

Na osnovu člana 91 stav 4 Zakona o veterinarstvu ("Službeni list CG", broj 30/12) Ministarstvo poljoprivrede i ruralnog razvoja, donijelo je

Pravilnik o metodama kontrole rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog porijekla*

Pravilnik je objavljen u "Službenom listu CG", br. 45/2014 od 24.10.2014. godine, a stupio je na snagu 1.11.2014.

* U ovaj pravilnik prenesena je Odluka Komisije 2002/657 od 14 avgusta 2002. o implementaciji Direktive Savjeta 96/23/EC za vršenje analitičkih metoda i tumačenja rezultata

Član 1

Ovim pravilnikom propisuju se metode kontrole rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog porijekla.

Član 2

Izrazi upotrijebljeni u ovom pravilniku imaju sljedeća značenja:

- 1) **tačnost** je stepen podudarnosti između rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednost, koja se određuje utvrđivanjem istinitosti i preciznosti;
- 2) **alfa (α) greška** je vjerovatnoća da je ispitani uzorak stvarno negativan, iako su dobijeni pozitivni rezultati (lažno pozitivni rezultat);
- 3) **analit** je supstanca koju treba dokazati, identifikovati i/ili kvantifikovati i njeni derivati koji se stvore tokom analize;
- 4) **beta (β) greška** je vjerovatnoća da je ispitani uzorak stvarno pozitivan, iako su dobijeni negativni mjerni rezultati (lažno negativni rezultat);
- 5) **mjerno odstupanje (Bias)** je razlika između očekivanog rezultata ispitivanja i prihvaćene referentne vrijednosti;
- 6) **kalibracioni standard** je količina supstance koja vezuje vrijednost sa referentnom bazom;
- 7) **sertifikovani referentni materijal (CRM)** je materijal u kojem je utvrđen određen sadržaj analita;
- 8) **ko-hromatografija** je postupak u kojem se ekstrakt uzorka prije hromatografisanja, dijeli na dva dijela, od kojih se jedan dio podvrgava hromatografiji kao takav, a drugi dio se miješa sa standardom analita koji se ispituje i na isti način podvrgava hromatografiji, a količina dodanog standardnog analita mora biti približna procijenjenoj količini analita u ekstraktu, radi poboljšanja identifikacije analita pri upotrebi hromatografske metode, pogotovo kada nije dostupan odgovarajući interni standard;
- 9) **uporedno ispitivanje** je analiziranje istog uzorka istom metodom kako bi se provjerile performansne karakteristike metode uključujući ispitivanje slučajne mjerne greške i mjerno odstupanje laboratorija;

10) **potvrдна metoda** je metoda kojom se dobijaju potpuni ili dodatni podaci na osnovu kojih je određenu supstancu moguće jasno identifikovati i po potrebi kvantifikovati na nivou značajnosti;

11) **granična koncentracija analita (CC_α)** je granica na kojoj i iznad koje se može zaključiti, uz vjerovatnoću α greške da je uzorak pozitivan;

12) **sposobnost dokazivanja (CC_β)** je najmanji sadržaj supstance koji je moguće dokazati metodom, identifikovati i/ili kvantifikovati u uzorku, uz vjerovatnoću β greške, a slučaju supstance za koju nije utvrđena dozvoljena količina, sposobnost dokazivanja je najniža koncentracija koja se može dokazati sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$ u kontaminiranom uzorku, a u slučaju supstance za koje je utvrđena dozvoljena količina, sposobnost dokazivanja je koncentracija koja se može dokazati, sa statističkom sigurnošću od $1 - \beta$, uz ustanovljenu dozvoljenu koncentraciju;

13) **obogaćeni uzorak** je uzorak kojem je dodata poznata količina analita koji treba dokazati;

14) **međulaboratorijsko ispitivanje** je organizovanje, vršenje i ocjena ispitivanja identičnog uzorka u dvije ili više laboratorija prema unaprijed određenim uslovima, kako bi se provjerili uslovi vršenja ispitivanja, kao uporedno ispitivanje ili ispitivanje osposobljenosti;

15) **interni standard (IS)** je supstanca koja nije sadržana u uzorku, čija su fizičko-hemijska svojstva što je moguće sličnija svojstvima analita kojeg treba identifikovati i koji se dodaje svakom uzorku i svakom kalibracionom standardu;

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

17) **nivo značaja** je koncentracija supstance ili analita u uzorku koja je u skladu sa važećim propisima;

18) **minimalno potrebna granica efektivnosti (MRPL)** je najmanji sadržaj analita u uzorku koji se mora dokazati i potvrditi i služi za usklađivanje efektivnosti analitičkih metoda za one supstance za koje dozvoljena granica nije ustanovljena (tj. ne smiju biti prisutne);

19) **efektivnost** je funkcionalni kvalitet koji se može pripisati analitičkoj metodi, a to mogu biti: specifičnost, tačnost, istinitost, preciznost, ponovljivost, obnovljivost, iskorištenje (engl. recovery), sposobnost dokazivanja i robusnost;

20) **kriterijum efektivnosti** su zahtjevi u pogledu efektivnosti prema kojima se može ocijeniti da analitička metoda odgovara svrsi i da daje pouzdane rezultate;

21) **dozvoljeni nivo** predstavlja maksimalni propisani nivo rezidua, maksimalni nivo ili drugi maksimum tolerancije za supstance;

22) **preciznost** je stepen podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobijenih po unaprijed određenim propisanim uslovima, obično se izražava kao nepreciznost i računa kao standardna devijacija rezultata ispitivanja, jer što je manja preciznost, veća je standardna devijacija;

23) **ispitivanje osposobljenosti** je analiziranje istog uzorka, pri čemu laboratorije mogu primijeniti metode po sopstvenom izboru, uz uslov da se te metode primijene pod uobičajenim uslovima. Ispitivanje se mora vršiti u skladu sa smjernicama ISO/IEC 43-1 i 43-2 i može služiti za ocjenu ponovljivosti metoda;

24) **kvalitativna metoda** je analitička metoda kojom se supstanca identifikuje na bazi svojih hemijskih, bioloških i fizičkih svojstava;

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

26) **slijepa proba sa reagensom** podrazumijeva primjenu cjelokupnog analitičkog postupka bez ispitnog dijela uzorka ili uz jednaku količinu odgovarajućeg rastvarača umjesto uzorka;

27) **iskorišćenje (engl. recovery)** je procenat stvarne koncentracije supstance izdvojene tokom analitičkog postupka, a određuje se tokom vrednovanja (validacija) metode, ako sertifikovani referentni materijal nije dostupan;

28) **referentni materijal** je materijal čija su jedno ili više svojstava potvrđena vrednovanom metodom, tako da se može koristiti za kalibraciju instrumenta ili potvrdu mjerne metode.

29) **ponovljivost** je preciznost u uslovima ponovljivosti;

30) **uslovi ponovljivosti** su uslovi pod kojima isti analitičar, koristeći istu opremu u istoj laboratoriji, dobije nezavisne rezultate ispitivanja primjenjujući istu metodu na istim ispitivanim uzorcima;

31) **obnovljivost** je preciznost pod uslovima obnovljivosti;

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

33) **robustnost** je podložnost analitičke metode na promjene uslova ispitivanja u odnosu na različitost vrste uzoraka, analita, uslove skladištenja, uslove sredine i/ili uslove pripreme uzoraka pod kojima se metoda može primjenjivati onakva kakva jeste ili uz utvrđene manje izmjene, a potrebno je uzeti u obzir sve uslove ispitivanja koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama, a mogu uticati na rezultat analize (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH, temperatura);

34) **slijepa proba sa uzorkom** je primjena cijelog analitičkog postupka na dijelu uzorka za analizu koji je uzet iz uzorka u kojem nema analita;

35) **orijentaciona metoda (engl. screening)** je metoda koja se primjenjuje u cilju dokazivanja prisutnosti neke supstance ili vrste supstance na nivou značaja, ove metode odlikuje sposobnost brze obrade velikog broja uzoraka i koriste se za analiziranje velikog broja uzoraka u cilju otkrivanja mogućih pozitivnih rezultata, a posebno su dizajnirane da izbjegnu davanje lažno negativnih rezultata;

36) **ispitivanje unutar jedne laboratorije (unutrašnje vrednovanje-validacija)** je 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;

37) **specifičnost** je svojstvo metode da se razlikuje analit koji se određuje od drugih supstanci, ova karakteristika zavisi prije svega od opisane tehnike mjerenja, ali može varirati zavisno od vrste smjese ili matriksa;

38) **standardni dodatak** je postupak pri kojem se uzorak za ispitivanje dijeli na dva (ili više) ispitnih manjih uzoraka za analizu, jedan uzorak 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 sadržaj analita u uzorku, uzimajući u obzir iskorišćenje (engl. recovery) analitičkog postupka;

39) **standardni analit** je analit poznatog i sertifikovanog sadržaja i čistoće koji se u analizi koristi kao referentni;

40) **supstanca** je materija posebnog ili određenog hemijskog sastava i njeni metaboliti;

41) **poduzorak** je količina materijala uzeta iz uzorka na kojem se vrši testiranje;

42) **uzorak za ispitivanje** je uzorak pripremljen iz laboratorijskog uzorka od kojeg će se uzimati poduzorci za analizu;

43) **istinitost** je stepen podudarnosti između srednje vrijednosti veće serije rezultata i prihvaćene referentne vrijednosti, a obično se izražava mjernim odstupanjem (bias).

44) **jedinice** su jedinice koje su opisane u ISO/IEC 8000.

45) **vrednovanje metode (validacija)** je potvrđivanje metode ispitivanjem i obezbjeđivanjem stvarnih dokaza da su ispunjeni posebni zahtjevi u pogledu specifične primjene.

46) **obnovljivost unutar laboratorije** je preciznost dobijena u istoj laboratoriji pod propisanim (unaprijed određenim) uslovima (npr. metoda, materijal koji se ispituje, analitičari, okolina) u opravdano dužim vremenskim razmacima.

Član 3

Uzorci za kontrolu rezidua u životinjama i proizvodima životinjskog porijekla ispituju se:

- prema instrukcijama za ispitivanje u skladu sa MEST ISO 78-2:2011;
- prema kriterijumima efektivnosti i drugim zahtjevima za analitičke metode date u Prilogu 1 koji je sastavni dio ovog pravilnika;

Član 4

Minimalno potrebna granica efektivnosti (MRPL) za analitičke metode za dokazivanje: hloramfenikola, metabolita nitrofurana, medroksiprogesterona i malahit zelenog data je u Prilogu 2 koji je sastavni dio ovog pravilnika.

Član 5

Kvalitet rezultata ispitivanja uzoraka vrši se praćenjem ispitivanja i/ili rezultata kalibracije u skladu sa tačkom 5.9 MEST EN ISO/IEC 17025:2011.

Član 6

Rezultat analize je pozitivan ako je veći od granične količine analita po potvrdnoj metodi.

Ako je za neku supstancu utvrđena dozvoljena količina analita, granična količina je količina iznad koje je moguće, sa statističkom sigurnošću od $1-\alpha$, utvrditi da je dozvoljena količina premašena.

Ako za neku supstancu nije utvrđena dozvoljena količina analita, granična količina je najmanji nivo koncentracije koji se može dokazati ispitivanjem sa sigurnošću od $1 - \alpha$.

Za supstance date u Prilogu 3 koji je sastavni dio ovog pravilnika, koje imaju anabolički efekat, nedozvoljene supstance i supstance za koje se ne može odrediti maksimalno dozvoljena količina, a greška može biti 1% ili niža, a za ostale supstance 5% ili niža.

Član 7

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu Crne Gore".

Broj: 323-25/14-4

Podgorica, 15. oktobra 2014. godine

Ministar,
Prof. dr **Petar Ivanović**, s.r.

KRITERIJUMI EFEKTIVNOSTI I DRUGI ZAHTIJEVI ZA ANALITIČKE METODE

Analitičke metode ili kombinacija metoda koje se razlikuju od metoda datih u ovom prilogu mogu se koristiti kao orijentacione ili potvrđne metode ako se dokaže da ispunjavaju zahtjeve utvrđene ovim pravilnikom.

1.1. OPŠTI ZAHTIJEVI

1.1.1. Rukovanje uzorcima

Uzorci za kontrolu rezidua se obrađuju i sa njima treba da se postupa na način koji pruža najveću mogućnost dokazivanja supstance i sprečava mogućnost slučajne kontaminacije ili gubitka analita.

1.1.2. Izvodjenje ispitivanja

1.1.2.1. Iskorišćenje

Tokom analize uzoraka iskorišćenje se određuje za svaku seriju uzoraka, ako je iskorišćenje u okviru granica, tada se koristi stalni faktor korekcije u suprotnim, koristi se faktor iskorišćenja koji je dobijen za određenu seriju uzoraka, osim ako se ne primjenjuje specifični faktor iskorišćenja analita u uzorku, pri čemu se za kvantitativno određivanje analita u uzorku primjenjuje postupak standardnog dodatka u skladu sa tačkom 2.5 ovog priloga ili interni standard.

1.1.2.2. Specifičnost

Izbor analitičke metode za ispitivanje treba da bude takav da se u eksperimentalnim uslovima razlikuju analiti od drugih supstanci, a za šta mora da postoji procjena te mogućnosti.

Prilikom primjene analitičke metode treba da se izbjegavaju sve predvidljive smetnje (npr. homologa, analogi, metabolički proizvodi rezidua), a naročito važno je ispitati smetnje koje mogu uzrokovati sastojci matricne ksa.

1.2. ORIJENTACIONE (engl. SCREENING) METODE

Orijentacione (screening) metode mogu se koristiti ako se može dokazati dokumentovano i sledi živo da su validovane i da im je procenat lažno usaglašenih rezultata manji od 5% (β greška) na nivou značaja, a u slučaju sumnje na rezultat ispitivanja, taj rezultat mora se dokazati potvrđnom metodom.

1.3. POTVRDNE METODE ZA REZIDUE I KONTAMINANTE ORGANSKOG PORIJEKLA

Potvrđne metode za rezidue i kontaminante organskog porijekla obezbjeđuju informacije o hemijskoj strukturi analita. Metode koje se zasnivaju isključivo na hromatografskoj analizi, bez primjene spektrometrijskog dokazivanja, nijesu same po sebi odgovarajuće za primjenu kao potvrđne metode, a ukoliko jednoj tehnici nedostaje specifičnost, potrebna specifičnost se postiže analitičkim postupcima koji se sastoje od odgovarajućih kombinacija postupaka prečišćavanja, hromatografskog razdvajanja ili razdvajanja i spektrometrije.

Potvrđne metode, koje se koriste za ispitivanje rezidua ili kontaminanata organskog porijekla date su u Tabeli 1 ovog priloga.

TABELA 1
Potvrđne metode za ispitivanje rezidua ili kontaminanata organskog porijekla

Instrumentalne tehnike	Supstance	
LC ili GC sa masenom spektrometrijom	Grupe A i B	Samo poslije on-line ili off-line hromatografskog razdvajanja Samo ako se koriste tehnike skeniranja ili najmanje 3 (grupa B) ili 4 (grupa A) identifikacione tačke za tehnike koje ne evidentiraju cjelokupni spektar masa
LC ili GC sa IR spektrometrijom	Grupe A i B	Specifični zahtjevi za apsorpciju u IR spektrometriji
LC skeniranje DAD	Grupa B	Specifični zahtjevi za apsorpciju u UV spektrometriji
LC fluorescencija	Grupa B	Samo za molekule sa prirodnom fluorescencijom i molekule koji fluoresciraju nakon transformacije ili derivatizacije
2-D TLC-skeniranje UV/VIS	Grupa B	Dvodimenzionalni HPTLC i ko-hromatografija su obavezni
GC Detekcija zahvatom elektrona	Grupa B	Samo ako se koriste dvije kolone različitog polariteta
LC imunogram	Grupa B	Samo ako su korišćena najmanje 2 različita hromatografska sistema ili drugi nezavisni metod
LC-UV/VIS (jedna talasna dužina)	Grupa B	Samo ako su korišćena najmanje 2 različita hromatografska sistema ili drugi nezavisni metod

1.3.1. Opšti kriterijum efektivnosti i zahtjevi

Potvrđne metode moraju osigurati podatke o hemijskoj strukturi analita.

Ako više jedinjenja daje isti rezultat, metoda ne može praviti razliku između tih jedinjenja.

Ako se u metodi primjenjuje odgovarajući interni standard, on se dodaje poduzorku za analizu na početku postupka ekstrakcije.

Zavisno od raspoloživosti, upotrebljavaju se ili stabilni oblici analita obično izotopom, koji su pogodni za dokazivanje masenom spektrometrijom ili jedinjenja koji su po svojoj strukturi slična analitu.

Ako se ne može upotrijebiti odgovarajući interni standard, identifikacija analita potvrđuje se ko-hromatografijom, a u tom slučaju dobija se samo jedan pik, pri čemu visina ili površina pika odgovara količini dodanog analita.

Za gasnu hromatografiju (GC) ili tečnu hromatografiju (LC), širina pika na polovini visine mora biti između 90 – 110% raspona izvorne širine pika, a retencionna vremena moraju biti jednaka uz toleranciju od 5%.

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

Referentni ili obogaćeni materijal koji sadrži poznate količine analita na ili u blizini dozvoljene količine ili granične količine (pozitivni kontrolni uzorak) kao i negativni kontrolni materijali i slijepe probe sa reagensom, treba da budu podvrgnuti cijelom postupku istovremeno sa svakom serijom analiziranih uzoraka za ispitivanje.

Redosljed analiza ekstrakta korišćenjem analitičkog instrumenta je: slijepa proba sa reagensom, negativni kontrolni uzorak, uzorak ili uzorci koji se potvrđuju, negativni kontrolni uzorak i na kraju pozitivni kontrolni uzorak, a svaka izmjena redosljeda treba da se opravda.

1.3.2. Dodatni kriterijumi efektivnosti i drugi zahtjevi za kvantitativne metode analize

1.3.2.1. Istinitost kvantitativnih metoda

U slučaju ponovljenih analiza sertifikovanog referentnog materijala, odstupanje prosječnog masenog udjela koji je eksperimentalno određen i korigovan iskorišćenjem od potvrđene vrijednosti predstavlja istinitost kvantitativnih metoda datih u tabeli 2 ovog priloga.

Tabela 2

Minimalna istinitost kvantitativnih metoda

Masena koncentracija	okvir
<1 µg/kg	-50 % do +20 %
>1 µg/kg to 10 µg/kg	-30 % do +10 %
>10 µg/kg	-20 % do +10 %

Ako sertifikovani referentni materijali (CRM) nijesu dostupni, istinitost mjerenja se može ocijeniti analizom slijepih uzoraka u koje je dodata poznata količina analita.

Podaci korigovani prosječnim iskorišćenjem prihvatljivi su samo ako su u granicama navedenim u rasponu u tabeli 2 ovog priloga.

1.3.2.2. Preciznost kvantitativnih metoda

Međulaboratorijski koeficijent varijacije (CV) za ponavljanje analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uslovima obnovljivosti, ne smije biti veći od nivoa izračunatog Horwitz-ovom jednačinom.

Horwitz-ova jednačina glasi:

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

gdje je C maseni sadržaj izražen kao potencija (eksponent) sa bazom 10 (npr. 1 mg/g = 10^{-3}), u skladu sa tabelom 3 ovog priloga.

TABELA 3

Obnovljivost koeficijenta varijacije za kvantitativne metode

Maseni udio	Obnovljivost CV(koeficijenta varijacije) (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1mg/kg)	16

(*) Za maseni udio manji od 100 µg/kg, primjena Horwitz-eve jednačine daje neprihvatljivo visoke rezultate.

Zbog toga CV za koncentracije niže od 100 µg/kg, mora biti što je moguće niži.

Za analize izvedene pod uslovima ponovljivosti, unutarlaboratorijski CV obično bi trebalo da iznosi između jedne polovine i dvije trećine vrijednosti datih u tabeli 3 ovog priloga.

Za analize izvedene pod unutarlaboratorijskim uslovima obnovljivosti unutarlaboratorijski CV ne smije biti veći od CV obnovljivosti.

U slučaju supstanci za koje je utvrđena dozvoljena količina, metoda mora postići unutarlaboratorijsku obnovljivost koja nije veća od odgovarajućeg CV obnovljivosti kod 50 % dozvoljene količine.

1.3.3. Kriterijum efektivnosti i drugi zahtjevi za dokazivanje masenom spektrometrijom

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

1.3.3.1. Hromatografsko razdvajanje

Za GC-MS postupke, separacija gasnom hromatografijom izvodi se primjenom kapilarnih kolona. Za LC-MS postupke, hromatografsko razdvajanje izvodi se primjenom odgovarajućih LC kolona.

Najmanje prihvatljivo retenciono vrijeme analita koji se ispituje mora biti jednako dvostrukom retencionom vremenu koje odgovara praznoj zapremini kolone.

Retenciono vrijeme (ili relativno retenciono vrijeme) analita u poduzorku za analizu mora odgovarati retencionom vremenu zadržavanja kalibracionog standarda unutar određenog intervala retencionog vremena.

Interval retencionog vremena mora biti srazmjeran sposobnosti razdvajanja hromatografskog sastava, a odnos između hromatografskog retencionog vremena analita i retencionog vremena internog standarda, tj. relativno retenciono vrijeme analita, mora odgovarati retencionom vremenu kalibracionog rastvora uz toleranciju od $\pm 0,5$ % za GC i $\pm 2,5$ % za LC.

1.3.3.2. Određivanje masenom spektrometrijom

Određivanje masenom spektrometrijom sprovodi se upotrebom MS tehnika, kao što je snimanje cjelokupnih spektara masa (full scan) ili praćenje odabranih jona (SIM), kao i upotrebom MS-MSⁿ tehnika, kao što je praćenje odabranih reakcija (SRM) ili drugih odgovarajućih MS ili MS-MSⁿ tehnika u kombinaciji sa odgovarajućim načinima jonizacije.

Kod masene spektrometrije sa visokom rezolucijom (HRMS), rezolucija mora biti veća od 10000 za cijelo područje snimanja masa na 10% razdvojenosti doline pika.

Snimanje cjelokupnih spektara (full scan): kad se određivanje masenom spektrometrijom vrši snimanjem cjelokupnih spektara, moraju obavezno biti prisutni svi izmjereni dijagnostički joni s relativnim intenzitetom većim od 10% u referentnom spektru kalibracionog standarda (molekularni jon, karakteristični adukti molekularnog iona, karakteristični fragmenti i izotopni joni).

Praćenje odabranih jona (SIM): kad se određivanje masenom spektrometrijom sprovodi fragmentografijom, molekularni jon bi trebalo da bude jedan od odabranih dijagnostičkih jona (molekularni jon, karakteristični adukti molekularnog jona, karakteristični fragmenti i svi njihovi izotopni joni).

Odabrani dijagnostički joni ne bi smjeli poticati isključivo od istog dijela molekula, a odnos signal-šum za svaki dijagnostički jon treba da bude (jednak ili veći) $\geq 3:1$.

Snimanje cjelokupnih spektara (full scan) i praćenje odabranih jona (SIM): relativni intenzitet dokazanih jona, izražen kao procenat prema najintenzivnijem jonu ili najintenzivnijem prelaznom jonu, mora odgovarati intenzitetu kalibracionog standarda, bilo iz rastvora kalibracionog standarda ili obogaćenih uzoraka, na uporednim koncentracijama, mjerenim pod istim uslovima i uz tolerancije date u tabeli 4 ovog priloga.

Tabela 4
Maksimalno dozvoljene tolerancije za relativnu intenzitet jona korišćenjem masene spektrometrije

Relativni intenzitet (% bazni pik)	EI-GC-MS	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ
>50 %	±10 %	±20 %
>20 % do 50 %	±15 %	±25 %
>10 % do 20 %	±20 %	±30 %
<10 %	±50 %	±50 %

Tumačenje podataka dobijenih masenom spektrometrijom: relativni intenzitet dijagnostičkih jona i/ili jonskih parova prekursor/proizvoda moraju se identifikovati upoređivanjem spektara ili integriranjem signala pojedinačnih tragova masa.

Kada se primjenjuje korekcija osnovnog šuma, ona se mora primijeniti podjednako na cijelu seriju i mora biti jasno naznačena. Snimanje cjelokupnih spektara (full scan): ako se snimanje cjelokupnih spektara bi ježi u jednostrukoj masenoj spektrometriji, najmanje četiri jona moraju biti prisutna sa relativnom zastupljenošću jednakom ili većom od 10% u odnosu na bazni pik.

Molekularni jon se uključuje ako je prisutan u referentnom spektru sa intenzitetom većim ili jednakim od 10%.

Najmanje četiri jona moraju biti unutar najviših dopuštenih tolerancija za relativnu zastupljenost jona, u skladu sa Tabelom 5 ovog priloga.

Ako se primjenjuje pretraživanje baza podataka uz pomoć računara rezultat upoređivanja podataka o spektru masa u ispitivanom uzorku sa onima iz kalibracionog rastvora mora biti veći od kritičnog faktora podudarnosti, a taj faktor se određuje tokom postupka vrednovanja za svaki analit na osnovu spektara za koje su ispunjeni uslovi i treba provjeriti eventualne promjene spektara uzrokovane matricom i/ili karakteristikama detektora.

Praćenje odabranih jona (SIM): ako se fragmenti mase mjere drugim tehnikama osim snimanja cjelokupnih spektara, za tumačenje podataka primjenjuje se sastav identifikacionih tačaka.

Za potvrdu zabranjenih supstanci potrebne su najmanje četiri identifikacione tačke, a za ostale supstance najmanje tri identifikacione tačke.

Identifikacione tačke koje pripadaju svakoj pojedinoj osnovnoj tehnici masene spektrometrije date su u tabeli 5 ovog priloga.

Da bi identifikaciona tačka potrebna za potvrdu bila kvalifikovana mora se izračunati ukupan broj identifikacionih tačaka prema tabeli 6 ovog priloga:

- odnos najmanje jednog jona, i
- svi odgovarajući izmjereni odnosi jona moraju zadovoljavati navedene zahtjeve, i
- moгу se kombinovati najviše tri odvojene tehnike kako bi se postigao najmanji broj identifikacionih tačaka.

TABELA 5
Odnos udjela fragmenata masa i pripadajućih identifikacionih tačaka

MS tehnika	Identifikacione tačke
Masena spektrometrija niske rezolucije	1,0
LR-MS prekursor jon	1,0
LR-MS prelazni proizvodi	1,5
HRMS	2,0
HR-MS prekursor jon	2,0
HR-MS prelazni proizvodi	2,5

Napomena :

- Svaki jon može biti izbrojan samo jedanput.
 - GC-MS koja koristi elektron jonizaciju se smatra različitom tehnikom od GC-MS koja koristi hemijsku jonizaciju.
 - U slučaju povećanja broja identifikacionih tačaka mogu se koristiti različiti analiti samo ako derivati nastaju različitim hemijskim reakcijama.
 - Za zabranjene supstance, ukoliko se koristi jedna od sljedećih tehnika u analitičkoj proceduri:
 - HPLC u kombinaciji sa spektrofotometrijom uz dokazivanje nizom dioda (engl. diode array spectrophotometry) (DAD);
 - HPLC u kombinaciji sa fluorescencijskim dokazivanjem;
 - HPLC u kombinaciji sa imunogramom;
 - dvodimenzionalni TLC u kombinaciji sa spektrometrijskom detekcijom,
- Navedene tehnike mogu doprinijeti najviše sa jednom identifikacionom tačkom, ako su ispunjeni odgovarajući kriterijumi za ove tehnike.
- Prelazni proizvodi uključuju i produkte prve generacije i produkte druge generacije (kćerke i unuke) proizvoda.

TABELA 6
Broj pripadajućih identifikacionih tačaka za spektar
različitih tehnika i njihovih kombinacija (n=cijeli broj)

Tehnike	Broj jona	Identifikacione tačke
GC-MS (EI ili CI)	N	n
GC-MS (EI i CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
2 (EI) + 2 (CI)	2 (Derivat A) + 2 (Derivat B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 prekursor i 2 kćerke	4
LC-MS-MS	1 prekursor i 2 kćerke	4
GC-MS-MS	2 prekursor jona, svaki sa 1 kćerkom	5
LC-MS-MS	2 prekursor jona, svaki sa 1 kćerkom	5
LC-MS-MS-MS	1 prekursor, 1 kćerka i 2 unuke	5,5
HRMS	N	2n
GC-MS i LC-MS	2+2	4
GC-MS i HRMS	2+1	4

1.3.4. Kriterijum efektivnosti i drugi zahtjevi za hromatografiju u kombinaciji sa dokazivanjem u infracrvenom području
Odgovarajući pikovi su maksimumi apsorpcije u infracrvenom spektru kalibracionog standarda ako ispunjavaju sljedeće zahtjeve:

1.3.4.1. Infra-crveno dokazivanje

Apsorpcijski maksimum mora biti u rasponu talasnog broja 4000-500 cm^{-1} .
Intenzitet apsorpcije ne smije biti manji od:

- (a) specifične molarne apsorpcije od 40 u odnosu na baznu liniju p ka, 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 sa teoretske tačke gledišta mogla dati prednost odgovarajućim pikovima određenim prema tački (a), u praksi je lakše odrediti p kove prema tački (b).

Određuje se broj pikova u infracrvenom spektru analita čije frekvencije odgovaraju odgovarajućem p ku u spektru kalibracionog 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 sa odgovarajućim pikom u referentnom spektru kalibracionog standarda.

Potrebno je najmanje šest odgovarajućih p kova u infracrvenom spektru kalibracionog standarda, a ako ima manje od šest odgovarajućih pikova, razmatrani spektar se ne može koristiti kao referentni spektar.

Rezultat ispitivanja sličnosti odnosno procenat odgovarajućih p kova pronađenih u infracrvenom spektru analita mora biti najmanje 50, a ako za odgovarajući pik ne postoji tačno poklapanje, odgovarajuće područje spektra analita mora odgovarati prisutnosti pika za poređenje.

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. Kriterijum efektivnosti i drugi zahtjevi za određivanje analita upotrebom LC uz druge tehnike dokazivanja

1.3.5.1. Hromatografsko razdvajanje

Za hromatografsko razdvajanje uvjek treba koristiti interni standard, ako je za to dostupan odgovarajući materijal.

Prednost u primjeni imaju srodni standardi sa vremenom zadržavanja kao analit, a vrijeme zadržavanja analita mora biti u dopuštenim granicama prema odgovarajućem kalibracionom standardu uz iste uslove ispitivanja.

Najmanje prihvatljivo vrijeme zadržavanja za analit mora biti dvostruko veće od vremena zadržavanja koje odgovara praznoj zapremini kolone, a odnos između retencionog vremena analita i retencionog vremena unutrašnjeg standarda, tj. relativno retenciono vrijeme analita, mora biti jednako retencionom vremenu kalibracionog standarda u odgovarajućem matriksu, uz toleranciju od $\pm 2,5 \%$.

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

Kriterijumi efikasnosti za metode tačne hromatografije moraju u potpunosti biti ispunjeni.

Apsorpcioni maksimumi u spektru analita moraju biti na istim talasnim dužinama kao i oni kalibracionog standarda uz toleranciju koja zavisi od rezolucije sistema dokazivanja.

Za dokazivanje pomoću niza dioda tolerancija je obično u okviru $\pm 2 \text{ nm}$.

Za djelove dva spektra čija je relativna apsorbanca jednaka ili veća od 10%, spektar analita iznad 220 nm ne smije se vidljivo razlikovati od spektra kalibracionog standarda, a ovaj je zahtjev ispunjen kada su, prvo, prisutni isti maksimumi i, drugo, kada razlika između dva spektra ni u jednoj od datih tačaka nije veća od 10% od apsorbanse kalibracionog standarda.

U slučaju elektronskog pretraživanja i upoređivanja spektara ispitnih uzoraka sa onima iz kalibracionog rastvora, rezultat upoređivanja mora biti veći od kritičnog faktora podudarnosti.

Taj faktor se određuje tokom postupka vrednovanja za svaki analit, na osnovu spektara za koje su ispunjeni dati uslovi. Eventualne promjene spektara uzrokovane matriksom i/ili karakteristikama detektora se moraju provjeriti.

1.3.5.3. Kriterijum efektivnosti za fluorometrijsko dokazivanje

Kriterijum efektivnosti za metode tečne hromatografije u potpunosti mora biti ispunjen i odnosi se na molekule koji prirodno fluoresciraju i molekule koje pokazuju fluorescenciju poslije transformacije ili derivatizacije.

Talasne dužine ekscitacije i emisije, u kombinaciji sa hromatografskim uslovima, moraju se odabrati na način da se pojava interferencijskih komponenti u ekstraktima slijepog uzorka svede na najmanju moguću mjeru, a 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. Kriterijum efektivnosti za dokazivanje analita LC imunogramom

LC imunogram se ne može sam po sebi koristiti kao potvrdna metoda.

Odgovarajući kriterijumi za metode tečne hromatografije moraju u potpunosti biti ispunjeni. Unaprijed utvrđeni parametri kontrole kvaliteta (npr. nespecifično vezivanje, relativno vezivanje kontrolnih uzoraka, vrijednost apsorpcije slijepog uzorka) moraju biti u okviru granica dobijenih tokom vrednovanja probe, a imunogram se mora sastojati od najmanje pet frakcija. Svaka frakcija mora biti manja od polovine širine pika.

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

1.3.5.5. Određivanje analita tečnom hromatografijom (LC) uz UV/VIS dokazivanje (jedna talasna dužina)

Tečna hromatografija (LC) uz dokazivanje u UV/VIS području (jedna talasna dužina) ne može se sama 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. Kriterijum efektivnosti i drugi zahtjevi za određivanje analita upotrebom 2-D TLC uz spektrometrijsko UV/VIS dokazivanje sa snimanjem cijelog spektra

Dvodimenzionalna tankoslojna hromatografija visoke efektivnosti (HPTLC) i ko-hromatografija su obavezni. R_f vrijednosti analita moraju se podudarati sa 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 polovinu zbira prečnika mrlja, a spektar analita ne smije se vizualno razlikovati od spektra standarda, kao za UV/VIS detekciju uz snimanje cijelog spektra.

U slučaju elektronskog pretraživanja baza podataka i upoređivanja, odnos podataka o spektru u uzorku za ispitivanje sa podacima kalibracionog rastvora mora biti veća od kritičnog faktora podudarnosti.

Taj faktor se određuje tokom postupka validacije za svaki analit na temelju spektara za koje su propisani uslovi, što se mora provjeriti varijabilnost spektara uzrokovana matriksom i funkcionisanje detektora.

1.3.7. Kriterijum efektivnosti i zahtjevi za određivanje analita gasnom hromatografijom uz detekciju zahvatom elektrona (ECD)

Interni standard treba koristiti ako je odgovarajući materijal u tu svrhu dostupan, a to bi prvenstveno trebalo da bude srodna supstanca čija je retenciona vrijednost blizu retencionog vremena analita.

Retenciono vrijeme analita mora biti u dozvoljenim granicama prema odgovarajućem kalibracionom standardu uz iste uslove ispitivanja. Minimalno prihvatljivo retenciono vrijeme za analit mora biti jednako dvostrukom retencionom vremenu koje odgovara praznoj zapremini kolone, a odnos retencionog vremena analita i retencionog vremena internog standarda, tj. relativno retenciono vrijeme analita, mora biti jednako vremenu zadržavanja kalibracionog 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, a za dobijanje dodatnih podataka može se primijeniti ko-hromatografija.

1.4. POTVRDNE METODE ZA HEMIJSKE ELEMENTE

Potvrdne metode analize hemijskih elemenata moraju se bazirati na principu jasne identifikacije i tačne i precizne kvantifikacije, uz pomoć fizicko-hemijskih svojstava koji su jedinstveni za taj element na nivou koncentracije od interesa (npr. karakteristična talasna dužina emitovanog ili apsorpcionog zračenja, atomska masa).

Potvrdne metode analize hemijskih elemenata date su tabeli 7 ovog priloga.

Tabela 7
Potvrdne metode analize za hemijske elemente

Tehnike	Mjereni parametri
Diferencijalna pulsna anodna voltametrija	Električni signal
Atomska apsorpciona spektrometrija	
Plamen	Apsorpciona talasna dužina
Stvaranje hidrida	Apsorpciona talasna dužina
Hladne pare	Apsorpciona talasna dužina
Elektrotermalna atomizacija (grafitna peč)	Apsorpciona talasna dužina
Atomska emisiona spektrometrija	Emisija talasne dužine
Induktivno spregnuta plazma	Emisija talasne dužine
Masena spektrometrija	
Induktivno spregnuta plazma	Odnos mase i naelektrisanja

1.4.1. Zajednički kriterijumi efektivnosti i drugi zahtjevi za potvrđne metode

Referentni uzorak ili obogaćeni uzorak koji sadrži poznatu količinu analita na ili u blizini dopuštene granice ili granične količine (pozitivni kontrolni uzorak) kao i negativni kontrolni materijali i slijepe probe sa reagensom trebalo bi da budu podvrgnuti cijelom postupku istovremeno sa svakom serijom ispitivanih uzoraka.

Preporučeni redosljed analize ekstrakta pomoću analitičkih instrumenata je sljedeći: slijepa proba sa reagensom, negativni kontrolni uzorak, uzorak koji se ispituje, negativni kontrolni uzorak i na kraju pozitivni kontrolni uzorak. Svaka izmjena ovog redosljeda mora se opravdati.

Kod većine analitičkih postupaka neophodna je potpuna razgradnja (digestija) organskog matriksa kako bi se dobili rastvori prije određivanja analita, a to se može postići primjenom postupaka mikrotalasne mineralizacije koji rizik od gubitka i/ili kontaminacije ispitivanog analita svede na najmanju mjeru, upotrebom dekontaminiranog teflonskog posuđa dobrog kvaliteta, a za primjenu drugih postupaka vlatne ili suve digestije moraju postojati dokumentovani 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 koncentrisanja analita prije analize korišćenjem analitičkog uređaja.

Prilikom kalibracije, eksterno ili postupkom standardnog dodatka, mora se paziti da se ne prekorači radno područje utvrđeno za analizu. Kalibracioni standardi se obavezno pripremaju u rastvoru koji se, što je moguće više, podudara sa sastavom rastvora uzorka, a ako to zahtijevaju specifične analitičke okolnosti, primjenjuje se i korekcija nespecifičnog signala.

1.4.2. Dodatni kriterijumi efektivnosti i drugi zahtjevi za kvantitativne analitičke metode

1.4.2.1. Istinitost kvantitativnih metoda

Kod ponovnog analiziranja sertifikovanog referentnog materijala za hemijske elemente, odstupanje eksperimentalno utvrđene srednje vrijednosti sadržaja analita od potvrđene vrijednosti ne smije biti van granice od $\pm 10\%$.

Ako ne postoje sertifikovani referentni materijali, prihvatljivo je da se istinitost mjerenja ocjenjuje određivanjem poznate količine elementa dodate u nepoznati uzorak koji se ispituje, uz proračun iskorišćenja, što treba voditi računa da za razliku od analita, dodata količina elementa nije hemijski vezana u ispitivanom materijalu i da zbog toga dobijeni rezultati imaju manju varijabilnost od rezultata dobijenih upotrebom sertifikovanog referentnog materijala (CRM), a podaci o iskorišćenju prihvatljivi su jedino ako je njihova vrijednost u okviru $\pm 10\%$ ciljne vrijednosti.

1.4.2.2. Preciznost kvantitativnih metoda

Međulaboratorijski koeficijent varijacije (CV) za ponavljanje analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uslovima obnovljivosti, ne smije biti veći od vrijednosti datih u tabeli 8 ovog priloga.

Tabela 8
CV (koeficijent varijacije) za kvantitativne metode

Maseni sadržaj	CV (%)
$\geq 10 \mu\text{g/kg} - 100 \mu\text{g/kg}$	20
$> 100 \mu\text{g/kg} - 1000 \mu\text{g/kg}$	15
$\geq 1000 \mu\text{g/kg}$	10

1.4.3. Specifični zahtjevi za diferencijalnu pulsnu voltametriju (DPASV)

Organska supstanca u uzorcima mora da bude potpuno razložena prije DPASV određivanja.

Na voltamogramu se ne smije vidjeti široki signal koji je nastao zbog prisutnosti organske materije.

Neorganski sastojci matriksa mogu uticati na visinu pika pri DPASV postupku, a kvantifikacija se mora obaviti metodom standardnog dodatka.

Tipični voltamogrami rastvora uzorka moraju biti dostavljeni uz metodu.

1.4.4. Specifični zahtjevi za atomsku apsorpcionu spektrometriju (AAS)

AAS se koristi za određivanje jednog elementa i zbog toga zahtjeva da eksperimentalni parametri budu optimalno podešeni za određeni element koji se kvantifikuje, a rezultati se moraju provjeriti kvalitativno i kvantitativno kad je god to moguće, uz pomoć alternativnih apsorpcionih linija (dvije različite talasne dužine).

Kalibracioni standard se priprema u rastvoru matriksa čiji je sastav što je moguće sličniji sastavu rastvora ispitivanog uzorka (npr. koncentracija kiselina ili sastav modifikatora).

Svi reagensi moraju biti najvećeg mogućeg stepena čistoće kako bi se vrijednosti slijepe probe svele na najmanju moguću mjeru, a u zavisnosti od načina isparavanja i/ili atomizacije uzorka mogu se razlikovati različiti tipovi atomske apsorpcijske spektrometrije.

1.4.4.1. Specifični zahtjevi za plamenu AAS

Instrument mora biti optimalno podešen za svaki element, a posebno se mora provjeriti sastav gasa i brzina protoka.

Kako bi se izbjegle interferencije uzrokovane nespecifičnom apsorpcijom, mora se kao korekcija koristiti izvor energije sa kontinuiranim spektrom, a u slučaju nepoznatih matriksa, mora se provjeriti da li je potrebna korekcija nespecifične apsorpcije.

1.4.4.2. Specifični zahtjevi za AAS sa grafitnom peći

Kontaminacija u laboratoriji često utiče na tačnost pri radu sa grafitnom peći na nivou ultra tragova, stoga se pri radu sa uzorkom i standardom moraju upotrebljavati reagensi visoke čistoće, dejonizovana voda i posuđe od inertne plastike, a instrument se mora

optimalno podesiti za svaki element i moraju se provjeriti uslovi prethodne obrade uzorka, atomizacije (temperatura, vr jeme) i modifikacija matr ksa.

Rad pod izotermnim uslovima atomizac je (npr. poprečna zagrijana grafitna kiveta sa ugrađenom L'vov-om platformom) smanjuje uticaj matr ksa pri atomizaciji analita.

Kombinacija modifikacije matriksa i Zeeman-ove korekcije nespecifične apsorpcije dopušta kvantifikaciju pomoću kalibracione krive koja se zasniva na mjerenju vodenog rastvora standarda.

1.4.5. Specifični zahtjevi za AAS uz stvaranje hidrida

Organska jedinjenja koja sadrže elemente kao što su arsen, bizmut, germanij, olovo, antimon, selen, kalaj i telur mogu biti vrlo stabilna i mogu zahtijevati oksidacionu razgradnju kako bi se dobile tačne vrjednosti ukupnog sadržaja elementa, pa je potrebna razgradnja mikrotalasima ili spaljivanje pod visokim pritiskom uz jake oksidacione uslove, pri čemu se najveća pažnja mora posvetiti potpunoj i reproducibilnoj konverziji elemenata u hidride.

Formiranje hidrida arsena u rastvoru HCl sa NaBH₄ zavisi od oksidacionog stepena arsena (As(III) brzo formiranje, As(V) dugotrajniji prelaz), tako da se radi izbjegavanja gubitaka osjetljivosti u određivanju As(V) pomoću protočno-injekcione tehnike, koji je posljedica kratkog vremena reakcije u tom sastavu, As(V) se mora redukovati u As(III) nakon oksidacionog razlaganja, uz pomoć kalijum jodida/askorbinske kiseline ili cisteina.

Na isti način se mora postupati sa slijepim probama, kalibracionim rastvorima i rastvorima uzorka, a rad sa serijama uzoraka omogućava određivanje obje specijacije arsena.

Zbog sporijeg nastajanja As(V) hidrida, kalibrator ja se vrši integracijom površina ispod p kova pod uslovom da je uređaj optimalno podešen, a protok gasa, kojim se hidrid prenosi u atomizator, mora se kontrolisati.

1.4.6. Specifični zahtjevi za AAS metodom hladnih para

Tehnika hladnih para se upotrebljava samo za ispitivanje žive koja lako isprava i apsorbuje što zahtijeva posebnu pažnju tokom cijelog postupka, kao i izbjegavanje kontaminacije reagensima ili iz okruženja.

Organska jedinjenja koja sadrže živu zahtijevaju oksidacionu razgradnju, kako bi se odredio ukupni sadržaj žive u uzorku, za šta se upotrebljavaju zatvoreni sistemi sa razgradnjom mikrotalasima ili spaljivanjem pod visokim pritiskom, a oprema koja je došla u dodir sa živom mora se pažljivo očistiti.

Za niže vrijednosti granične koncentracije preporučuje se adsorpcija elementarne žive na adsorbens od zlata/platine i potom gasno otpuštanje, a kontakt adsorbensa ili radnog dijela uređaja sa vlagom ometa mjerenje i mora se izbjegavati.

1.4.7. Specifični zahtjevi za atomsku emisiju spektrometriju sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-AES)

ICP-AES je metoda koja omogućava istovremeno mjerenje više različitih elemenata, čija je primjena moguća nakon razgradnje organske supstance, za šta se koriste zatvoreni sistemi razgradnje mikrotalasima ili spaljivanja pod jakim pritiskom, a da bi ICP-AES analiza bila djelotvorna od posebnog značaja su kalibracija i izbor elementa odnosno talasne dužine.

U slučaju linearnih kalibracionih krivih, dovoljno je izmjeriti samo četiri koncentracije kalibracionih rastvora, jer su kalibracione krive kod ICP-AES postupka uglavnom linearne duž četiri do šest redova veličina koncentracije, a kalibracija ICP-AES sistema uglavnom se obavlja standardom koji sadrži više elemenata koji se priprema u rastvoru sa istom koncentracijom kiseline kao i ispitivani rastvor.

Radi linearnosti kalibracione krive treba provjeriti koncentracije elemenata.

Izbor talasnih dužina za mjerenje emisije analita mora da odgovara koncentracijama elemenata koji se određuju, a ako je koncentracija analita van radnog raspona jedne emisije linije, mora se primijeniti druga emisiona linija, pri čemu se bira najosjetljivija emisiona linija (bez smetnji), a zatim manje osjetljiva linija.

Kod analize na granici detekcije, ili u blizini te granice, obično se koristi najosjetljivija linija za analizu.

Spektralne i pozadinske interferencije predstavljaju najveće poteškoće kod ICP-AES postupka. Moguće interferencije su npr. jednostavno pozadinsko pomjeranje, koso pozadinsko pomjeranje, direktno spektralno preklapanje i složeno pozadinsko pomjeranje, koje ima uzrok i način otklanjanja tako što se interferencije koriguju, a radni parametri optimizuju, zavisno od matriksa, a neke smetnje se mogu izbjeći razblaživanjem ili prilagođavanjem matriksa.

Sa svakom serijom ispitivanih uzoraka, na isti način kao i uzorci, obrađuje se i referentni i obogaćeni materijal koji sadrži poznate količine jednog ili više analita.

Za provjeru eventualnog pomjeranja, mora se provjeravati standard (npr. poslije svakih deset

uzoraka). Svi reagensi i gas koji se koristi za stvaranje plazme moraju biti najveće moguće čistoće.

1.4.8. Posebni zahtjevi za masenu spektrometriju sa induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS)

Određivanje elemenata u tragovima pomoću prosječne atomske mase (hrom, bakar i nikal) može biti podložno jakim smetnjama od drugih izobarnih ili višeatomskih jona, a sprečava se samo ako je snaga rezolucije najmanje 7000-8000.

Smetnje u postupku masene spektrometrije su: odstupanje instrumenta, uticaj matriksa i interferencije molekulskih jona ($m/z < 80$), što se može korigovati pripremom više internih standarda koji pokrivaju isti maseni raspon kao i elementi koji se ispituju.

Pri određivanju postupkom ICP-MS, neophodna je potpuna razgradnja organske supstance u uzorcima, kao i kod AAS, a isparljivi elementi kao npr. jod moraju se nakon razaranja u zatvorenim posudama prevesti u stabilno oksidaciono stanje.

Najveće smetnje uzrokovane su kombinacijama molekulskih jona argona (plazma gas), vodonika, ugljenika, azota i kiseonika (kiseline za rastvaranje, nečistoće plazma gasa i atmosfera) sa matriksom, a radi izbjegavanja interferencija vrši se potpuno razlaganje, pozadinska mjerenja i odgovarajući izbor analitičkih masa (koji je ponekad povezan sa slabijim nivoom detekcije) i kiselina za razaranja (npr. azotna kiselina).

Da bi se elementi odredili, treba da se uklone interferencije izborom odgovarajućih specifičnih atomskih masa, uključujući potvrdu odnosa izotopa.

Za svako mjerenje se mora, upotrebom internih standarda, provjeriti odziv instrumenta u pogledu Fano faktora.

2. VREDNOVANJE (VALIDACIJA)

Vrednovanjem se dokazuje da analitička metoda ispunjava kriterijume koji se odnose na karakteristike efektivnosti.

Karakteristike efektivnosti prema vrstama metoda date su u tabeli 9 ovog priloga.

Tabela 9
Karakteristikama efektivnosti metoda

		CCβ Sposobnost dokazivanja	CCα Granična koncentracija (količina) analita	Istinitost /iskorištenje	Preciznost	Selektivnost/ specifičnost	Primjenjivost/ Robusnost/ stabilnost
Kvalitativne metode	S	+	-	-	-	+	+
	C	+	+	-	-	+	+
Kvantitativne metode	S	+	-	-	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S= skrining metode; C=potvrđne metode; +=obavezno dokazivanje

2.1. Procedure vrednovanja (validacije)

Vrednovanje metoda može se vršiti međulaboratorijskim ispitivanjem prema Codex Alimentarius-u, ISO ili IUPAC ili prema alternativnim metodama kao što su ispitivanja u jednoj laboratoriji odnosno unutrašnje vrednovanje, uz modularni postupak, koji se sastoji od:

1. skupa zajedničkih karakteristika efektivnosti koje su nezavisne od primijenjenog modela vrednovanja i
2. specifičnijih postupaka koji zavise od modela datih u tabeli 10 ovog priloga.

Tabela 10
Parametri efektivnosti nezavisni i zavisni od modela

Validacija		
Parametri efektivnosti nezavisni od modela	Parametri efektivnosti zavisni od modela	
Zajedničke karakteristike efektivnosti (2.1.1)	Konvencionalni validacioni pristup(2.1.2)	Unutrašnji validacioni pristup(2.1.3)
Specifičnost	Iskorištenje	Iskorištenje
Istinitost	Ponovljivost	Ponovljivost
Robusnost: manje promjene	Obnova jivost unutar laboratorije	Obnovljivost unutar laboratorije
Stabilnost	Obnova jivost	Obnovljivost
	CCα Granična koncentracija	CCα Granična koncentracija
	CCβ Sposobnost dokazivanja	CCβ Sposobnost dokazivanja
	Kalibraciona kriva	Kalibraciona kriva
	Robusnost: manje promjene	Robusnost

2.1.1. Parametri efektivnosti nezavisni od modela

Za vrednovanje metoda primjenjuju se karakteristike efektivnosti i statistički postupak u kojem se kombinuju obavljena ispitivanja radi određivanja različitih parametara.

2.1.1.1. Specifičnost

Analitičkim metodama treba da se postigne razlika između analita i srodnih supstanci (izomera, metabolita, produkata razgradnje, endogenih supstanci, sastojaka matriksa, itd.) radi provjere interferencije sprovođenjem dva postupka.

Za dokazivanje prisutnosti mogućih interferencija i procjene njihovog efekta biraju se supstance koje ih mogu izazvati i analiziraju se slijepi uzorci za dokazivanje njihove prisutnosti, i to:

- odabirom hemijski srodnih jedinjenja (metabolita, derivata, itd.) ili drugih supstanci koje bi mogle interferirati sa jedinjenjem koje se dokazuje u uzorku;
- analizom odgovarajućeg broja reprezentativnih slijepih uzoraka ($n \geq 20$) i provjere interferencije (signali, p kovi, tragovi jona) u području u kojem se očekuje pojava analita;
- obogaćivanjem reprezentativnih slijepih uzoraka do odgovarajuće koncentracije supstancama koje bi mogle ometati identifikaciju i/ili kvantifikaciju analita.

Nakon izvršene analize, ispituje se da li:

- je prisutnost interferencije mogla dovesti do pogrešne identifikacije,
- je prisutnost jedne ili više interferencija otežala identifikaciju dokazujućeg analita, ili
- postoji značajni uticaj na kvantifikaciju.

2.1.1.2. Istinitost metode

Istinitost metode se može utvrditi samo pomoću sertifikovanog referentnog materijala (CRM), prema postupku datom u MEST ISO 5725-4:2011.

Istinitost metode određuje se:

- se šest replika sertifikovanog referentnog materijala,
- na osnovu koncentracije analita koji je prisutan u svakom uzorku replika,
- izračunavanjem srednje vrijednosti, standardne devijacije i koeficijenta varijacije (%) za te koncentracije,
- izračunavanjem istinitosti podjelom dokazane srednje vrijednosti sa sertifikovanom vrjednošću (mjerenom kao koncentracija) i množenjem sa 100, da bi se rezultat izrazio u procentu.

Istinitost (%) = srednja vrijednost dokazane koncentracije korigovana iskorišćenjem x 100/ potvrđena vrijednost

Ako ne postoji sertifikovani referentni materijal, umjesto istinitosti može se odrediti iskorišćenje.

2.1.1.3. Primjenjivost/robusnost (manje promjene)

Primjenjivost/robusnost podrazumijeva namjerno uvođenje manjih promjena u metodama od strane laboratorije i praćenje posljedica.

Pr je ispitivanja vrši se izbor faktora koji učestvuju u pripremnoj obradi, prečišćavanju i analizi uzoraka, a koji bi mogli uticati na rezultate mjerenja (analitičar, izvor i starost reagenasa, rastvarači, standardi i ekstrakti uzoraka, brzina zagrijavanja, temperatura, pH vrijednost, kao i mnoge drugi faktori koji se mogu javiti u laboratoriji).

Faktori treba da se modifikuju po redu veličine koji odgovara odstupanjima do kojih obično dolazi između laboratorija, tako što se:

- odrede faktori koji bi mogli uticati na rezultate,
- neznatno promijeni svaki faktor,
- test robusnosti vrši prema Youden-ovom postupku koji predstavlja frakcionirani faktorski model, a interakcija među različitim faktorima ne može se dokazati,
- otkr je da neki faktor značajno utiče na rezultate mjerenja i vrše se dalja ispitivanja kako bi se odredile granice prihvatljivosti tog faktora,
- u protokolu izvođenja metode navode faktori koji značajno utiču na rezultate.

Postupak se zasniva na tome da se ne ispituje jedna po jedna promjena, već nekoliko promjena odjednom (npr. ako se sa A, B, C, D, E, F, G označe nominalne vrjednosti za sedam različitih faktora koji bi, u slučaju da se njihove nominalne vrijednosti neznatno promijene, mogli uticati na rezultate, a njihove alternativne vrjednosti označe malim slovima a, b, c, d, e, f, g, dobija se 2⁷ odnosno 128 mogućih različitih kombinacija, od čega je moguće odabrati podskup od osam kombinacija kod kojih postoji ravnoteža između malih i velikih slova u skladu sa tabelom 11 ovog priloga, stim što se bira osam kombinacija koje sadrže odabrane faktore (A-G), čije je rezultat prikazan kao S-Z u Tabeli 11 ovog priloga).

Tabela 11
Ispitivanje robusnosti (manje promjene)

	Kombinacija determinančnih brojeva							
Faktor F	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 izračunavanje vidjeti primjere za testiranje robusnosti u Prilogu 1, tačka 2.3

2.1.1.4. Stabilnost

Nedovoljna stabilnost analita ili sastojaka materijala u uzorku u toku skladištenja ili analize može dovesti do značajnih odstupanja u konačnom rezultatu analize, zbog čega treba provjeriti stabilnost rastvora kalibracionog standarda, jer je stabilnost analita u različitim uslovima skladištenja najčešće poznata.

Ukoliko stabilnost analita u rastvoru nije poznata, određuje se:

- pripremanjem svježih osnovnih rastvora jednog ili više analita (stock) i razblaživanjem prema uputstvu za ispitivanje, kako bi se dobilo dovoljno alikvota (npr. 40) svake odabrane koncentracije (otprilike na nivou *minimalno potrebne granice efektivnosti* (MPRL)) za supstance za koje nije utvrđena dozvoljena količina, odnosno oko dozvoljene granice za ostale supstance, kao i pripremanjem rastvora analita koji je upotrijebljen za obogaćivanje kao i onoga koji će se upotrijebiti u konačnom rastvoru za analizu, i bilo koji drugi značajni rastvor (npr. derivatizovani standardi),
- mjerenjem udjela analita u svježe pripremljenom rastvoru prema uputstvu za ispitivanje,
- raspoređivanjem odgovarajućih zapremina u prikladno laboratorijsko posuđe, označavanjem i skladištenjem u skladu sa tabelom 12 ovog priloga.

Tabela 12
Određivanje stabilnosti analita u rastvoru

	-20 °C	+4 °C	+20 °C
Tamno	10 alikvota	10 alikvota	10 al kvota
Svijetlo			10 al kvota

- vrijeme skladištenja može iznositi jednu do četiri sedmice, a po potrebi duže (npr. dok se ne primjete prve pojave degradacije tokom identifikacije i/ili kvantifikacije) i mora se zabilježiti maksimalno vrijeme skladištenja i optimalni uslovi skladištenja,
- koncentracija analita u svakom al kvotu koju treba izračunati uzimajući kao 100%-tnu vrjednost rastvora koja je svježe pripremljena u trenutku analize.

$$\text{Preostali analit (\%)} = C_1 \times 100 / C_{\text{svje\eta a}}$$

C_1 = trenutna koncentracija

$C_{\text{svje\eta a}}$ = koncentracija svje\eta eg rastvora

Stabilnost analita u matr ksu odre\eta uje se :

- upotrebom prirodno kontaminiranih uzoraka ukoliko je mogu\eta e, a ako prirodno kontaminirani materijal nije na raspolaganju, treba upotrijebiti matriks oboga\eta en sa analitom,
- ako je na raspolaganju prirodno kontaminiran materijal, koli\eta ina analita u materijalu odre\eta uje se dok je mater jal svje\eta , a ostali alikvoti materijala mogu se uzeti nakon jedne, dvije, \eta etiri i dvadeset sedmica i treba im odrediti koli\eta inu analita, dok tkivo treba skladi\eta iti na temperaturi od najmanje minus 20°C ili, po potrebi, ni\eta oj,
- ako prirodno kontaminirani materijal nije na raspolaganju, uzeti materijal koji ne sadr\eta i analit i homogenizovati ga, podijeliti u pet alikvota i svaki alikvot obogatiti sa analitom koji bi trebalo da bude pripremljen u maloj koli\eta ini vodenog rastvora, od \eta ega se odmah analizira jedan alikvot, a ostali se skladi\eta e na temperaturi od najmanje minus 20°C ili, po potrebi, ni\eta oj i analiziraju posli je jedne, dv je, \eta etiri i dvadeset sedmica.

2.1.1.5. Kalibraciona kriva

Kad se kalibracione krive koriste u svrhu kvantifikacije analita pri njihovoj izradi treba :

- upotrijebiti najmanje pet nivoa (uklju\eta uju\eta i nulti),
- opisati operativni raspon krive,
- opisati matemati\eta ku formulu krive i primjerenost podataka krive,
- opisati raspone prihvata jivosti parametara krive.

Kada je potrebna serijska kalibracija bazirana na standardnom rastvoru, treba nazna\eta iti prihvata jive raspone parametara kalibracione krive, koji mogu varirati od serije do serije.

2.1.2. Uobi\eta ajeni postupak vrednovanja (validacije)

Izra\eta unavanje parametara u skladu sa uobi\eta ajenim metodama zahtjeva izvo\eta enje nekoliko pojedina\eta nih ispitivanja. Mora se odrediti svaka karakteristika efektivnosti za svaku ve\eta u promjenu (robustnost). Metodama za ispitivanje vi\eta e analita mogu\eta e je istovremeno analizirati nekoliko analita, uz uslov da su prethodno isklju\eta ene interference koje bi mogle biti zna\eta ajne. Na isti na\eta in se mo\eta e odrediti nekoliko karakteristika efektivnosti. U cilju smanjenja posla, preporu\eta ljivo je kombinovati ispitivanja u \eta to je mogu\eta e ve\eta oj mjeri (npr. ponovljivost i unutarlaboratorijsku obnovljivost sa specifi\eta no\eta \eta u i analizom negativnog slijepog uzorka kako bi se odredila CC_{α} i provjerila specifi\eta nost).

2.1.2.1. Iskori\eta \eta enje (recovery)

Ako ne postoji sertifikovani referentni materijal, iskori\eta \eta enje se odre\eta uje ispitivanjem, upotrebom oboga\eta enog matriksa, i to:

- odabirom 18 al kvota kontrolnog uzorka koji se dijele u tri grupe po \eta est alikvota i svakoj grupi se dodaje analit u koli\eta ini koja je 1, 1,5 i 2 puta ve\eta a od minimalno potrebne granice efektivnosti (MPRL) odnosno koja je 0,5, 1 i 1,5 puta ve\eta a od dozvoljene koli\eta ine,
- analizom uzoraka i izra\eta unavanjem koncentracije u svakom uzorku,
- izra\eta unavanjem iskori\eta \eta enja za svaki uzorak prema formuli: % iskori\eta \eta enja = $100 \times \text{izmjereni sadr\eta aj} / \text{nivo oboga\eta enja}$,
- izra\eta unavanjem srednjeg iskori\eta \eta enja i CV iz \eta est rezultata u svakoj grupi,

Konvencionalna metoda iz ta\eta ke 2.5 ovog priloga za odre\eta \eta vanje iskori\eta \eta enja je varijanta metode standardnog dodatka ako:

- se uzorak smatra kontrolnim uzorkom, umjesto uzorkom za analizu,
- se smatra da su kona\eta ni prinos¹ i iskori\eta \eta enje² sli\eta ni za oba poduzorka,
- uzorci za ispitivanje imaju iste mase, a ekstrakti poduzoraka za analizu iste zapremine,
- koli\eta ina kalibracionog standarda koja je dodata drugom (oboga\eta enom) poduzorku za analizu iznosi X_{ADD} . ($X_{ADD} = \rho_A \cdot V_A$),
- je x_1 izmjerena vr jednost za slijepi uzorak, a x_2 izmjerena vrijednost drugog (oboga\eta enog) poduzorka, tada je iskori\eta \eta enje % = $100 (x_2 - x_1) / X_{ADD}$.

Ako neki od uslova iz stava 2 ove podta\eta ke nije (ili se pretpostavlja da n je) ispunjen, tada se primjenjuje cijeli postupak odre\eta \eta vanja iskori\eta \eta enja u skladu sa ta\eta kom 2.5. ovog priloga.

2.1.2.2. Ponovljivost

Ponovljivost se odre\eta uje;

- pripremanjem odre\eta enog broja uzoraka identiqnih matriksa, kojima je dodat analit tako da se dobiju koncentracije koje iznose 1, 1,5 i 2 puta ve\eta e od minimalno potrebne granice efektivnosti (MPRL) odnosno 0,5, 1 i 1,5 puta ve\eta e od dozvoljene koli\eta ine;
- za svaki nivo analita, analizom sa najmanje \eta est replika;
- analizom uzoraka;
- izra\eta unavanjem koncentracije u svakom uzorku;
- izra\eta unavanjem srednje koncentracije, standardne devijacije i koeficijenta varijacije (%) oboga\eta enih uzoraka;

¹ Prinos: ona masena frakcija analita koja se nalazi u uzorku, koja je prisutna i u krajnjem ekstraktu

² Iskori\eta \eta enje: ona masena frakcija analita dodata uzorku, koja je prisutna i u krajnjem ekstraktu. U ostatku dokumenta pretpostavlja se da su ova dva pojma jednaka i zbog toga \eta e se koristiti samo termin iskori\eta \eta enje.

- ponavljanjem postupaka iz al. 1 do 5 ove podtačke još najmanje dva puta;
- izračunavanjem ukupne srednje koncentracije i koeficijenta varijacije za obogaćene uzorke.

2.1.2.3. Unutarlaboratorijska obnovljivost (reproducibilnost)

Unutarlaboratorijska obnovljivost određuje se:

- pripremanjem određenog broja uzoraka za analizu (identičnih ili različitih materijala), kojima je dodat analit ili više analita, tako da se dobiju koncentracije 1, 1,5 i 2 puta veće od minimalno potrebne granice efektivnosti odnosno 0,5, 1 i 1,5 puta veće od dozvoljene količine;
- za svaki nivo koncentracije, analiza se obavlja sa najmanje šest ponavljanja;
- ponavljanjem postupaka iz al. 1 i 2 ove podtačke još najmanje dva puta od strane različitih lica koja vrše analizu i u različitim uslovima okoline (npr. sa različitim serijama reagensa, rastvarača, pri različitim sobnim temperaturama, sa različitim instrumentima i slično po mogućnosti);
- analizom uzoraka;
- izračunavanjem koncentracije u svakom uzorku;
- izračunavanjem srednje koncentracije, standardne devijacije i koeficijenta varijacije (%) obogaćenih uzoraka.

2.1.2.4. Obnovljivost (reproducibilnost)

Obnovljivost se verifikuje po potrebi (reproducibilnost), a laborator je treba da učestvuje u uporednim ispitivanjima prema standardu MEST ISO 5725-2:2011.

2.1.2.5. Granična koncentracija analita (CC_{α})

CC_{α} određuje se u skladu sa ovim prilogom.

Za supstance za koje nije utvrđena dozvoljena količina, CC_{α} utvrđuje se:

- postupkom sa kalibracionom krivom prema standardu ISO 11843 (kritična vrjednost net varijable stanja) kada se koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje na nivo MRPL ili iznad njega, u jednakim razmacima, a nakon izvršene analize grafički se prikazuju odnos signala i dodate količine u skladu sa tačkom 2.2. ovog priloga, a CC_{α} je jednaka pripadajućoj koncentraciji u tački presjeka sa ordinatom y koja je uvećana za 2,33 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti, što se primjenjuje jedino za kvantitativna ispitivanja ($\alpha=1\%$), ili
- analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po materijalu, radi izračunavanja odnosa signal-šum u vremenskom intervalu u kojemu se očekuje analit, pri čemu se za CC_{α} može uzeti trostruka vrjednost odnosa signal-šum, a primjenjuje se i za kvantitativna i kvalitativna ispitivanja.

Za supstance za koje je utvrđena dozvoljena količina, CC_{α} se utvrđuje:

- postupkom sa kalibracionom krivom prema standardu ISO 11843 kada se koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje oko dozvoljene količine, u jednakim razmacima, a nakon izvršene analize grafički se pokazuje odnos signala i dodate količine u skladu sa tačkom 2.2. ovog priloga, a CC_{α} je jednaka koncentraciji na dozvoljenoj količini uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti ($\alpha = 5\%$),
- ili analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po materijalu, obogaćenih jednim ili više analita na nivou dozvoljenih količina, a CC_{α} je jednaka koncentraciji na dozvoljenoj količini uvećanoj za 1,64 odgovarajuće standardne devijacije ($\alpha = 5\%$).

2.1.2.6. Sposobnost dokazivanja (CC_{β})

CC_{β} određuje se u skladu sa ovim prilogom.

Za supstance za koje nije utvrđena dozvoljena količina, CC_{β} utvrđuje se:

- postupkom sa kalibracionom krivom prema standardu ISO 11843 (najmanja određena vrjednost net varijable stanja) kada se koristi reprezentativni slijepi uzorak koji je obogaćen na nivou ili ispod minimalno potrebne granice efektivnosti u jednakim razmacima, a nakon izvršene analize grafički se prikazuju odnos signala i dodate količine analita u skladu sa tačkom 2.2. ovog priloga, a CC_{β} je jednaka odgovarajućoj CC_{α} uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti na nivou srednje vrijednosti CC_{α} ($\beta=5\%$);
- analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po materijalu, obogaćenih sa jednim ili više analita na nivou granične koncentracije (količine) analita CC_{α} , a sposobnost dokazivanja jednaka je vrijednosti CC_{α} uvećane za 1,64 standardne devijacije je unutarlaboratorijske obnovljivosti za izmjereni udio ($\beta=5\%$),
- ako ne postoje kvantitativni rezultati, sposobnost dokazivanja se određuje analizom slijepog uzorka koji je obogaćen na ili iznad CC_{α} , čime što je sposobnost dokazivanja metode jednaka nivou koncentracije kod koje postoji samo $\leq 5\%$ lažno negativnih rezultata, zbog čega je potrebno obaviti najmanje 20 ispitivanja za najmanje jedan nivo koncentracije.

Za supstance za koje je utvrđena dozvoljena količina, CC_{β} utvrđuje se:

- postupkom sa kalibracionom krivom prema standardu ISO 11843 kada se koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje analizom oko dozvoljene granice u jednakim razmacima, nakon analize izračunava se standardna devijacija srednjeg sadržaja izmjenjenog na nivou granične koncentracije (količine) analita CC_{α} , a sposobnost dokazivanja jednaka je odgovarajućoj graničnoj koncentraciji uvećanoj za 1,64 standardne devijacije je unutarlaboratorijske obnovljivosti ($\beta=5\%$), ili
- analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po materijalu, obogaćenih jednim ili više analita na nivou granične koncentracije analita CC_{α} , a sposobnost dokazivanja jednaka je vrjednosti CC_{α} uvećanoj za 1,64 odgovarajuće standardne devijacije ($\beta=5\%$).

2.1.2.7. Robusnost (značajne promjene)

Robusnost analitičke metode se ispituje pod različitim eksperimentalnim uslovima (npr. različite vrste, različiti materijali ili različiti uslovi uzorkovanja).

Robusnost (značajne promjene) se procjenjuje Youden-ovim postupkom, a za sve veće promjene za koje je dokazano da značajno utiču na vršenje ispitivanja određuju se karakteristike efektivnosti.

2.1.3. Vrednovanje u skladu sa alternativnim modelima

Ako se primjenjuju postupci vrednovanja (validac je metoda), u protokolu izvođenja validac je utvrđuje se osnovni model i plan sa odgovarajućim preduslovima, pretpostavkama i formulama.

Ukol ko se primjenjuje model unutrašnjeg vrednovanja, karakterist ke efektivnosti se utvrđuju na način koji omogućava vrednovanje značajnih promjena unutar istog postupka vrednovanja, što zahtjeva izradu eksperimentalnog plana ispitivanja.

2.1.3.1. Eksperimentalni plan

Ekperimantalnim planom uzima se u obzir broj različitih životinjskih vrsta i različiti faktori koji se ispituju u skladu sa tabelom 13 ovog priloga.

Kao prvi korak u cjelom postupku vrednovanja (validacije metode) određuju se uzorci životinjskih vrsta koji će se analizirati, da bi se odabrale najvažnije vrste i faktori koji bi mogli uticati na rezultate analize.

Sljedeći korak je odabir opsega koncentracije koji je prilagođen svrsi i značaju ispitivanja.

Metodom koja se vrednuje (validuje) moguće je istovremeno ispitati nekoliko analita.

Vodeći faktori (A i B), za koje su utvrđene dvije varijacije su osnova na kojoj se kombinuju nivoi faktora, a vodeći faktori mogu uključivati faktore kao što su vrsta uzorka ili matriks.

Promjena vodećeg faktora na dva nivoa (označene kao + ili –) sa dvije različite vrste (A i B) vrši se u skladu sa tabelom 14 ovog priloga, a promjenom vodećih faktora na više od dva nivoa povećava se broj analiza koje treba obaviti.

Moguće je mijenjati vodeće faktore na više od dva nivoa, čime se samo povećava broj analiza koje treba obaviti.

Tabela 13
Faktori za vrednovanje (validaciju)

Pol životinje	(faktor 1)
Rasa	(faktor 2)
Uslovi transporta	(faktor 3)
Uslovi skladištenja	(faktor 4)
Svježina uzorka	(faktor 5)
Prirast	(faktor 6)
Razni operateri sa različitim iskustvima	(faktor 7)

Tabela 14
Eksperimentalni plan

Vrste	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Br. uzorka
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

S obzirom da se svaki uzorak (svaka kombinacija nivoa faktora) mora obogatiti sa četiri različite koncentracije oko nivoa značajnosti, za svaki nivo se mora analizirati jedan slijepi uzorak, što znači da se za cijeli postupak vrednovanja mora obaviti $5 \times 16 = 80$ analiza.

Na osnovu 80 rezultata analiza moguće je dobiti:

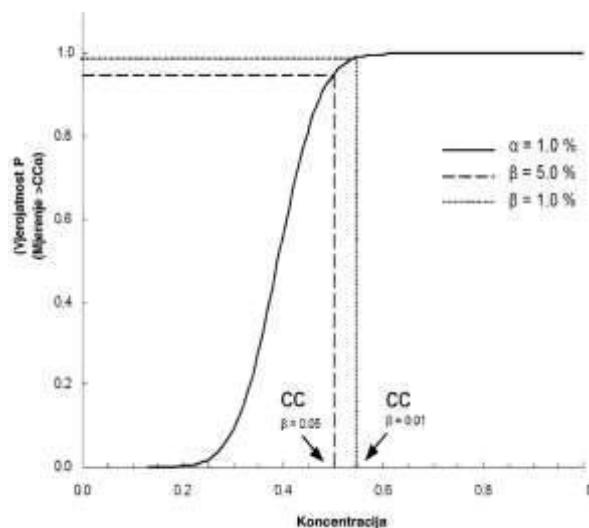
- iskorišćenje;
- ponovljivost po nivou koncentracije (S_{ir}),
- unutarlaboratorijsku obnovu živost po nivou koncentracije (S_{ir}),
- graničnu koncentraciju (količina) analita (CC_{α}),
- sposobnost dokazivanja (CC_{β}),
- krivu efikasnosti (procenat β -greške u odnosu na koncentraciju (u skladu sa podtačkom 2.1.3.2. ovog priloga)),
- robusnost u odnosu na značajne promjene, robusnost u odnosu na manje promjene može se odrediti u skladu sa podtačkom 2.1.1.3. ovog priloga,
- 16 kalibracionih krivih vezanih za uzorke,
- jednu ukupnu kalibracionu krivu,
- interval očekivanja sveobuhvatne kalibracione krive,
- devijacije uzrokovane matriksom (S_{mat}),
- devijacije uzrokovane procesom analize (S_{run}),
- uticaj pojedinačnih faktora na rezultate mjerenja.

Na osnovu dobijenih rezultata moguće je dobiti sveobuhvatnu procjenu efektivnosti metode, jer se ne ispituje uticaj samo pojedinačnih faktora, nego i odgovarajuća kombinacija tih faktora, na osnovu čega se može odrediti da li će se neki od odabranih faktora isključiti iz

ukupne kalibracione krive zbog značajnog odstupanja od standardnih devijacija ostalih faktora.

2.1.3.2. Kriva efikasnosti

Kriva efikasnosti (Slika 1) pruža informacije o sposobnosti dokazivanja metode unutar odabranog opsega koncentracije, upućuje na mogućnost od β -greške pri primjeni ispitivane metode i omogućava praćenje sposobnosti dokazivanja za odgovarajuće kategorije metoda (screening, potvrda) ili tipove metoda (kvalitativna ili kvantitativna) za određenu β -grešku (npr. 5%).



Slika 1. Kriva efikasnosti

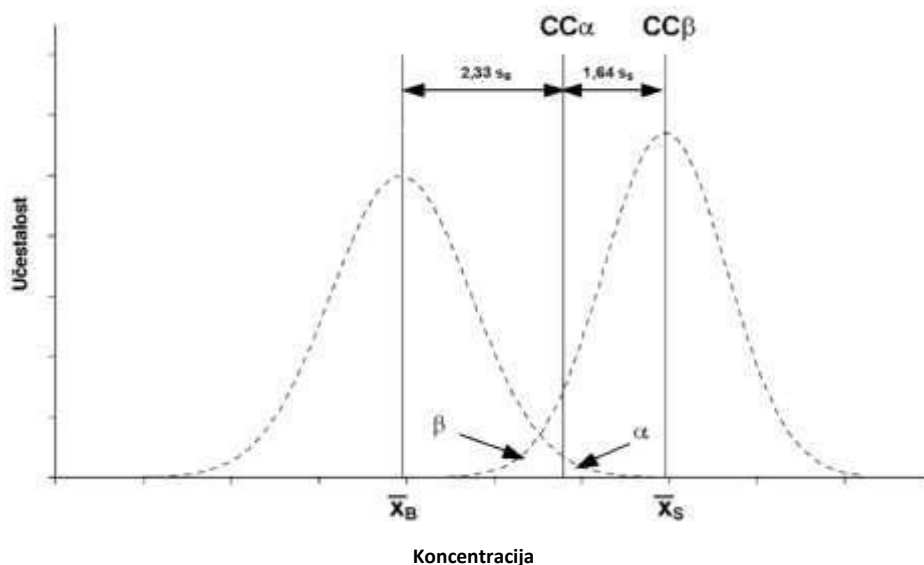
Slika 1. prikazuje primjer grafičkog prikaza sposobnosti dokazivanja ($CC\beta$) analitičke metode. Kod ovdje prikazane metode postoji stalni rizik od donošenja pogrešne odluke od 5% kod koncentracije od 0,50 $\mu\text{g/kg}$. Kod koncentracije od 0,55 $\mu\text{g/kg}$ rizik od lažno negativnog rezultata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

2.1.3.3. Obnovljivost

Utvrđivanje obnovljivosti metode putem unutarlaboratorijskog ispitivanja (interna validacija) zahtjeva ponovna učestvovanja u ispitivanjima osposobljenosti u skladu sa smjernicama ISO 43-1 i 43-2.

Metode se primjenjuju po izboru ukoliko se obezbijedi njihova primjena pod rutinskim uslovima, pri čemu se standardna devijacija može upotrijebiti za ocjenu obnovljivosti metode.

2.2 Grafički prikaz različitih analitičkih granica za supstance



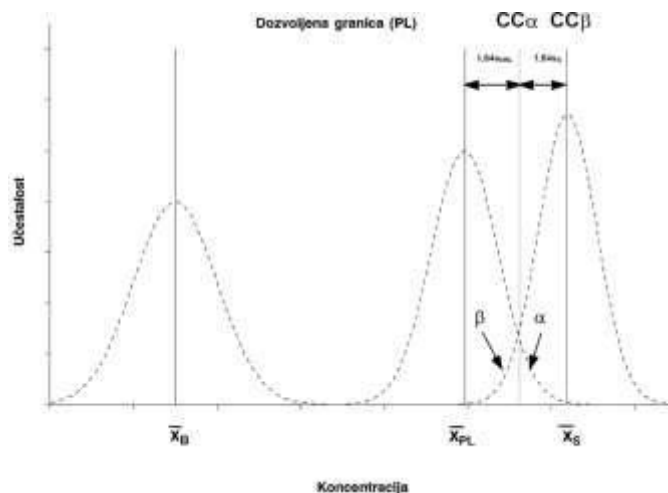
Slika 2 Supstance za koje nije utvrđena dozvoljena granica

$\bar{X}_s$ Srednja vrijednost koncentracije kontaminiranog uzorka

s_B Standardna devijacija standardnog uzorka (određenog pod uslovima unutarlaboratorijske obnovljivosti)

s_s Standardna devijacija kontaminiranog uzorka (određenog pod uslovima unutar-

- laboratorijske obnovljivosti)
- α Procenat lažno neusaglašenih rezultata
- β Procenat lažno usaglašenih rezultata
- CC α Koncentracija sa datom α -greškom i 50% β -greškom
- CC β Koncentracija sa veoma malom α -greškom i β -greškom



Slika 3 Supstance za koje nije utvrđena dozvoljena granica

- $\bar{X}_B$ Srednja vrjednost koncentracije uzorka
- $\bar{X}_{PL}$ Srednja vrijednost koncentracije uzorka koji sadrži analit na dozvoljenom nivou
- $\bar{X}_S$ Srednja vrjednost koncentracije kontaminiranog uzorka
- S_{PL} Standardna devijacija uzorka koji sadrži analit na dozvoljenom nivou
(određenog pod uslovima unutar-laboratorijske obnovljivosti)
- S_S Standardna devijacija kontaminiranog uzorka (određenog pod uslovima unutar-laboratorijske obnovljivosti)
- α Procenat lažno neusaglašenih rezultata
- β Procenat lažno usaglašenih rezultata
- CC α Koncentracija sa datom α -greškom i 50% β -greškom
- CC β Koncentracija sa veoma malom α -greškom i β -greškom

2.3 Ispitivanja robusnosti prema Youden-ovoj metodi

Uporedjivanje prosjeka (A)

- AA= $\Sigma(A_i)/4$
- AB= $\Sigma(B_i)/4$
- AC= $\Sigma(C_i)/4$
- AD= $\Sigma(D_i)/4$
- AE= $\Sigma(E_i)/4$
- AF= $\Sigma(F_i)/4$
- AG= $\Sigma(G_i)/4$
- Aa= $\Sigma(a_i)/4$
- Ab= $\Sigma(b_i)/4$
- Ac= $\Sigma(c_i)/4$
- Ad= $\Sigma(d_i)/4$
- Ae= $\Sigma(e_i)/4$
- Af= $\Sigma(f_i)/4$

Upoređuju se prosjeci velikih slova (A_A do A_G) sa prosjecima pripadajućih malih slova (Aa do Ag). Ako faktor ima neki efekat, 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 greške.

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

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

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, proizilazi da svi faktori zajedno utiču na rezultat, čak i ako svaki pojedinačni faktor ne pokazuje značajni uticaj, i da metoda nije dovoljno robusna u odnosu na odabrane modifikacije.

2.4 Unutrašnji postupak (engl. in house) vrednovanja (validacije)

Unutrašnji postupak vrednovanja (validacije) vrši se prema tab. 13 i 14 ovog priloga.

2.5 Metoda standardnog dodatka

Uzorak za ispitivanje sa T udjelom analita podijeli se na dva poduzorka 1 i 2, čije su mase m_1 odnosno m_2 . Poduzorku 2 doda se zapremina V_A rastvor koncentracije je analita ρ_A .

Postupcima ekstrakcije i prečišćavanja koji su propisani metodom, dobijena su dva ekstrakta poduzoraka, zapremine V_1 odnosno V_2 .

Ukoliko je iskorišćenje analita r_c , oba ekstrakta se ispituju metodom mjerenja osjetljivosti b i daju analitički odgovor x_1 odnosno x_2 .

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

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

Ovom metodom se može odrediti iskorišćenje r_c , a zatim se dijelu ekstrakta poduzorka 1 (zapremine V_3) dodaje poznata količina $\rho_B \times V_B$ analita te se testira.

Analitička koncentracija je x_1 , a iskorišćenje je:

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

Može se izračunati osjetljivost b , kao:

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

AAS (engl. Atomic absorption spectrometry) atomska apsorpciona spektrometrija

AES (engl. Atomic emission spectrometry) atomska emisiona 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 jonizacija

CRM (engl. Certified reference material) potvrđni 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 voltametrij s anodnim otapanjem

ECD (engl. electron capture detection) elektronapsorpciona detekcija

EI (engl. electronic impact ionisation) elektronska jonizacija

GC (engl. gas chromatography) gasna hromatografija

HPLC (engl. high performance liquid chromatography) tečna hromatografija visokog performansa

HPTLC (engl. high performance thin layer chromatography) tankoslojna hromatografija visokog performansa

HRMS (engl. high resolution mass spectrometry) masena spektrometrija visoke rezolucije

ICP-AES (engl. inductively coupled plasma-mass spectrometry) atomska emisiona spektrometrija s induktivno povezanom plazmom

ICP-MS (engl. inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry) masena spektrometrija s induktivno povezanom plazmom

IR (engl. infrared) infracrveni

ISO (engl. International Standard Organisation), Međunarodna organizacija za norme

LC	(engl. liquid chromatography) tečna hromatografija
LR(MS)	(engl. low resolution (mass spectrometry) (masena spektrometrija) niske rezolucije
MRPL	(engl. Minimum required performance limit) minimalno potrebne granice efektivnosti
MS ⁿ	(engl. mass spectrometry) masena spektrometrija eksponent – broj generacija jona izvedenih iz prekursora
m/z	(engl. mass/charge ratio) omjer masa/naboj
R _f	(engl. relative migration to the solvent front) relativna migracija prema frontu rastvaraca (TLC)
RSDL	(engl. relative standard deviation of the laboratory) relativna standardna devijacija laboratorija
SIM	(engl. selected ion monitoring) praćenje odabranih jona
TLC	(engl. thin layer chromatography) tankoslojna hromatografija
UV	(engl. ultraviolet light) ultraljubičasto zračenje
VIS	(engl. visible light) vidljivo zračenje

PRILOG 2

MINIMALNO POTREBNE GRANICE EFEKTIVNOSTI

Supstanca i/ili metabolit	Matriks	MPRL
Hloramfenikol	meso	0,3 µg/kg
	jaja	
	mlijeko	
	urin	
	proizvodi akvakulture	
	med	
Medroksiprogesteron acetat	kapsula bubrega praseta	1 µg/kg
Metaboliti nitrofurana:		
- furazolidon - furaltadon - nitrofurantoin - nitrofurazon	Živalsko meso Proizvodi akvakulture	1 µg/kg za sve
Suma malahit zelenog i leukomalahit zelenog	Meso proizvoda akvakulture	2 µg/kg

PRILOG 3

SUPSTANCE KOJE IMAJU ANABOLIČKI EFEKT, NEDOZVOLJNE SUPSTANCE I SUPSTANCE ZA KOJE SE NE MOŽE ODREDITI MAKSIMALNO DOZVOLJENA KOLIČINA

GRUPA SUPSTANCI/FARMAKOLOŠKI AKTIVNA SUPSTANCA:

Stilbeni, derivati stilbena, njihove soli i estri
 Antitireoidne supstance
 Steroidi
 Laktoni rezorcinne kiseline uključujući i zeranol
 Beta agonisti
 Aristolochia spp. i njeni preparati
 Hloramfen kol
 Hloroform
 Hlorpromazin
 Kolhicin
 Dapson
 Dimetridazol
 Metronidazol
 Nitrofurani (uključujući furozalidon)
 Ronidazol

