	(engl. ultraviolet light) ultraljubičasto zračenje
VIS	(engl. visible light) vidljivo zračenje