

KRITERIJUMI EFEKTIVNOSTI I DRUGI ZAHTJEVI ZA ANALITIČKE METODE

Dio 1

1.1 Zhtjevi za orijentacione metode

1.1.1 Kategorije pogodnih orijentacionih metoda

Kao pogodne orijentacione metode primjenjuju se kvalitativne, polukvantitativne ili kvantitativne metode.

1.1.2 Zhtjevi za biološke, biokemijske ili fiziokohemijske orijentacione metode

Za zabranjene ili neodobrene supstance CC β mora biti na najnižem razumno ostvarivom nivou, a u svakom slučaju niži od referentne vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA) za supstance za koje su referentne vrijednosti za preduzimanje mjera utvrđene.

Za odobrene farmakološki aktivne susptance CC β mora biti niži od maksimalno dozvoljene količine rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljene količine (ML).

U svrhu orijentacije primjenjuju se samo one analitičke metode za koje se na dokumentovano sledljivi način može pokazati da su validovane i da je njihov procenat lažno usklađenih rezultata manji od ili jednak 5 % (β - greška). U slučaju sumnje na neusklađeni rezultat taj se rezultat mora potvrditi potvrdnom metodom.

Kvantitativne orijentacione metode, koje se upotrebljavaju i za orijentaciju i potvrdu, moraju ispunjavati iste zhtjeve u vezi s tačnošću, opsegom i preciznošću opisane u tač. 1.2.2.1 i 1.2.2.2.

1.2 Zhtjevi za potvrdne metode

1.2.1 Opšti zhtjevi za potvrdne metode

Za zabranjene ili neodobrene supstance CC α mora biti na najnižem razumno ostvarivom nivou. Za zabranjene ili neodobrene supstance za koje je utvrđena referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA) CC α mora biti manji od referentne vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA) ili jednak toj vrijednosti.

Za odobrene supstance CC α mora biti veći od maksimalno dozvoljene količine rezidua(MRL) ili maksimalno dozvoljene količine (ML), ali što je bliže moguće tim vrijednostima.

U svrhu potvrđivanja primjenjuju se samo one analitičke metode za koje se na dokumentovano sledljivi način može pokazati da su validovane i da je njihov procenat lažno neusklađenih rezultata (α -greška) manji od ili jednak 1 % za zabranjene ili neodobrene supstance, odnosno, manji od ili jednak 5 % za odobrene supstance.

Potvrdnim metodama dobijaju se informacije o strukturnom hemijskom sastavu analita. Dakle, potvrdne metode koje se zasnivaju isključivo na hromatografskoj analizi bez primjene detekcije masenom spektrometrijom same po sebi nijesu pogodne za primjenu kao potvrdne metode za zabranjene ili neodobrene farmakološki aktivne supstance. Ako masena spektrometrija nije pogodna za odobrene supstance, mogu se upotrijebiti druge metode kao što su HPLC-DAD i HPLC-FLD ili njihova kombinacija.

Kada je to potrebno prema potvrdnoj metodi, pogodan interni standard dodaje se poduzorku za analizu na početku postupka ekstrakcije. Zavisno od raspoloživosti, koriste se stabilni oblici analita obilježeni izotopom, koji su posebno pogodni za detekciju masenom spektrometrijom, ili analogna jedinjenja koji su po svojoj strukturi vrlo slična analitu. Ako se ne može upotrijebiti odgovarajući interni standard, poželjno je da se identifikacija analita potvrdi ko-hromatografijom¹. U tom slučaju dobija se samo jedan pik (vrh), pri čemu je povećana visina (ili površina) pika jednaka količini dodatog analita. Ako to nije izvodljivo, upotrebljava se matriks udružen standardom ili matriks obogaćen standardom.

1.2.2 Opšti kriterijumi efektivnosti za potvrdne metode

1.2.2.1 Istinost ocijenjena iskorišćenjem

Za ponovljene analize potvrđene referentne supstance odstupanje prosječnog masenog udjela koji je eksperimentalno određen i korigovan iskorišćenjem od potvrđene vrijednosti mora biti u skladu sa minimalnim rasponima istinitosti navedenim u tabeli 1.

Tabela 1. Minimalna istinitost kvantitativnih metoda

Masena koncentracija	Opseg
<1 $\mu\text{g/kg}$	-50 % do +20 %
>1 $\mu\text{g/kg}$ to 10 $\mu\text{g/kg}$	-30 % do +20 %
>10 $\mu\text{g/kg}$	-20 % do +20 %

¹ Ko-hromatografija je postupak u kojem se ekstrakt uzorka prije koraka hromatografije dijeli na dva dijela. Jedan se dio podvrgava hromatografiji kao takav. Drugi se dio miješa sa standardnim analitom koji se ispituje. Potom se ta mješavina isto podvrgava hromatografiji. Količina dodatog standardnog analita mora biti slična procijenjenoj količini analita u ekstraktu. Ko-hromatografija se koristi za poboljšanje identifikacije analita pri upotrebi hromatografskih metoda, posebno kad se ne može koristiti odgovarajući interni standard.

Ako nema potvrđenih referentnih supstanci, istinitost mjerenja može se ocijeniti na druge načine, na primjer korišćenjem supstanci sa dodijeljenim vrijednostima iz međulaboratorijskih ispitivanja ili dodavanjem poznatih količina analita na slijepi matiks.

1.2.2.2 Preciznost

Koeficijent varijacije (CV) za ponovljene analize referentnog ili obogaćenog materijala, u uslovima unutarlaboratorijske obnovljivosti, ne smije biti veći od nivoa izračunatog Horwitzovom jednačinom. Jednačina glasi:

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

gdje je C maseni udio izražen kao potencija (eksponent) s osnovom 10 (npr. 1 mg/g = 10^{-3}). Za masene udjele manje od 120 µg/kg primjenom Horwitzove jednačine dobijaju se neprihvatljivo visoke vrijednosti. Stoga najveći dozvoljeni koeficijent varijacije ne smije biti veći od vrijednosti prikazanih u tabeli 2.

Tabela 2. Prihvatljivi koeficijent varijacije

Maseni udio	CV ponovljivost (%)
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16 (prilagođeno na osnovu Horwitzove jednačine)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (prilagođeno na osnovu Horwitzove jednačine)
10–120 µg/kg	25(*)
< 10 µg/kg	30(*)

(*) Prikazani CV (%) služi kao smjernica i treba biti na najnižem razumno ostvarljivom nivou

Za analize koje se izvode u uslovima ponovljivosti koeficijent varijacije u uslovima ponovljivosti mora biti jednak ili manji od dvije trećine vrijednosti navedenih u tabeli 2.

1.2.3 Zahtjevi za hromatografsku separaciju

Za tečnu (LC) ili gasnu hromatografiju (GC) najmanje prihvatljivo vrijeme zadržavanja (retenciono vrijeme) analita koji se ispituju mora biti jednako dvostrukom vremenu zadržavanja koje važi za prazni volumen kolone. Vrijeme zadržavanja analita u ekstraktu mora odgovarati vremenu zadržavanja kalibracionog standarda, matriksa udruženog standardom ili matriksa obogaćenog standardom uz odstupanje od $\pm 0,1$ minuta. Za brzu hromatografiju, gdje je vrijeme zadržavanja manje od dva minuta, prihvatljivo je odstupanje manje od 5 % vremena zadržavanja. Ako se upotrebljava interni standard, odnos između hromatografskog vremena zadržavanja analita i vremena zadržavanja internog standarda, tj. relativno vrijeme zadržavanja analita, mora odgovarati vremenu zadržavanja kalibracionog standarda, matriksa udruženog standardom ili matriksa obogaćenog standardom uz najveće odstupanje od 0,5 % za gasnu hromatografiju i 1 % za tečnu hromatografiju za metode validovane od datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika.

1.2.4 Posebni kriterijumi efektivnosti za masenu spektrometriju

1.2.4.1 Detekcija masenom spektrometrijom

Detekcija masenom spektrometrijom izvodi se upotrebom nekih od sljedećih mogućnosti:

- snimanje cjelokupnih (engl. full scan, FS) masenih spektara;
- praćenje odabranih jona (engl. selected ion monitoring, SIM);
- tehnike sekvencijalne masene spektrometrije (MS^n) kao što je praćenje odabranih reakcija (engl. selected reaction monitoring (SRM));
- kombinacija tehnika masene spektrometrije (MS) ili sekvencijalne masene spektrometrije (MS^n) sa odgovarajućim načinima jonizacije.

Pogodne su i masena spektrometrija niske rezolucije (engl. low resolution mass spectrometry, LRMS, pri jediničnoj masenoj rezoluciji) i masena spektrometrija visoke rezolucije (engl. high resolution mass spectrometry, HRMS), uključujući npr. dvostruko fokusirajuće instrumente, instrumente koji mjere vrijeme putovanja (engl. time of flight, TOF) i instrumente Orbitrap.

Za potvrđivanje identiteta analita u masenoj spektrometriji visoke rezolucije (HRMS) masena devijacija svih dijagnostičkih jona mora biti ispod 5 ppm (ili u slučaju $m/z < 200$ ispod 1 mDa). Na osnovu toga mora se odabrati efikasna rezolucija pogodna svrsi, koja uopšteno mora biti veća od 10 000 za cijeli raspon mase sa ulegnućem od 10 % ili 20 000 na punoj širini na polovini maksimuma (engl. full width at half maximum, FWHM).

Kada se određivanje masenom spektrometrijom sprovodi snimanjem cjelokupnih spektara (i LRMS i HRMS), pogodni su samo dijagnostički joni sa relativnim intenzitetom većim od 10 % u referentnom spektru kalibracionog standarda, matriksa udruženog standardom ili matriksa obogaćenog standardom. Dijagnostički joni uključuju molekulski jon (ako je prisutan pri ≥ 10 % intenziteta baznog pika) i karakteristične jone fragmenata ili produkata.

Odabir jona prekursora: kada se određivanje masenom spektrometrijom sprovodi fragmentacijom nakon odabira jona prekursora, odabir jona prekursora obavlja se pri jediničnoj masenoj rezoluciji ili boljoj. Odabrani jon prekursora čine molekulski jon, karakteristični adukti molekulskog jona, karakteristični joni produkata ili jedan od njihovih izotopnih jona. Ako odabir prekursora ima interval odabira mase veći od jednog daltona (npr. u slučaju akvizicije koja ne zavisi od podataka), tehnika se smatra potvrđnom analizom snimanjem cjelokupnih spektara.

Joni fragmenata i produkata: Odabrani joni fragmenata ili produkata su dijagnostički fragment za analit/produkt koji se mjeri. Neselektivni prelazi (npr. tropilijum katjon ili gubitak vode) trebaju se izostaviti kad god je to moguće. Brojnost dijagnostičkih jona određuje se na osnovu površine pikova ili visine integrisanih hromatograma ekstrahovanih jona. To se primjenjuje i kada se mjerenja snimanjem cjelokupnih spektara koriste za identifikaciju. Odnos signal-šum (S/N) svih dijagnostičkih jona mora biti jednak ili veći od tri naprema jedan (3: 1).

Relativni intenziteti: relativni intenziteti dijagnostičkih jona (odnos iona) izražavaju se kao postotak intenziteta najbrojnijeg jona ili prelaza. Odnos jona mora se odrediti poređenjem spektara ili integrisanjem signala masenih tragova ekstrahovanih jona. Odnos jona analita koji se potvrđuje mora odgovarati odnosu jona matriksa udruženog standardom, matriksa obogaćenog standardom ili standardnih rastvora na poredivim koncentracijama, mjerenim pod istim uslovima, uz relativno odstupanje od ± 40 %.

Za sve masene spektrometrijske analize mora se odrediti najmanje jedan odnos jona. Poželjno je da su to joni dobijeni jednim snimanjem, ali mogu poticati i od različitih snimanja prilikom istog injektiranja (tj. snimanje cjelokupnih spektara i snimanje masenih fragmenata).

1.2.4.2 Identifikacija

Sistem identifikacionih tačaka upotrebljava se za odabir odgovarajućih načina akvizicije i kriterijuma evaluacije. Za potvrdu identiteta supstance u matriksu za koje je utvrđena maksimalno dozvoljena količina rezidua (odobrena upotreba) potrebne su najmanje četiri identifikacione tačke. Za neodobrene ili zabranjene supstance potrebno je pet identifikacionih tačaka. Jedna tačka može poticati iz hromatografske separacije. U tabeli 3. prikazan je broj identifikacionih tačaka koje se mogu dobiti pojedinom tehnikom. Da bi se mogle dobiti identifikacione tačke potrebne za potvrdu, mogu se dodati identifikacione tačke dobijene različitim tehnikama.

1. Sve masene spektrometrijske analize moraju se kombinovati sa tehnikom separacije koja pokazuje dovoljnu snagu separacije i selektivnost za određenu primjenu. Odgovarajuće su tehnike separacije, između ostalih, tečna hromatografija (LC), gasna hromatografija (GC), kapilarna elektroforeza (CE) i superkritična tečna hromatografija (SFC). U slučaju analita u kojem je prisutno

bilo koje izobarno ili izomerno jedinjenje, prihvatljivost vremena zadržavanja (tj. $\pm 0,5$ % u gasnoj hromatografiji te ± 1 % u tečnoj hromatografiji i superkritičnoj tečnoj hromatografiji) obavezna je za potvrdu njegovog identiteta.

2. Mogu se kombinovati najviše tri posebne tehnike kako bi se postigao minimalni broj identifikacionih tačaka.

3. Različiti načini jonizacije (npr. elektronska jonizacija i hemijska jonizacija) smatraju se različitim tehnikama.

Tabela 3. Identifikacione tačke po tehnikama

Tehnika	Identifikacione tačke
Separacija (način GC, LC, SFC, CE)	1
LR-MS jon	1
Odabir jona prekursora pri masenom rasponu od $< \pm 0,5$ Da	1 (indirektno)
LR-MS ⁿ jon produkta	1,5
HR-MS jon	1,5
HR-MS ⁿ jon produkta	2,5

Tabela 4. Primjeri broja identifikacionih tačaka za posebne tehnike i kombinacije tehnika (n = cijeli broj)

Tehnike	Separacij a	Broj jona	Identifikacione tačke
GC-MS (EI ili CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI i CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI i CI) 2 derivata	GC	2 (Derivat A) + 2 (Derivat B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	N (MS)	1 + n
GC- ili LC-MS/MS	GC ili LC	1 prekursor + 2 produkta	1 + 1 + 2 $\times$ 1,5 = 5
GC- ili LC-MS/MS	GC ili LC	2 prekursora + 2 produkta	1 + 2 + 2 $\times$ 1,5 = 6
GC- ili LC-MS ³	GC ili LC	1 prekursor + 1 MS ² produkt + 1 MS ³ produkt	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- ili LC-HRMS	GC ili LC	n	1 + n $\times$ 1,5
GC- ili LC-HRMS/ MS	GC ili LC	1 prekursor (maseni raspon $< \pm 0,5$ Da) + 1 produkt	1 + 1 + 2,5 = 4,5
GC- ili LC-HRMS i HRMS/MS	GC ili LC	1 ion detektovan snimanjem cjelokupnih spektara + 1 HRMS jon produkta ^(a)	1 + 1,5 + 2,5 = 5
GC- i LC-MS	GC i LC	2 jona (GCMS) + 1 jon (LCMS)	1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6

^(a) Ne uzima se dodatna identifikaciona tačka za odabir jona prekursora ako je taj jon prekursora isti ion (ili adukt ili izotop) kao HRMS jon praćen snimanjem cjelokupnog spektra.

1.2.5 Posebni kriterijumi efektivnosti za određivanje analita upotrebom tečne hromatografije i tehnike detekcije koja nije masena spektrometrija

Kao alternativa metodama koje se zasnivaju na masenoj spektrometriji i samo za odobrene supstance mogu se upotrijebiti sledeće tehnike, pod uslovom da su ispunjeni odgovarajući kriterijumi za te tehnike:

1. spektrofotometrija detekcijom sa diodnim nizom (engl. diode array detection, DAD) uz snimanje cjelokupnog spektra sa HPLC-om;

2. spektrofotometrija fluorescentnom detekcijom (engl. fluorescence detection spectrophotometry, FLD) u slučaju upotrebe HPLC-a.

Tečna hromatografija uz UV/VIS detekciju (jedna talasna dužina) ne može se sama po sebi koristiti kao potvrdna metoda.

1.2.5.1 Kriterijumi efektivnosti za spektrofotometriju sa diodnim nizom uz snimanje cjelokupnog spektra

Moraju se ispuniti kriterijumi efektivnosti za hromatografsku separaciju iz tačke 1.2.3. Maksimumi apsorpcije u UV spektru analita moraju biti na istim talasnim dužinama kao i oni kalibracionog standarda u matriksu, uz maksimalnu toleranciju koja zavisi od rezolucije sistema detekcije. Za detekciju sa diodnim nizom maksimalna tolerancija obično je unutar ± 2 nm. Za one delove dvaju spektara čija je relativna apsorpcija veća od ili jednaka 10 % spektar analita iznad 220 nm ne smije se vidljivo razlikovati od spektra kalibracionog standarda. Taj je kriterijum zadovoljen kada su, prvo, prisutni isti maksimumi i, drugo, kada razlika između dva spektara ni u jednoj tački nije veća od 10 % od apsorpcije kalibracionog standarda. U slučaju kompjuterskog pretraživanja baza podataka i upoređivanja, poređenje podataka o spektru u službenim uzorcima sa onima kalibracionog rastvora mora biti veća od kritičnog faktora podudarnosti. Taj se faktor određuje tokom postupka validacije za svaki analit na osnovu spektara za koje su ispunjeni prethodno opisani uslovi. Mora se proveriti varijabilnost spektara uzrokovana matriksom uzorka i funkcionisanjem detektora.

1.2.5.2 Kriterijumi efektivnosti za spektrofotometriju fluorescencijskom detekcijom

Moraju se ispuniti kriterijumi efektivnosti za hromatografsku separaciju iz tačke 1.2.3. Talasne dužine ekscitacije i emisije, u kombinaciji sa hromatografskim uslovima, moraju se odabrati tako da se efekti interferirajućih komponenti u ekstraktima slijepog uzorka svedu na najmanju mjeru. Između talasne dužine ekscitacije i emisije treba biti najmanje 50 nanometara.

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.

To se odnosi na molekule koje pokazuju prirodnu fluorescenciju i molekule koje pokazuju fluorescenciju nakon transformacije ili derivatizacije.

Dio 2 VALIDACIJA

2.1 Karakteristike efektivnosti koje treba odrediti za analitičke metode

Validacijom metode pokazuje se da analitička metoda ispunjava kriterijume koji se odnose na odgovarajuće karakteristike efektivnosti. Različiti ciljevi kontrole zahtijevaju različite kategorije metoda. U tabeli 5. prikazano je koje se karakteristike efektivnosti proveravaju za koju vrstu metode, a dalje objašnjenje svakog parametra nalazi se u ovom dijelu.

Tabela 5. Klasifikacija analitičkih metoda prema karakteristikama efektivnosti koje se moraju odrediti

Metoda	Potvrдна		Orijentaciona		
	Kvalitativna	Kvantitativna	Kvalitativna	Polukvantitativna	Kvantitativna
Supstance	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identifikacija u skladu s tačkom 1.2.	x	x			
CC α	x	x			
CC β	–		x	x	x
Istinitost		x			x
Preciznost		x		x.	x
Relativni efekat matriksa/apsolutno iskorištenje (*)		x			x
Selektivnost/specifičnost		x	x	x	x
Stabilnost (#)		x	x	x	x
Robusnost		x	x	x	x

x: potrebno je kako bi se validacijom dokazalo da su ispunjeni zahtjevi za karakteristiku efektivnosti.

x.: zahtjevi preciznosti iz tačke 1.2.2.2. ne moraju se ispuniti za polukvantitativne orijentacione metode. Međutim, preciznost se određuje kako bi se dokazala pogodnost metode za izbjegavanje lažno usklađenih analitičkih rezultata.

A: zabranjene ili neodobrene supstance

B: odobrene supstance

(#) Ako su podaci o stabilnosti za analite u matriksu dostupni iz naučne literature ili iz druge laboratorije, predmetne laboratorija ne mora ih ponovno utvrditi. Međutim, upućivanje na dostupne podatke o stabilnosti za analite u rastvaraču prihvatljivo je samo ako se primjenjuju isti uslovi.

(*) Relevantno za metode masene spektrometrije kako bi se validacijom dokazalo da su ispunjeni zahtjevi za kriterijume efektivnosti. Relativni efekat matriksa metode određuje se kada taj efekat efekat nije ocijenjen tokom postupka validacije. Apsolutno iskorištenje metode određuje se kada se ne upotrebljava interni standard ni kalibracija matriksom obogaćenim standardom.

2.2 Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost

U ovom dijelu su navedeni primjeri i reference za postupke validacije. Mogu se primijeniti i drugi postupci kako bi se pokazalo da metoda ispunjava kriterijume efektivnosti, pod uslovom da pružaju isti nivo i kvalitet informacija.

2.2.1 Uobičajena validacija

Izračunavanje parametara u skladu sa uobičajenim metodama zahtijeva izvođenje nekoliko pojedinačnih eksperimenata. Za svaku veću promjenu mora se odrediti svaka karakteristika efektivnosti (vidjeti odjeljak 2.4.). Metodama za ispitivanje više analita moguće je istovremeno analizirati nekoliko analita, pod uslovima da su isključene interferencije koje bi mogle biti značajne. Na isti se način može odrediti nekoliko karakteristika efektivnosti. Stoga, da bi se smanjila količina posla, preporučljivo je što više kombinovati eksperimente (npr. ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost sa specifičnošću, analizu slijepih uzoraka kako bi se odredila granica odlučivanja za potvrdnu metodu i ispitivanje osjetljivosti).

2.2.1.1 Istinitost na osnovu sertifikovanog referentnog materijala

Poželjno je odrediti istinitost analitičke metode pomoću sertifikovanog referentnog materijala. Postupak za to opisan je u standardu ISO 5725-4:1994².

U nastavku je naveden primjer:

1. analizirajte šest replika sertifikovanog referentnog materijala u skladu sa uputstvima za testiranje koje važe za određenu metodu;
2. odredite koncentraciju analita koji je prisutan u svakom uzorku replika;
3. izračunajte srednju vrijednost, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) za tih šest replika;
4. izračunajte istinitost dijeljenjem detektovane srednje vrijednosti potvrđenom vrijednošću (mjerenom kao koncentracija) i pomnožite sa 100 kako biste rezultat izrazili u procentima.

Istinitost (%) = (srednja vrijednost detektovane koncentracije korigovane iskorištenjem) $\times$ 100/potvrđena vrijednost

2.2.1.2 Istinitost na osnovu obogaćenih uzoraka

Ako nije dostupan sertifikovani referentni materijal, istinitost metode određuje se eksperimentima uz upotrebu obogaćenog slijepog matriksa, u najmanjoj mjeri u skladu sa sljedećom šemom:

1. za metode validovane od datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika odaberite slijepi uzorak i obogatite pri koncentraciji od: (a) 0,5³, 1,0 i 1,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA); ili

² ISO 5725-4:2020, Tačnost (istinitost i preciznost) mjernih metoda i rezultata – 4. dio: Osnovne metode određivanja istinitosti standardne mjerne metode (klauzula 3.).

³ Kada se za neodobrenu farmakološki aktivnu supstancu ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera, koncentracija koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera može se

(b) 0,1⁴, 1,0 i 1,5 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljena količina (ML) za odobrene supstance; ili

(c) 1,0, 2,0 i 3,0 puta najniži kalibracioni nivo za neodobrene supstance (za koje nije utvrđena referentna vrijednost za preduzimanje mjera);

2. za svaki nivo koncentracije analiza se mora obaviti sa šest replika;

3. analizirajte uzorke;

4. izračunajte koncentraciju detektovanu u svakom uzorku;

5. izračunajte istinitost za svaki uzorak pomoću jednačine u nastavku, a zatim izračunajte srednju istinitost i koeficijent varijacije za šest rezultata na svakom nivou koncentracije.

Istinitost (%) = (srednja vrijednost detektovane koncentracije korigovana iskorištenjem) × 100/nivo obogaćenja

Za metode za odobrene supstance validovane prije datuma početka primjene ovog Pravilnika dovoljno je određivanje istinitosti metode upotrebom šest obogaćenih alikvota pri 0,5, 1,0 i 1,5 puta maksimalno dozvoljene količina rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljene količina (ML).

2.2.1.3 Ponovljivost

1. Za metode validovane od datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika mora se pripremiti skup uzoraka istih slijepih matriksa iste vrste. Oni se moraju obogatiti analitom tako da se dobiju koncentracije jednake:

(a) 0,5⁵, 1,0 i 1,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA); ili

(b) 0,1⁶, 1,0 i 1,5 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljena količina (ML) za odobrene supstance; ili

(c) 1,0, 2,0 i 3,0 puta najniži kalibracioni nivo za neodobrene ili zabranjene supstance u slučaju da referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA) nije primjenljiva.

2. Za svaki nivo koncentracije analiza se mora obaviti sa najmanje šest replika.

3. Analizirajte uzorke.

4. Izračunajte koncentraciju detektovanu u svakom uzorku.

5. Izračunajte srednju koncentraciju, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) obogaćenih uzoraka.

6. Ponovite ove korake još najmanje dvaput za ukupno najmanje 18 replika po nivou.

7. Izračunajte ukupne srednje koncentracije, standardne devijacije (tako da izračunate prosjek standardne devijacije kao kvadrata pojedinačnih izvođenja i zatim izračunate kvadratni korijen te vrijednosti) i koeficijente varijacije za obogaćene uzorke.

Za metode za odobrene supstance validovane prije datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika dovoljno je određivanje ponovljivosti uz obogaćene matrikse sa koncentracijama u iznosu od 0,5, 1,0 i 1,5 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljena količina (ML).

Druga je mogućnost da se ponovljivost izračuna u skladu sa standardom ISO 5725-2:2019⁷.

2.2.1.4 Unutarlaboratorijska obnovljivost

1. Za validacije koje se sprovode nakon datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika pripremite skup uzoraka određenog ispitnog materijala (identičnih ili različitih matriksa), kojima je dodat jedan ili više analita tako da se dobiju koncentracije koje iznose:

(a) 0,5⁵, 1,0 i 1,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA); ili

(b) 0,1⁶, 1,0 i 1,5 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljena količina (ML) za odobrene supstance; ili

(c) 1,0, 2,0 i 3,0 puta najniži kalibracioni nivo za neodobrene ili zabranjene supstance u slučaju da referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA) nije primjenljiva.

2. Izvršite analizu za svaki nivo koncentracije sa najmanje šest replika slijepog uzorka.

3. Analizirajte uzorke.

4. Izračunajte koncentraciju detektovanu u svakom uzorku.

5. Ponovite ove korake još najmanje dvaput (za ukupno najmanje 18 replika po nivou), sa različitim serijama slijepog uzorka, različitim analitičarima i u što više različitih uslova okoline, npr. različite serije reagensa, rastvarača, različite sobne temperature, različiti instrumenti ili varijacija drugih parametara.

6. Odredite srednju koncentraciju, standardnu devijaciju i koeficijent varijacije (%) obogaćenih uzoraka.

Za metode za odobrene supstance validovane prije datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika dovoljno je određivanje unutarlaboratorijske obnovljivosti i uz obogaćene matrikse sa koncentracijama od 0,5, 1,0 i 1,5 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua ili maksimalno dozvoljena količina.

Druga je mogućnost da se i izračun unutarlaboratorijske obnovljivosti/srednje preciznosti obavi u skladu s normama ISO 5725-1:2023⁸, ISO 11843-1:1997⁹, Codex CAC/GL 59-2006¹⁰.

2.2.2 Validacija prema alternativnim modelima

Za izračunavanje parametara u skladu sa alternativnim modelima potrebno je izvođenje plana testiranja. Plan testiranja mora biti napravljen tako da se u njemu uzme u obzir broj različitih vrsta i različitih faktora koji se ispituju. Stoga se kao prvi korak u cijelom postupku validacije razmatraju populacijski uzorci koji će se u budućnosti analizirati u laboratoriji kako bi se odredile najvažnije vrste

zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,5 i 1,0 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera ili najnižim kalibrisanim nivoom ako je niža od 0,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera.

⁴ Kada se za određenu farmakološki aktivnu supstancu ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,1 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua, koncentracija od 0,1 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,1 i 0,5 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua.

⁵ Kada se za neodobrenu farmakološki aktivnu supstancu ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera, koncentracija koja iznosi 0,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,5 i 1,0 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera ili najnižim kalibrisanim nivoom ako je niža od 0,5 puta referentna vrijednost za preduzimanje mjera.

⁶ Kada se za određenu farmakološki aktivnu supstancu ne može razumno ostvariti validacija koncentracije koja iznosi 0,1 puta maksimalno dozvoljena količina rezidua, koncentracija koja iznosi 0,1 puta najveća dopuštena količina rezidua može se zamijeniti najnižom razumno ostvarivom koncentracijom koja iznosi između 0,1 i 0,5 puta najveća dopuštena količina rezidua.

⁷ ISO 5725-2:2019 Tačnost (istinitost i preciznost) mjernih metoda i rezultata – 2. dio: Osnovna metoda određivanja ponovljivosti i obnovljivosti standardne mjerne metode (klauzula 3.).

⁸ ISO 5725-1:2023 Tačnost (istinitost i preciznost) mjernih metoda i rezultata – 1. dio: Opšti principi i definicije (klauzula 3.).

⁹ ISO 11843-1:1997 Mogućnost dokazivanja – 1. dio: Nazivi i definicije.

¹⁰ Komisija za Codex alimentarius, Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda/Svjetska zdravstvena organizacija, Guidelines on estimation of uncertainty of results (Smjernice za procjenu nesigurnosti rezultata) (CAC/GL 59-2006).

i faktori koji bi mogli uticati na mjerne rezultate. Faktorski pristup omogućuje ocjenjivanje mjerne nesigurnosti rezultata ispitivanja, dobijenih u različitim uslovima ispitivanja u određenoj laboratoriji, kao što su različiti analitičari, različiti instrumenti, različite serije reagensa, različiti matriksi, različita protekla vremena ispitivanja i različite temperature ispitivanja. Nakon toga treba odabrati raspon koncentracije koji je prilagođen svrsi u skladu sa maksimalno dozvoljenom količinom rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljenom količinom (ML) za odobrene supstance ili sa referentnom vrijednošću za preduzimanje mjera (RPA) ili najnižim kalibracionim nivoom za zabranjene ili neodobrene supstance.

Faktorskim pristupom nastoje se dobiti pouzdani podaci o preciznosti i mjerni podaci istovremenom kontrolisanom varijacijom odabranih faktora. On omogućuje procjenu kombinovanog uticaja faktorskih efekata i nasumičnih efekata. Plan testiranja ujedno omogućuje ispitivanje robusnosti¹¹ analitičke metode i određivanje standardne devijacije unutarnje obnovljivosti među matriksima.

U daljem tekstu navodi se primjer alternativne metode korištenjem ortogonalnog plana testiranja.

Može se ispitati do sedam faktora (faktori šuma). Ispitivanje je osmišljeno tako da se primjenom plana testiranja istovremeno mogu odrediti preciznost, istinitost (na osnovu obogaćenih uzoraka), osjetljivost, mjerna nesigurnost i kritične koncentracije.

Tabela 6. Primjer ortogonalnog plana testiranja sa sedam faktora (I–VII) promijenjenih na dva nivoa (A/B) u validacionoj studiji sa osam procesa analize (kombinacija nivoa faktora)

Faktor	I	II	III	IV	V	VI	VII
Proces analize 01	A	A	A	A	A	A	A
Proces analize 02	A	A	B	A	B	B	B
Proces analize 03	A	B	A	B	A	B	B
Proces analize 04	A	B	B	B	B	A	A
Proces analize 05	B	A	A	B	B	A	B
Proces analize 06	B	A	B	B	A	B	A
Proces analize 07	B	B	A	A	B	B	A
Proces analize 08	B	B	B	A	A	A	B

Procjena efektivnosti metode vrši se na način kako opisuju Jülicher i dr.¹² ili prema normi ISO/TS 23471:2022.¹¹

2.2.3 Drugi postupci validacije

Mogu se primijeniti i drugi postupci kako bi se pokazalo da metoda ispunjava kriterijume efektivnosti za karakteristike efektivnosti, pod uslovom da pružaju isti nivo i kvalitet informacija. Validacija se može obaviti i sprovođenjem međulaboratorijskog ispitivanja kao što to utvrđuju Codex Alimentarius, ISO ili IUPAC¹³ ili pomoću alternativnih metoda kao što su ispitivanja u jednoj laboratoriji odnosno unutrašnja validacija¹⁴. Ako se primjenjuju alternativni postupci validacije, u protokolu izvođenja validacije utvrđuju se temeljni model i strategija sa odgovarajućim preduslovima, pretpostavkama i formulama, ili se na njih barem upućuje.

2.3 Selektivnost/specifičnost

Sposobnost razlikovanja između analita i njemu srodnih supstanci mora se odrediti u najvećoj mogućoj mjeri. Moraju se odrediti interferencije homologa, izomera, produkta degradacije, endogenih tvari, analoga, metabolita rezidua koja se analizira, jedinjenja

¹¹ Promjene uslova ispitivanja koji se ovdje navode mogu uključivati uzorke, analite, uslove čuvanja, uslove okoline i/ili uslove pripreme uzoraka. Za sve uslove ispitivanja koji bi u praksi mogli biti podložni promjenama (npr. stabilnost reagensa, sastav uzorka, pH, temperatura) mora se ukazati na sve varijacije koje bi mogle uticati na rezultat analize.

¹² Jülicher, B., Gowik, P. i Uhlig, S. (1998.) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept (Ocjena metoda detekcije u analizi tragova pomoću statistički utemeljenog koncepta unutrašnje validacije). Analyst, 123, 173. ISO/TS 23471:2022 Experimental designs for evaluation of uncertainty – Use of factorial designs for determining uncertainty functions (Planiranje eksperimenata za evaluaciju nesigurnosti – Upotreba faktorskih planova eksperimenata za određivanje funkcija nesigurnosti).

¹³ IUPAC (1995.), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies (Protokol o oblikovanju, izvođenju i tumačenju ispitivanja efektivnosti metoda), Pure & Applied Chem, 67, 331.

¹⁴ Gowik, P., Jülicher, B. i 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 (Multirezidualna metoda za nesteroidne antiinflamatorne lijekove u plazmi korištenjem tačne hromatografije visokih performansi uz primjenu detekcije pomoću niza fotodioda. Opis metode i sveobuhvatna unutrašnja validacija), J. Chromatogr., 716, 221.

matriksa ili bilo koje druge potencijalno interferirajuće supstance te se metoda prema potrebi mora izmijeniti da bi se izbjegle utvrđene interferencije. Za određivanje specifičnosti metode primjenjuje se sledeći pristup:

1. odaberite niz hemijski srodnih jedinjenja ili drugih supstanci koje bi mogle interferirati sa značajnim jedinjenjem koje je možda prisutno u uzorcima i provjerite mogu li interferirati sa analizom ciljnih analita;
2. analizirajte odgovarajući broj reprezentativnih slijepih uzoraka, npr. različite serije ili serije različitih životinjskih vrsta ($n \geq 20$) i provjerite interferencije signala, pikova ili tragova jona u značajnom području u kojem se očekuje elucija ciljanog analita;
3. obogatite reprezentativne slijepe uzorke do relevantne koncentracije supstancama koje bi mogle ometati identifikaciju i/ili kvantifikaciju analita i ispitajte:
 - (a) bi li prisutnost dodate supstance mogla dovesti do pogrešne identifikacije;
 - (b) otežava li dodata supstanca identifikaciju ciljnog analita;
 - (c) postoji li značajni uticaj dodate supstance na kvantifikaciju.

2.4 Robusnost

Mora se ispitati kontinuirana efektivnost analitičke metode u različitim uslovima ispitivanja, koji na primjer uključuju različite uslove uzorkovanja i manje promjene koje se mogu dogoditi pri rutinskom testiranju. Za ispitivanje robusnosti metode trebale bi se uvesti manje promjene uslova ispitivanja. Ocjenjuje se važnost tih promjena. Za sve manje promjene za koje se pokazalo da značajno utiču na efektivnost ispitivanja mora se odrediti svaka karakteristika efektivnosti.

2.5 Stabilnost

Mora se odrediti stabilnost kalibracionog standarda, matriksa održenog standardom i/ili matriksa obogaćenih standardom i stabilnost analita ili komponenti matriksa u uzorku tokom čuvanja ili analize jer nestabilnost može uticati na rezultate ispitivanja.

Stabilnost analita u različitim uslovima čuvanja obično je dobro poznata. Ispitivanja koja se sprovode radi praćenja uslova čuvanja standarda i uzoraka, koja su sastavni dio uobičajenog sistema akreditacije laboratorija i kontrole kvaliteta, mogu pružiti potrebne podatke. Ako su dostupni podaci o stabilnosti za analite u matriksu (npr. na osnovu podataka iz referentnih laboratorija EU-a (EURL), objavljenih podataka itd.), svaka pojedina laboratorija ne mora utvrđivati te podatke. Međutim, upućivanje na dostupne podatke o stabilnosti za analite u rastvoru i u matriksu prihvatljivo je samo ako se primjenjuju isti uslovi.

Ako nijesu dostupni potrebni podaci o stabilnosti, trebaju se upotrijebiti pristupi u nastavku. Osim toga primjena izohronog pristupa¹⁵ sa temperaturnim sistemom skladištenja sličnim onom u tabeli 7. ovog Priloga omogućava utvrđivanje mogućih nestabilnosti analita i procjenu odgovarajućih rokova skladištenja i takođe se može koristiti.

2.5.1 Određivanje stabilnosti analita u rastvoru

1. Pripremite svježe matične rastvore jednog ili više analita i razblažite ih prema uputstvima za testiranje kako biste dobili dovoljno alikvota (npr. 40) svake odabrane koncentracije. Pripremaju se uzorci:

- (a) rastvor analita koji se koristi za obogaćivanje;
- (b) rastvor analita koji se koristi za konačnu analizu;
- (c) svih drugih značajnih rastvora (npr. derivatizovani standardi).

2. Izmjerite udio analita u svježe pripremljenom rastvoru prema uputstvima za testiranje.

3. Rasporedite odgovarajuće zapremine u prikladne sudove za čuvanje, označite ih i čuvajte u skladu sa uslovima svjetla i temperature iz šeme u tabeli 7. Vrijeme čuvanja mora se odabrati uzimajući u obzir primijenjenu analitičku praksu, po mogućnosti dok se ne primijete prve pojave degradacije tokom identifikacije i/ili kvantifikacije. Ako se tokom ispitivanja stabilnosti ne primijeti degradacija, vrijeme čuvanja u ispitivanju stabilnosti mora biti jednako vremenu najdužeg roka čuvanja rastvora.

4. Izračunajte koncentraciju jednog ili više analita u svakom alikvotu u poređenju sa koncentracijom analita u svježe pripremljenom rastvoru prema jednačini u nastavku:

$$\text{Preostali analit (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{svježa}}$$

C_i = koncentracija u vremenskoj tački i

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

Srednja vrijednost pet replika rastvora koje su bile čuvane ne smije se razlikovati za više od 15 % od srednje vrijednosti pet svježe pripremljenih replika rastvora. Srednja vrijednost pet svježe pripremljenih rastvora upotrebljava se kao osnova za proračun procentne razlike.

Tablica 7. Šema za određivanje stabilnosti analita u rastvoru

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

2.5.2 Određivanje stabilnosti analita u matriksu

1. Ako je moguće, upotrijebite prirodno kontaminirane uzorke. Ako prirodno kontaminirani matriks nije na raspolaganju, mora se upotrijebiti slijepi matriks obogaćen analitom.

2. Ako je na raspolaganju testirani kontaminirani matriks, homogenizujte ga, po mogućnosti dok je još svjež. Podijelite matriks na pet dijelova i analizirajte iz svakog dijela po jedan alikvot.

3. Ako prirodno kontaminirani matriks nije na raspolaganju, uzmite slijepi matriks i homogenizujte ga. Podijelite matriks u pet alikvota. Obogatite svaki dio analitom oko nivoa značaja, koji bi po mogućnosti trebao biti pripremljen u maloj količini vodenog rastvora. Odmah analizirajte iz svakog dijela po jedan alikvot.

4. Čuvajte djelove (poduzorke) homogenizovanog kontaminiranog matriksa ili obogaćenog slijepog matriksa na temperaturi koja odražava uslove čuvanja prihvaćene u laboratoriji za određenu kombinaciju analita/matriksa i odredite koncentracije analita nakon kratkoročnog, srednjeročnog i dugoročnog čuvanja (najmanje onoliko dugo koliko se uzorak obično čuva u laboratoriji).

¹⁵ Lamberty, A., Schimmel, H. i Pauwels, J. (1998.) The study of the stability of reference materials by isochronous measurements (Studija stabilnosti referentnih materijala pomoću izohronih mjerenja.), Fres. J. Anal. Chem. 360, 359.

5. Srednja vrijednost pet alikvota jednog dijela, koji je bio čuvan, ne smije se razlikovati od srednje vrijednosti pet svježe pripremljenih alikvota za više od unutarlaboratorijske obnovljivosti metode. Srednja vrijednost pet svježe pripremljenih alikvota upotrebljava se kao osnova za izračun procentne razlike.

6. Zabilježite najduže prihvatljivo vrijeme čuvanja i optimalne uslove čuvanja.

2.6 Granica odlučivanja za potvrdnu metodu (CC α)

CC α se određuje za potvrdne metode. CC α se utvrđuje na osnovu uslova koji su u skladu sa zahtjevima za identifikaciju ili identifikaciju i kvantifikaciju iz Dijela 1.

Za kontrolu usklađenosti uzoraka kombinovana standardna mjerna nesigurnost već je uzeta u obzir u vrijednosti CC α (granica odlučivanja za potvrdnu metodu).

1. Za neodobrene ili zabranjene farmakološki aktivne supstance CC α se računa na sljedeći način:

(a) metoda 1.: postupkom kalibracione krive prema standardu ISO 11843-1:1997¹⁶ (u tekstu: kritična vrijednost neto varijable stanja). U tom se slučaju koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje na nivo referentne vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA) ili najnižeg kalibracionog nivoa i iznad njih u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke. Nakon identifikacije grafički prikažite odnos signala, ako je moguće, ili ponovno izračunate koncentracije i dodate koncentracije. Granica odlučivanja jednaka je pripadajućoj koncentraciji u tački presjeka sa ordinatom y plus 2,33 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti u tački presjeka. Ova metoda primjenjiva je samo na kvantitativna ispitivanja. Granice odlučivanja dobijene ovim pristupom moraju se provjeriti analiziranjem slijepog matriksa obogaćenog na izračunatoj granici odlučivanja;

(b) metoda 2.: analiziranjem najmanje 20 reprezentativnih slijepih uzoraka po matriksu kako bi se izračunao odnos signala i šuma u vremenskom intervalu u kojem se očekuje analit. Kao granica odlučivanja može se uzeti trostruka vrijednost odnosa signal-šum. Ovo je primjenljivo na kvantitativna i kvalitativna ispitivanja. Granice odlučivanja dobijene ovim pristupom moraju se provjeriti analiziranjem slijepog matriksa obogaćenog na izračunatoj granici odlučivanja;

(c) metoda 3.: CC α = najniži kalibracioni nivo + k(jednostrani, 99 %) × (kombinovana) standardna mjerna nesigurnost na najnižem kalibracionom nivou.

Za neodobrene ili zabranjene farmakološki aktivne supstance, zavisno od postupka validacije (i povezanim stepenima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, n = ∞), upotrebljava se k-faktor od 2,33.

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost pogodne su za definisanje (kombinovane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih faktora koji na to utiču.

Metoda 2. za proračun vrijednosti CC α može se upotrebljavati samo do 1. januara 2026. u slučaju metoda validovanih prije datuma stupanja na snagu ovog Pravilnika. Za metode validovane nakon stupanja na snagu ovog Pravilnika moraju se primjenljivati isključivo metoda 1. ili 3.

2. Za odobrene supstance CC α se izračunava na sljedeći način:

(a) za odobrene supstance u kombinacijama matriksa/vrsta za koje je utvrđena maksimalno dozvoljena količina rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljena količina (ML):

i. metoda 1.: postupkom kalibracione krive prema standardu ISO 11843-1:1997 (u tekstu: kritična vrijednost neto varijable stanja). U tom se slučaju koristi slijepi uzorak koji se obogaćuje na nivou maksimalno dozvoljene količine rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljene količine (ML) i iznad njih u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke. Nakon identifikacije grafički prikažite odnos signala, ako je moguće, ili ponovo izračunate koncentracije i dodate koncentracije. Granica odlučivanja jednaka je pripadajućoj koncentraciji pri maksimalno dozvoljenoj količini rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljenoj količini (ML) plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti na dozvoljenoj granici ($\alpha = 5\%$);

ii. metoda 2.: CC α = maksimalno dozvoljena količina rezidua (ili maksimalno dozvoljena količina) + k(jednostrani, 95 %) × (kombinovana) standardna mjerna nesigurnost pri maksimalno dozvoljenoj količini rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljenoj količini (ML).

Za odobrene supstance, zavisno od postupka validacije (i povezanim stepenima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, n = ∞), upotrebljava se k-faktor od 1,64.

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost pogodne su za definisanje (kombinovane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih faktora koji na to utiču.

Za farmakološki aktivne supstance za koje je utvrđena maksimalno dozvoljena količina rezidua za grupu različitih supstanci, CC α supstance sa najvišom koncentracijom u uzorku upotrebljava se kao CC α za ocjenjivanje grupe supstanci u ispitivanom uzorku;

(b) za odobrene supstance u kombinacijama matriksa/vrsta za koje nije utvrđena maksimalno dozvoljena količina rezidua ne smiju biti prisutne rezidue. Za odobrene supstance za koje nije utvrđena maksimalno dozvoljena količina rezidua (MRL), za proračun vrijednosti CC α upotrebljava se kaskadna maksimalno dozvoljena količina rezidua. Primjenjuje se metoda 1. ili 2. iz prethodnog stava, ali „maksimalno dozvoljena količina rezidua” odnosi se na „0,5 puta kaskadna¹⁷ maksimalno dozvoljena količina rezidua, uz ciljani 0,1 puta kaskadna maksimalno dozvoljena količina rezidua kada je to razumno izvodljivo”.

2.7 Sposobnost detekcije za orijentacionu metodu (CC β)

CC β se određuje za orijentacione metode. CC β se utvrđuje na osnovu Dijela 1 ovog Priloga i u skladu sa zahtjevima utvrđenima u tabeli 5. Međutim, za orijentacione metode ne trebaju se primjenjivati potpuni zahtjevi za identifikaciju (tačke 1.2.3., 1.2.4., 1.2.5.).

1. Za neodobrene ili zabranjene farmakološki aktivne supstance mora se osigurati najveća β -greška od 5 %. CC β se računa na sledeći način:

(a) metoda 1.: postupkom kalibracione krive prema standardu ISO 11843-1:1997 (u tekstu: najmanja vrijednost neto varijable stanja koja se može detektovati). U tom slučaju koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji je obogaćen na nivou referentne vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA) i ispod nje odnosno, ako referentna vrijednost za preduzimanje mjera (RPA) nije utvrđena, oko orijentacione ciljane koncentracije u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke. Grafički prikažite odnos signala i dodate koncentracije. Sposobnost detekcije jednaka je odgovarajućoj koncentraciji na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti za srednji izmjereni udio na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji. Ekstrapolacija daleko ispod najnižeg nivo obogaćenja (< 50 % najnižeg nivo obogaćenja) potvrđuje se eksperimentalnim podacima u koraku validacije;

(b) metoda 2.: ispitivanje obogaćenog slijepog uzorka na nivoima koncentracije jednakim i većim od orijentacione ciljane koncentracije. Na tom nivou koncentracije analizira se 20 obogaćenih slijepih uzoraka kako bi se osigurala pouzdana osnova za ovo

¹⁶ ISO 11843-1:1997 Mogućnost dokazivanja – 1. dio: Nazivi i definicije.

¹⁷ UREDBA KOMISIJE (EU) 2018/470 od 21. marta 2018. o detaljnim pravilima o najvećim dopuštenim količinama rezidua koje treba uzeti u obzir pri sprovođenju kontrola za hranu porijeklom od životinja liječenih u EU-u u skladu sa članom 11. Direktive 2001/82/EZ

određivanje. Ako na tom nivou koncentracije ostaje samo $\leq 5\%$ lažno usklađenih rezultata, nivo je jednak sposobnosti detekcije metode. Ako se dobije $>5\%$ lažno usklađenih rezultata, odabrana orijentaciona ciljna koncentracija se povećava, a ispitivanje ponavlja kako bi se provjerila usklađenost sa zahtjevom da ostaje samo $\leq 5\%$ lažno usklađenih rezultata;

(c) metoda 3.: $CC\beta = \text{orijentaciona ciljna koncentracija} + k(\text{jednostrani, } 95\%) \times (\text{kombinovana}) \text{ standardna mjerna nesigurnost na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji ili iznad nje.}$

Za neodobrene ili zabranjene farmakološki aktivne supstance, zavisno od postupka validacije (i povezanim stepenima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, $n = \infty$), upotrebljava se k-faktor od 1,64.

Unutarlaboratorijska obnovljivosti istinitost pogodne su za definisanje (kombinovane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih faktora koji na to utiču.

2. Za odobrene supstance mora se osigurati najveća β -greška od 5% . $CC\beta$ se računa na sljedeći način:

(a) metoda 1.: postupkom kalibracione krive prema standardu ISO 11843-1:1997 (u tekstu: najmanja vrijednost neto varijable stanja koja se može detektovati). U tom slučaju koristi se reprezentativni slijepi uzorak koji je obogaćen na nivou dozvoljene granice i ispod nje, počevši od orijentacione ciljne koncentracije u jednakim razmacima. Analizirajte uzorke i identifikujte analite. Izračunajte standardnu devijaciju srednjeg udjela izmjenjenog na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji.

Sposobnost detekcije jednaka je odgovarajućoj koncentraciji na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji plus 1,64 puta standardna devijacija unutarlaboratorijske obnovljivosti za srednji izmjereni udio na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji.

(b) metoda 2.: ispitivanjem obogaćenog slijepog uzorka na nivoima koncentracije ispod dopuštene granice. Za svaki nivo koncentracije analizira se 20 obogaćenih slijepih uzoraka kako bi se osigurala pouzdana osnova za ovo određivanje. Sposobnost detekcije jednaka je nivou koncentracije kod koje ostaje samo $\leq 5\%$ lažno usklađenih rezultata;

(c) metoda 3.: $CC\beta = \text{orijentaciona ciljna koncentracija} + k(\text{jednostrani, } 95\%) \times (\text{kombinovana}) \text{ standardna mjerna nesigurnost na orijentacionoj ciljnoj koncentraciji ili iznad nje.}$

Za odobrene supstance, zavisno od postupka validacije (i povezanim stepenima slobode), može se opravdano primijeniti t-distribucija ili, ako je kao osnova uzeta Gaussova distribucija (jednostrana, $n = \infty$), upotrebljava se k-faktor od 1,64 (u kaskadnoj ili ubičajenoj upotrebi maksimalno dozvoljene količine rezidua).

Unutarlaboratorijska obnovljivost i istinitost pogodne su za definisanje (kombinovane) standardne mjerne nesigurnosti ako se određuju uzimanjem u obzir svih relevantnih faktora koji na to utiču.

2.8 Kalibracione krive

Kad se kalibracione krive primjenjuju u svrhu kvantifikacije:

(1) pri njihovoj izradi treba upotrijebiti najmanje pet nivoa (uključujući nulti nivo), po mogućnosti u jednakim razmacima;

(2) mora se opisati operativni opseg krive;

(3) mora se opisati matematička formula krive i primjenljivost podataka krivoj (koeficijent određivanja R^2);

(4) moraju se opisati opsezi prihvatljivosti parametara krive.

Za kalibracione krive na osnovu standardnog rastvora moraju se naznačiti prihvatljivi opsezi matriksa udruženog standardom ili matriksa obogaćenih standardom za parametre kalibracione krive, koji mogu varirati od serije do serije.

2.9 Apsolutno iskorištenje

Apsolutno iskorištenje metode nije potrebno određivati ako su dostupni unutrašnji standard, kalibracija matriksom obogaćenim standardom ili oboje. U svim drugim slučajevima apsolutno iskorištenje metode se određuje.

Kada su ispunjeni zahtjevi za istinitost, kako je utvrđeno u tabeli 1., može se koristiti fiksni faktor korekcije. U protivnom se koristi faktor iskorištenja dobijen za tu određenu seriju. Druga je mogućnost da se umjesto faktora korekcije iskorištenja koristi postupak standardnog dodatka¹⁸ ili interni standard.

Apsolutno iskorištenje izračunava se za najmanje šest reprezentativnih serija matriksa.

Alikvot slijepog matriksa obogaćuje se analitom prije ekstrakcije, a drugi alikvot slijepog matriksa obogaćuje se nakon pripreme uzorka na relevantni nivo koncentracije i određuje se koncentracija analita.

Iskorištenje se računa na sljedeći način:

$\text{Iskorištenje (analit)} = \frac{(\text{površina pika matriksa obogaćenog standardom})}{(\text{površina pika matriksa udruženog standardom})} \times 100$

2.10 Relativni efekti matriksa

Relativni efekat matriksa određuje se u svim slučajevima. To se može učiniti u okviru validacije ili u posebnim ispitivanjima. Relativni efekat matriksa mora se izračunati za barem 20 različitih slijepih serija (matriks/vrsta), u skladu sa područjem primjene metode, npr. različite vrste koje je potrebno obuhvatiti.

Slijepi matriks nakon ekstrakcije treba obogatiti analitom na referentnoj vrijednosti za preduzimanje mjera, maksimalno dozvoljenoj količini rezidua (MRL) ili maksimalno dozvoljenoj količini (ML) i treba ga analizirati zajedno s čistim rastvorom analita.

Relativni efekat matriksa ili faktor matriksa (engl. matrix factor, MF) računa se na sledeći način:

$\text{MF (standard)} = \frac{\text{površina pika MMS standarda}}{\text{površina pika standardnog rastvora}}$

$\text{MF (IS)} = \frac{\text{površina pika MMSIS-a}}{\text{površina pika IS-a rastvora}}$

$\text{MF (standard normalizovan za IS)} = \frac{\text{MF (standard)}}{\text{MF (IS)}}$

IS: interni standard

MMS: matriks udruženog standardom

Koeficijent varijacije ne smije biti veći od vrijednosti navedenih u tabeli 2. ovog Priloga za MF (standard normalizovan za IS).

¹⁸ Količina standardnog analita koja se dodaje može, na primjer, biti od dva do pet puta veća od procijenjene količine analita u uzorku. Cilj postupka je odrediti udio analita u uzorku uzimajući u obzir iskorištenje analitičkog postupka.

Dio 3

KONTROLA KVALITETA TOKOM RUTINSKE ANALIZE – KONTINUIRANA PROVJERA EFEKTIVNOSTI METODE

Moraju se ispuniti zahtjevi za osiguranje kvaliteta analitičkih rezultata iz tačke 7.7. standarda ISO/IEC 17025:2017¹⁹.

Tokom rutinske analize, analiza sertifikovanih referentnih materijala (CRM) poželjna je opcija dokazivanja efektivnosti metode. Budući da su sertifikovani referentni materijali koji sadrže relevantne analite na potrebnim nivoima koncentracije rijetko dostupni, kao druga mogućnost mogu se upotrijebiti i referentni materijali koji pružaju i opisuju referentne laboratorije EU-a ili laboratorije koje su stekle akreditaciju prema standardu ISO/IEC 17043:2023²⁰. Još je jedna mogućnost korišćenje internih referentnih materijala koji se redovno kontrolišu.

Kontinuirana provjera efektivnosti metode tokom rutinske analize treba se sprovesti u orijentacionom koraku i u potvrdnom koraku.

1. Za orijentacioni korak:

za svaku seriju obavljenih analiza istovremeno se analizira skup sledećih uzoraka za kontrolu kvaliteta:

(a) kontrolni uzorak za pogodnost sistema instrumenta, po mogućnosti specifičan za metodu;

(b) uzorci za kontrolu kvaliteta koji su obogaćeni na koncentraciju blizu orijentacione ciljne koncentracije, a po mogućnosti na CC β orijentacione metode za odobrene farmakološki aktivne supstance kao i zabranjene ili neodobrene supstance;

(c) usklađeni kontrolni uzorak (slijepi uzorci) i, kada je relevantno, slijepi uzorci sa reagensom.

2. Za potvrdni korak:

za svaku seriju obavljenih analiza istovremeno se analizira skup sledećih uzoraka za kontrolu kvaliteta:

(a) kontrolni uzorak za pogodnost sistema instrumenta, po mogućnosti specifičan za metodu;

(b) uzorci za kontrolu kvaliteta koji su obogaćeni na koncentraciju blizu maksimalno dozvoljene količine rezidua ili maksimalno dozvoljene količine za odobrene farmakološki aktivne supstance ili blizu referentne vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA) ili najnižeg kalibracionog nivoa za zabranjene ili neodobrene supstance (neusklađeni kontrolni uzorci);

(c) usklađeni kontrolni uzorak (slijepi uzorci) i, kada je relevantno, slijepi uzorci sa reagensom.

Preporučuje se sledeći redosled uzoraka za kontrolu kvaliteta: kontrolni uzorak za pogodnost sistema instrumenta, usklađeni kontrolni uzorak, uzorak ili uzorci koje treba potvrditi, ponovno usklađeni kontrolni uzorak i obogaćeni uzorak za kontrolu kvaliteta (neusklađeni kontrolni uzorci).

Za kvantitativne metode za svaku seriju službenih uzoraka analizira se i mjeri kalibraciona kriva prije ili poslije prethodno navedenih uzoraka.

Kada je to izvodljivo, ocjenjuje se istinitost (na osnovu obogaćenih uzoraka) svih ciljanih analita u neusklađenim kontrolnim uzorcima pomoću dijagrama kontrole kvaliteta u skladu sa tačkom 7.7. standarda ISO/IEC 17025:2017. Ako je za to potreban disproporcionalno velik broj određivanja istinitosti, broj analita može se smanjiti na broj reprezentativnih analita.

Dio 4

PROŠIRENJE VALIDOVANOG PODRUČJA PRIMJENE PRETHODNO VALIDOVANE METODE

Ponekad je potrebno proširiti područje primjene prethodno sveobuhvatno validovane metode. U tim slučajevima proširenje područja primjene treba postići na djelotvoran i analitički pouzdan način. To se može postići izvršavanjem validacije na smanjenom broju uzoraka (npr. na polovini uzoraka) u poređenju sa potpunom validacijom.

Ipak, vrsta i broj izmjena koje treba validovati u jednoj smanjenoj validacionoj šemi uvijek se moraju zasnivati na stručnom znanju i prethodnom iskustvu, npr. za promjenu tehnike detekcije u svakom bi slučaju bila potrebna potpuna validacija.

Uopšteno, da bi se osigurala stalna valjanost metode, njena efektivnost mora se kontinuirano pratiti i upoređivati sa prvobitno dobijenim parametrima validacije. Ta je kontinuirana kontrola efektivnosti metode po mogućnosti osmišljena tako da se podaci koji nedostaju za potpunu validaciju mogu prikupiti tokom vremena (npr. pomoću nekoliko podataka iz uzoraka za kontrolu kvaliteta u svakoj analitičkoj seriji).

4.1 Proširenje metoda koje se tiče opsega koncentracija

Zbog promjena maksimalno dozvoljenih količina rezidua (MRL), maksimalno dozvoljenih količina (ML) i referentnih vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA) može postati neophodno prilagoditi opseg koncentracije za koji se metoda validuje. U tom slučaju prihvatljiva je primjena smanjene validacione šeme.

Kalibracione krive za izmijenjeni opseg trebaju se pripremiti u skladu s validovanim postupkom. Trebaju se analizirati različite serije obogaćene na različite nivoe koncentracije (tačke 2.2.1., 2.2.2.). Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost/srednja preciznost trebale bi biti unutar prihvatljivog opsega u poređenju sa onima izvorno validovane metode. Prema potrebi treba ponovo izračunati CC β (orijentacione metode) i CC α (potvrdne metode).

4.2 Proširenje metoda koje se tiče dodatnih supstanci

Proširenje metoda na dodatna jedinjenja uopšteno je moguće samo za analite koji imaju sličnu strukturu i karakteristike kao oni koji su već uključeni u analitičku metodu. U tom slučaju prihvatljiva je primjena smanjene validacione šeme. Slično tome, nije dozvoljeno odstupanje od opisa metoda.

Kalibracione krive za dodatne supstance trebaju se pripremiti u skladu s validovanim postupkom. Trebaju se analizirati različite serije matriksa obogaćene na različite nivoe koncentracije (tačke 2.2.1., 2.2.2.). Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost/srednja preciznost trebale bi biti unutar poredljivog opsega u odnosu na druge analite u izvorno validovanoj metodi i u skladu sa zahtjevima utvrđenima u tački 1.2.2. Za nove analite mora se izračunati CC β (orijentacione metode) i CC α (potvrdne metode).

4.3 Proširenje metoda koje se tiče matriksa/vrste

Odluka o uključivanju novih matriksa ili vrsta u validovanu analitičku metodu uvijek se mora donijeti za svaki pojedinačni slučaj na osnovu znanja i iskustva koje je dosad stečeno u pogledu metode i preliminarnih ispitivanja kojima se ocjenjuju mogući efekti i interferencije matriksa. Uopšteno, to će biti moguće samo za matrikse koji imaju slična svojstva i za nekritične analite (stabilnost, sposobnost detekcije).

Kalibracione krive (standarda ili matriksa) trebaju se pripremiti u skladu s validovanim postupkom. Trebaju se analizirati različite serije matriksa obogaćene na različite nivoe koncentracije (tačke 2.2.1., 2.2.2.). Istinitost, ponovljivost i unutarlaboratorijska obnovljivost/srednja preciznost trebale bi biti unutar prihvatljivog opsega u odnosu na izvorno validovanu metodu i u skladu sa

¹⁹ ISO/IEC 17025: 2017. Opšti zahtjevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje (tačka 7.7.).

²⁰ ISO/IEC 17043:2023 Ocjenjivanje usklađenosti – Opšti zahtjevi za ispitivanje sposobnosti.

zahtjevima utvrđenima u tački 1.2.2. Zavisno od postupka validacije može biti potreban ponovni proračun vrijednosti CC β (orijentacione metode) ili CC α (potvrđne metode).

Ako rezultati nijesu unutar prihvatljivog opsega u poređenju sa vrijednostima za izvorni matriks, bit će potrebna dodatna potpuna validacija kako bi se odredili parametri efektivnosti za pojedini matriks/vrstu.

U slučajevima kada se maksimalno dozvoljene količine rezidua za određenu supstancu razlikuju za određene matrikse najvjerovatnije će biti teško prilagoditi područje primjene metode s obzirom na dodatni matriks/vrstu i koncentraciju jer u tom slučaju treba uzeti u obzir dvije izmjene. U takvim slučajevima preporučuje se potpuna validacija.

Dio 5

KRITERIJUMI EFEKTIVNOSTI I DRUGI ZAHTIJEVI ZA ANALITIČKE METODE IZ ČLANA 3, STAV 2

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 spriječava mogućnost slučajne kontaminacije ili gubitka analita.

Ispitivanje uzoraka metodama koje ispunjavaju zahtjeve ovog dijela vršiće se najkasnije do 1. decembra 2026. godine

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. homolog, analogi, metabolički proizvodi rezidua), a naročito važno je ispitati smetnje koje mogu uzrokovati sastojci matr ksa.

1.2. ORIJENTACIONE (engl. SCREENING) METODE

Orijentacione (screening) metode mogu se koristiti ako se može dokazati dokumentovano i sledljivo 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. POTVRĐNE 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	Supstanc e	
LC ili GC sa masenom spektrometrijom	Grupe A i B	Samo posl je 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 spetrometrijom	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 fluoroscencijom 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 duzina)	Grupa B	Samo ako su korišćena najmanje 2 različita hromatografska sistema ili drugi nezavisni metod

1.3.1. Opšti kriterijum i efektivnosti i zahtjevi

Potvrđene 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 obilježeni izotopom, koji su podesni 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 retenciona 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 ponavljane 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 Horowitz-eve jednačine daje neprihvatljivo visoke rezultate. Zbog toga CV za koncentracije nize 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 potvrđene 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 retencijom 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 %	$\pm 10\%$	$\pm 20\%$
>20 % do 50 %	$\pm 15\%$	$\pm 25\%$
>10 % do 20 %	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
<10 %	$\pm 50\%$	$\pm 50\%$

Tumačenje podataka dobijenih masenom spektrometrijom: relativni intenzitet dijagnostičkih jona i/ili jonskih parova prekursor/proizvoda moraju se identifikovati upoređivanjem spektara ili integrisanjem 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 bilježi u jednostrukoj masenoj spektrometriji, najmanje četiri jona moraju biti prisutni 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 materijalnim 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 cilju povećanja broja identifikacionih tačaka mogu se koristiti različiti analiti samo ako derivati nastaju različitim hemijskim reakcijama.

(4) 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.

(5) 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 pika, ili od

(b) relativne apsorpcije od 12,5 % od apsorpcije najintenzivnijeg pika u području 4000-500 cm^{-1}

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

Napomena:

Iako bi se sa teoretske tačke gledišta mogla dati prednost odgovarajućim pikovima određenim prema tački (a), u praksi je lakše odrediti pikove prema tački (b).

Određuje se broj pikova u infracrvenom spektru analita čije frekvencije odgovaraju odgovarajućem pik 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 pikova 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 pikova 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 uvijek 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 absorbance 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-kromatografija su obavezni. Rf vrijednosti analita moraju se podudarati sa Rf vrijednostima standarda uz toleranciju od $\pm 5\%$.

Izgled analita ne smije se razlikovati od izgleda standarda.

Kod mrlja iste boje, središte najbliže mrlje mora biti odvojeno od središta mrlje analita za najmanje polovinu zbira 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 čije je retenciono vrijeme 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

Potvrдне 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).

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

Tabela 7

Potvrдне 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 peć)	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 potvrдне 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 svode na najmanju mjeru, upotrebom dekontaminiranog teflonskog posuđa dobrog kvaliteta, a za primjenu drugih postupaka vlažne 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. Istinost 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, stim što treba voditi računa da za razliku od analita, dodata količina elementa nije hemijski vezana u ispitivanom matriksu i da zbog toga tako dobijeni rezultati imaju manju vrijednost 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 ponavljane 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 pikova 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 (dv je 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 interference 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, vrijeme) i modifikacija matriksa.

Rad pod izotermnim uslovima atomizacije (npr. poprečna zagrijana grafitna kiveta sa ugrađenom Lvov-om platformom) smanjuje uticaj matriksa 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, germanijum, olovo, antimon, selen, kalaj i telur mogu biti vrlo stabilna i mogu zahtijevati oksidacionu razgradnju kako bi se dobile tačne vrijednosti 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 NaBH_4 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 obije specijacije arsena.

Zbog sporijeg nastajanja As(V) hidrida, kalibracija se vrši integracijom površina ispod pikova 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 razradnje 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 uređaja 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 linearosti 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 emisione 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 analit.

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/i 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.

Prije određivanja 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 razaranje (npr. azotna kiselina).

Da bi se elementi odredili, treba da se otklone 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

		CC β Sposobnost dokazivanja	CC α 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. specifičnih 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
Zajednicke karakteristike efektivnosti (2.1.1)		Konvencionalni validacioni pristup(2.1.2) Unutrašnji validacioni pristup (2.1.3)
Specifičnost	Iskorišćenje	Iskorišćenje
Istinitost	Ponovljivost	Ponovljivost
Robusnost: manje promjene	Obnovljivost unutar laboratorije	Obnovljivost unutar laboratorije
Stabilnost	Obnovljivost	Obnovljivost
	CC α Granična koncentracija	CC α Granična koncentracija
	CC β Sposobnost dokazivanja	CC β 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.

2.1.2. 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, pikovi, 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.

2.1.2.1. 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 vrijednošću (mjerenom kao koncentracija) i množenjem sa 100, da bi se rezultat izrazio u procentu.

Istinitost (%) = srednja vrijednost dokazane koncentracije korigovana iskorišćenjem $\times 100$ / potvrđena vrijednost

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

2.1.2.2. Primjenjivost/robusnost (manje promjene)

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

Prije 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,
- otkrije 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 vrijednosti za sedam različitih faktora koji bi, u slučaju da se njihove nominalne vrijednosti neznatno promijene, mogli uticati na rezultate, a njihove alternativne vrijednosti 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

2.1.2.3. Stabilnost

Nedovoljna stabilnost analita ili sastojaka matriksa 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 stabilnost analita u rastvoru

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

- 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 alikvotu koju treba izračunati uzimajući kao 100%-tnu vrijednost rastvora koja je svježe pripremljen u trenutku analize.

Preostali analit (%) = C₁ x 100/ C_{svježa}

C₁ = trenutna koncentracija

C_{svježa} = koncentracija svježeg rastvora

Stabilnost analita u matriksu određuje se :

- upotrebom prirodno kontaminiranih uzoraka ukoliko je moguće, a ako prirodno kontaminirani materijal nije na raspolaganju, treba upotrijebiti matriks obogaćen sa analitom,
- ako je na raspolaganju prirodno kontaminiran materijal, količina analita u materijalu određuje se dok je materijal svjež, a ostali alikvoti materijala mogu se uzeti nakon jedne, dvije, četiri i dvadeset sedmica i treba im odrediti količinu analita, dok tkivo treba skladištiti na temperaturi od najmanje minus 20°C ili, po potrebi, nižoj,
- ako prirodno kontaminirani materijal nije na raspolaganju, uzeti materijal koji ne sadrži analit i homogenizovati ga, podijeliti u pet alikvota i svaki alikvot obogatiti sa analitom koji bi trebalo da bude pripremljen u maloj količini vodenog rastvora, od čega se odmah

analizira jedan alikvot, a ostali se skladište na temperaturi od najmanje minus 20°C ili, po potrebi, nižoj i analiziraju poslije jedne, dvije, četiri i dvadeset sedmica.

2.1.2.4. Kalibraciona kriva

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

- upotrijebiti najmanje pet nivoa (uključujući nulti),
- opisati operativni raspon krive,
- opisati matematičku formulu krive i primjerenost podataka krive,
- opisati raspone prihvatljivosti parametara krive.

Kada je potrebna serijska kalibracija bazirana na standardnom rastvoru, treba naznačiti prihvatljive raspone parametara kalibracione krive, koji mogu varirati od serije do serije.

2.1.3. Uobičajeni postupak vrednovanja (validacije)

Izračunavanje parametara u skladu sa uobičajenim metodama zahtjeva izvođenje nekoliko pojedinačnih ispitivanja. Mora se odrediti svaka karakteristika efektivnosti za svaku veću promjenu (robustnost). Metodama za ispitivanje više analita moguće je istovremeno analizirati nekoliko analita, uz uslov da su prethodno isključene interference koje bi mogle biti značajne. Na isti način se može odrediti nekoliko karakteristika efektivnosti. U cilju smanjenja posla, preporučljivo je kombinovati ispitivanja u što je moguće većoj mjeri (npr. ponovljivost i unutarlaboratorijsku obnovljivost sa specifičnošću i analizom negativnog slijepog uzorka kako bi se odredila CC_α i provjerila specifičnost).

2.1.3.1. Iskorišćenje (recovery)

Ako ne postoji sertifikovani referentni materijal, iskorišćenje se određuje ispitivanjem, upotrebom obogaćenog matriksa, i to:

- odabirom 18 alikvota kontrolnog uzorka koji se dijele u tri grupe po šest alikvota i svakoj grupi se dodaje analit u količini koja je 1, 1,5 i 2 puta veća od minimalno potrebne granice efektivnosti (MPRL) odnosno koja je 0,5, 1 i 1,5 puta veća od dozvoljene količine,
 - analizom uzoraka i izračunavanjem koncentracije u svakom uzorku,
 - izračunavanjem iskorišćenja za svaki uzorak prema formuli: % iskorišćenja = $100 \times \frac{\text{izmjereni sadržaj/nivo obogaćenja}}{\text{dodata standarda}}$,
 - izračunavanjem srednjeg iskorišćenja i CV iz šest rezultata u svakoj grupi,
- Konvencionalna metoda iz tačke 2.5 ovog priloga za određivanje iskorišćenja je varijanta metode standardnog dodatka ako:
- se uzorak smatra kontrolnim uzorkom, umjesto uzorkom za analizu,
 - se smatra da su konačni prinos²¹ i iskorišćenje²² slični za oba poduzorka,
 - uzorci za ispitivanje imaju iste mase, a ekstrakti poduzoraka za analizu iste zapremine,
 - količina kalibracionog standarda koja je dodata drugom (obogaćenom) poduzorku za analizu iznosi xADD. ($xADD = pA \cdot VA$),
 - je x1 izmjerena vrjednost za slijepi uzorak, a x2 izmjerena vrjednost drugog (obogaćenog) poduzorka, tada je iskorišćenje % $= 100 \frac{(x2 - x1)}{xADD}$.

Ako neki od uslova iz stava 2 ove podtačke nije (ili se pretpostavlja da nije) ispunjen, tada se primjenjuje cijeli postupak određivanja iskorišćenja u skladu sa tačkom 2.5. ovog priloga.

2.1.3.2. Ponovljivost

Ponovljivost se određuje;

- pripremanjem određenog broja uzoraka identičnih matriksa, kojima je dodat analit tako da se dobiju koncentracije koje iznose 1, 1,5 i 2 puta veće od minimalno potrebne granice efektivnosti (MPRL) odnosno 0,5, 1 i 1,5 puta veće od dozvoljene količine;
- za svaki nivo analita, analizom sa najmanje šest replika;
- analizom uzoraka;
- izračunavanjem koncentracije u svakom uzorku;
- izračunavanjem srednje koncentracije, standardne devijacije i koeficijenta varijacije (%) obogaćenih uzoraka;
- ponavljanjem postupaka iz al. 1 do 5 ove podtačke još najmanje dva puta;
- izračunavanjem ukupne srednje koncentracije i koeficijenta varijacije za obogaćene uzorke.

2.1.3.3. Unutarlaboratorijska obnovljivost (reproducibilnost)

Unutarlaboratorijska obnovljivost određuje se:

- pripremanjem određenog broja uzoraka za analizu (identičnih ili različitih matriksa), kojima je dodat analit ili više analita, tako da se dobiju koncentracije 1, 1,5 i 2 puta veće od 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.

2.1.3.4. Obnovljivost (reproducibilnost)

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

²¹ Prinos: ona masena frakcija analita koja se nalazi u uzorku, koja je prisutna i u krajnjem ekstraktu

²² Iskorišćenje: 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 ce se koristiti samo termin iskoriscenje.

2.1.3.5. 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 vrijednost 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 matriksu, radi izračunavanja odnosa signal-šum u vremenskom intervalu u kojemu se očekuje analit, pri čemu se za CC α može uzeti trostruka vrijednost 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 matriksu, 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 ($\alpha = 5\%$).

2.1.3.6. 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 vrijednost 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 β uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti na nivou srednje vrijednosti CC β ($\beta = 5\%$);

- analizom najmanje 20 slijepih uzoraka po matriksu, obogaćenih sa jednim ili više analita na nivou granične koncentracije (količine) analita CC β , a sposobnost dokazivanja jednaka je vrijednosti CC β uvećane za 1,64 standardne devijacije 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 β , stim 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 izmjerenog na nivou granične koncentracije (količine) analita CC β , a sposobnost dokazivanja jednaka je odgovarajućoj graničnoj koncentraciji uvećanoj za 1,64 standardne devijacije unutarlaboratorijske obnovljivosti ($\beta = 5\%$), ili

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

2.1.3.7. Robusnost (značajne promjene)

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

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

2.1.4. Vrednovanje u skladu sa alternativnim modelima

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

Ukoliko se primjenjuje model unutrašnjeg vrednovanja, karakteristike efektivnosti se utvrđuju na način koji omogućava vrednovanje značajnih promjena unutar istog postupka vrednovanja, što zahtijeva izradu eksperimentalnog plana ispitivanja.

2.1.4.1. Eksperimentalni plan

Eksperimentalnim 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 cijelom 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 iznačaja 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:

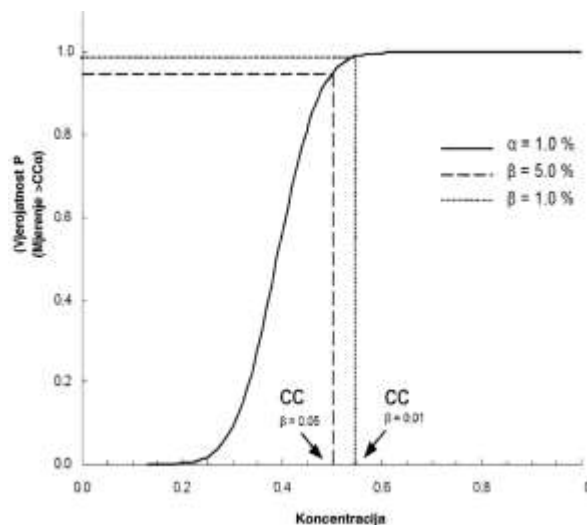
- iskorišćenje;
- ponovljivost po nivou koncentracije (Sir),
- unutarlaboratorijsku obnovu živost po nivou koncentracije (Sir),
- graničnu koncentraciju (količina) analita (CC α),
- sposobnost dokazivanja (CC β),
- krivu efikasnosti (procenat β -greške u odnosu na koncentraciju (u skladu sa podtačkom 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 (Smat),
- devijacije uzrokovane procesom analize (Srun),
- 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.

2.1.4.2.

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%.

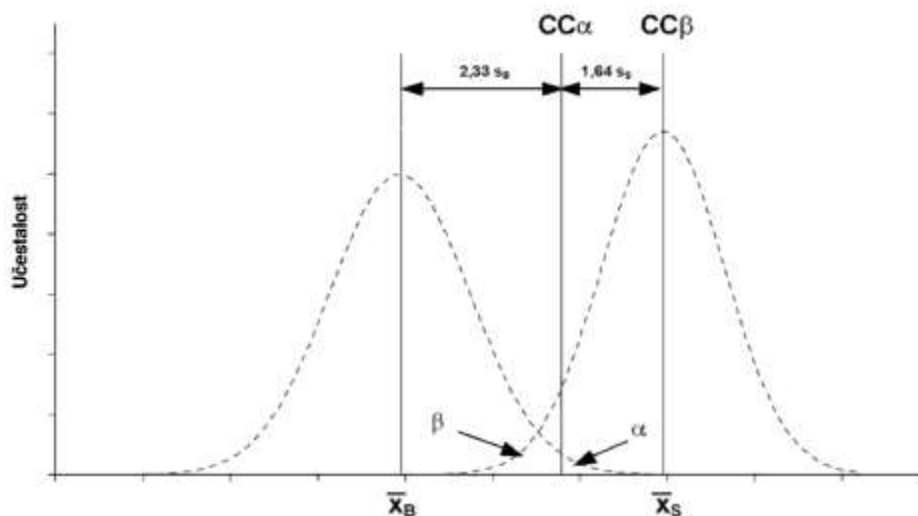
2.1.4.3. Obnovljivost

Utvrdjivanje 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

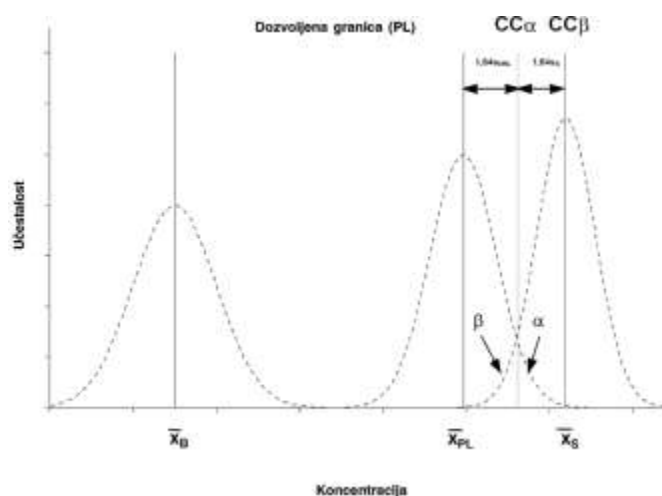
Grafički prikaz različitih analitičkih granica za supstance



Koncentracija

Slika 2 Supstance za koje nije utvrđena dozvoljena granica

$\bar{x}$	S	Srednja vrijednost koncentracije kontaminiranog uzorka
S_B		Standardna devijacija uzorka (određenog pod uslovima unutarlaboratorijske obnovljivosti)
S_S		Standardna devijacija kontaminiranog uzorka (određenog pod uslovima unutarlaboratorijske obnovljivosti)
α		Procenat lažno neusaglašenih rezultata
β		Procenat lažno usaglašenih rezultata
$CC\alpha$		Koncentracija sa datom α -greškom i 50% β -greškom
$CC\beta$		Koncentracija sa veoma malom α -greškom i β -greškom



Slika 3 Supstance za koje nije utvrđena dozvoljena granica

$\bar{X}$	B	Srednja vrijednost koncentracije slijepog uzorka
$\bar{X}$	PL	Srednja vrijednost koncentracije uzorka koji sadrži analit na dozvoljenom nivou
$\bar{X}$	S	Srednja vrijednost koncentracije kontaminiranog uzorka
	SPL	Standardna devijacija uzorka koji sadrži analit na dozvoljenom nivou (određenog pod uslovima unutar-laboratorijske obnovljivosti)
	SS	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

Upoređivanje prosjeka (A)

Upoređuju se prosjeci velikih od AA do AG sa prosjecima pripadajućih malih slova od 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.

$A_i = \sum(B_i)/4$
 $AB = \sum(B_i)/4$
 $AC = \sum(C_i)/4$
 $AD = \sum(D_i)/4$
 $AE = \sum(E_i)/4$
 $AF = \sum(F_i)/4$
 $A = \sum(G_i)/4$
 $Aa = \sum(a_i)/4$
 $Ab = \sum(b_i)/4$
 $Ac = \sum(c_i)/4$
 $Ad = \sum(d_i)/4$
 $Ae = \sum(e_i)/4$
 $Af = \sum(f_i)/4$
 $Ag = \sum(g_i)/4$

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

Standardna devijacija razlika D_i (SD_i):

$$SD_i = \sqrt{2 \times \sum (D_i^2) / 7}$$

Ako je vrijednost SD_i 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 $\square A$.

Postupcima ekstrakcije i prečišćavanja koji su propisani metodom, dobijena su dva ekstrakta poduzoraka, zapremine V_1 odnosno V_2 . Ukoliko je iskorišćenje analita rc , oba ekstrakta se ispituju metodom mjerenja osjetljivosti b i daju analitički odgovor x_1 odnosno x_2 .

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

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

Ovom metodom se može odrediti iskorišćenje rc , 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:

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

Može se izračunati osjetljivost b , kao:

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

AAS (engl. Atomic absorption spectrometry) atomska apsorpciona spektrometrija AES (engl. Atomic emission spectrometry) atomska emisijona 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) potvrdni referentni materijal CV (engl. coefficient of variation) koeficijent varijacije

2D TLC (engl. two dimensional thin layer chromatography) dvodimenzionalna tankoslojna hromatografija DAD (engl. diode array detection) dokazivanje nizom dioda

DPASV (engl. differential pulse anodic stripping voltametry) diferencijalna pulsna voltametrija s anodnim otapanjem ECD (engl. electron capture detection) 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

HP TLC (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 emisijona 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 (engl. mass spectrometry) masena spektrometrija

n eksponent – broj generacija jona izvedenih iz prekursora m/z (engl. mass/charge ratio) omjer masa/naboja

R_f (engl. relative migration to the solvent front) relativna migracija prema frontu rastvarača

(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

Referentne vrijednosti za preduzimanje mjera (RPA)

Supstanca i/ili metabolit	RPA (µg/kg)	Ostale odredbe
Hloramfenikol	0,15	
Malahit zeleno	0,5	0,5 µg/kg suma malahit zelenog i leukomalahit zelenog
Nitrofurani i njihovi metaboliti:	0,5 ²³²⁴	0,5 µg/kg za svaki od metabolita furazolidona (AOZ ili 3-amino-2-oksazolidinon), furaltadona (AMAZ ili 3-amino-5-metilmorfolino-2-oksazolidinon), nitrofurantoina (AHD ili 1-aminohidantoin), nitrofurazona (SEM ili semikarbazid) ili nifursola (DNSH ili hidrazid 3,5-dinitrosalicilne kiseline).

”

²³ Budući da se SEM prirodno pojavljuje u slatkovodnim rakovima u nivoima iznad RPA, samo je prisutnost AOZ-a, AMOZ-a, AHD-a i DNSH-a u količinama koje su iznad RPA jasan pokazatelj nezakonite upotrebe nitrofurana i njegovih metabolita. Referentna vrijednost za preduzimanje mjera od 0,5 µg/kg za SEM kod slatkovodnih rakova primjenjuje se samo ako je nezakonita upotreba nitrofurazona ili SEM-a kod slatkovodnih rakova već utvrđena, odnosno ako je otkriven barem jedan od drugih metabolita nitrofurana.

²⁴ Zbog pojave SEM-a iznad referentne vrijednosti za preduzimanje mjera kao posljedica prerade u želatinu, kolagenu, kolagen-hidrolizatu, hidroliziranim proizvodima od hrskavice, proizvodima od krvi osušenim raspršivanjem, koncentratima bjelanjčevina iz surutke i mlijeka, kazeinatima i mlijeku u prahu (osim početne i prelazne hrane za odojčad), samo nivoi AOZ-a, AMOZ-a, AHD-a i DNSH-a iznad referentne vrijednosti za preduzimanje mjera jasno upućuju na nezakonitu upotrebu nitrofurana i njihovih metabolita. Referentna vrijednost za preduzimanje mjera od 0,5 µg/kg za SEM u želatinu, kolagenu, kolagen-hidrolizatu, hidroliziranim proizvodima od hrskavice, proizvodima od krvi osušenim raspršivanjem, koncentratima bjelanjčevina iz surutke i mlijeka, kazeinatima i mlijeku u prahu (osim početne i prelazne hrane za odojčad) primjenjuje se samo ako je utvrđena nezakonita upotreba nitrofurazona ili SEM-a, odnosno ako je otkriven barem jedan od drugih metabolita nitrofurana.