

II

(Rättsakter vilkas publicering inte är obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUT

av den 12 augusti 2002

om genomförande av rådets direktiv 96/23/EG avseende analysmetoder och tolkning av resultat

[delgivet med nr K(2002) 3044]

(Text av betydelse för EES)

(2002/657/EG)

EUROPEISKA GEMENSKAPERNAS KOMMISSION HAR FATTAT
DETTA BESLUT

med beaktande av Fördraget om upprättandet av Europeiska gemenskapen,

med beaktande av rådets direktiv 96/23/EG av den 29 april 1996 om införande av kontrollåtgärder för vissa ämnen och restsubstanser som kan finnas i levande djur och i produkter framställda därav och om upphävande av direktiv 85/358/EEG och 86/469/EEG samt beslut 89/187/EEG och 91/664/EEG ⁽¹⁾, särskilt artikel 15.1 andra stycket i detta, och

av följande skäl:

- (1) Förekomsten av restsubstanser i produkter av animaliskt ursprung är ett folkhälsoproblem.
- (2) I kommissionens beslut 98/179/EG av den 23 februari 1998, i vilket tillämpningsföreskrifter avseende officiell provtagning för kontroll av vissa ämnen och resthalter av dessa i levande djur och animaliska produkter ⁽²⁾ fastställs, anges att analysen av proverna endast får utföras av de laboratorier som den behöriga nationella myndigheten har godkänt för officiella kontroller av restsubstanser.
- (3) Det är nödvändigt att säkerställa kvaliteten på, och jämförbarheten för, de analysresultat som lämnas av laboratorier som är godkända för kontroll av restsubstanser. Detta bör uppnås genom användning av kvalitetssäkringssystem och särskilt genom användning av metoder som är validerade enligt allmänna förfaranden och prestationskriterier och genom säkerställandet av spårbarheten till allmänna standarder eller standarder om vilka överenskommelse träffats.
- (4) Rådets direktiv 93/99/EEG av den 29 oktober 1993 om ytterligare åtgärder för offentlig kontroll av livsmedel ⁽³⁾

och kommissionens beslut 98/179/EG kräver att officiella kontrolllaboratorier ackrediteras enligt ISO 17025 (1) från och med januari 2002. Enligt beslut 98/179/EG skall de godkända laboratorierna delta i ett internationellt godkänt system för extern kvalitetskontroll och ackreditering. Därutöver måste de godkända laboratorierna visa sin kompetens genom att regelbundet och med godkänt resultat delta i lämpliga kvalifikationstest som erkänts eller organiserats av nationella eller gemenskapens referenslaboratorier.

- (5) Ett nätverk av gemenskapens referenslaboratorier, nationella referenslaboratorier och nationella kontrolllaboratorier verkar enligt direktiv 96/23/EG för att öka samordningen.
- (6) Som ett resultat av framsteg som gjorts inom analytisk kemi efter antagandet av direktiv 96/23/EG har användningen av rutin- och referensmetoder trängts undan av ett kriteriebaserat tillvägagångssätt, i vilket prestationskriterier och förfaranden för validering av undersökande metoder och konfirmeringsmetoder etableras.
- (7) Det är nödvändigt att fastställa gemensamma kriterier för tolkningen av de officiella kontrolllaboratoriernas provresultat för att garantera ett harmoniserat genomförande av rådets direktiv 96/23/EG.
- (8) Det är nödvändigt att göra det möjligt att fortlöpande fastställa den lägsta funktionsgräns som krävs (MRPL) för de analytiska metoderna för substanser för vilka ingen tillåten gräns har angivits och särskilt för de substanser vilkas användning inte är tillåten eller är specifikt förbjuden inom gemenskapen för att säkerställa ett harmoniserat genomförande av direktiv 96/23/EG.

⁽¹⁾ EGT L 125, 23.5.1996, s. 10.

⁽²⁾ EGT L 65, 5.3.1998, s. 31.

⁽³⁾ EGT L 290, 24.11.1993, s. 14.

- (9) Kommissionens beslut 90/515/EEG av den 26 september 1990 om fastställande av referensmetoder för att påvisa rester av tungmetaller och arsenik ⁽¹⁾, kommissionens beslut 93/256/EEG av den 14 maj 1993 om metoder för att spåra resthalter av ämnen med hormonell eller tyreostatisk verkan ⁽²⁾ samt kommissionens beslut 93/257/EEG av den 15 april 1993 om referensmetoder och förteckning över nationella referenslaboratorier för påvisande av restämnen ⁽³⁾, senast ändrat genom beslut 98/536/EG ⁽⁴⁾, har tidigare setts över mot bakgrund av den vetenskapliga och tekniska utvecklingen, varvid deras räckvidd och bestämmelser har ansetts vara otillräckliga, och bör följaktligen upphävas genom detta beslut.
- (10) För att tillåta att metoder för analyser av officiella prover anpassas till detta beslut, skall en övergångsperiod anges.
- (11) De åtgärder som föreskrivs i detta beslut är förenliga med den uppfattning som Ständiga kommittén för livsmedelskedjan och djurhälsa har.

HÄRIGENOM FÖRESKRIVS FÖLJANDE.

Artikel 1

Ämnesområde och omfattning

I detta beslut anges tillämpningsföreskrifter för de analytiska metoder som skall användas för kontroll av officiella prover som tagits enligt artikel 15.1 andra meningen i direktiv 96/23/EG och specificeras allmänna kriterier för tolkningen av analytiska resultat från officiella kontrolllaboratorier för sådana prover.

Detta beslut gäller inte för substanser för vilka mera specifika regler har fastställts i annan gemenskapslagstiftning.

Artikel 2

Definitioner

I detta beslut skall definitionerna i direktiv 96/23/EG och i bilagan till detta beslut tillämpas.

Artikel 3

Analysmetoder

Medlemsstaterna skall se till att officiella prover som tas enligt direktiv 96/23/EG analyseras med metoder som

- är dokumenterade i provinstruktioner, företrädesvis enligt ISO 78-2 ⁽⁶⁾,
- är förenliga med del 2 i bilagan till detta beslut,
- har validerats enligt de förfaranden som beskrivs i del 3 i bilagan,
- är förenliga med den relevanta lägsta funktionsgräns som krävs och som skall fastställas enligt artikel 4.

⁽¹⁾ EGT L 286, 18.10.1990, s. 33.

⁽²⁾ EGT L 118, 14.5.1993, s. 64.

⁽³⁾ EGT L 118, 14.5.1993, s. 75.

⁽⁴⁾ EGT L 251, 11.9.1998, s. 39.

Artikel 4

Lägsta funktionsgräns som krävs (MRPL)

Detta beslut skall ses över för att fortlöpande fastställa den lägsta funktionsgräns som krävs för analytiska metoder som skall användas för substanser för vilka ingen tillåten gräns har fastställts.

Artikel 5

Kvalitetskontroll

Medlemsstaterna skall säkerställa kvaliteten på analysresultaten av prov som tagits enligt direktiv 96/23/EG, särskilt genom att övervaka provtagning och/eller kalibrering av resultat enligt kapitel 5.9 i ISO 17025 ⁽¹⁾.

Artikel 6

Tolkning av resultaten

1. Det skall anses att analysresultatet inte uppfyller kraven om beslutsgränsen för konfirmeringsmetoden för analyten överskrids.

2. När ett tillåtet gränsvärde fastställts för en substans, är beslutsgränsen den koncentration över vilken man med en statistisk säkerhet av $1 - \alpha$ kan avgöra att det tillåtna gränsvärdet verkligen överskridits.

3. När inget tillåtet gränsvärde fastställts för en substans, är beslutsgränsen den lägsta koncentrationsnivå vid vilken en metod med en statistisk säkerhet av $1 - \alpha$ kan urskilja förekomsten av en viss analyt.

4. För substanser som anges i grupp A i bilaga I till direktiv 96/23/EG får α -felet vara högst 1 procent. För alla andra substanser får α -felet vara högst 5 procent.

Artikel 7

Upphävande

Besluten 90/515/EEG, 93/256/EEG och 93/257/EEG skall upphöra att gälla.

Artikel 8

Övergångsbestämmelser

Metoder för analys av officiella prover av substanser som anges i grupp A i bilaga I till direktiv 96/23/EG, vilka uppfyller kriterierna i besluten 90/515/EEG, 93/256/EEG och 93/257/EEG, får användas upp till två år efter det att detta beslut har trätt i kraft. Metoder som för närvarande gäller för substanser som anges i grupp B i bilaga I till direktiv 96/23/EG skall överensstämma med detta beslut senast fem år efter beslutets tillämpningsdatum.

*Artikel 9***Datum för tillämpning**

Detta beslut skall tillämpas från och med den 1 september 2002.

*Artikel 10***Mottagare**

Detta beslut riktar sig till medlemsstaterna.

Utfärdat i Bryssel den 12 augusti 2002.

På kommissionens vägnar

David BYRNE

Ledamot av kommissionen

BILAGA

PRESTATIONSKRITERIER, ÖVRIGA KRAV OCH FÖRFARANDE FÖR ANALYTISKA METODER

1. DEFINITIONER

I detta beslut används följande beteckningar med de betydelser som här anges:

- 1.1 *noggrannhet*: hur nära ett provresultat överensstämmer med ett accepterat referensvärde (2). Noggrannheten bestäms genom att man bestämmer riktighet och precision.
- 1.2 *alfa (α)-fel*: sannolikheten för att det undersökta provet uppfyller kraven, trots att mätningen visar det motsatta ("oriktigt positivt beslut").
- 1.3 *analyt*: den substans som skall påvisas, identifieras och/eller kvantifieras samt derivat som uppdagas under analysen.
- 1.4 *beta (β)-fel*: sannolikheten för att det undersökta provet faktiskt inte uppfyller kraven, trots att mätresultatet visar det motsatta ("oriktigt negativt beslut").
- 1.5 *systematiskt fel*: skillnaden mellan ett förväntat provresultat och ett accepterat referensvärde (2).
- 1.6 *kalibreringsstandard*: ett hjälpmedel för mätningar, som representerar kvantiteten av den aktuella substansen på ett sätt som knyter dess värde till en referensbas.
- 1.7 *certifierat referensmaterial (CRM)*: ett material som har ett specificerat analytinnnehåll.
- 1.8 *standardadditionskromatografi*: ett förfarande där extraktet delas upp i två delar före kromatografisteget eller -stegen. Den första delen kromatograferas i befintligt skick. Den andra delen blandas med den standardanalyt som skall mätas. Därefter kromatograferas även blandningen. Mängden tillsatt standardanalyt skall motsvara den förväntade mängden analyt i extraktet. Denna metod är utformad för att förbättra identifieringen av en analyt vid användning av kromatografimetoder, särskilt när ingen lämplig inre standard kan användas.
- 1.9 *kollaborativ avprovning*: analys av samma prov med samma metod för att bestämma metodens prestationskaraktär. Studien täcker slumpvisa mätfel och laboratoriets systematiska mätfel.
- 1.10 *konfirmeringsmetod*: sådana metoder som används för att få fullständig eller kompletterande information som gör det möjligt att entydigt identifiera analyten och, om nödvändigt, kvantifieras på den givna nivån.
- 1.11 *beslutsgräns (CCa)*: den gräns vid och över vilken man med en felsannolikhet av α kan avgöra om ett prov inte uppfyller kraven.
- 1.12 *detektionsförmåga (CC β)*: den minsta mängd av en substans som kan upptäckas, identifieras och/eller kvantifieras i ett prov med en felsannolikhet om β . För substanser som saknar fastställt tillåtet gränsvärde, avser detektionsförmågan den lägsta koncentration vid vilken en metod har förmåga att upptäcka faktiskt förorenade prover med en statistisk sannolikhet om $1 - \beta$. För substanser med fastställt gränsvärde, betyder detta att detektionsförmågan är den koncentration vid vilken metoden med en statistisk sannolikhet om $1 - \beta$ kan upptäcka tillåtna koncentrationer.
- 1.13 *spetsat provmaterial*: ett prov som har anrikats med en känd mängd av den analyt som skall påvisas.
- 1.14 *mellanlaboratorieavprovning (jämförelse)*: två eller flera laboratoriers organisation, utförande och värdering av material från en och samma provtagning i överensstämmelse med förutbestämda betingelser, för att fastställa provmetodens prestation. Beroende på syftet kan studien klassificeras som en kollaborativ avprovning eller en kvalifikationsprovning.
- 1.15 *inre standard*: en substans som inte finns i provet och vars fysikalisk-kemiska egenskaper i så hög grad som möjligt liknar analyten som skall identifieras. Den inre standarden tillsätts varje prov och varje kalibreringsstandard.
- 1.16 *laboratorieprov*: ett prov som har förberetts för att sändas till ett laboratorium och som är avsett för kontroll eller undersökning.
- 1.17 *given nivå*: den koncentration av substans eller analyt i ett prov som är signifikant för att avgöra dess förenlighet med lagstiftningen.
- 1.18 *lägsta funktionsgräns som krävs (MRPL)*: den minsta mängd av en analyt i ett prov som åtminstone måste detekteras och konfirmeras. Avsikten är att harmonisera den analytiska prestandan för substanser som saknar fastställt gränsvärde.

- 1.19 *prestationskarakteristika*: funktionell kvalitet som kan tillskrivas en analytisk metod. Detta kan t.ex. vara specificitet, noggrannhet, riktighet, precision, repeterbarhet, reproducerbarhet, återvinning, detektionsförmåga och motståndsförmåga.
- 1.20 *prestationskriterier*: behovet av prestationskarakteristika, genom vilka kan avgöras om den analytiska metoden är lämplig för sitt ändamål och ger tillförlitliga resultat.
- 1.21 *tillåten gräns*: maximalt värde för rests substans, högsta gränsvärde eller annan maximal tolerans för substanser som angivits på annan plats i gemenskapslagstiftningen.
- 1.22 *precision*: graden av överensstämmelse mellan oberoende testresultat som erhållits under fastställda (förutbestämda) betingelser. Måttet på precision uttrycks vanligen som brist på precision och beräknas som standardavvikelse av provresultatet. Lägre precision anges som en större standardavvikelse (2).
- 1.23 *kvalifikationsprövning*: analys av ett och samma prov för att ge laboratorier möjlighet att välja sina egna metoder, förutsatt att dessa metoder används under rutinmässiga förhållanden. Prövningen måste genomföras enligt ISO-guide 43-1 (3) och 43-2 (4) och kan användas för att fastställa metodernas reproducerbarhet.
- 1.24 *kvalitativ metod*: en analytisk metod som identifierar en substans på grundval av dess kemiska, biologiska eller fysiska egenskaper.
- 1.25 *kvantitativ metod*: en analytisk metod som fastställer mängden eller massfraktionen för en substans, så att den kan uttryckas som ett numeriskt värde med lämplig enhet.
- 1.26 *bestämning av kemikalieblank*: en fullständig analys som utelämnar provportionen eller använder motsvarande mängd lämpligt lösningsmedel i stället för provportionen.
- 1.27 *återvinning*: den procentuella andelen av den faktiska koncentrationen av en substans som återvinns under en analys. Den bestäms under valideringen, om det inte finns något certifierat referensmaterial.
- 1.28 *referensmaterial*: ett material hos vilket en eller flera egenskaper har bestämts med en validerad metod, så att det kan användas för att kalibrera utrustning eller för att kontrollera en mätmetod.
- 1.29 *repeterbarhet*: precision under repeterbarhetsbetingelser (2).
- 1.30 *repeterbarhetsbetingelser*: betingelser när oberoende provresultat fås med samma metod på identiskt provmaterial i samma laboratorium och av samma person som använder samma utrustning (2).
- 1.31 *reproducerbarhet*: precision under reproducerbarhetsbetingelser (2) (4).
- 1.32 *reproducerbarhetsbetingelser*: betingelser under vilka provresultat fås med samma metod på identiskt provmaterial i olika laboratorier med olika personer som använder olika utrustning (2) (4).
- 1.33 *motståndsförmåga*: en analytisk metods känslighet för ändringar av försöksbetingelserna uttryckt som en förteckning över provmaterial, analyter, lagringsförhållanden, miljö- och/eller provberedningsförhållanden, under vilka metoden kan tillämpas som den beskrivs eller med specificerade mindre ändringar. För alla de försöksbetingelser som i praktiken kan variera (t.ex. reagensernas stabilitet, provsammansättning, pH, temperatur) skall alla avvikelser som kan påverka analysresultatet anges.
- 1.34 *bestämning av blankprov*: en fullständig analys av en provportion som har tagits från ett prov som inte innehåller analyten.
- 1.35 *screeningmetod*: metoder som används för att påvisa förekomsten av en substans eller substansklass på den aktuella nivån. Dessa metoder har en hög provkapacitet och används för att undersöka stora mängder prover för eventuella positiva resultat. De är utformade för att undvika falskt negativa resultat.
- 1.36 *enskild laboratoriestudie (inomlaboratievalidering)*: en analytisk undersökning som involverar ett enda laboratorium som använder en metod för att analysera samma eller olika provmaterial under olika förhållanden och under berättigat långa tidsintervaller.
- 1.37 *specificitet*: en metods förmåga att skilja mellan den analyt som skall mätas och andra substanser. Denna egenskap är i huvudsak en funktion av den mätteknik som används, men kan variera beroende på förenings- eller matrisklass.

- 1.38 *standardtillsats*: ett förfarande där provet delas upp i två (eller flera) provportioner. En av portionerna analyseras som sådan och de andra provportionerna tillsätts kända mängder av standardanalyt före analysen. Mängden standardanalyt som tillsätts måste vara mellan två och fem gånger större än den förväntade mängden analyt i provet. Denna metod är utformad för att bestämma mängden av en analyt i ett prov med beaktande av återvinningen för analysmetoden.
- 1.39 *standardanalyt*: en analyt vars innehåll och renhet är kända och bestyrkta och som skall användas som en referens vid analysen.
- 1.40 *substans*: material med specifik eller klart avgränsad sammansättning samt dess metaboliter.
- 1.41 *provportion*: den mängd material som hämtats från det prov på vilket analysen eller observationen utförs.
- 1.42 *prov*: ett prov som har beretts av ett laboratorieprov och från vilket provportionen tas.
- 1.43 *riktighet*: hur nära ett provresultat överensstämmer med ett genomsnittligt värde som erhållits från ett stort antal provresultat och ett accepterat referensvärde. Riktigheten uttrycks vanligen som systematisk fel (2).
- 1.44 *enheter*: de enheter som beskrivs i ISO 31 (20) och direktiv 71/354/EEG (19).
- 1.45 *validering*: konfirmation genom undersökning och tillhandahållande av faktiska bevis att bestämda krav för ett specifikt användningsområde uppfylls.
- 1.46 *inomlaboratoriereproducerbarhet*: den precision som fås i samma laboratorium under fastställda (förutbestämda) betingelser (avseende t.ex. metod, provmaterial, personer, omgivning) under berättigat långa tidsintervall.

2. PRESTATIONSKRITERIER FÖR OCH ÖVRIGA KRAV PÅ ANALYTISKA METODER

Analytiska metoder eller kombinationer av andra metoder än de som beskrivs nedan får endast användas för screening eller konfirmation om det kan visas att de uppfyller de relevanta krav som fastställs i detta beslut.

2.1 ALLMÄNNA KRAV

2.1.1 Hantering av prover

Prover skall tas, hanteras och bearbetas så att sannolikheten för att en eventuell analyt påvisas blir så stor som möjlig. Provhanteringen skall förhindra eventuell oavsiktlig förorening eller förlust av analyt.

2.1.2 Provens prestanda

2.1.2.1 Återvinning

Under analysen av proverna, skall återvinningen bestämmas för varje provsats om en fast återvinningskorrigeringsfaktor används. Om återvinningsgraden ligger inom gränserna, kan den fasta korrigeringsfaktorn användas. Annars skall återvinningsfaktorn som fastställts för den enskilda satsen användas, om inte den specifika återvinningsfaktorn för analyten i provet används, varvid förfarandet för standardtillsatser (se punkt 3.5) eller en inre standard skall användas för den kvantitativa bestämningen av en analyt i ett prov.

2.1.2.2 Specificitet

En metod skall ha förmåga att skilja mellan analyten och de andra substanserna under försöksbetingelserna. En uppskattning av i vilken grad detta är möjligt skall göras. Strategier för att övervinna varje förutsägbar interferens med substanser när den beskrivna mättekniken används, t.ex. homologa och analoga ämnen eller metaboliter av den restsubstans som undersöks, skall användas. Det är av största betydelse att den interferens som kan orsakas av matriskomponenterna undersöks.

2.2 SCREENINGMETODER

Endast sådana analysmetoder som bevisats vara validerade på ett dokumenterat, spårbart sätt och som har en frekvens av falskt negativa resultat som är < 5 (β -fel) på den givna nivån, skall användas för screening i enlighet med direktiv 96/23/EG. Vid ett misstänkt positivt resultat skall resultatet verifieras med hjälp av en konfirmeringsmetod.

2.3 KONFIRMERINGSMETODER FÖR ORGANISKA RESTSUBSTANSER OCH FÖRORENINGAR

Konfirmeringsmetoderna för organiska restsustanser eller föroreningar skall ge information om analytens kemiska struktur. Metoder som endast grundar sig på kromatografisk analys utan användning av spektrometrisk detektion är således olämpliga att användas som enda konfirmeringsmetod. Om en enskild teknik saknar tillräcklig specificitet, skall den önskade specificiteten uppnås genom analyser som består av en lämplig kombination av rening, kromatografisk separation och spektrometrisk detektion.

Följande metoder eller kombinationer av metoder anses lämpliga för identifiering av organiska restsustanser eller föroreningar för substansgrupper enligt tabellen nedan:

Tabell 1

Lämpliga konfirmeringsmetoder för organiska restsustanser och föroreningar

Mätteknik	Substanser bilaga I 96/23/EG	Begränsningar
Vätskekromatografi (LC) eller gaskromatografi (GC) med masspektrometri	Grupperna A och B	Endast efter online eller offline kromatografisk separation Endast om fullscantekniker används eller vid användning av åtminstone 3 (grupp B) eller 4 (grupp A) identifieringspunkter för tekniker som inte registrerar hela masspektrumet
LC eller GC med infraröd-spektrometri	Grupp A och B	Specifika krav för absorption vid infraröd-spektrometri skall tillgodoses
LC-fullscan DAD	Grupp B	Specifika krav för absorption vid infraröd-spektrometri skall tillgodoses
LC-fluorescens	Grupp B	Endast för molekyler som uppvisar en naturlig fluorescens och för molekyler som fluorescerar antingen efter att de har omvandlats eller bildat derivat
2-D TLC – full-scan UV/VIS	Grupp B	Tvådimensionell högpresterande tunnskiktskromatografi (HPTLC) och standardadditionskromatografi är obligatoriska
GC-elektroninfångningsdetektion	Grupp B	Endast om två kolumner med olika polaritet används
LC-immunogram	Grupp B	Endast om minst två olika kromatografiska system eller en annan, oberoende detekteringsmetod används
LC-UV/VIS (en bestämd våglängd)	Grupp B	Endast om minst två olika kromatografiska system eller en annan, oberoende detekteringsmetod används

2.3.1 Allmänna prestationskriterier och krav

Konfirmeringsmetoderna skall ge information om analytens kemiska struktur. Om mer än en förening ger samma reaktion, innebär det att metoden inte kan skilja mellan dessa föreningar. Metoder som endast grundar sig på kromatografisk analys utan användning av spektrometrisk detektion är olämpliga att användas som enda konfirmeringsmetoder.

En lämplig inre standard som används i metoden skall tillsättas provportionen i början av extraktionsmetoden. Beroende på vad som finns tillgängligt skall antingen stabila isotopmärkta former av analyten, vilka är särskilt lämpliga för masspektrometrisk detektion, eller föreningar vilkas struktur liknar analytens användas.

Om ingen lämplig inre standard kan användas, skall identifieringen av analyten verifieras med standardadditionskromatografi. I detta fall skall bara en topp erhållas. Toppens ökade höjd (eller area) skall motsvara mängden tillsatt analyt. I samband med gaskromatografi (GC) eller vätskekromatografi (LC) skall toppens bredd vid halva maximihöjden vara 90–110 % av den ursprungliga bredden och retentionstiderna skall vara identiska med en marginal på 5 %. Vid tunnskiktskromatografiska metoder (TLC) skall endast den fläck som antas tillhöra analyten bli kraftigare. Det får inte uppstå någon ny fläck och utseendet får inte ändras.

Referensmaterial eller spetsat material som innehåller kända mängder analyt, som ligger vid eller nära antingen den högsta tillåtna gränsen eller beslutsgränsen (positivt kontrollprov) samt negativt kontrollmaterial och reagensblankprov skall helst genomgå hela analysförloppet samtidigt som varje sats analysprover undersöks. Ordningen vid injicering av extrakten i analysinstrumentet är följande: reagensblankprov, negativt kontrollprov, prov(er) som skall konfirmeras, negativt kontrollprov på nytt och slutligen positivt kontrollprov. Alla avvikelser från denna sekvens skall motiveras.

2.3.2 Ytterligare prestationskriterier och övriga krav för kvantitativa analysmetoder

2.3.2.1 Riktigheten hos kvantitativa metoder

Vid upprepade analyser av ett certifierat referensmaterial får avvikelserna för den genomsnittliga massfraktionen, som har bestämts genom experiment och korrigerats för återvinningen, inte ligga utanför följande riktvärden:

Tabell 2

Minsta riktighet hos kvantitativa metoder

Massfraktion	Område
≤ 1 µg/kg	– 50 % till + 20 %
> 1 µg/kg till 10 µg/kg	– 30 % till + 10 %
≥ 10 µg/kg	– 20 % till + 10 %

När det inte finns något certifierat referensmaterial tillgängligt kan riktigheten hos mätningarna fastställas genom återvinningen för tillsatser av kända mängder av analyten eller analyterna till en blankmatris. Data som korrigerats med medelvärde av återvinningen godkänns endast om de ligger inom de gränser som anges i tabell 2.

2.3.2.2 Precision för kvantitativa metoder

Variationskoefficienten (CV) mellan och inom laboratorier för upprepade analys av ett referensmaterial eller spetsat material under reproducerbarhetsbetingelser får inte överskrida det värde som beräknats enligt Horwitz-ekvationen. Ekvationen lyder:

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

där C är massfraktionen uttryckt som tiopotens (t.ex. 1 mg/g = 10^{-3}). Se tabell 3 för exempel.

Tabell 3

Exempel på variationskoefficienter för reproducerbarheten för kvantitativa metoder för ett antal massfraktioner av en analyt

Massfraktion	CV för reproducerbarhet (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Vid massfraktioner lägre än 100 µg/kg fås oacceptabelt höga värden då Horwitz-ekvationen används. Variationskoefficienterna för koncentrationer som är lägre än 100 µg/kg skall därför vara så låga som möjligt.

Vid analyser som utförs under reproducerbarhetsbetingelser bör variationskoefficienten inom laboratoriet i normala fall vara mellan en halv och två tredjedelar av värdena som anges ovan. Vid analyser som utförs under inomlaboratoriereproducerbarhetsbetingelser får variationskoefficienten inom laboratoriet inte vara större än variationskoefficienten för reproducerbarheten.

För substanser med ett fastställt tillåtet högsta gränsvärde skall metoden inom laboratoriet uppnå en reproducerbarhet som inte är större än motsvarande variationskoefficient för reproducerbarheten vid en koncentration på 0,5 gånger det tillåtna gränsvärdet.

2.3.3 Prestationskriterier och övriga krav för masspektrometrisk detektion

Masspektrometrimetoder är lämpliga som konfirmerings- och/eller referensmetoder bara om de används efter en kromatografisk separation som utförs online eller offline.

2.3.3.1 Kromatografisk separation

Vid GC-MS-förfaranden skall kapillärkolumner användas vid den gaskromatografiska separationen. Vid LC-MS-förfaranden skall lämpliga LC-kolumner användas vid den kromatografiska separationen. I båda fallen är den minsta godkända retentionstiden för analyten som undersöks två gånger den retentionstid som motsvarar hålrumsvolymen för kolumnen. Retentionstiden (eller den relativa retentionstiden) för analyten i provportionen skall motsvara kalibreringsstandarden inom ett bestämt retentionstidsfönster. Retentionstidsfönstret skall stå i rimlig proportion till det kromatografiska systemets upplösningssförmåga. Analytens relativa retentionstid, dvs. förhållandet mellan analytens och den inre standardens kromatografiska retentionstid, skall motsvara kalibreringslösningens med en tolerans på $\pm 0,5\%$ för gaskromatografi och $\pm 2,5\%$ för vätskekromatografi.

2.3.3.2 Masspektrometrisk detektion

Masspektrometrisk detektion skall utföras genom användning av MS-tekniker, såsom registrering av hela masspektra (fullscan) eller selektiv jonanalys (SIM) och MS-MSⁿ-tekniker som selektiv referensanalys (SRM) eller andra lämpliga MS- eller MS-MSⁿ-tekniker i kombination med lämpliga joniseringsmetoder. Vid högupplösande masspektrografi (HRMS), skall upplösningen normalt bli större än 10 000 för hela massområdet vid 10 % "valley".

Fullscan: Om den masspektrometriska bestämningen utförs genom registrering av fullscan-spektra är närvaron obligatorisk för alla uppmätta diagnostiska joner (molekyljonen, karaktäristiska addukter av molekyljonen, karaktäristiska fragmentjoner och isotopjoner), som har en relativ intensitet som är högre än 10 % i referensspektret för kalibreringsstandarden.

SIM: Om den masspektrometriska bestämningen utförs med hjälp av massfragmentografi, skall molekyljonen helst vara en av de valda diagnostiska jonerna (molekyljonen, karaktäristiska addukter av molekyljonen, karaktäristiska fragmentjoner och alla deras isotopjoner). De valda diagnostiska jonerna skall inte uteslutande härröra från samma del av molekylen. Signal-brusförhållandet för varje diagnostisk jon skall vara $\geq 3:1$.

Fullscan och SIM: De relativa intensiteterna för de påvisade jonerna, uttryckta som procent av intensiteten av den starkaste jonen eller övergången, skall stämma överens med intensiteterna för kalibreringsstandarden, antingen från kalibreringsstandardlösningarna eller från spetsade prover, vid jämförbara koncentrationer, uppmätta under samma betingelser. Intensiteterna skall ligga inom följande toleranser:

Tabell 4

Högsta tillåtna toleranser för relativa jonintensiteter vid användning av olika masspektrometriska tekniker

Relativ intensitet (% av bastoppen)	EI-GC-MS (relativ)	CI-GC-MS, GC-MS ⁿ LC-MS, LC-MS ⁿ (relativ)
> 50 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
> 20 %–50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
> 10 %–20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Tolkning av masspektrala data: De relativa intensiteterna för de diagnostiska jonerna och/eller moder-/dotterjonparen skall identifieras genom jämförelse av spektra eller genom integrering av signalerna för de enskilda massfragmenten. När bakgrundskorrigerings används skall denna användas på samma sätt för hela satsen (se 2.3.1 fjärde stycket) och klart anges.

Fullscan: När fullscan-spektra registreras i en enda masspektrometri, skall det finnas minst fyra joner med en relativ intensitet på ≥ 10 procent av bastoppen. Molekyljonen skall ingå om den finns med i referensspektret med en relativ intensitet på ≥ 10 procent. Minst fyra joner skall ligga inom de högsta tillåtna toleranserna för de relativa jonintensiteterna (tabell 5). Datorstödd sökning i databaser får användas. I detta fall skall jämförelsen av masspektrala data i provet med kalibreringslösningen överstiga en kritisk matchningsfaktor. Denna faktor skall under valideringen bestämmas för varje enskild analyt på grundval av spektra som uppfyller de kriterier som beskrivs nedan. Variationen i spektrat som orsakas av provmatrisen och detektorns prestanda skall kontrolleras.

SIM: När massfragment mäts med andra än fullscan-tekniker, skall ett system med identifieringspunkter användas för att tolka data. Vid konfirmation av ämnen i grupp A i bilaga I till direktiv 96/23/EG skall minst fyra identifieringspunkter krävas. Vid konfirmation av ämnen i grupp B i bilaga I till direktiv 96/23/EG krävs minst tre identifieringspunkter. I tabellen nedan visas antalet identifieringspunkter som kan erhållas vid var och en av de grundläggande masspektrometriska teknikerna. För att uppfylla kraven för identifieringspunkterna som krävs för konfirmation och för att beräkna summan av identifieringspunkterna skall emellertid

- minst ett jonförhållande mäts,
- alla relevanta uppmätta jonförhållanden uppfylla kriterierna som beskrivs ovan, och
- högst tre enskilda tekniker kombineras för att uppnå det minsta antalet identifieringspunkter.

Tabell 5

Förhållandet mellan ett antal klasser av massfragment och identifieringspunkter som kan fås

MS-teknik	Identifieringspunkter per jon
Lågupplösande masspektrometri (LR)	1,0
LR-MS ⁿ moderjon	1,0
LR-MS ⁿ övergångsprodukter	1,5
HRMS	2,0
HR- MS ⁿ moderjon	2,0
HR-MS ⁿ övergångsprodukter	2,5

Anmärkningar:

- Varje jon får bara räknas en gång.
- GS-MS med elektronstötjonisation betraktas som en annan teknik än GC-MS med kemisk jonisering.
- Olika kemiska derivat av en analyt kan bara användas för att öka antalet identifieringspunkter om derivaten använder olika reaktionskemi.
- Beträffande substanser i grupp A i bilaga I till direktiv 96/23/EG när följande tekniker används vid analysen: högpresterande vätskekromatografi (HPLC) kopplat med fullscan-spektrometri med diod array-detektion (DAD); eller HPLC kopplat med fluorescensdetektion; eller HPLC kopplat till ett immunogram; eller tvådimensionell tunnslikt-kromatografi kopplad till spektrometrisk detektion; de kan bidra med högst en identifieringspunkt under förutsättning att de relevanta kriterierna för dessa tekniker är uppfyllda.
- Övergångsprodukter omfattar både dotter- och dotterdotterprodukter.

Tabell 6

Exempel på antalet identifieringspunkter som fås för ett antal tekniker och kombinationer av dessa (n = ett heltal)

Teknik(er)	Antal joner	Identifieringspoäng
GC-MS (EI eller CI)	N	n
GC-MS (EI och CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
GC-MS (EI eller CI) 2 derivat	2 (derivat A) + 2 (derivat B)	4
LC-MS	N	n
GC-MS-MS	1 moderjon och 2 dotterjoner	4
LC-MS-MS	1 moderjon och 2 dotterjoner	4
GC-MS-MS	2 moderjoner, med vardera 1 dotterjon	5
LC-MS-MS	2 moderjoner, med vardera 1 dotterjon	5
LC-MS-MS-MS	1 moderjon, 1 dotterjon och 2 dotterdotterjoner	5,5
HRMS	N	2 n
GC-MS och LC-MS	2 + 2	4
GC-MS och HRMS	2 + 1	4

2.3.4 Prestationskriterier och övriga krav för kromatografi kopplad till infraröd detektion

Lämpliga toppar: Med lämpliga toppar avses absorptionsstoppar i en kalibreringsstandards infraröda spektrum vilka uppfyller följande krav.

2.3.4.1 Infraröd detektion

Absorptionsmaximum: Absorptionsmaximum skall ligga inom vågtalsområde 4 000–500 cm^{-1} .

Absorptionsintensiteten: Absorptionsintensiteten skall inte understiga

- a) antingen en specifik molabsorbans på 40 i förhållande till toppbaslinjen, eller
- b) en relativ absorbans på 12,5 procent av absorbansen hos toppen med den högsta intensiteten inom området 4 000–500 cm^{-1}

om båda mäts i förhållande till noll-linjen, och 5 procent av absorbansen hos toppen med den högsta intensiteten inom området 4 000–500 cm^{-1} , om båda mäts i förhållande till sin toppbaslinje.

Anmärkning: Även om lämpliga toppar enligt alternativ a teoretiskt kan vara att föredra, är lämpliga toppar enligt alternativ b lättare att bestämma i praktiken.

Antalet toppar i analytens infraröda spektrum, vilkas frekvenser motsvarar en lämplig topp inom kalibreringsstandards spektrum, bestäms med en marginal på $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$.

2.3.4.2 Tolkning av infraröda spektraldata

Absorption skall förekomma i alla de områden inom analytens spektrum som motsvarar en lämplig topp inom kalibreringsstandards referensspektrum. Minst sex lämpliga toppar krävs inom kalibreringsstandards infraröda spektrum. Om det finns mindre än sex lämpliga toppar (7) inom ett spektrum, kan detta inte användas som referensspektrum. "Överensstämmelsen", dvs. den procentuella andelen lämpliga toppar som påträffats inom analytens infraröda spektrum, skall vara minst 50. Om det inte finns någon exakt motsvarighet till en lämplig topp, skall det relevanta området i analytens spektrum vara förenligt med förekomsten av en lämplig topp. Denna metod kan endast tillämpas på absorptionsstoppar i provets spektrum med en intensitet på minst tre gånger brusets mellan topparna.

2.3.5 Prestationskriterier och övriga krav för bestämning av en analyt genom vätskekromatografi och andra detektionstekniker

2.3.5.1 Kromatografisk separation

En inre standard skall användas om det finns lämpligt material till detta. Det skall helst vara en relaterad standard med en retentionstid som är i närheten av analytens. Analyten skall eluera vid den retentionstid som är karakteristisk för motsvarande kalibreringsstandard under samma försöksbetingelser. Den minsta tillåtna retentionstiden för en analyt skall vara två gånger den retentionstid som motsvarar hålrumsvolymen för kolonnen. Analytens relativa retentionstid, dvs. förhållandet mellan analytens och den inre standardens retentionstid, skall vara densamma som kalibreringsstandards i lämplig matris inom en marginal av $\pm 2,5 \%$.

2.3.5.2 Fullscan UV/VIS-detektering

Prestationskriterierna för LC-metoder skall uppfyllas.

Våglängden för maximal absorption i analytens spektrum skall vara identisk med kalibreringsstandards våglängd inom en marginal som bestäms av detektionssystemets upplösning. Vid diod array-detektion ligger den typiska marginalen inom $\pm 2 \text{ nm}$. Analytens spektrum över 220 nm får inte skilja sig utseendemässigt från kalibreringsstandards spektrum vad gäller de delar av dessa spektra som har en relativ absorbans på $\geq 10 \%$. Detta kriterium är uppfyllt om samma maxima föreligger och skillnaden mellan de båda spektra inte på någon iakttagen punkt överstiger 10 % av kalibreringsstandards absorbans. Om datorstödd sökning och matchning i databaser används, skall jämförelsen av de spektrala data för provet med data för kalibreringslösningen överstiga en kritisk matchningsfaktor. Denna faktor skall under valideringen bestämmas för varje enskild analyt på grundval av spektra som uppfyller de kriterier som beskrivs ovan. Variationen i spektrat som orsakas av provmatrisen och detektorns prestanda skall kontrolleras.

2.3.5.3 Prestationskriterier för fluorimetrisk detektion

Prestationskriterierna för LC-metoder skall uppfyllas.

Metoden kan användas för molekyler som uppvisar en naturlig fluorescens och för molekyler som fluorescerar antingen efter att de har omvandlats eller bildat derivat. Valet av exciterings- och emissionsvåglängderna i kombination med de kromatografiska betingelserna skall göras så att förekomsten av interfererande komponenter i blankprovsextrakten minimeras.

Avståndet från den närmaste maximitoppen på kromatogrammet till den markerade analyttoppen skall vara minst en full bredd vid 10 % av maximihöjden för analyttoppen.

2.3.5.4 Prestationskriterier för bestämning av en analyt genom LC-immunogram

LC-immunogram är olämplig att användas som enda konfirmeringsmetod.

Relevanta kriterier för LC-metoder skall uppfyllas.

De på förhand definierade kvalitetskontrollparametrarna, t.ex. icke-specifik bindning, den relativa bindningen för kontrollproverna, blankprovets absorbansvärde, skall ligga inom de gränser som fastställs under valideringen av undersökningen.

Immunogrammet skall bestå av minst fem fraktioner.

Varje fraktion skall vara mindre än hälften av toppens bredd.

Den fraktion som innehåller den högsta analytkoncentrationen skall vara densamma för det misstänkta provet, det positiva kontrollprovet och standarden.

2.3.5.5 Kriterier för bestämning av en analyt genom vätskekromatografi med UV/VIS-detektion (en våglängd)

Vätskekromatografi med UV/VIS-detektion (en våglängd) är olämplig att användas som enda konfirmeringsmetod.

Avståndet från den närmaste maximitoppen på kromatogrammet till den markerade analyttoppen skall vara minst en full bredd vid 10 % av maximihöjden för analyttoppen.

2.3.6 Prestationskriterier och övriga krav för bestämning av en analyt genom 2-D TLC, kopplad till fullscan UV-spektrometridetektion

Tvådimensionell högpresterande tunnskiktskromatografi och standardadditionskromatografi är obligatoriska.

Analytens RF-värden skall överensstämma med standardernas RF-värden inom $\pm 5\%$.

Analytens utseende skall inte kunna skiljas från standardens.

Beträffande fläckar med samma färg skall avståndet mellan mittpunkten för den punkt som ligger närmast och mittpunkten för analytfläcken vara minst lika med hälften av summan av fläckarnas diameter.

Analytens spektrum får inte skilja sig utseendemässigt från standardens spektrum, enligt beskrivningen av fullscan UV/VIS-detektion.

Om datorstödd sökning och matchning i databaser används skall jämförelsen av de spektrala data för provet med data för kalibreringslösningen överstiga en kritisk matchningsfaktor. Denna faktor skall under valideringen bestämmas för varje enskild analyt på grundval av spektra som uppfyller de kriterier som beskrivs ovan. Variationen i spektrat som orsakas av provmatrisen och detektorns prestanda skall kontrolleras.

2.3.7 Prestationskriterier och övriga krav för bestämning av en analyt genom gaskromatografi i kombination med elektroninfångningsdetektion (ECD)

En inre standard skall användas om det finns lämpligt material till detta. Det skall helst vara ett relaterat ämne med en retentionstid som är i närheten av analytens. Analyten skall eluera vid den retentionstid som är karakteristisk för motsvarande kalibreringsstandard under samma försöksbetingelser. Den minsta tillåtna retentionstiden för en analyt skall vara två gånger den retentionstid som motsvarar hålrumsvolymen för kolonnen. Analytens relativa retentionstid, dvs. förhållandet mellan analytens och den inre standardens retentionstid, skall vara densamma som kalibreringsstandardens i lämplig matris inom en marginal av $\pm 0,5\%$. Avståndet från den närmaste maximitoppen på kromatogrammet till den markerade analyttoppen skall vara minst en full bredd vid 10 % av maximihöjden för analyttoppen. För ytterligare information kan standardadditionskromatografi användas.

2.4 KONFIRMERINGSMETODER FÖR GRUNDÄMNEN

Konfirmeringsanalyser av kemiska grundämnen skall grunda sig på entydig identifiering och korrekt, liksom preciserad, kvantifiering genom fysikalisk-kemiska egenskaper som är unika för det aktuella grundämnet (t.ex. grundämnestypisk våglängd för emitterad eller absorberad strålning, atomvikt) vid den givna nivån.

Följande metoder eller kombinationer av metoder anses lämpliga för identifiering av kemiska grundämnen:

Tabell 7

Lämpliga metoder för konfirmering av kemiska grundämnen

Teknik	Parameter som mätts
Pulspolarografi	Elektrisk signal
Atomabsorptionsspektrometri	
Flamma	Absorptionsvåglängd
Hydridgenerering	Absorptionsvåglängd
Kall flamlös	Absorptionsvåglängd
Elektrotermisk atomisering (grafitugn)	Absorptionsvåglängd
Atomemissionsspektrometri	
Induktivt kopplad plasma	Emissionsvåglängd
Masspektrometri	
Induktivt kopplad plasma	Förhållandet massa/laddning

2.4.1 Allmänna prestationskriterier och övriga krav för konfirmeringsmetoder

Referensmaterial eller spetsat material som innehåller kända mängder analyt, som ligger vid eller nära antingen den högsta tillåtna gränsen eller beslutsgränsen (positivt kontrollprov) samt negativt kontrollmaterial och reagensblankprov skall helst genomgå hela analysförfarandet med varje sats analysprover som undersöks. Den rekommenderade ordningen vid injicering av extrakten i analysinstrumentet är följande: reagensblankprov, negativt kontrollprov, prov(er) som skall konfirmeras, negativt kontrollprov och slutligen positivt kontrollprov. Alla avvikelser från denna sekvens skall motiveras.

I allmänhet kräver de flesta analysmetoderna fullständig nedbrytning av den organiska matrisen för att lösningar skall fås före bestämningen av analyten. Detta kan uppnås med hjälp av mikrovågsmineraliseringsmetoder, vilka minimerar risken för förlust och/eller förorening av den givna analyten. Sanerade teflonkärl av god kvalitet skall användas. Om andra våta eller torra nedbrytningsmetoder används, skall dokumenterade bevis finnas tillgängliga för att utesluta eventuella förlust- eller föroreningsfenomen. Som ett alternativ till nedbrytning kan under vissa förhållanden separationsmetoder (t.ex. extraktion) väljas för att separera och/eller koncentrera analyterna från matrisbeståndsdelarna och för att överföra proverna till analysutrustningen.

Vad beträffar kalibreringen, oberoende om den är extern eller baseras på tillsatser av standardlösning, är det viktigt att arbetsområdet som fastställts för analysmetoden inte överskrids. Vid externa kalibreringar är det obligatoriskt att kalibreringsstandarderna bereds i en lösning som i så stor utsträckning som möjligt motsvarar provlösningens sammansättning. Bakgrundskorrigeringar skall också tillämpas om detta krävs med hänsyn till specifika analytiska förhållanden.

2.4.2 Ytterligare prestationskriterier och övriga krav för kvantitativa analysmetoder

2.4.2.1 Riktigheten hos kvantitativa metoder

Vid upprepade analyser av ett certifierat referensmaterial för grundämnen får avvikelserna för det genomsnittliga innehållet, som har bestämts genom experiment, från det certifierade värdet inte ligga utanför gränsen $\pm 10\%$. När det inte finns något certifierat referensmaterial tillgängligt kan riktigheten hos mätningarna fastställas genom återvinning av tillsatser av kända mängder av grundämnet till det okända provet. Lägg märke till att det tillsatta grundämnet inte är kemiskt bundet i den verkliga matrisen, vilket är fallet för analyten, och att resultaten som fås med denna metod därför har mindre giltighet än i de fall då de fås genom användning av certifierade referensmaterial. Återvinningsdata godkänns endast om de ligger inom $\pm 10\%$ av målvärdet.

2.4.2.2 Precision för kvantitativa metoder

Vid upprepade analys av ett prov som utförs under reproducerbarhetsbetingelser inom laboratoriet, får variationskoefficienten (CV) inom laboratoriet för medelvärde inte överstiga följande värden:

Tabell 8

Variationskoefficienter för kvantitativa metoder för ett antal massfraktioner för ett grundämne

Massfraktion	CV (%)
≥ 10 µg/kg till 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg till 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3 Särskilda krav för pulspolarografi

Det är av största vikt att organiskt material i proverna bryts ned fullständigt innan pulspolarografibestämningar utförs. Inga breda utslag som beror på förekomst av organiskt material får förekomma i voltammogrammen. Höjden på topparna kan vid pulspolarografi påverkas av oorganiska matrisbeståndsdelar. Därför skall kvantifieringen ske med hjälp av tillsatser av standardlösning. Ett typexempel på ett voltammogram av en provlösning skall bifogas metodbeskrivningen.

2.4.4 Särskilda krav för atomabsorptionsspektrometri (AAS)

Denna teknik används i huvudsak för ett enskilt grundämne och kräver därför optimering av de experimentella inställningarna beroende på vilket grundämne som skall kvantifieras. När det är möjligt skall resultaten kontrolleras både kvalitativt och kvantitativt genom användning av alternativa absorptionslinjer (helst skall två olika linjer väljas ut). Kalibreringsstandarderna skall beredas i en matrislösning som i så stor utsträckning som möjligt motsvarar provlösningen (t.ex. syrakoncentration eller modifierarens sammansättning). För att minimera blankvärden skall alla reagenser ha högsta möjliga renhetsgrad. Olika typer av atomabsorptionsspektrometri kan särskiljas beroende på vilken metod som har valts för att förånga och/eller atomisera provet.

2.4.4.1 Särskilda krav för flam-AAS

Instrumentinställningarna skall optimeras för varje grundämne. Särskilt skall gassammansättningen och flödena kontrolleras. För att undvika interferenser som orsakas av bakgrundsabsorption skall en kontinuerlig källkompensator användas. Vid okända matriser skall en kontroll göras om korrigering för bakgrunden behövs.

2.4.4.2 Särskilda rekommendationer för grafitugns-AAS

Föreningar i laboratoriet påverkar ofta noggrannheten när man arbetar med ultralåga halter i grafitugnen. Därför skall reagenser av hög renhetsgrad, avjoniserat vatten och inerta plastartiklar för hanteringen av prov och standard användas. Instrumentinställningarna skall optimeras för varje grundämne. Särskilt förbehandlings- och atomiseringsbetingelserna (temperatur, tid) och matrismodifieringen skall kontrolleras.

Genom att arbeta under isotermska atomiseringsbetingelser (t.ex. transversellt uppvärmd grafitugn med integrerad L'vov-plattform) (8) minskas matrisens inverkan på atomiseringen av analyten. Kvantifiering med hjälp av en kalibreringskurva baserad på mätningar av vattenlösningar av standarder får användas i kombination med matrismodifiering och Zeeman-bakgrundskorrektion (9).

2.4.5 Särskilda krav för atomabsorptionsspektrometri genom hydridgenerering

Organiska föreningar som innehåller grundämnena som arsenik, vismut, germanium, bly, antimon, selen, tenn och tellur kan vara mycket stabila och kräva oxidativ nedbrytning för att korrekt resultat för det totala grundämnesinnehållet skall fås. Därför rekommenderas mikrovågsnedbrytning eller högttrycksföraskning under starkt oxidativa betingelser. Det är mycket viktigt att omvandlingen av grundämnena till motsvarande hydrider är fullständig och reproducerbar.

Bildningen av arsenikhydrid i saltsyralösning med NaBH₄ beror på arsenikens oxidationstillstånd (As III: snabb bildning, As V: längre bildningsperiod). För att undvika förluster av känsligheten vid bestämning av As V med "flow injection"-tekniken, som beror på den korta reaktionstiden i systemet, skall As V reduceras till As III efter den oxidativa nedbrytningen. Kaliumjodid/citronsyra eller cystein är lämpliga att använda till detta. Blankprover, kalibreringslösningar och provlösningar skall behandlas på samma sätt. Genom att arbeta med ett satssystem kan båda arseniktyperna bestämmas utan att noggrannheten påverkas. På grund av den försenade bildningen av As V-hydrid skall kalibreringen ske vid integreringen av topparean. Instrumentinställningarna skall optimeras. Gasflödet, som överför hydriden till atomiseringsmunstycket, är särskilt viktigt och skall kontrolleras.

2.4.6 Särskilda krav för atomabsorptionsspektrometri genom hydridgenerering

Kall flamlös AAS används endast för kvicksilver. På grund av förångningen och adsorptionsförluster av elementärt kvicksilver skall särskild försiktighet iakttas under hela analysen. Förorening från reagenser eller omgivningen skall omsorgsfullt undvikas.

Organiska föreningar som innehåller kvicksilver kräver oxidativ nedbrytning för att rätt resultat för den totala mängden kvicksilver skall fås. Vid nedbrytningen skall slutna system med mikrovågsnedbrytning eller högtrycks-föraskning användas. Särskild försiktighet krävs vid rengöring av den utrustning som har varit i kontakt med kvicksilver.

Det är fördelaktigt att använda "flow injection"-tekniken. Vid lägre beslutsgränser rekommenderas adsorption av elementärt kvicksilver på guld/platina-adsorbent följt av termisk nedbrytning. Mätningen störs om adsorbenten eller cellen kommer i kontakt med fukt och detta skall därför undvikas.

2.4.7 Särskilda krav för ICP-atomemissionsspektrometri (ICP-AES)

Induktivt kopplad plasma-atomemissionsspektrometri (10) är en metod för analys av flera grundämnen. Metoden medger samtidiga mätningar av flera olika grundämnen. Vid användning av ICP-atomemissionsspektrometri skall en nedbrytning av proverna först ske för att sonderdela organiska matriser. Vid nedbrytningen skall slutna system med mikrovågsnedbrytning eller högtrycksföraskning användas. Instrumentkalibreringen och valet av grundämne eller våglängd spelar en avgörande roll för resultatet av en ICP-AES-analys. Vid instrumentkalibreringen, då kalibreringskurvorna är linjära, krävs vanligtvis endast mätning av kalibreringslösningarna vid fyra koncentrationer, eftersom kalibreringskurvorna för ICP-atomemissionsspektrometri i allmänhet är linjära över fyra till sex storleksordningar för koncentrationen. Kalibreringen av ICP-AES-system bör normalt utföras med en standard som innehåller flera grundämnen. Standarden skall beredas i en lösning som har samma syrakoncentration som provlösningen. Grundämnescykler skall kontrolleras för den linjära kurvan.

Valet av våglängder för mätning av analyternas emission är lämpligt för koncentrationerna av de grundämnen som skall bestämmas. Om analytkoncentrationen hamnar utanför arbetsområdet för en emissionslinje skall en annan emissionslinje väljas. Först och främst skall den känsligaste emissionslinjen (utan störning) väljas, därefter en mindre känslig linje. Om arbetsområdet ligger vid eller nära detektionsgränsen är den känsligaste linjen för respektive analyt oftast det bästa valet. Spektral- och bakgrundsinterferenser orsakar stora problem vid ICP-atomemissionsspektrometri. Exempel på möjliga interferenser är enkel bakgrundsdrift, lutande bakgrundsdrift, direkt spektral överlappning och komplex bakgrundsdrift. Var och en av dessa interferenser har sina egna orsaker och åtgärder. Beroende på matriserna skall korrigering av interferensen och optimering av driftparametrarna tillämpas. Vissa interferenser kan undvikas genom utspädning eller anpassning av matriserna. För varje sats analysprover skall referensmaterialet och det spetsade materialet som innehåller kända mängder av analyten eller analyterna samt blankmaterial behandlas på samma sätt som analysproverna. För att testa avdriften skall standarden kontrolleras efter exempelvis tio prover. Alla reagenser och plasmagasen skall ha högsta möjliga renhetsgrad.

2.4.8 Särskilda krav för ICP-masspektrometri (ICP-MS) (11)

Vid bestämning av spårämnen med genomsnittlig atomvikt, exempelvis krom, koppar och nickel, finns det risk för kraftig interferens från andra isobariska och mångatomiga joner. Detta kan undvikas endast när tillgänglig upplösningsförmåga är åtminstone 7 000–8 000. Svårigheter i samband med masspektrometriteknikerna omfattar instrumentdrift, matriseffekter och molekyljonsinterferens ($m/z < 80$). Flera inre standardiseringar i samma massområde som grundämnena som skall bestämmas krävs för att korrigera instrumentdrift och matriseffekter.

Fullständig nedbrytning av organiskt material i proverna krävs innan mätningar med ICP-masspektrometri utförs. Liksom för atomabsorptionsspektrometri skall flyktiga grundämnen, exempelvis jod, överföras till ett stabilt oxidationstillstånd efter nedbrytningen i slutna kärl. Den svåraste interferensen kommer från molekyljonskombinationer av argon (plasmagas), väte, kol, kväve och syre (upplösningssyror, föroreningar i plasmagas och atmosfäriska gaser som kommer med flödet) och provmatrisen. För att undvika interferenser krävs fullständig nedbrytning, bakgrundsmätningar, lämpligt val av analysmängder ibland förbundet med en lägre förekomst (sämre detektionsgräns) och upplösningssyror, t.ex. salpetersyra.

För de grundämnen som skall bestämmas skall interferenser undvikas genom ett lämpligt val av specifika analysmängder inklusive kontroll av isotopkvoter. Instrumentrespons med hänsyn till Fano-faktorer skall kontrolleras innan varje mätning med hjälp av inre standarder.

3. VALIDERING

Validering skall visa att den analytiska metoden är förenlig med de kriterier som är tillämpliga på de aktuella prestationskarakteristika.

Olika kontrollsyften kräver olika metodkategorier. Följande tabell anger vilka prestationskarakteristika som skall bestämmas för respektive metod.

Tabell 9

Klassificering av analysmetoder genom de prestationskarakteristika som skall bestämmas

		Detektionsförmågan CCB	Beslutsgräns CCa	Riktighet/återvinning	Precision	Selektivitet/ specificitet	Tillämplighet/ motståndsförmåga/Stabilitet
Kvalitativa metoder:	S	+	–	–	–	+	+
	C	+	+	–	–	+	+
Kvantitativa metoder:	S	+	–	–	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = screeningmetoder; C = konfirmeringsmetoder; + = bestämningen är obligatorisk

3.1 VALIDERINGSFÖRFARANDEN

Detta kapitel ger exempel och/eller referenser på förfaranden vid validering av analytiska metoder. Andra sätt att visa att den analytiska metoden är förenlig med prestationskriterierna för prestationskarakteristika kan användas, förutsatt att de ger information av samma grad och kvalitet.

Validering kan också utföras genom en mellanlaboratorieavprovning som det är fastställt i Codex Alimentarius, ISO eller IUPAC (12), eller enligt alternativa metoder, såsom enskilda laboratoriestudier eller inomlaboratorievalidering (13) (14). Denna del fokuserar på studier vid enskilda laboratorier (eller inomlaboratorievalidering) genom användning av ett modulärt tillvägagångssätt. Detta tillvägagångssätt består av:

1. ett antal allmänna prestationskarakteristika som är oberoende av vilken valideringsmodell som används, och
2. mer specifika modellberoende förfaranden enligt beskrivning i tabell 10.

Tabell 10

Modelloberoende och modellberoende prestationsparametrar

Validering		
Modelloberoende prestationsparametrar	Modellberoende prestationsparametrar	
Allmänna prestationskarakteristika (3.1.1)	Konventionell valideringsmetod (3.1.2)	Inomlaboratorievalideringsmetod (3.1.3)
Specificitet	Återvinning	Återvinning
Riktighet	Repeterbarhet	Repeterbarhet
Motståndsförmåga: mindre ändringar	Inomlaboratoriereproducerbarhet	Inomlaboratoriereproducerbarhet
Stabilitet	Reproducerbarhet	Reproducerbarhet
	Beslutsgräns (CCa)	Beslutsgräns (CCa)
	Detektionsförmåga (CCβ)	Detektionsförmåga (CCβ)
	Kalibreringskurvor	Kalibreringskurvor
	Motståndsförmåga: större ändringar	Motståndsförmåga

3.1.1 Modelloberoende prestationskaraktäristika

Oberoende av vilken valideringsmetod som väljs, skall följande prestationskaraktäristika bestämmas. För att minska arbetsbördan kan ett noggrant utformat och statistiskt sunt sätt användas för att kombinera experimenten som utförs för bestämningen av de olika parametrarna.

3.1.1.1 Specificitet

För analytiska metoder är det viktigt att kunna skilja mellan analyten och nära relaterade substanser (isomerer, metaboliter, nedbrytningsprodukter, endogena substanser, matrisbeståndsdelar etc.). Det krävs två metoder för att kontrollera om det finns interferenser.

Därför skall eventuella ämnen som kan interferera väljas och relevanta blankprov analyseras för att påvisa förekomsten av eventuella interferenser och för att uppskatta deras effekt.

- Välj ett antal kemiskt relaterade föreningar (metaboliter, derivat etc.) eller andra ämnen som sannolikt förekommer i samband med föreningen i fråga och som kan finnas i proverna.
- Analysera ett lämpligt antal representativa blankprov ($n \geq 20$) och kontrollera om det finns interferenser (signaler, toppar, jonspår) i området ifråga där målanalyten förväntas eluera.
- Vidare skall representativa blankprover spetsas vid relevant koncentration med ämnen som är benägna att interferera med identifieringen och/eller kvantifieringen av analyten.
- Undersök efter analysen huruvida
 - förekomsten kan leda till falsk identifiering, eller
 - identifieringen av målanalyten hindras av förekomsten av en eller flera interferenser eller
 - kvantifieringen märkbart påverkas.

3.1.1.2 Riktighet

I detta avsnitt beskrivs bestämningen av riktighet (en del i begreppet noggrannhet). Riktigheten kan endast fastställas med hjälp av certifierat referensmaterial. Om det finns ett certifierat referensmaterial skall detta användas. Metoden beskrivs i detalj i ISO 5725-4 (5). Nedan finns ett exempel.

- Analysera sex replikat av certifierat referensmaterial i enlighet med provinstruktionerna för metoden.
- Bestäm koncentrationen för analyten som finns i varje replikatprov.
- Beräkna medelvärde, standardavvikelsen och variationskoefficienten (procent) för dessa koncentrationer.
- Beräkna riktigheten genom att dividera den påvisade medelkoncentrationen med det certifierade värdet (mätt som koncentration) och multiplicera med 100 för att uttrycka resultatet i procent.

Riktighet (procent) = påvisad genomsnittlig koncentration korrigerad med avseende på återvinningen $\times 100$ /certifierat värde.

Om det inte finns något certifierat referensmaterial kan återvinningen bestämmas enligt beskrivningen i 4.1.2.1.

3.1.1.3 Tillämplighet/motståndsförmåga (mindre ändringar)

I dessa undersökningar används mindre, rimliga variationer som avsiktligt införts av laboratoriet och observationen av konsekvenserna.

Förundersökningar utförs genom val av faktorer för förbehandling av provet, rening och analys som kan påverka mätresultaten. Sådana faktorer kan omfatta personen som utför analysen, reagensernas källa och ålder, lösningsmedel, standarder och provextrakt, uppvärmningshastigheten, temperaturen, pH-värdet samt många andra faktorer som kan förekomma i laboratoriet. Dessa variationer skall modifieras i den omfattning som motsvarar de avvikelser som vanligen uppkommer mellan laboratorier.

- Identifiera möjliga faktorer som kan påverka resultaten.
- Variera varje faktor något.

- Genomför ett test av motståndsförmågan genom att använda Youden-metoden (15) (16). (Andra godkända metoder kan användas vid detta tillfälle. Youden-metoden minimerar dock tiden och arbetsinsatsen.) Youden-metoden är ett ofullständigt faktorförsök. Interaktionen mellan olika faktorer kan inte påvisas.
- Om det konstateras att en faktor påverkar mätresultatet signifikant, utförs ytterligare experiment för att bestämma de godtagbara gränserna för denna faktor.
- Faktorer som signifikant inverkar på resultatet skall tydligt markeras i försöksplanen.

Grundtanken är inte att undersöka en ändring åt gången utan att införa flera variationer samtidigt. Exempel: Låt A, B, C, D, E, F, G beteckna de nominella värdena för sju olika faktorer som skulle kunna påverka resultaten om deras nominella värden ändrades något. Låt deras alternativa värden betecknas med de motsvarande gemena bokstäverna a, b, c, d, e, f och g. Detta ger resultatet 2⁷ eller 128 olika möjliga kombinationer.

Det är möjligt att välja en delmängd på åtta av dessa kombinationer som är balanserad med avseende på versaler och gemener (tabell 11). Åtta bestämningar skall göras, i vilka en kombination av de valda faktorerna (A–G) används. Resultatet av dessa bestämningar visas som S–Z i tabell 11 nedan.

Tabell 11

Experimentmodell för undersökning av motståndsförmåga (mindre ändringar)

Faktorvärde F	Kombination av bestämningar nr							
	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
Observerade resultat R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

För beräkningar, se exempel på test av motståndsförmåga i 3.3.

3.1.1.4 Stabilitet

Man har kunnat iakttä otilräcklig stabilitet hos analyten eller matrisens beståndsdelar under lagring eller analys av provet kan ge upphov till signifikanta avvikelser hos analysresultatet. Vidare bör kalibreringsstandardens stabilitet i lösningen kontrolleras. Vanligtvis är analytens stabilitet väl beskriven under olika lagringsförhållanden. Övervakning av lagringsförhållandena utgör en del av det normala ackrediteringssystemet för laboratorier. Om förhållandena inte är kända, visar exemplen nedan hur stabiliteten kan bestämmas.

Stabiliteten hos analyten i lösning

- Bered nya stamlösningar för analyten eller analyterna och späd enligt specifikation i provinstruktionerna för att få tillräckligt många alikvoter (t.ex. 40) av varje vald koncentration (omkring den lägsta funktionsgräns som krävs för ämnen som saknar fastställd funktionsgräns eller omkring den tillåtna gränsen för andra ämnen. Bered båda lösningarna för den analyt som används för spetsning och i den slutliga analyslösningen och alla andra lösningar som är av intresse (t.ex. standarder av derivat).
- Mät analytkoncentrationen i den nyberedda lösningen enligt provinstruktionerna.
- Portionera lämpliga mängder i passande behållare, märk och laga enligt planen nedan:

Tabell 12

Plan för bestämning av analytstabilitet i lösning.

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Mörkt	10 alikvoter	10 alikvoter	10 alikvoter
Ljust			10 alikvoter

- Lagringstiden kan väljas till 1, 2, 3 och 4 veckor eller längre vid behov, t.ex. tills de första nedbrytningsfenomenen kan observeras under identifieringen och/eller kvantifieringen. Den maximala lagringstiden och de optimala lagringsförhållandena skall registreras.
- Beräkningen av koncentrationen av analyt(er) i varje alikvot skall göras genom att den nyberedda analyslösningen får anta värdet 100 procent vid tiden för analysen.

$$\text{Resterande analyt (procent)} = C_i \times 100/C_{ny}$$

C_i koncentration vid aktuell tidpunkt

C_{ny} koncentration för nyberedd lösning

Stabilitet hos analyt(er) i matris

- När det är möjligt skall förvärvade prover användas. Om det inte finns något förvärvat material att tillgå, skall matris som spetsats med analyten användas.
- Om det finns förvärvat material att tillgå, skall koncentrationen i materialet bestämmas medan materialet fortfarande är nytt. Ytterligare alikvoter av materialet skall tas ut efter 1, 2, 4 och 20 veckor och koncentrationerna skall bestämmas. Vävnaden skall lagras vid minus 20 °C eller lägre temperatur om så krävs.
- Om det inte finns något förvärvat material att tillgå, används en liten mängd blankmaterial som homogeniseras. Dela upp materialet i fem alikvoter. Spetsa varje alikvot med analyten, som helst skall beredas i en liten mängd vattenlösning. Analysera omedelbart en alikvot. Spara resterande alikvoter vid minus 20 °C eller lägre temperatur och analysera dem efter 1, 2, 4 och 20 veckor.

3.1.1.5 Kalibreringskurvor

Då kalibreringskurvor används för kvantifiering skall

- minst fem nivåer (inklusive noll) användas för att konstruera kurvan,
- kurvans arbetsområde beskrivas,
- kurvans matematiska formel och anpassningsgraden för data till kurvan beskrivas,
- godtagbarhetsområden för kurvans parametrar beskrivas.

När seriell kalibrering baserad på en standardlösning behövs, skall godtagbara områden anges för de parametrar för kalibreringskurvan som kan variera från serie till serie.

3.1.2 Konventionell valideringsmetod

Beräkningen av parametrarna enligt konventionella metoder kräver att flera enskilda experiment utförs. Varje prestationskarakteristik skall bestämmas för varje större ändring (se under punkten "tillämplighet/motståndsförmåga" ovan). Vid metoder som använder flera analyter kan många analyter analyseras samtidigt under förutsättning att eventuella relevanta interferenser har uteslutits i förväg. Många prestationskarakteristika kan bestämmas på liknande sätt. Därför förordas att experimenten kombineras i så stor utsträckning som möjligt (t.ex. repeterbarhet och inomlaboratoriäreproducerbarhet med specificitet, analys av blankprover för att bestämma detektionsgränsen och för att testa specificiteten).

3.1.2.1 Återvinning

Om det inte finns något certifierat material att tillgå, skall återvinningen bestämmas experimentellt med hjälp av spetsade blankmatriser, exempelvis enligt planen nedan:

- Välj 18 alikvoter av ett blankmaterial och spetsa 6 alikvoter på vardera nivån som motsvarar 1, 1,5 och 2 gånger den lägsta funktionsgräns som krävs eller 0,5, 1 och 1,5 gånger den tillåtna gränsen.
- Analysera proverna och beräkna koncentrationen för varje prov.

- Beräkna återvinningen för varje prov med hjälp av ekvationen nedan.
- Beräkna den genomsnittliga återvinningen och variationskoefficienten för de sex resultaten på varje nivå.
- Procent återvinning = $100 \times \text{uppmätt innehåll/spetsningsmängd}$.

Denna konventionella metod för bestämningen av återvinningen är en variant av metoden som beskrivs i punkt 3.5, med tillsatser av standardlösningar, då

- provet betraktas som ett blankprov i stället för ett prov som skall analyseras,
- man anser att utbytet ⁽¹⁾ och återvinningen ⁽²⁾ är lika för de två provportionerna,
- proverna har samma massa och provportionen extraherar samma volymer,
- mängden kalibreringsstandard som tillsätts den andra provportionen (med tillsats) märks xADD, ($xADD = \rho A \cdot VA$),
- x1 är det uppmätta värdet av blankprovet och x2 är det uppmätta värdet av den andra provportionen (med tillsats).
- Då fås att den procentuella återvinningen = $100 (x2 - x1)/xADD$

Om något av ovanstående villkor inte kommer (eller antas komma) att uppfyllas, skall hela förfarandet för bestämning av återvinningen med hjälp av tillsatser av standardlösningar utföras enligt 3.5.

3.1.2.2 Repeterbarhet

- Bered en uppsättning prover med identiska matriser, spetsade med analyten till koncentrationer som motsvarar 1, 1,5 och 2 gånger den funktionsgräns som krävs eller 0,5, 1 och 1,5 gånger den tillåtna gränsen.
- På varje nivå skall analysen utföras med minst sex replikat.
- Analysera proverna.
- Beräkna koncentrationerna som påvisas i varje prov.
- Beräkna medelvärdet, standardavvikelsen och variationskoefficienten (procent) för de spetsade proverna.
- Upprepa dessa steg vid minst två andra tillfällen.
- Beräkna de totala medelkoncentrationerna och variationskoefficienten för de spetsade proverna.

3.1.2.3 Inomlaboratoriereproducerbarhet

- Bered en uppsättning prover av specificerat provmaterial (identiska eller olika matriser), spetsade med analyten eller analyterna till koncentrationer som motsvarar 1, 1,5 och 2 gånger den lägsta funktionsgräns som krävs eller 0,5, 1 och 1,5 gånger den tillåtna gränsen.
- På varje nivå skall analysen utföras med minst sex replikat.
- Upprepa dessa steg vid minst två olika tillfällen med olika personer och olika miljöbetingelser, t.ex. olika reagenssatser, lösningsmedel etc., olika rumstemperaturer, olika instrument etc. om det är möjligt.
- Analysera proverna.
- Beräkna koncentrationerna som påvisas i varje prov.
- Beräkna medelvärdet, standardavvikelsen och variationskoefficienten (procent) för de spetsade proverna.

3.1.2.4 Reproducerbarhet

När reproducerbarhet skall verifieras, bör laboratorier delta i kollaborativa undersökningar enligt ISO 5725-2 (5).

3.1.2.5 Beslutsgräns (CCa)

Beslutsgränsen skall fastställas enligt kraven för identifiering eller identifiering och kvantifiering på det sätt som anges i "Prestationskriterier för och övriga krav på analytiska metoder" (avsnitt 2).

⁽¹⁾ Utbyte: den del av analytens massa som finns i det prov som förekommer i slutextraktet.

⁽²⁾ Återvinning (här): den del av analytens massa som tillsätts provet, som ingår i slutextraktet. I resten av dokumentet förutsätts det att utbytet och återvinningen är lika, varför endast termen "återvinning" används.

När det gäller ämnen som saknar fastställd gräns, kan $CC\alpha$ bestämmas:

- Genom kalibreringskurvsförfarandet i enlighet med ISO 11843 (17) (här benämnt "critical value of the net state variable", ung. "kritiska värdet för nettotillståndsvärdet"). I detta fall skall blankmaterial användas som spetsats vid och över den lägsta funktionsgräns som krävs i multipla steg med inbördes konstant avstånd. Analysera proverna. Efter identifiering plottas signalen mot den tillsatta koncentrationen. Motsvarande koncentration vid skärningen med y-axeln plus 2,33 gånger standardavvikelsen för inomlaboratoriereproducerbarheten för skärningen är lika med beslutsgränsen. Detta gäller endast kvantitativa undersökningar ($\alpha = 1$ procent).
- Genom analys av minst 20 blankmaterial per matris för att beräkna signal-brusförhållandet vid det tidsfönster som analyten förväntas komma. Som beslutsgräns kan tre gånger signal-brusförhållandet användas. Detta gäller kvantitativa och kvalitativa undersökningar.

När det gäller ämnen med en fastställd gräns, kan $CC\alpha$ bestämmas:

- Genom kalibreringskurvsförfarandet i enlighet med ISO 11843 (17) (här benämnt "critical value of the net state variable", ung. "kritiska värdet för nettotillståndsvärdet"). I detta fall skall blankmaterial användas som spetsats vid och över den tillåtna gränsen i multipla steg med konstant inbördes avstånd. Analysera proverna. Efter identifiering plottas signalen mot den tillsatta koncentrationen. Motsvarande koncentration vid den tillåtna gränsen plus 1,64 gånger standardavvikelsen för inomlaboratoriereproducerbarheten är lika med beslutsgränsen ($\alpha = 5$ %).
- Genom att analysera minst 20 blankmaterial per matris som spetsats med analyt(er) vid beslutsgränsen. Koncentrationen vid den tillåtna gränsen plus 1,64 gånger motsvarande standardavvikelse motsvarar beslutsgränsen ($\alpha = 5$ %).

Se även artikel 5 och punkt 3.2.

3.1.2.6 Detektionsförmåga ($CC\beta$)

Detektionsförmågan skall bestämmas enligt kraven för identifiering eller identifiering plus kvantifiering enligt definitionen (se del 2).

När det gäller ämnen som saknar fastställd gräns, kan $CC\beta$ bestämmas:

- Genom kalibreringskurvsförfarandet i enlighet med ISO 11843 (17) (här benämnt det minsta detekterbara värdet för nettotillståndsvärdet). I detta fall skall blankmaterial användas som spetsats vid och under den minsta funktionsgräns som krävs i multipla steg med inbördes konstant avstånd. Analysera proverna. Efter identifiering plottas signalen mot den tillsatta koncentrationen. Motsvarande koncentration vid beslutsgränsen plus 1,64 gånger standardavvikelsen för inomlaboratoriereproducerbarheten för det genomsnittligt uppmätta innehållet vid beslutsgränsen är lika med detektionsförmågan ($\beta = 5$ %).
- Genom analys av minst 20 blankmaterial per matris som spetsats med analyt(er) vid beslutsgränsen. Analysera proverna och identifiera analyterna. Värdet för beslutsgränsen plus 1,64 gånger standardavvikelsen för inomlaboratoriereproducerbarheten för det uppmätta innehållet är lika med detektionsförmågan ($\beta = 5$ %).
- Om det inte finns några kvantitativa resultat tillgängliga kan detektionsförmågan bestämmas genom undersökning av spetsat blankmaterial vid och över beslutsgränsen. I detta fall är koncentrationsnivån, då endast ≤ 5 % falskt negativa resultat kvarstår, lika med detektionsförmågan för metoden. Därför skall minst 20 undersökningar på minst en koncentrationsnivå utföras för att garantera ett tillförlitligt underlag för denna bestämning.

När det gäller ämnen som har en fastställd gräns, kan $CC\beta$ bestämmas:

- Genom kalibreringskurvsförfarandet i enlighet med ISO 11843 (17) (här benämnt "minimum detectable value of the net state variable", ung. "det minsta detekterbara värdet för nettotillståndsvärdet"). I detta fall skall blankmaterial användas som spetsats vid och över den tillåtna gränsen i multipla steg med konstant inbördes avstånd. Analysera proverna och identifiera analyten eller analyterna. Beräkna standardavvikelsen för det genomsnittligt uppmätta innehållet vid beslutsgränsen. Motsvarande koncentration vid värdet för beslutsgränsen plus 1,64 gånger standardavvikelsen för inomlaboratoriereproducerbarheten är lika med detektionsförmågan ($\beta = 5$ %).
- Genom att analysera minst 20 blankmaterial per matris som spetsats med analyt(er) vid beslutsgränsen. Värdet för beslutsgränsen plus 1,64 gånger motsvarande standardavvikelse är lika med detektionsförmågan ($\beta = 5$ %).

Se även 3.2.

3.1.2.7 Motståndsförmåga (större ändringar)

Den analytiska metoden skall testas under olika experimentella förhållanden, som exempelvis omfattar olika arter, olika matriser eller olika provtagningsbetingelser. De ändringar som införs bör vara betydande. Betydelsen av dessa ändringar kan utvärderas exempelvis genom användning av Youden-metoden (15) (16). Varje prestationskarakteristik skall bestämmas för alla större ändringar som har visat sig ha en signifikant effekt på undersökningens prestanda.

3.1.3 Validering enligt alternativa modeller

Om alternativa valideringar tillämpas skall den underliggande modellen och strategin med respektive förutsättningar, antaganden och formler fastställas i valideringsplanen eller åtminstone hänvisningar ges till var de finns tillgängliga. Nedan ges ett exempel på en alternativ metod. Vid tillämpning av exempelvis den inomlaboratorievalideringsmodellen, bestäms prestationskarakteristika på ett sätt som tillåter validering av större ändringar inom samma valideringsförfarande. Detta kräver att en experimentell valideringsplan utformas.

3.1.3.1 Experimentell plan

En experimentell plan skall utformas med hänsyn till antalet olika arter och olika faktorer som skall undersökas. För att de viktigaste arterna och de faktorer som kan inverka på mätresultaten skall kunna väljas ut, skall därför det första steget i hela valideringen gälla de provpopulationer som skall analyseras i laboratoriet i framtiden. Därefter skall koncentrationsområdet väljas ut på ett ändamålsenligt sätt med hänsyn till den givna nivån.

Exempel:

- Flera analyter kan undersökas samtidigt med analysmetoden som valideras.
- Två variationer av huvudfaktorn har identifierats (A och B). Huvudfaktorerna utgör grunden för vilka faktornivåer som kombineras. Dessa huvudfaktorer kan omfatta faktorer som exempelvis arter eller matris. I detta exempel varierades huvudfaktorn på två nivåer, dvs. två olika arter (art A och B) beaktades. I allmänhet kan man variera huvudfaktorerna på mer än två nivåer, vilket dock endast ökar antalet analyser som skall utföras.
- Dessa utvalda faktorer skall varieras på två nivåer (angivna som antingen + eller -).

Tabell 13

Exempel på faktorer som anses viktiga för ett valideringsförfarande

Djurets kön	(faktor 1)
Ras	(faktor 2)
Transportförhållanden	(faktor 3)
Lagringsförhållanden	(faktor 4)
Provets färskhet	(faktor 5)
Uppfödningsförhållanden	(faktor 6)
Olika personer med olika erfarenheter	(faktor 7)

Tabell 14

Möjlig experimentell plan för ovanstående exempel

Art	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Prov nr
A	+	+	+	+	-	+	-	1
A	+	+	-	-	+	-	-	2
A	+	-	+	-	-	-	+	3
A	+	-	-	+	+	+	+	4
A	-	+	+	-	+	+	+	5
A	-	+	-	+	-	-	+	6
A	-	-	+	+	+	-	-	7
A	-	-	-	-	-	+	-	8

Art	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7	Prov nr
B	+	+	+	+	+	–	+	9
B	+	+	–	–	–	+	+	10
B	+	–	+	–	+	+	–	11
B	+	–	–	+	–	–	–	12
B	–	+	+	–	–	–	–	13
B	–	+	–	+	+	+	–	14
B	–	–	+	+	–	+	+	15
B	–	–	–	–	+	–	+	16

Eftersom varje prov (varje kombination av faktornivå) skall spetsas med fyra olika koncentrationer i närheten av den givna nivån och ett blankprov skall analyseras för varje nivå, skall $5 \times 16 = 80$ analyser utföras för hela valideringsexperimentet.

Från dessa 80 mätresultat kan man beräkna (13) (14).

Återvinning

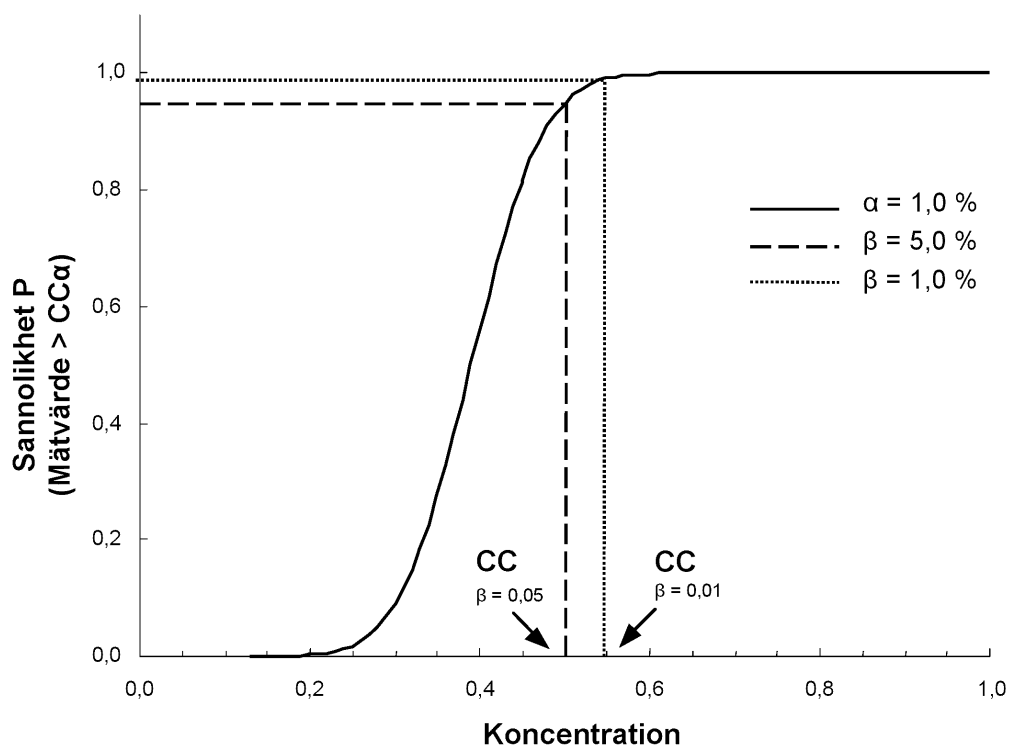
- Repeterbarheten per koncentrationsnivå (s_{ip}).
- Inomlaboratoriereproducerbarheten per koncentrationsnivå (s_{ir}).
- Beslutsgräns (CC α).
- Detektionsförmåga (CC β).
- Styrkefunktion (β -feltäthet mot koncentration kapitel (se punkt 3.1.3.2).
- Motståndsförmåga mot större ändringar; motståndsförmåga mot mindre ändringar kan bestämmas i enlighet med punkt 3.1.1.3.
- 16 provrelaterade kalibreringskurvor.
- 1 generell kalibreringskurva.
- Prediktionsintervall för den generella kalibreringskurvan.
- Matrisinducerade avvikelser (s_{mat}).
- Körningsinducerade avvikelser (s_{run}).
- Effekten av de individuella faktorerna på mätresultaten.

Dessa prestationskaraktäristika möjliggör en övergripande utvärdering av prestationsnivån för metoden, eftersom inte bara inverkan av de individuella faktorerna undersöks utan även de relevanta kombinationerna av dessa faktorer. Med hjälp av denna experimentutformning kan man bestämma om den ena eller den andra av de valda faktorerna skall uteslutas från den totala kalibreringskurvan, eftersom faktorn avviker signifikant från standardavvikelse för de andra faktorerna.

3.1.3.2 Styrkefunktion

Styrkefunktionen ger information om metodens detektionsförmåga inom det valda koncentrationsområdet. Den hänför sig till risken för β -fel när den tillämpas på den undersökta metoden. Med hjälp av styrkefunktionen kan detektionsförmågan för respektive metodkategori (kontroll, konfirmation) eller typ av metod (kvalitativ eller kvantitativ) beräknas för ett bestämt β -fel (t.ex. 5 %).

Figur 1:
Styrkefunktion



Figur 1 visar ett exempel på en grafisk bestämning av detektionsförmågan ($CC\beta$). För just den här metoden är den återstående risken att ta ett felaktigt negativt beslut 5 % vid en koncentration på 0,50 $\mu\text{g/kg}$. Vid koncentrationen 0,55 $\mu\text{g/kg}$ har risken för ett falskt negativt resultat minskat till 1 procent.

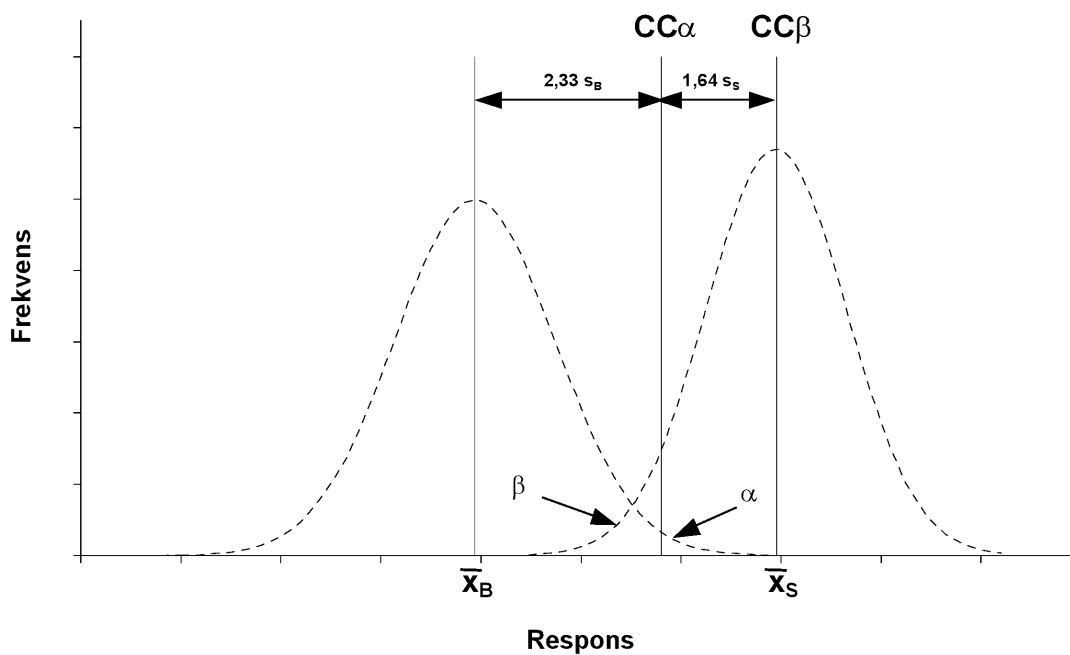
3.1.3.3 Reproducerbarhet

Bestämningen av en metods reproducerbarhet med hjälp av inomlaboratorievalideringsprincipen kräver deltagande i en kvalifikationsprövning i enlighet med ISO Guide 43-1 (3) och 43-2 (4). Laboratorierna kan själva välja metoder, förutsatt att dessa metoder används under rutinförhållanden. Laboratoriets standardavvikelse kan användas för att fastställa metodens reproducerbarhet.

3.2 GRAFISK FRAMSTÄLLNING AV DE OLIKA ANALYTISKA GRÄNSVÄRDENA

Figur 2:

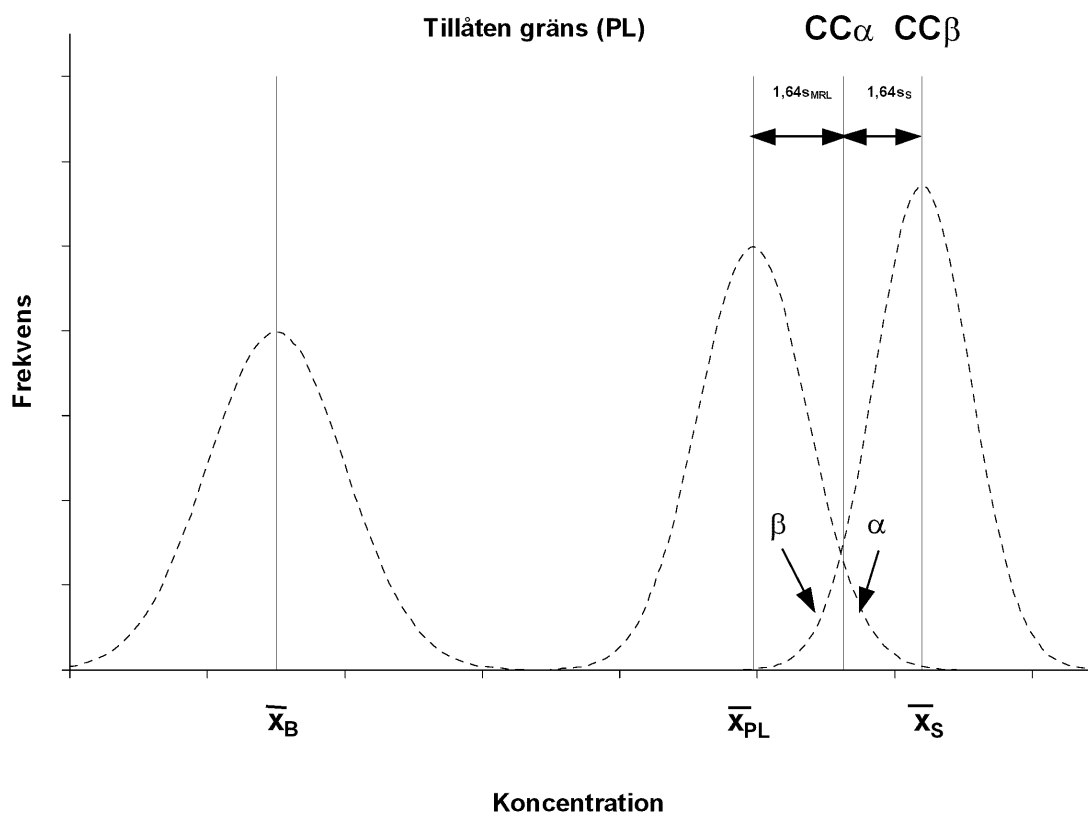
Ämnen för vilka inga tillåtna gränser har fastställts



- \bar{x}_S genomsnittligt responsvärde för det förorenade provet
- s_B standardavvikelse för blankprovet (bestämt under reproducerbarhetsbetingelser inom laboratoriet)
- s_S standardavvikelse för det förorenade provet (bestämt under reproducerbarhetsbetingelser inom laboratoriet)
- α frekvens av falskt positiva resultat
- β frekvens av falskt negativa resultat
- $CC\alpha$ respons med ett givet α -fel och 50 % β -fel
- $CC\beta$ respons med ett mycket litet α -fel och ett givet β -fel

Figur 3:

Ämnen med en fastställd tillåten gräns



\bar{x}_B genomsnittlig koncentration för blankprovet

\bar{x}_{PL} genomsnittlig koncentration för provet som innehåller analyten vid den tillåtna gränsen

\bar{x}_S genomsnittlig koncentration för det förorenade provet

s_{PL} standardavvikelse för provet som innehåller analyten vid den tillåtna gränsen (bestämt under reproducerbarhetsbetingelser inom laboratoriet)

s_S standardavvikelse för det förorenade provet (bestämt under reproducerbarhetsbetingelser inom laboratoriet)

α frekvens av falskt positiva resultat

β frekvens av falskt negativa resultat

CC α respons med ett givet α -fel och 50 % β -fel

CC β respons med ett mycket litet α -fel och ett givet β -fel

3.3 BERÄKNINGSEXEMPEL FÖR TEST AV MOTSTÅNDSFÖRMÅGA MOT MINDRE ÄNDRINGAR I ENLIGHET MED YOUTENMETODEN (16)

Jämförelse av medelvärden (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$	Jämför medelvärdena för versaler (A_A till A_G) med medelvärdena för motsvarande gemener (A_a till A_g). Om en faktor har en effekt, kommer skillnaden att vara signifikant större än skillnaderna för de andra faktorerna.
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	En metod med motståndsförmåga skall inte påverkas av ändringar som med största sannolikhet förekommer mellan laboratorier.
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	Om det inte finns någon påfallande skillnad, fås det mest realistiska måttet på det slumpvisa felet ur de sju differenserna.
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	
$A_a = \Sigma(a_i)/4$	
$A_b = \Sigma(b_i)/4$	
$A_c = \Sigma(c_i)/4$	
$A_d = \Sigma(d_i)/4$	
$A_e = \Sigma(e_i)/4$	
$A_f = \Sigma(f_i)/4$	
$A_g = \Sigma(g_i)/4$	

Differenser (D)

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

Kvadraterna av differenserna (D_i^2)

$D_a^2 =$ värdet a
$D_b^2 =$ värdet b
$D_c^2 =$ värdet c
$D_d^2 =$ värdet d
$D_e^2 =$ värdet e
$D_f^2 =$ värdet f
$D_g^2 =$ värdet g

Standardavvikelsen för differenserna $D_i(s_{Di})$:

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

Om s_{Di} som fås på detta sätt är signifikant större än standardavvikelsen för metoden som utförts under reproducerbarhetsbetingelser inom laboratoriet (se ovan), är det på förhand givet att alla faktorerna tillsammans påverkar resultatet, även om varje enskild faktor inte har någon signifikant inverkan, och att metoden inte har tillräcklig motståndsförmåga gentemot valda modifieringar.

3.4 BERÄKNINGSEXEMPEL FÖR INOMLABORATORIEVALIDERINGEN

Exempel och beräkningar för inomlaboratorievalideringsplanen i enlighet med vad som sägs om validering med alternativa modeller (punkt 3.1.3) (13) (14).

3.5 BERÄKNINGSEXEMPEL FÖR TILLSATS AV STANDARDLÖSNINGAR

Ett analysprov med innehållet T av analyten delas upp i två provportioner, 1 och 2, med de respektive massorna m_1 och m_2 . Till provportion 2 tillsätts en volym V_A av lösningen med en analytkoncentration på ρ_A . Två extrakt av provportionerna med de respektive volymerna V_1 och V_2 fås efter metodens extraktions- och reningssteg. Återvinningen för analyten antas vara rc . Båda extrakten undersöks med en mätmetod med känsligheten b och ger ett analysvar på x_1 , respektive x_2 .

Om man antar att rc och b är lika för analyten i det ursprungliga provet och i provet med tillsats, kan innehållet T beräknas enligt följande:

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

Metoden gör det möjligt att bestämma återvinningen rc . Därefter, utöver undersökningen som beskrivs ovan, tillsätts en känd mängd $\rho_B \cdot V_B$ av analyten till en del av extraktet av provportion 1 (volym V_3) som därefter undersöks. Det analytiska svaret är x_3 och återvinningen är:

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

Dessutom kan man beräkna känsligheten b som:

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

Alla tillämpningsvillkor och mer detaljerade uppgifter finns beskrivna (18).

4. FÖRKORTNINGAR SOM ANVÄNDS

AAS	atomabsorptionsspektrometri
AES	atomemissionsspektrometri
AOAC-I	Association of Official Analytical Chemists International
B	bunden fraktion (immunologiska undersökningar)
CI	kemisk jonisering
CRM	certifierat referensmaterial
CV	variationskoefficient
2 D	tvådimensionell
DAD	diod array-detektion
DPASV	pulspolarografi
ECD	elektroninfångningsdetektion
EI	elektronstötjonisation
GC	gaskromatografi
HPLC	högpresterande vätskekromatografi
HPTLC	högpresterande tunnskikt-kromatografi
HRMS	högupplösande (masspektrometri)
ICP-AES	ICP-atomemissionsspektrometri
ICP-MS	ICP-masspektrometri
IR	infraröd
ISO	Internationella standardiseringsorganisationen
LC	vätskekromatografi
LR(MS)	lågupplösande (masspektrometri)
MRPL	lägsta funktionsgräns som krävs
MS	masspektrometri
m/z	massa/laddningsförhållande
RF	relativ vandring till lösningsmedelsfronten (TLC)
RSDL	relativa standardavvikelser för laboratoriet
SIM	selektiv jonanalys
TLC	tunnskikt-kromatografi
UV	ultraviolett ljus
VIS	synligt ljus

5. REFERENSER

- (1) ISO 17025: 1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories
- (2) ISO 3534-1: 1993 Statistical Methods for quality control – Vol. 1 vocabulary and symbols
- (3) ISO Guide 43-1: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes
- (4) ISO Guide 43-2: 1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons – Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies
- (5) ISO 5725: 1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results – Part 1: General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method

- (6) ISO 78-2: 1999 Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis
 - (7) W.G de Ruig and J.M Weseman "A new approach to confirmation by infrared spectrometry" J. Chemometrics 4 (1990) 61-77.
 - (8) Se t.ex. May, T.W., Brumbaugh, W.G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Analytical Chemistry 54(7):1032-1037 (90353)
 - (9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675
 - (10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golightly (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992
 - (11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, pp. 329
 - (12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Applied Chem, 67, 331
 - (13) Jülicher, B., Gowik, P. und Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173
 - (14) Gowik, P., Jülicher, B. und Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. J. Chromatogr., 716, 221
 - (15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA
 - (16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; "Statistical Manual of the AOAC–Association of Official Analytical Chemists", AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff
 - (17) ISO 11843: 1997 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case
 - (18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: "Yield or recovery: a world of difference". Proceedings 8th Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, page 2-9.
 - (19) Council Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement Official Journal L 243, 29/10/1971, p. 29
 - (20) ISO 31-0: 1992 Quantities and units – Part 0: General principles
-