

ROZPORZĄDZENIE WYKONAWCZE KOMISJI (UE) 2021/808**z dnia 22 marca 2021 r.****w sprawie wydajności metod analitycznych w odniesieniu do pozostałości substancji farmakologicznie czynnych stosowanych u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, oraz interpretacji wyników, jak również w sprawie metod stosowanych do pobierania próbek oraz uchylające decyzje 2002/657/WE i 98/179/WE****(Tekst mający znaczenie dla EOG)**

KOMISJA EUROPEJSKA,

uwzględniając Traktat o funkcjonowaniu Unii Europejskiej,

uwzględniając rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15 marca 2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, zmieniające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 999/2001, (WE) nr 396/2005, (WE) nr 1069/2009, (WE) nr 1107/2009, (UE) nr 1151/2012, (UE) nr 652/2014, (UE) 2016/429 i (UE) 2016/2031, rozporządzenia Rady (WE) nr 1/2005 i (WE) nr 1099/2009 oraz dyrektywy Rady 98/58/WE, 1999/74/WE, 2007/43/WE, 2008/119/WE i 2008/120/WE, oraz uchylające rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 854/2004 i (WE) nr 882/2004, dyrektywy Rady 89/608/EWG, 89/662/EWG, 90/425/EWG, 91/496/EWG, 96/23/WE, 96/93/WE i 97/78/WE oraz decyzję Rady 92/438/EWG (rozporządzenie w sprawie kontroli urzędowych) ⁽¹⁾, w szczególności jego art. 34 ust. 6,

a także mając na uwadze, co następuje:

- (1) W rozporządzeniu (UE) 2017/625 ustanowiono przepisy dotyczące przeprowadzania kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przez właściwe organy państw członkowskich w celu sprawdzenia zgodności z przepisami Unii, między innymi w zakresie bezpieczeństwa żywności, na wszystkich etapach produkcji, przetwarzania i dystrybucji. Przewiduje się w nim przepisy szczególne dotyczące kontroli urzędowych w odniesieniu do substancji, których stosowanie może skutkować pozostałościami w żywności i paszy, oraz ustanawia ogólne wymogi dotyczące metod stosowanych do pobierania próbek, analiz i badań laboratoryjnych podczas kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych.
- (2) W decyzji Komisji 2002/657/WE ⁽²⁾ ustanowiono wymogi dotyczące wydajności metod analitycznych i interpretacji wyników analiz niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego, a w decyzji Komisji 98/179/WE ⁽³⁾ ustanowiono szczegółowe zasady pobierania próbek urzędowych do celów monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego. Obie decyzje zostały przyjęte na podstawie dyrektywy Rady 96/23/WE ⁽⁴⁾, uchylonej rozporządzeniem (UE) 2017/625. W świetle nowych osiągnięć naukowych przepisy te należy zaktualizować i włączyć do ram kontroli urzędowych określonych w rozporządzeniu (UE) 2017/625.
- (3) Zgodnie z art. 1 akapit drugi decyzji 2002/657/WE decyzja ta nie ma zastosowania do substancji, dla których w innych przepisach unijnych ustanowiono bardziej szczegółowe zasady. Do substancji tych należą mikotoksyny w środkach spożywczych, dioksyny i dioksynopodobne polichlorowane bifenyle (PCB) w środkach spożywczych oraz ołów, kadm, rtęć i benzo[a]piren w środkach spożywczych. Mikotoksyny w środkach spożywczych muszą spełniać wymagania określone w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 401/2006 ⁽⁵⁾ ustanawiającym metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych. W odniesieniu do diok-

⁽¹⁾ Dz.U. L 95 z 7.4.2017, s. 1.

⁽²⁾ Decyzja Komisji 2002/657/WE z dnia 14 sierpnia 2002 r. wykonująca dyrektywę Rady 96/23/WE dotyczącą wyników metod analitycznych i ich interpretacji (Dz.U. L 221 z 17.8.2002, s. 8).

⁽³⁾ Decyzja Komisji 98/179/WE z dnia 23 lutego 1998 r. ustanawiająca szczegółowe zasady pobierania próbek do celów monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego (Dz.U. L 65 z 5.3.1998, s. 31).

⁽⁴⁾ Dyrektywa Rady 96/23/WE z dnia 29 kwietnia 1996 r. w sprawie środków monitorowania niektórych substancji i ich pozostałości u żywych zwierząt i w produktach pochodzenia zwierzęcego oraz uchylająca dyrektywy 85/358/EWG i 86/469/EWG oraz decyzje 89/187/EWG i 91/664/EWG (Dz.U. L 125 z 23.5.1996, s. 10).

⁽⁵⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 401/2006 z dnia 23 lutego 2006 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów urzędowej kontroli poziomów mikotoksyn w środkach spożywczych (Dz.U. L 70 z 9.3.2006, s. 12).

syn i dioksynopodobnych PCB zastosowanie ma rozporządzenie Komisji (UE) 2017/644 ⁽⁶⁾ ustanawiające metody pobierania i analizy próbek do celów kontroli poziomów dioksyn, dioksynopodobnych PCB i niedioksynopodobnych PCB. Przepisy dotyczące pobierania próbek i analizy na potrzeby kontroli urzędowych pod kątem ołowiu, kadmu, rtęci i benzo[a]pirenu w środkach spożywczych określono w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 333/2007 ⁽⁷⁾.

- (4) Ze względu na jasność i pewność prawa należy połączyć przepisy mające zastosowanie do pobierania próbek i analizy substancji farmakologicznie czynnych w jeden akt prawny, tak jak w przypadku mikotoksyn, dioksyn, dioksynopodobnych PCB, ołowiu, kadmu, rtęci i benzo[a]pirenu w środkach spożywczych.
- (5) Należy zatem uchylić decyzje 98/179/WE i 2002/657/WE i zastąpić je niniejszym rozporządzeniem.
- (6) Zgodnie z rozporządzeniem (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady ⁽⁸⁾ kokcydiostatyki i histomonostatyki mogą być stosowane jako dodatki paszowe, w związku z czym do analiz zawartości tych substancji w paszach zastosowanie ma rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 ⁽⁹⁾ ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz. Niniejsze rozporządzenie powinno mieć jednak zastosowanie w przypadku analizy pasz w ramach działań następczych podczas dochodzeń w sprawie źródła próbki niezgodnej z przepisami w odniesieniu do przypadków podejrzenia lub stwierdzenia niezgodności z przepisami Unii dotyczącymi stosowania lub pozostałości substancji farmakologicznie czynnych dopuszczonych w weterynaryjnych produktach leczniczych lub jako dodatki paszowe bądź z przepisami Unii dotyczącymi stosowania lub pozostałości zakazanych lub niedopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych
- (7) W celu zapewnienia ciągłości przeprowadzania kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych dotyczących pozostałości substancji farmakologicznie czynnych oraz w celu uniknięcia konieczności ponownej walidacji wszystkich metod jednocześnie, metody, które zostały zwalidowane przed datą wejścia w życie niniejszego rozporządzenia, mogą pozostać w użyciu przez ograniczony okres, z zastrzeżeniem wymogów pkt 2 i 3 załącznika I do decyzji 2002/657/WE. Należy zatem zapewnić państwom członkowskim wystarczająco dużo czasu na zastosowanie wymogów określonych w niniejszym rozporządzeniu do wszystkich metod analitycznych.
- (8) Środki przewidziane w niniejszym rozporządzeniu są zgodne z opinią Stałego Komitetu ds. Roślin, Zwierząt, Żywności i Pasz,

PRZYJMUJE NINIEJSZE ROZPORZĄDZENIE:

Artykuł 1

Przedmiot i zakres stosowania

W niniejszym rozporządzeniu ustanawia się przepisy dotyczące metod analizy stosowanych do pobierania próbek i przeprowadzania analiz laboratoryjnych w odniesieniu do pozostałości substancji farmakologicznie czynnych u żywych zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, w ich częściach ciała i płynach ustrojowych, odchodach, tkankach, w produktach pochodzenia zwierzęcego, produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego, paszy i wodzie. Określa się w nim również zasady interpretacji wyników analitycznych tych analiz laboratoryjnych.

Niniejsze rozporządzenie stosuje się do kontroli urzędowych mających na celu sprawdzenie zgodności z wymogami dotyczącymi obecności pozostałości substancji farmakologicznie czynnych.

⁽⁶⁾ Rozporządzenie Komisji (UE) 2017/644 z dnia 5 kwietnia 2017 r. ustanawiające metody pobierania i analizy próbek do celów kontroli poziomów dioksyn, dioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli i niedioksynopodobnych polichlorowanych bifenyli w niektórych środkach spożywczych oraz uchylające rozporządzenie (UE) nr 589/2014 (Dz.U. L 92 z 6.4.2017, s. 9).

⁽⁷⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 333/2007 z dnia 28 marca 2007 r. ustanawiające metody pobierania próbek i analizy do celów kontroli poziomów pierwiastków śladowych i zanieczyszczeń procesowych w środkach spożywczych (Dz.U. L 88 z 29.3.2007, s. 29).

⁽⁸⁾ Rozporządzenie (WE) nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt (Dz.U. L 268 z 18.10.2003, s. 29).

⁽⁹⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 152/2009 z dnia 27 stycznia 2009 r. ustanawiające metody pobierania próbek i dokonywania analiz do celów urzędowej kontroli pasz (Dz.U. L 54 z 26.2.2009, s. 1).

Artykuł 2

Definicje

Do celów niniejszego rozporządzenia stosuje się definicje zawarte w art. 2 rozporządzenia delegowanego Komisji (UE) 2019/2090⁽¹⁰⁾, w rozporządzeniu Komisji (UE) 2019/1871⁽¹¹⁾, w art. 2 rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 470/2009⁽¹²⁾ oraz w rozporządzeniu Rady (EWG) nr 315/93⁽¹³⁾.

Stosuje się również następujące definicje:

- 1) „odzysk bezwzględny” oznacza uzysk w końcowym etapie procesu analitycznego dla analitu podzielony przez ilość analitu w próbce pierwotnej, wyrażony w procentach;
- 2) „dokładność” oznacza stopień zgodności między wynikiem badania a przyjętą prawdziwą wartością odniesienia, ustaloną poprzez oszacowanie poprawności i precyzji⁽¹⁴⁾;
- 3) „błąd alfa (α)” oznacza prawdopodobieństwo, że badana próbka jest zgodna, nawet jeżeli uzyskano niezgodny wynik pomiaru;
- 4) „analit” oznacza element systemu, który ma być analizowany;
- 5) „substancja dopuszczona” oznacza substancję farmakologicznie czynną dopuszczoną do stosowania u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, zgodnie z dyrektywą 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady⁽¹⁵⁾;
- 6) „błąd beta (β)” oznacza prawdopodobieństwo, że badana próbka jest rzeczywiście niezgodna, nawet jeżeli uzyskano zgodny wynik pomiaru;
- 7) „błąd systematyczny” oznacza różnicę między szacowaną wartością wyniku badania a przyjętą wartością odniesienia;
- 8) „wzorzec kalibracji” oznacza identyfikowalne odniesienie dla pomiarów, które przedstawia ilość danej substancji, ukazując powiązanie jej wartości z podstawą odniesienia;
- 9) „certyfikowany materiał odniesienia” (CRM) oznacza materiał odniesienia, któremu towarzyszy dokumentacja wydana przez organ delegowany i który zapewnia co najmniej jedną wartość określonych właściwości wraz z powiązaną niepewnością i identyfikowalnością, przy użyciu właściwych procedur⁽¹⁶⁾;
- 10) „chromatografia równoległa” oznacza technikę, w której nieznaną substancję jest nanoszona na nośnik chromatograficzny wraz z co najmniej jednym znanym związkiem, przy założeniu, że względne zachowanie substancji znanej i nieznannej pomoże w identyfikacji substancji nieznannej;
- 11) „porównanie międzylaboratoryjne” oznacza analizę tej samej próbki (tych samych próbek) przy użyciu tej samej metody w celu określenia charakterystyki wydajności metody w różnych laboratoriach, przy czym badanie pozwala na obliczenie przypadkowego błędu pomiaru i laboratoryjnego błędu systematycznego w odniesieniu do zastosowanej metody;

⁽¹⁰⁾ Rozporządzenie delegowane Komisji (UE) 2019/2090 z dnia 19 czerwca 2019 r. uzupełniające rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 w odniesieniu do przypadków podejrzenia lub stwierdzenia niezgodności z przepisami Unii dotyczącymi stosowania lub pozostałości substancji farmakologicznie czynnych dopuszczonych w weterynaryjnych produktach leczniczych lub jako dodatki paszowe bądź z przepisami Unii dotyczącymi stosowania lub pozostałości zakazanych lub niedopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych (Dz.U. L 317 z 9.12.2019, s. 28).

⁽¹¹⁾ Rozporządzenie Komisji (UE) 2019/1871 z dnia 7 listopada 2019 r. w sprawie punktów odniesienia dla działań kontrolnych, dotyczących niedozwolonych substancji farmakologicznie czynnych obecnych w żywności pochodzenia zwierzęcego oraz uchylające decyzję 2005/34/WE (Dz.U. L 289 z 8.11.2019, s. 41).

⁽¹²⁾ Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 470/2009 z dnia 6 maja 2009 r. ustanawiające wspólnotowe procedury określania maksymalnych limitów pozostałości substancji farmakologicznie czynnych w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 2377/90 oraz zmieniające dyrektywę 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady i rozporządzenie (WE) nr 726/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady (Dz.U. L 152 z 16.6.2009, s. 11).

⁽¹³⁾ Rozporządzenie Rady (EWG) nr 315/93 z dnia 8 lutego 1993 r. ustanawiające procedury Wspólnoty w odniesieniu do substancji skażających w żywności (Dz.U. L 37 z 13.2.1993, s. 1).

⁽¹⁴⁾ ISO 3534-1: 2006 Statystyka – Terminologia i symbole – część 1: Ogólne terminy z zakresu rachunku prawdopodobieństwa i statystyki (rozdział 1).

⁽¹⁵⁾ Dyrektywa 2001/82/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 6 listopada 2001 r. w sprawie wspólnotowego kodeksu odnoszącego się do weterynaryjnych produktów leczniczych (Dz.U. L 311 z 28.11.2001, s. 1).

⁽¹⁶⁾ JCGM 200:2008, Międzynarodowy słownik metrologii – Pojęcia podstawowe i ogólne oraz terminy z nimi związane (VIM), wydanie trzecie 2008: <https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm> (rozdział 5 Normy pomiarowe (etalony)).

- 12) „metoda potwierdzająca” oznacza metodę, która daje pełną lub uzupełniającą informację umożliwiającą jednoznaczną identyfikację substancji i w razie potrzeby jej określenie ilościowe z wykorzystaniem jednego z poniższych sposobów:
- pod względem maksymalnego limitu pozostałości lub maksymalnej zawartości substancji dopuszczonych;
 - pod względem punktów odniesienia dla działań kontrolnych w przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych, dla których ustanowiono punkt odniesienia dla działań kontrolnych;
 - pod względem stężenia na najniższym racjonalnie osiągalnym poziomie w przypadku substancji zakazanej lub niedopuszczonej, dla której nie ustanowiono punktu odniesienia dla działań kontrolnych;
- 13) „współczynnik rozszerzenia (k)” oznacza liczbę, która wyraża pożądany poziom ufności i która jest związana z niepewnością rozszerzoną pomiaru;
- 14) „decyzyjna wartość graniczna na potrzeby potwierdzenia (CC α)” oznacza wartość graniczną, przy której i powyżej której można stwierdzić z prawdopodobieństwem błędu α , że próbka jest niezgodna, a wartość $1 - \alpha$ oznacza statystyczną pewność w ujęciu procentowym, że dopuszczalna wartość graniczna została przekroczona;
- 15) „zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych (CC β)” oznacza najmniejszą zawartość analitu, jaką można wykryć lub określić ilościowo w próbce z prawdopodobieństwem błędu β :
- w przypadku zakazanych lub niedopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych CC β jest najniższym stężeniem, przy którym metoda jest w stanie wykryć lub określić ilościowo, z pewnością statystyczną $1 - \beta$, próbki zawierające pozostałości substancji zakazanych lub niedopuszczonych;
 - w przypadku substancji dopuszczonych CC β jest stężeniem, przy którym metoda jest w stanie wykryć stężenia poniżej dopuszczalnej wartości granicznej z pewnością statystyczną $1 - \beta$;
- 16) „próbka wzbogacona” oznacza próbkę wzbogaconą znaną ilością analitu, jaki ma zostać wykryty lub określony ilościowo;
- 17) „międzylaboratoryjne badanie porównawcze” oznacza organizację, przeprowadzenie i ocenę badań na tej samej próbce (tych samych próbkach) przez co najmniej dwa laboratoria zgodnie z wcześniej ustalonymi warunkami w celu oceny wydajności badania, jako porównanie międzylaboratoryjne albo badanie biegłości;
- 18) „wzorzec wewnętrzny (IS)” oznacza substancję, której nie zawiera próbka, o właściwościach fizyko-chemicznych jak najbardziej zbliżonych do właściwości analitu, który ma zostać zidentyfikowany lub określony ilościowo;
- 19) „poziom udziału” oznacza stężenie substancji lub analitu w próbce, które jest istotne dla ustalenia jej zgodności z przepisami pod względem:
- maksymalnego limitu pozostałości lub maksymalnej zawartości substancji dopuszczonych zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 124/2009 ⁽¹⁷⁾ i rozporządzeniem Komisji (UE) nr 37/2010 ⁽¹⁸⁾;
 - punktów odniesienia dla działań kontrolnych w odniesieniu do substancji zakazanych lub niedopuszczonych, dla których ustanowiono punkt odniesienia dla działań kontrolnych zgodnie z rozporządzeniem (UE) 2019/1871;
 - stężenia na najniższym osiągalnym w sposób analityczny poziomie w przypadku substancji zakazanej lub niedopuszczonej, dla której nie ustanowiono punktu odniesienia dla działań kontrolnych;
- 20) „najniższy poziom skalibrowany” oznacza najniższe stężenie, w odniesieniu do którego kalibrowano układ pomiarowy;
- 21) „matryca” oznacza materiał, z którego pobrana jest próbka;
- 22) „efekt matrycowy” oznacza różnicę reakcji analitycznej między wzorcem rozpuszczonym w rozpuszczalniku a wzorcem przygotowanym w ekstrakcie z matrycy albo bez korekty przy użyciu wzorca wewnętrznego, albo z korektą przy użyciu wzorca wewnętrznego;

⁽¹⁷⁾ Rozporządzenie Komisji (WE) nr 124/2009 z dnia 10 lutego 2009 r. ustalające maksymalne zawartości w żywności kokcydiostatyków i histomonostatyków pochodzących z nieuniknionego zanieczyszczenia krzyżowego tymi substancjami pasz, dla których nie są one przeznaczone (Dz.U. L 40 z 11.2.2009, s. 7).

⁽¹⁸⁾ Rozporządzenie Komisji (UE) nr 37/2010 z dnia 22 grudnia 2009 r. w sprawie substancji farmakologicznie czynnych i ich klasyfikacji w odniesieniu do maksymalnych limitów pozostałości w środkach spożywczych pochodzenia zwierzęcego (Dz.U. L 15 z 20.1.2010, s. 1).

- 23) „wzorec przygotowany w ekstrakcie z matrycy” oznacza matrycę zerową (tj. bez analitu), do której dodaje się analit w określonym zakresie stężeń po przetworzeniu próbki;
- 24) „wzorec przygotowany z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją” oznacza matrycę zerową (tj. bez analitu), do której przed ekstrakcją rozpuszczalnikiem i obróbką próbki dodaje się analit w określonym zakresie stężeń;
- 25) „wielkość mierzona” oznacza szczególną wielkość, której wartość należy określić poprzez pomiar.
- 26) „niepewność pomiaru” oznacza parametr nieujemny związany z wynikiem pomiaru charakteryzujący rozproszenie wartości, które można racjonalnie przypisać wielkości mierzonej, w oparciu o wykorzystane informacje;
- 27) „kryteria wydajności” oznaczają wymogi dotyczące elementu charakterystyki wydajności, na podstawie których można osądzić, czy metoda analityczna nadaje się do zamierzonego zastosowania i daje rzetelne wyniki;
- 28) „precyzja” oznacza stopień zgodności między wynikami niezależnych badań otrzymanymi w określonych warunkach i wyrażona jest jako odchylenie standardowe lub współczynnik zmienności wyników badania;
- 29) „metoda jakościowa” oznacza metodę analityczną, za pomocą której wykrywa się lub identyfikuje substancję lub grupę substancji na podstawie ich właściwości chemicznych, biologicznych lub fizycznych;
- 30) „metoda ilościowa” oznacza metodę analityczną, za pomocą której określa się ilość lub ułamek masy substancji w taki sposób, aby można ją było wyrazić jako wartość liczbową w odpowiednich jednostkach;
- 31) „odzysk” oznacza ilość analitu z uwzględnieniem odzysku podzieloną przez wzbogaconą ilość analitu w próbce matrycy, wyrażoną w procentach;
- 32) „korekta odzysku” oznacza stosowanie wzorców wewnętrznych, stosowanie krzywej wzorcowej matrycy oraz zastosowanie współczynnika korekty odzysku, a także połączenie tych podejść;
- 33) „materiał odniesienia” oznacza materiał wystarczająco jednorodny i stabilny pod względem jednej lub większej liczby określonych właściwości, co do którego stwierdzono, że nadaje się do zamierzonego zastosowania w procesie pomiaru lub w badaniu właściwości nominalnych ⁽¹⁹⁾;
- 34) „względny efekt matrycowy” oznacza różnicę reakcji analitycznej między wzorcem rozpuszczonym w rozpuszczalniku a wzorcem przygotowanym w ekstrakcie z matrycy z korektą z wykorzystaniem wzorca wewnętrznego;
- 35) „powtarzalność” oznacza precyzję w warunkach, w jakich uzyskano wyniki niezależnych badań prowadzonych tą samą metodą, na identycznym materiale badawczym, w tym samym laboratorium, przez ten sam podmiot, przy użyciu tego samego sprzętu, w krótkich odstępach czasu;
- 36) „odtwarzalność” oznacza precyzję w warunkach, w jakich uzyskano wyniki badań prowadzonych tą samą metodą, na identycznym materiale badawczym, w różnych laboratoriach, przez różne podmioty, przy użyciu różnego sprzętu ⁽²⁰⁾;
- 37) „odporność” oznacza podatność metody analitycznej na zmiany w warunkach doświadczalnych, w których metoda może być stosowana w formie przedstawionej lub z określonymi niewielkimi modyfikacjami;
- 38) „metoda przesiewowa” oznacza metodę stosowaną do badania przesiewowego pod kątem substancji lub klasy substancji na poziomie udziału;
- 39) „przesiewowe stężenie docelowe” (STC) oznacza stężenie mniejsze lub równe $CC\beta$, przy którym pomiar przesiewowy klasyfikuje próbkę jako potencjalnie niezgodną – „przesiew dodatni” – i powoduje konieczność przeprowadzenia badania potwierdzającego;
- 40) „selektywność” oznacza zdolność metody do odróżnienia badanego analitu od innych substancji;
- 41) „badanie w pojedynczym laboratorium” lub „walidacja wewnętrzna” oznacza badanie analityczne prowadzone przez jedno laboratorium, przy użyciu jednej metody do przeanalizowania tych samych lub różnych materiałów badawczych, w różnych warunkach w uzasadnionych, długich odstępach czasu;

⁽¹⁹⁾ Komisja Kodeksu Żywnościowego, Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa/Światowa Organizacja Zdrowia, Wytyczne dotyczące terminologii analitycznej (CAC/GL 72-2009).

⁽²⁰⁾ ISO 5725-1:1994 Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów – część 1: Ogólne zasady i definicje (rozdział 3).

- 42) „dodatek wzorca” oznacza procedurę, w ramach której jedna część próbki jest analizowana jako taka, a do pozostałych badanych części przed analizą dodaje się znane ilości wzorca analitycznego;
- 43) „wzorec analityczny” oznacza analit o znanej i certyfikowanej zawartości i czystości, używany jako odniesienie w analizie;
- 44) „substancja” oznacza materię o stałym składzie, charakteryzującą się elementami, które ją tworzą, oraz określonymi właściwościami fizycznymi;
- 45) „badana część” oznacza ilość materiału pobranego z próbki, na którym prowadzi się badanie lub obserwację;
- 46) „poprawność” oznacza stopień zgodności między średnią wartością uzyskaną na podstawie dużej serii wyników badań a przyjętą wartością odniesienia;
- 47) „jednostki” oznaczają jednostki opisane w ISO 80000 ⁽²¹⁾ i dyrektywie Rady 80/181/EWG ⁽²²⁾;
- 48) „walidacja” oznacza wykazanie poprzez badanie oraz przedstawienie przekonywających dowodów na to, że spełnione są szczególne wymogi określonego zamierzonego zastosowania ⁽²³⁾, w ramach badania w pojedynczym laboratorium lub porównania międzylaboratoryjnego;
- 49) „odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna” lub „precyzja pośrednia/wewnętrzna odtwarzalność” oznacza precyzję pomiaru w określonych warunkach wewnątrzlaboratoryjnych w konkretnym laboratorium.

Artykuł 3

Metody analizy

Państwa członkowskie zapewniają, aby próbki pobrane zgodnie z art. 34 rozporządzenia (UE) 2017/625 były analizowane przy użyciu metod, które spełniają następujące wymogi:

- 1) dokumentuje się je w instrukcjach dotyczących badań, najlepiej zgodnie z załącznikami do ISO 78-2:1999 Chemia – Wytyczne opracowywania norm – część 2: Metody analizy chemicznej ⁽²⁴⁾;
- 2) spełniają kryteria wydajności i inne wymogi dotyczące metod analitycznych określone w rozdziale 1 załącznika I do niniejszego rozporządzenia;
- 3) zostały zwalidowane zgodnie z wymogami określonymi w rozdziałach 2 i 4 załącznika I do niniejszego rozporządzenia;
- 4) umożliwiają egzekwowanie punktów odniesienia dla działań kontrolnych określonych w rozporządzeniu (UE) 2019/1871, identyfikację obecności substancji zakazanych i niedopuszczonych oraz egzekwowanie maksymalnych zawartości (MZ), które zostały ustalone na podstawie rozporządzenia (EWG) nr 315/93 i rozporządzenia (WE) nr 124/2009, oraz maksymalnych limitów pozostałości (MLP), które zostały ustalone na podstawie rozporządzeń (WE) nr 1831/2003 i (WE) nr 470/2009.

Artykuł 4

Kontrola jakości

Państwa członkowskie zapewniają jakość wyników analiz przeprowadzonych zgodnie z rozporządzeniem (UE) 2017/625, w szczególności poprzez monitorowanie badań lub wyników kalibracji zgodnie z normą ISO/IEC 17025:2017 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących oraz zgodnie z wymaganiami dotyczącymi kontroli jakości podczas rutynowej analizy, jak określono w rozdziale 3 załącznika I do niniejszego rozporządzenia.

⁽²¹⁾ ISO 80000-1:2009 Wielkości i jednostki – część 1: Postanowienia ogólne (wprowadzenie).

⁽²²⁾ Dyrektywa Rady 80/181/EWG z dnia 20 grudnia 1979 r. w sprawie zbliżenia ustawodawstw państw członkowskich odnoszących się do jednostek miar i uchylająca dyrektywę 71/354/EWG (Dz.U. L 39 z 15.2.1980, s. 40).

⁽²³⁾ ISO/IEC 17025:2017 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących (rozdział 3).

⁽²⁴⁾ ISO 78-2: 1999 Chemia – Wytyczne opracowywania norm – część 2: Metody analizy chemicznej (załączniki).

Artykuł 5

Interpretacja wyników

1. Wynik analizy uznaje się za niezgodny, jeżeli jest równy lub wyższy od decyzyjnej wartości granicznej na potrzeby potwierdzenia (CCa).
2. W przypadku substancji dopuszczonych, dla których ustalono maksymalny limit pozostałości lub maksymalną zawartość, decyzyjną wartością graniczną na potrzeby potwierdzenia (CCa) jest stężenie, przy którym lub powyżej którego można stwierdzić, z pewnością statystyczną o wartości liczbowej $1 - \alpha$, że przekroczona została dopuszczalna wartość graniczna.
3. W przypadku substancji niedopuszczonych lub zakazanych, lub substancji dopuszczonych, dla których nie ustalono maksymalnego limitu pozostałości lub maksymalnej zawartości w odniesieniu do określonego gatunku lub produktu, decyzyjną wartością graniczną na potrzeby potwierdzenia (CCa) jest najniższy poziom stężenia, przy którym można stwierdzić obecność danego analitu z pewnością statystyczną o wartości liczbowej $1 - \alpha$.
4. W przypadku niedopuszczonych lub zakazanych substancji farmakologicznie czynnych błąd α wynosi maksymalnie 1 %. W przypadku wszystkich pozostałych substancji błąd α wynosi maksymalnie 5 %.

Artykuł 6

Metody pobierania próbek

Państwa członkowskie zapewniają, aby próbki pobierano, obchodzono się z nimi i etykietowano je zgodnie ze szczegółowymi metodami pobierania próbek określonymi w załączniku II do niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 7

Uchylenia i środki przejściowe

Decyzje 2002/657/WE i 98/179/WE tracą moc z dniem wejścia w życie niniejszego rozporządzenia.

Jednakże do dnia 10 czerwca 2026 r. wymogi określone w pkt 2 i 3 załącznika I do decyzji 2002/657/WE nadal mają zastosowanie do metod, które zostały zwalidowane przed datą wejścia w życie niniejszego rozporządzenia.

Artykuł 8

Wejście w życie

Niniejsze rozporządzenie wchodzi w życie dwudziestego dnia po jego opublikowaniu w *Dzienniku Urzędowym Unii Europejskiej*.

Niniejsze rozporządzenie wiąże w całości i jest bezpośrednio stosowane we wszystkich państwach członkowskich.

Sporządzono w Brukseli dnia 22 marca 2021 r.

W imieniu Komisji
Ursula VON DER LEYEN
Przewodnicząca

ZAŁĄCZNIK I

ROZDZIAŁ 1

KRYTERIA WYDAJNOŚCI I INNE WYMOGI DLA METOD ANALITYCZNYCH**1.1. Wymogi dotyczące metod przesiewowych****1.1.1. Kategorie odpowiednich metod przesiewowych**

Jako odpowiednie metody przesiewowe stosuje się metody jakościowe, półilościowe lub ilościowe.

1.1.2. Wymogi dotyczące biologicznych, biochemicznych lub fizykochemicznych metod przesiewowych

W przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych CC β powinno pozostawać na najniższym racjonalnie osiągalnym poziomie, a w każdym razie poniżej punktu odniesienia dla działań kontrolnych (RPA) w odniesieniu do substancji, dla których RPA ustanowiono zgodnie z rozporządzeniem (UE) 2019/1871.

W przypadku dopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych CC β powinno pozostawać poniżej maksymalnego limitu pozostałości (MLP) lub maksymalnej zawartości (MZ).

Do celów badań przesiewowych należy stosować wyłącznie te metody analityczne, co do których można wykazać w udokumentowany, możliwy do przesłedzenia sposób, że są zwalidowane i posiadają współczynnik wyników fałszywie zgodnych niższy lub równy 5 % (błąd β). W przypadku podejrzenia wyniku niezgodnego wynik ten należy potwierdzić metodą potwierdzającą.

Ilościowe metody przesiewowe wykorzystywane zarówno do badań przesiewowych, jak i do potwierdzania, muszą spełniać takie same wymogi dotyczące dokładności, zakresu i precyzji, jak opisano w rozdziałach 1.2.2.1 i 1.2.2.2.

1.2. Wymogi dotyczące metod potwierdzających**1.2.1. Wymogi ogólne dotyczące metod potwierdzających**

W przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych wartość CC α powinna pozostawać na najniższym racjonalnie osiągalnym poziomie. Wartość CC α w odniesieniu do substancji zakazanych lub niedopuszczonych, dla których ustanowiono punkt odniesienia dla działań kontrolnych zgodnie z rozporządzeniem (UE) 2019/1871, powinna być równa temu punktowi lub od niego niższa.

W przypadku substancji dopuszczonych wartość CC α powinna być wyższa niż MLP lub MZ, jednak możliwie najbardziej zbliżona do tych wartości.

Do celów potwierdzenia należy stosować wyłącznie te metody analityczne, co do których można wykazać w udokumentowany, możliwy do przesłedzenia sposób, że są zwalidowane i posiadają współczynnik wyników fałszywie niezgodnych (błąd α) niższy lub równy 1 % w przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych bądź niższy lub równy 5 % w przypadku substancji dopuszczonych.

Metody potwierdzające dostarczają informacji na temat strukturalnego składu chemicznego analitu. W rezultacie metody potwierdzające oparte wyłącznie na analizie chromatograficznej bez wykrywania metodą spektrometrii mas nie są same w sobie odpowiednie do wykorzystania jako metody potwierdzające w odniesieniu do zakazanych lub niedopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych. Jeżeli metoda spektrometrii mas nie jest odpowiednia dla substancji dopuszczonych, można zastosować inne metody, takie jak HPLC-DAD i -FLD, lub ich połączenie.

Jeżeli jest to wymagane w ramach metody potwierdzającej, do badanej części na początku procedury ekstrakcji dodaje się odpowiedni wzorzec wewnętrzny. W zależności od dostępności, należy stosować albo trwałe, izotopowo oznaczone postaci analitu, które są w szczególności odpowiednie do wykrywania metodą spektrometrii mas, albo analogi, które pod względem budowy są bardzo podobne do analitu. Jeżeli nie można wykorzystać żadnego odpowiedniego wzorca wewnętrznego, preferowanym sposobem potwierdzenia identyfikacji analitu jest chromatografia równoległa⁽¹⁾. W tym przypadku uzyskuje się tylko jeden pik, przy czym powierzchnia pików jest równoważna ilości dodanego analitu. Jeżeli jest to niewykonalne, stosuje się wzorzec przygotowany w ekstrakcie z matrycy lub wzorzec przygotowany z matrycy wzobogaconej przed ekstrakcją.

⁽¹⁾ Chromatografia równoległa oznacza procedurę, w ramach której przed etapem (etapami) chromatografii ekstrakt próbki dzielony jest na dwie części. Część pierwsza jest poddawana badaniu chromatograficznemu bez zmian. Część drugą miesza się z wzorcem analitycznym, który ma zostać zmierzony. Następnie mieszaninę tę również poddaje się badaniu chromatograficznemu. Ilość dodanego wzorca analitycznego musi być podobna do szacunkowej ilości analitu w ekstrakcie. Chromatografia równoległa ma na celu poprawę identyfikacji analitu w przypadku użycia metod chromatograficznych, w szczególności jeżeli nie można wykorzystać żadnego odpowiedniego wzorca wewnętrznego.

1.2.2. *Ogólne kryteria wydajności metod potwierdzających*1.2.2.1. *Poprawność zmierzona na podstawie odzysku*

W przypadku powtórnych analiz certyfikowanego materiału odniesienia zakresy odchylenia doświadczalnie ustalonego średniego ułamka masowego, po uwzględnieniu odzysku, od wartości certyfikowanej muszą być zgodne z minimalnymi zakresami poprawności wymienionymi w tabeli 1.

Tabela 1

Minimalna poprawność metod ilościowych

| Ułamek masowy | Zakres |
|-----------------------|----------------|
| ≤ 1 µg/kg | -50 % do +20 % |
| > 1 µg/kg do 10 µg/kg | -30 % do +20 % |
| ≥ 10 µg/kg | -20 % do +20 % |

Jeżeli certyfikowane materiały odniesienia są niedostępne, dopuszcza się inne sposoby oceny poprawności pomiaru, np. przy użyciu materiałów z przypisanymi wartościami z międzylaboratoryjnych badań porównawczych lub poprzez dodanie znanej ilości analitu lub analitów do matrycy zerowej.

1.2.2.2. *Precyzja*

Współczynnik zmienności (CV) dla powtórnej analizy materiału odniesienia lub materiału wzbogaconego, w warunkach odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej, nie może przekraczać poziomu obliczonego za pomocą równania Horwitza. Równanie jest następujące:

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

gdzie C to ułamek masowy wyrażony jako potęga (wykładnik) 10 (np. 1 mg/g = 10⁻³). W przypadku ułamków masowych poniżej 120 µg/kg zastosowanie równania Horwitza daje niedopuszczalnie wysokie wartości. W związku z tym dopuszczalny maksymalny współczynnik zmienności nie może przekraczać wartości przedstawionych w tabeli 2.

Tabela 2

Dopuszczalny współczynnik zmienności

| Ułamek masowy | Współczynnik zmienności odtwarzalności (%) |
|-------------------------|--------------------------------------------|
| > 1 000 µg/kg | 16 (obliczone z równania Horwitza) |
| > 120 µg/kg–1 000 µg/kg | 22 (obliczone z równania Horwitza) |
| 10–120 µg/kg | 25 * |
| < 10 µg/kg | 30 * |

* Przedstawione współczynniki zmienności (%) mają charakter orientacyjny i powinny być na najniższym racjonalnie osiągalnym poziomie.

W przypadku analiz prowadzonych w warunkach powtarzalności współczynnik zmienności w warunkach powtarzalności nie może wynosić więcej niż dwie trzecie wartości wskazanych w tabeli 2.

1.2.3. *Wymogi dotyczące oznaczania metodą chromatografii*

W przypadku chromatografii cieczowej (LC) lub gazowej (GC) minimalny dopuszczalny czas retencji dla badanego analitu lub badanych analitów wynosi dwukrotność czasu retencji odpowiadającego objętości martwej kolumny. Czas retencji analitu w ekstrakcie odpowiada czasowi retencji wzorca kalibracji, wzorca przygotowanego w ekstrakcie z matrycy lub wzorca przygotowanego z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją, z dokładnością ± 0,1 min. W przypadku szybkiej chromatografii, gdy czas retencji jest krótszy niż 2 minuty, dopuszczalne jest odchylenie wynoszące poniżej 5 % czasu retencji. W przypadku zastosowania wzorca wewnętrznego stosunek

chromatograficznego czasu retencji analitu do czasu retencji wzorca wewnętrznego, tj. względny czas retencji analitu, odpowiada czasowi retencji wzorca kalibracji, wzorca przygotowanego w ekstrakcie z matrycy lub wzorca przygotowanego z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją przy maksymalnym odchyleniu wynoszącym 0,5 % w przypadku chromatografii gazowej i 1 % w przypadku chromatografii cieczowej dla metod zwalidowanych od dnia wejścia w życie niniejszego rozporządzenia.

1.2.4. Szczególne kryteria wydajności spektrometrii mas

1.2.4.1. Wykrywanie metodą spektrometrii mas

Wykrywanie metodą spektrometrii mas przeprowadza się przy wykorzystaniu niektórych z poniższych wariantów:

1. rejestracja pełnych widm masowych (pełne skany) – FS;
2. monitorowanie wybranych jonów (SIM);
3. techniki sekwencyjnej spektrometrii mas (MS^n) takie jak monitorowanie wybranych reakcji (SRM);
4. połączenie technik spektrometrii mas (MS) lub sekwencyjnej spektrometrii mas (MS^n) z odpowiednimi sposobami jonizacji.

Odpowiednia jest zarówno niskorozdzielcza spektrometria mas (LRMS, przy jednostkowej rozdzielczości masy), jak i wysokorozdzielcza spektrometria mas (HRMS), w tym np. sektory z podwójnym ogniskowaniem, analizator czasu przelotu (TOF) oraz analizator Orbitrap.

W celu potwierdzenia tożsamości analitu w wysokorozdzielczej spektrometrii mas (HRMS) odchylenie masy wszystkich jonów pomocniczych powinno wynosić poniżej 5 ppm (lub w przypadku $m/z < 200$ poniżej 1 mDa). Na tej podstawie należy wybrać skuteczną rozdzielczość odpowiednią do celu, przy czym rozdzielczość zazwyczaj wynosi ponad 10 000 dla całego zakresu masy przy 10 % dolinie lub 20 000 przy szerokości piku w połowie jego wysokości (FWHM).

Gdy oznaczanie metodą spektrometrii mas jest przeprowadzane poprzez rejestrowanie pełnego skanu widm (zarówno LRMS, jak i HRMS), odpowiednie są wyłącznie jony pomocnicze o względnej intensywności ponad 10 % w widmie referencyjnym wzorca kalibracji, wzorca przygotowanego w ekstrakcie z matrycy lub wzorca przygotowanego z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją. Jony pomocnicze obejmują jon molekularny (jeżeli występuje przy intensywności ≥ 10 % piku podstawowego) oraz charakterystyczne jony fragmentacyjne lub jony potomne.

Selekcja jonu macierzystego: gdy oznaczanie metodą spektrometrii mas jest przeprowadzane poprzez fragmentację po selekcji jonu macierzystego, selekcji jonu macierzystego dokonuje się przy rozdzielczości jednostkowej lub lepszej rozdzielczości. Wybrany jon macierzysty musi być jonem molekularnym, charakterystycznym adduktem jonu molekularnego, charakterystycznym jonem potomnym lub jednym z ich jonów izotopowych. Jeżeli do selekcji jonu macierzystego stosuje się okno selekcji masy o wartości ponad 1 daltona (np. w przypadku akwizycji niezależnej od danych), technikę uznaje się za pełnoskanową analizę potwierdzającą.

Jony fragmentacyjne i potomne: Wybrane jony fragmentacyjne lub jony potomne stanowią fragment diagnostyczny dla mierzonego analitu/produktu. W miarę możliwości należy pomijać nieselektywne procesy przejściowe (np. kation tropyliowy lub utratę wody). Nadmiar jonów pomocniczych określa się na podstawie powierzchni lub wysokości piku zintegrowanych chromatogramów wyekstrahowanych jonów. Zasada ta ma zastosowanie również wówczas, gdy do identyfikacji wykorzystuje się pomiary pełnoskanowe. Stosunek sygnału do szumu (S/N) w przypadku wszystkich jonów pomocniczych musi być większy lub równy trzy do jednego (3:1).

Względna intensywność: względną intensywność jonów pomocniczych (proporcję jonów) wyraża się jako procent intensywności najbardziej nadmiarowego jonu lub produktu przejściowego. Proporcję jonów należy ustalić poprzez porównanie widm lub scalenie sygnałów śladów masy wyekstrahowanych jonów. Proporcja jonów analitu, która ma zostać potwierdzona, odpowiada proporcji wzorców przygotowanych w ekstrakcie z matrycy, wzorców przygotowanych z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją lub roztworów wzorcowych przy porównywalnych stężeniach, mierzonych w tych samych warunkach, w granicach ± 40 % odchylenia względnego.

W przypadku wszystkich analiz metodą spektrometrii mas należy ustalić co najmniej jedną proporcję jonów. Najlepiej, by były to jony uzyskane w ramach jednego skanu, jednak jony mogą również pochodzić z różnych skanów w ramach tego samego wtrysku (tj. pełny skan i skan fragmentacyjny).

1.2.4.2. Identyfikacja

W celu wyboru odpowiednich sposobów akwizycji i kryteriów oceny stosuje się system punktów identyfikacyjnych. Aby potwierdzić w matrycy tożsamość substancji, dla których ustalono MLP (dopuszczone zastosowanie), wymagane są co najmniej 4 punkty identyfikacyjne. W przypadku substancji niedopuszczonych lub zakazanych wymaganych jest 5 punktów identyfikacyjnych. Jeden punkt można uzyskać w drodze oznaczenia metodą chromatografii. W tabeli 3 przedstawiono liczbę punktów identyfikacyjnych, którą można uzyskać dzięki każdej z technik. W celu uzyskania wymaganej do potwierdzenia liczby punktów identyfikacyjnych można dodać punkty identyfikacyjne uzyskane za pomocą różnych technik.

1. Wszystkie analizy metodą spektrometrii mas należy połączyć z techniką rozdzielania, która charakteryzuje się wystarczającą zdolnością rozdzielania i selektywnością dla danego zastosowania. Odpowiednie techniki rozdzielania obejmują między innymi chromatografię cieczową i gazową, elektroforezę kapilarną (CE) i chromatografię cieczą w stanie nadkrytycznym (SFC). W przypadku analitu, który zawiera dowolny związek izobaryczny lub izomeryczny, akceptowalność czasu retencji (tj. $\pm 0,5\%$ w przypadku GC oraz $\pm 1\%$ w przypadku LC i SFC) jest obowiązkowa w celu potwierdzenia tożsamości.
2. Można połączyć maksymalnie trzy różne techniki w celu osiągnięcia minimalnej liczby punktów identyfikacyjnych.
3. Różne sposoby jonizacji (np. jonizację elektronową (EI) i jonizację chemiczną (CI)) uznaje się za różne techniki.

Tabela 3

Punkty identyfikacyjne z podziałem na techniki

| Technika | Punkty identyfikacyjne |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Rozdzielanie (metodą GC, LC, SFC, CE) | 1 |
| Jon LR-MS | 1 |
| Selekcja jonu macierzystego przy zakresie masy wynoszącym $< \pm 0,5$ Da | 1 (pośredni) |
| Jon potomny LR-MS ^a | 1,5 |
| Jon HR-MS | 1,5 |
| Jon potomny HR-MS ^a | 2,5 |

Tabela 4

Przykłady liczby punktów identyfikacyjnych uzyskanych dla określonych technik i ich kombinacji (n = liczba całkowita)

| Technika lub techniki | Rozdzielanie | Liczba jonów | Punkty identyfikacyjne |
|------------------------------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| GC-MS (EI lub CI) | GC | n | 1 + n |
| GC-MS (EI oraz CI) | GC | 2 (EI) + 2 (CI) | 1 + 4 = 5 |
| GC-MS (EI lub CI) 2 pochodne | GC | 2 (pochodna A) + 2 (pochodna B) | 1 + 4 = 5 |
| LC-MS | LC | n (MS) | 1 + n |
| GC- lub LC-MS/MS | GC lub LC | 1 jon macierzysty + 2 jony potomne | 1 + 1 + 2 × 1,5 = 5 |
| GC- lub LC-MS/MS | GC lub LC | 2 jony macierzyste + 2 jony potomne | 1 + 2 + 2 × 1,5 = 6 |
| GC- lub LC-MS ³ | GC lub LC | 1 jon macierzysty + 1 jon potomny MS ² + 1 jon potomny MS ³ | 1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5 |
| GC- lub LC-HRMS | GC lub LC | n | 1 + n × 1,5 |

| | | | |
|---------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| GC- lub LC-HRMS/MS | GC lub LC | 1 jon macierzysty (przy zakresie masy wynoszącym $\leq \pm 0,5$ Da) + 1 jon potomny | $1 + 1 + 2,5 = 4,5$ |
| GC- lub LC-HRMS i HRMS/MS | GC lub LC | 1 jon pełnoskanowy + 1 jon potomny HRMS ^a | $1 + 1,5 + 2,5 = 5$ |
| GC- i LC-MS | GC i LC | 2 jony (GCMS) + 1 jon (LCMS) | $1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6$ |

^a Nie uzyskuje się żadnego dodatkowego punktu identyfikacyjnego w przypadku selekcji jonu macierzystego, jeżeli ten jon macierzysty jest tym samym jonem (lub adduktem bądź izotopem) co jon HRMS monitorowany techniką pełnoskanową.

1.2.5. Szczególne kryteria wydajności dla oznaczenia analitu za pomocą chromatografii cieczowej z wykorzystaniem technik wykrywania innych niż spektrometria mas

Wyłącznie w odniesieniu do substancji dopuszczonych można stosować następujące techniki jako metody alternatywne dla metod opartych na spektrometrii mas, pod warunkiem że spełnione są odpowiednie kryteria dla tych technik:

1. pełnoskanowa spektrofotometria z detekcją diodową (DAD) w przypadku stosowania w połączeniu z metodą HPLC;
2. detekcja fluorescencyjna (FLD) w przypadku stosowania w połączeniu z metodą HPLC.

Sama metoda chromatografii cieczowej z wykrywaniem UV/VIS (pojedyncza długość fali) nie jest odpowiednia jako metoda potwierdzająca.

1.2.5.1. Kryteria wydajności dla pełnoskanowej spektrofotometrii z detekcją diodową

Muszą być spełnione kryteria wydajności dla oznaczania metodą chromatografii określone w rozdziale 1.2.3.

Maksyma absorpcji w widmie UV analitu muszą mieć te same długości fal co wzorzec kalibracji w matrycy z maksymalną tolerancją uzależnioną od rozdzielczości systemu wykrywania. W przypadku szybkiego detektora diodowego tolerancja ta wynosi zazwyczaj ± 2 nm. Widmo analitu powyżej 220 nm, dla tych części obu widm o absorpcji względnej większej lub równej 10 %, nie może różnić się widocznie od widma wzorca kalibracji. Kryterium to jest spełnione, kiedy, po pierwsze, obecne są te same maksima i, po drugie, kiedy różnica między tymi dwoma widmami w żadnym punkcie nie przekracza 10 % absorpcji wzorca kalibracji. W przypadku korzystania ze wspomaganego komputerowo przeszukiwania biblioteki i dopasowywania porównanie danych widmowych w urzędowych próbkach z danymi roztworu kalibracyjnego musi przekroczyć wartość współczynnika dopasowania krytycznego. Współczynnik należy ustalić w czasie procesu walidacji dla każdego analitu na podstawie widm, dla których spełnione są opisane powyżej kryteria. Należy sprawdzić zmienność widm spowodowaną matrycą próbki oraz działaniem detektora.

1.2.5.2. Kryteria wydajności dla detekcji fluorescencyjnej

Muszą być spełnione kryteria wydajności dla oznaczania metodą chromatografii określone w rozdziale 1.2.3.

Wyboru długości fal wzbudzenia i emisji w powiązaniu z warunkami chromatografii należy dokonać w taki sposób, aby zminimalizować oddziaływanie zakłócających składników w zerowych ekstraktach próbek. Różnica między długością fali wzbudzenia a długością fali emisji powinna wynosić co najmniej 50 nanometrów.

Najbliższe maksimum pików w chromatogramie oddzielone jest od wyznaczonego pików analitu o co najmniej jedną pełną szerokość pików przy 10 % maksymalnej wysokości pików analitu.

Dotyczy to cząsteczek, które wykazują naturalną fluorescencję oraz cząsteczek wykazujących fluorescencję po przemianie albo derywatywacji.

ROZDZIAŁ 2

WALIDACJA

2.1. Elementy charakterystyki wydajności, które należy ustalić dla metod analitycznych

Poprzez walidację metody wykazuje się, że metoda analityczna spełnia kryteria mające zastosowanie do odpowiednich elementów charakterystyki wydajności. Różne cele kontrolne wymagają różnych kategorii metod. W tabeli 5 określono, który element charakterystyki wydajności należy zweryfikować dla poszczególnych rodzajów metod, przy czym w niniejszym rozdziale przedstawiono dalsze wyjaśnienia dotyczące każdego z parametrów.

Tabela 5

Klasyfikacja metod analitycznych według elementów charakterystyki wydajności, które należy ustalić

| Metoda | Potwierdzenie | | Metoda przesiewowa | | |
|-----------------------------------------------|---------------|-----------|--------------------|--------------|-----------|
| | Jakościowe | Ilościowe | Jakościowa | Półilościowa | Ilościowa |
| Substancje | A | A, B | A, B | A, B | A, B |
| Identyfikacja zgodnie z rozdziałem 1.2 | x | x | | | |
| CC α | x | x | | | |
| CC β | – | | x | x | x |
| Poprawność | | x | | | x |
| Precyzja | | x | | (x) | x |
| Względny efekt matrycowy/odzysk bezwzględny * | | x | | | x |
| Selektywność/specyficzność | | x | x | x | x |
| Stabilność # | | x | x | x | x |
| Odporność | | x | x | x | x |

x: Wymagane jest udowodnienie poprzez walidację, że wymogi dotyczące danego elementu charakterystyki wydajności są spełnione.

(x) Wymogi dotyczące precyzji określone w rozdziale 1.2.2.2 nie muszą być spełnione w przypadku półilościowych metod przesiewowych. Należy jednak określić precyzję w celu udowodnienia, że dana metoda umożliwia uniknięcie fałszywie zgodnych wyników analiz.

A: substancje zakazane lub niedopuszczone

B: substancje dopuszczone

Jeżeli dane dotyczące stabilności analizów w matrycy można zaczerpnąć z literatury naukowej lub uzyskać z innego laboratorium, przedmiotowe laboratorium nie musi ponownie określać tych danych. Wykorzystanie dostępnych danych dotyczących stabilności analizów w roztworze jest jednak dopuszczalne wyłącznie w przypadku zastosowania identycznych warunków.

* Dotyczy metod MS, w których przypadku wymagane jest udowodnienie poprzez walidację, że wymogi dotyczące określonych elementów charakterystyki wydajności są spełnione. Względny efekt matrycowy metody należy określić wówczas, gdy nie został on oceniony w trakcie procedury walidacji. Odzysk bezwzględny metody należy ustalić wówczas, gdy nie zastosowano żadnego wzorca wewnętrznego ani kalibracji z użyciem wzorca przygotowanego z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją.

2.2. Poprawność, powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

W niniejszym rozdziale podano przykłady i odniesienia dla procedur walidacji. Można zastosować inne podejścia w celu wykazania, że metoda jest zgodna z kryteriami wydajności, pod warunkiem że zapewniają one ten sam poziom i tę samą jakość informacji.

2.2.1. Walidacja konwencjonalna

Obliczanie parametrów zgodnie z metodami konwencjonalnymi wymaga przeprowadzenia szeregu indywidualnych doświadczeń. Dla każdej większej zmiany należy określić każdy element charakterystyki wydajności (zob. rozdział 2.4). W przypadku metod wieloanalitowych kilka analitów można analizować równocześnie, o ile uprzednio wykluczy się ewentualne istotne interferencje. W podobny sposób można oznaczyć szereg elementów charakterystyki wydajności. W związku z tym, aby zminimalizować obciążenie pracą, zaleca się łączenie doświadczeń w największym możliwym zakresie (np. powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną ze specyficznością, analizą próbek zerowych w celu oznaczenia decyzyjnej wartości granicznej na potrzeby potwierdzenia i badaniem specyficzności).

2.2.1.1. Wyznaczanie poprawności na podstawie certyfikowanego materiału odniesienia

Zaleca się, by poprawność metody analitycznej wyznaczać na podstawie certyfikowanego materiału odniesienia (CRM). Procedura ta jest opisana szczegółowo w normie ISO 5725-4:1994 ⁽²⁾.

Przykład jest podany poniżej:

1. Należy przeanalizować sześć replik CRM zgodnie z instrukcjami dotyczącymi badań dla metody.
2. Należy ustalić stężenie analitu obecnego w każdej próbce replik.
3. Należy obliczyć średnią, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności (%) dla tych sześciu replik.
4. Należy obliczyć poprawność, dzieląc wykryte średnie stężenie przez wartość certyfikowaną (mierzoną jako stężenie) i mnożąc przez 100, aby wyrazić wynik jako procent.

Poprawność (%) = (średnie wykryte stężenie z uwzględnieniem odzysku) × 100/wartość certyfikowana

2.2.1.2. Wyznaczanie poprawności na podstawie próbek wzbogaconych

W przypadku niedostępności certyfikowanego materiału odniesienia poprawność metody wyznacza się, przeprowadzając doświadczenia z wykorzystaniem wzbogaconej matrycy zerowej, które powinny być zgodne z co najmniej następującym schematem:

1. W przypadku metod zwalidowanych od dnia wejścia w życie niniejszego rozporządzenia należy wybrać materiał zerowy i wzbogacić go przy stężeniu równym:
 - a) 0,5- ⁽³⁾, 1,0- i 1,5-krotności RPA; lub
 - b) 0,1- ⁽⁴⁾, 1,0- i 1,5-krotności MLP lub MZ w przypadku substancji dopuszczonych; lub
 - c) 1,0-, 2,0- i 3,0-krotności LCL (najniższy poziom skalibrowany) w przypadku substancji niedopuszczonych (w odniesieniu do których nie ustalono RPA).
2. Na każdym poziomie analizę należy wykonać z co najmniej sześcioma replikami.
3. Należy przeanalizować próbki.
4. Należy obliczyć stężenie wykryte w poszczególnych próbkach.
5. Należy obliczyć poprawność dla każdej próbki za pomocą poniższego równania, a następnie obliczyć średnią poprawność i współczynnik zmienności dla sześciu wyników na każdym poziomie stężenia.

Poprawność (%) = (średnie wykryte stężenie z uwzględnieniem odzysku) × 100/poziom wzbogacenia

W przypadku metod dotyczących substancji dopuszczonych zwalidowanych przed datą rozpoczęcia stosowania niniejszego rozporządzenia wystarczające jest określenie poprawności metody z wykorzystaniem 6 wzbogaconych podwielokrotności przy 0,5-, 1,0- i 1,5-krotności MLP lub MZ.

⁽²⁾ ISO 5725-4:2020 Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów – Część 4: Podstawowe metody wyznaczania poprawności standardowej metody pomiarowej (klauzula 3).

⁽³⁾ Jeżeli w przypadku niedozwolonej substancji farmakologicznie czynnej walidacja stężenia równego 0,5-krotności RPA nie jest racjonalnie osiągalna, stężenie równe 0,5-krotności RPA można zastąpić najniższym stężeniem równym 0,5–1,0-krotności RPA, które jest racjonalnie osiągalne.

⁽⁴⁾ Jeżeli w przypadku określonej substancji farmakologicznie czynnej walidacja stężenia równego 0,1-krotności MLP nie jest racjonalnie osiągalna, stężenie równe 0,1-krotności MLP można zastąpić najniższym stężeniem równym 0,1–0,5-krotności MLP, które jest racjonalnie osiągalne.

2.2.1.3. Powtarzalność

1. W przypadku metod zwalidowanych od dnia wejścia w życie niniejszego rozporządzenia należy przygotować zestaw próbek o takich samych matrycach zerowych tego samego gatunku. Należy je wzbogacić analitem tak, aby uzyskać stężenia równe:
 - a) 0,5-⁽⁵⁾, 1,0- i 1,5-krotności RPA;
 - b) 0,1-⁽⁶⁾, 1,0- i 1,5-krotności MLP lub MZ w przypadku substancji dopuszczonych; lub
 - c) 1,0-, 2,0- i 3,0-krotności LCL w przypadku substancji niedopuszczonych lub zakazanych, jeżeli RPA nie ma zastosowania.
2. Na każdym poziomie analizę należy wykonać z co najmniej sześcioma replikami.
3. Należy przeanalizować próbki.
4. Należy obliczyć stężenie wykryte w poszczególnych próbkach.
5. Należy obliczyć średnie stężenie, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności (%) dla próbek wzbogaconych.
6. Należy powtórzyć te kroki co najmniej dwukrotnie.
7. Należy obliczyć ogólne średnie stężenia, odchylenia standardowe (poprzez uśrednienie odchylenia standardowego podniesionego do kwadratu z poszczególnych przypadków i wyciągnięcie pierwiastka kwadratowego z tej wartości) oraz współczynniki zmienności dla próbek wzbogaconych.

W przypadku metod dotyczących substancji dopuszczonych zwalidowanych przed datą wejścia w życie niniejszego rozporządzenia wystarczające jest określenie powtarzalności z wykorzystaniem wzbogaconych matryc przy stężeniach równych 0,5-, 1,0- i 1,5-krotności MLP lub MZ.

Alternatywnie powtarzalność można obliczyć zgodnie z normą ISO 5725-2:2019⁽⁷⁾.

2.2.1.4. Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna

1. W przypadku walidacji dokonanych po dacie wejścia w życie niniejszego rozporządzenia należy przygotować zestaw próbek określonego materiału badawczego (identyczne lub różne matryce), wzbogaconych analitem lub analitami tak, aby uzyskać stężenia równe:
 - a) 0,5-⁵, 1,0- i 1,5-krotności RPA;
 - b) 0,1-⁽⁶⁾, 1,0- i 1,5-krotności MLP lub MZ w przypadku substancji dopuszczonych; lub
 - c) 1,0-, 2,0- i 3,0-krotności LCL w przypadku substancji niedopuszczonych lub zakazanych, jeżeli RPA nie ma zastosowania.
2. Należy wykonać analizę na każdym poziomie stężenia z co najmniej sześcioma replikami materiału zerowego.
3. Należy przeanalizować próbki.
4. Należy obliczyć stężenie wykryte w poszczególnych próbkach.

⁽⁵⁾ Jeżeli w przypadku niedozwolonej substancji farmakologicznie czynnej walidacja stężenia równego 0,5-krotności RPA nie jest racjonalnie osiągalna, stężenie równe 0,5-krotności RPA można zastąpić najniższym stężeniem równym 0,5–1,0-krotności RPA, które jest racjonalnie osiągalne.

⁽⁶⁾ Jeżeli w przypadku określonej substancji farmakologicznie czynnej walidacja stężenia równego 0,1-krotności MLP nie jest racjonalnie osiągalna, stężenie równe 0,1-krotności MLP można zastąpić najniższym stężeniem równym 0,1–0,5-krotności MLP, które jest racjonalnie osiągalne.

⁽⁷⁾ ISO 5725-2:2019 Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów – Część 2: Podstawowa metoda określania powtarzalności i odtwarzalności standardowej metody pomiarowej (klauzula 3).

5. Należy powtórzyć te kroki co najmniej dwukrotnie z innymi partiami materiału zerowego, z innymi podmiotami i w jak najbardziej zróżnicowanych warunkach środowiskowych, np. z różnymi partiami odczynników, rozpuszczalników, w różnych temperaturach pokojowych, z użyciem różnych przyrządów lub przy zmianie innych parametrów.
6. Należy ustalić średnie stężenie, odchylenie standardowe i współczynnik zmienności (%) dla próbek wzbogaconych.

W przypadku metod dotyczących substancji dopuszczonych zwalidowanych przed datą wejścia w życie niniejszego rozporządzenia wystarczające jest określenie odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej z wykorzystaniem wzbogaconych matryc przy stężeniach równych 0,5-, 1,0- i 1,5-krotności MLP lub MZ.

Alternatywnie odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną/precyzję pośrednią można również obliczyć zgodnie z normami ISO 5725-2:2019 i ISO 11843-1:1997 ⁽⁸⁾ oraz wytycznymi Komisji Kodeksu Żywnościowego CAC/GL 59-2006 ⁽⁹⁾.

2.2.2. Walidacja według modeli alternatywnych

Obliczanie parametrów zgodnie z modelami alternatywnymi wymaga wykonania planu doświadczeń. Plan doświadczeń należy sporządzić w oparciu o liczbę różnych gatunków i czynników poddanych badaniu. W związku z tym pierwszym etapem całej procedury walidacji jest analiza populacji objętych próbą, które będą badane w laboratorium w przyszłości, aby określić najważniejsze gatunki i czynniki, które mogą wpłynąć na wyniki pomiaru. Podejście oparte na czynnikach pozwala na ocenę niepewności pomiaru wyników badań uzyskanych w różnych warunkach badawczych w danym laboratorium, obejmujących np. przeprowadzanie analiz przez różnych analityków, z wykorzystaniem różnych przyrządów, różnych partii odczynników, różnych matryc, w różnych temperaturach, a także różny czas trwania analizy. Następnie należy wybrać zakres stężeń w sposób dostosowany do celu i zgodnie z MLP lub MZ w przypadku substancji dopuszczonych bądź RPA lub LCL w przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych.

Celem podejścia opartego na czynnikach jest wyznaczenie wiarygodnych danych dotyczących precyzji i danych pomiarowych poprzez jednoczesne kontrolowanie zmienności wybranych czynników. Umożliwia ono ocenę łącznego wpływu efektów czynnikowych i efektów losowych. Układ doświadczalny pozwala także na zbadanie odporności ⁽¹⁰⁾ metody analitycznej i ustalenie odchylenia standardowego wewnętrznej odtwarzalności w poszczególnych matrycach.

Poniżej podano przykład alternatywnego podejścia wykorzystującego ortogonalny plan układu doświadczalnego.

Można zbadać do siedmiu czynników (czynniki szumu). Badanie jest zaprojektowane w taki sposób, aby precyzję, poprawność (w oparciu o próbki wzbogacone), czułość, niepewność pomiaru i stężenia krytyczne można było określić jednocześnie poprzez wykonanie planu doświadczeń.

Tabela 6

Przykład ortogonalnego planu układu doświadczalnego z 7 czynnikami (I–VII) zróżnicowanymi na dwóch poziomach (A/B) w badaniu walidacyjnym obejmującym 8 prób (kombinacja poziomów czynnika)

| Czynnik | I | II | III | IV | V | VI | VII |
|----------|---|----|-----|----|---|----|-----|
| Próba 01 | A | A | A | A | A | A | A |
| Próba 02 | A | A | B | A | B | B | B |
| Próba 03 | A | B | A | B | A | B | B |
| Próba 04 | A | B | B | B | B | A | A |

⁽⁸⁾ ISO 11843-1:1997 Zdolność wykrywania – Część 1: Terminologia.

⁽⁹⁾ Komisja Kodeksu Żywnościowego, Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Żywnienia i Rolnictwa, Światowa Organizacja Zdrowia, Guidelines on estimation of uncertainty of results (Wytyczne dotyczące szacowania niepewności wyników) (CAC/GL 59-2006).

⁽¹⁰⁾ Zmiany określonych w nim warunków doświadczalnych mogą dotyczyć materiałów tworzących próbkę, analitów, warunków przechowywania, warunków środowiskowych lub warunków przygotowywania próbek. Dla wszystkich warunków doświadczalnych, które w praktyce mogłyby ulegać zmianom (np. stabilność odczynników, skład próbki, pH, temperatura), należy wskazać wszystkie odchylenia, które mogłyby mieć wpływ na wynik analizy.

| | | | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|
| Próba 05 | B | A | A | B | B | A | B |
| Próba 06 | B | A | B | B | A | B | A |
| Próba 07 | B | B | A | A | B | B | A |
| Próba 08 | B | B | B | A | A | A | B |

Obliczanie elementów charakterystyki metody odbywa się zgodnie z opisem w Jülicher et al. ⁽¹¹⁾.

2.2.3. Inne podejścia do walidacji

Można zastosować inne podejścia w celu wykazania, że metoda jest zgodna z kryteriami wydajności na potrzeby charakterystyki wydajności, pod warunkiem że zapewniają one ten sam poziom i tę samą jakość informacji. Walidację można również przeprowadzić poprzez wykonanie międzylaboratoryjnego badania porównawczego ustanowionego przez Kodeks Żywnościowy, ISO lub IUPAC ⁽¹²⁾ bądź zgodnie z metodą alternatywną, taką jak badanie w pojedynczym laboratorium lub walidacja wewnętrzna ⁽¹³⁾. W przypadku stosowania alternatywnych procedur walidacji będący podstawą model i strategię z odpowiednimi warunkami wstępnymi, założenia i wzory należy opisać w protokole walidacji lub przynajmniej należy podać odniesienia do ich dostępności.

2.3. Selektywność/specyficzność

Należy ustalić w możliwie najszerszym zakresie zdolność odróżniania analitu od blisko spokrewnionych z nim substancji. Należy określić interferencję homologów, izomerów, produktów degradacji, substancji endogennych, analogów, metabolitów danej pozostałości, związków matrycowych lub każdej innej substancji mogącej powodować interferencję, a w razie potrzeby metodę należy zmienić w celu uniknięcia zidentyfikowanych interferencji. Do określenia specyficzności metody stosuje się następujące podejście:

1. Należy wybrać szereg chemicznie spokrewnionych związków lub innych substancji, które prawdopodobnie mogą współwystępować z danym związkiem i mogą być obecne w próbkach, oraz zweryfikować, czy mogą zakłócać analizę docelowego analitu lub docelowych analizów.
2. Należy przeanalizować odpowiednią liczbę reprezentatywnych próbek zerowych, np. różne partie lub partie różnych gatunków zwierząt ($n \geq 20$), i sprawdzić, czy występują jakiegokolwiek interferencje sygnałów, pików lub śladów jonów w danym regionie, w którym docelowy analit ma być eluowany.
3. Należy wzbogacić reprezentatywne próbki zerowe przy odpowiednim stężeniu substancjami, które mogą zakłócać identyfikację lub kwantyfikację analitu, oraz sprawdzić, czy dodana substancja:
 - a) może prowadzić do mylnej identyfikacji;
 - b) zakłóca identyfikację docelowego analitu;
 - c) znacząco wpływa na kwantyfikację.

2.4. Odporność

Metodę analityczną należy zbadać pod kątem jej ciągłej wydajności w różnych warunkach doświadczalnych, które obejmują np. różne warunki pobierania próbek oraz niewielkie zmiany, które mogą wystąpić w badaniach rutynowych. W celu zbadania odporności metody zmiany wprowadzone w warunkach doświadczalnych powinny być niewielkie. Należy ocenić wagę tych zmian. Każdy element charakterystyki wydajności należy ustalić dla wszystkich niewielkich zmian wykazujących istotny wpływ na wydajność analizy.

⁽¹¹⁾ Jülicher, B., Gowik, P. i Uhlig, S., „Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept” (Ocena metod wykrywania w analizie śladowej na podstawie opartej na statystyce koncepcji wewnętrznej walidacji), 1998, *Analyst*, 120, s. 173.

⁽¹²⁾ IUPAC, „Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies” (Protokół dotyczący opracowywania, przeprowadzania i interpretowania badań skuteczności analitycznej), 1995, *Pure & Applied Chem*, 67, s. 331.

⁽¹³⁾ Gowik, P., Jülicher, B. i Uhlig, S., „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” (Metoda wielopozostałościowa dotycząca niesteroidowych leków przeciwzapalnych w osoczu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem z matrycą fotodiodową. Opis metody i kompleksowa walidacja wewnętrzna), 1998, *J. Chromatogr.*, 716, s. 221.

2.5. Stabilność

Jako że niestabilność może wpłynąć na wyniki badania, należy określić stabilność wzorca kalibracji, wzorca przygotowanego w ekstrakcie z matrycy lub wzorców przygotowanych z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją, a także analitu lub składników matrycy w próbce podczas przechowywania lub analizy.

Zazwyczaj stabilność analitu jest dobrze określona dla różnych warunków przechowywania. Wymaganych informacji mogą dostarczyć doświadczenia przeprowadzane w celu monitorowania warunków przechowywania wzorców i próbek, które wykonuje się w ramach normalnego systemu akredytacji i kontroli jakości laboratorium. Jeżeli dane dotyczące stabilności analitów w matrycy są dostępne (np. można je uzyskać z laboratoriów referencyjnych UE, dane te są publicznie dostępne itp.), nie muszą one być wyznaczane przez każde laboratorium. Wykorzystanie dostępnych danych dotyczących stabilności analitów w roztworze i matrycy jest jednak dopuszczalne wyłącznie w przypadku zastosowania identycznych warunków.

W przypadku gdy wymagane dane dotyczące stabilności nie są dostępne, należy zastosować poniższe podejścia.

2.5.1. Oznaczanie stabilności analitu w roztworze

- Należy sporządzić świeże roztwory podstawowe analitu lub analitów i rozcieńczyć zgodnie z instrukcjami dotyczącymi badań w celu uzyskania wystarczającej liczby podwielokrotności (np. 40) dla każdego wybranego stężenia. Próbkę powinny być przygotowane z:
 - roztworów analitu, które wykorzystuje się do wzbogacania;
 - roztworów analitu, które wykorzystuje się do ostatecznej analizy;
 - wszelkich innych roztworów będących przedmiotem zainteresowania (np. derywatyzowanych wzorców).
- Należy zmierzyć zawartość analitu w świeżo sporządzonym roztworze zgodnie z instrukcjami dotyczącymi badań.
- Należy dozować właściwe ilości do odpowiednich pojemników, umieścić etykiety i przechowywać zgodnie z warunkami dotyczącymi światła i temperatury określonymi na schemacie przedstawionym w tabeli 7. Czas przechowywania należy ustalić z uwzględnieniem stosowanej praktyki analitycznej, przy czym proces przechowywania powinien się optymalnie zakończyć z chwilą zaobserwowania pierwszych oznak degradacji podczas identyfikacji lub kwantyfikacji. Jeżeli podczas badania stabilności nie zostaną zaobserwowane żadne oznaki degradacji, czas przechowywania w ramach badania stabilności powinien być równy maksymalnemu okresowi przechowywania roztworu.
- Należy obliczyć stężenie analitu lub analitów w każdej podwielokrotności w porównaniu ze stężeniem analitu w świeżo sporządzonym roztworze, zgodnie z poniższym wzorem:

$$\text{pozostały analit (\%)} = C_1 \times 100 / C_{\text{świeży}}$$

$$C_1 = \text{stężenie w punkcie czasowym } i$$

$$C_{\text{świeży}} = \text{stężenie świeżego roztworu}$$

Średnia wartość pięciu roztworów replik, które były przechowywane, nie może się różnić o więcej niż 15 % od średniej wartości pięciu świeżo przygotowanych roztworów replik. Jako podstawę do obliczenia różnicy procentowej należy zastosować średnią wartość pięciu świeżo przygotowanych roztworów.

Tabela 7

Schemat oznaczania stabilności analitu w roztworze

| | -20 °C | + 4 °C | + 20 °C |
|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Ciemno | 10 podwielokrotności | 10 podwielokrotności | 10 podwielokrotności |
| Jasno | | | 10 podwielokrotności |

2.5.2. Oznaczanie stabilności analitu lub analitów w matrycy

- Jeżeli istnieje taka możliwość, należy wykorzystać pobrane próbki. Jeżeli nie jest dostępna żadna pobrana matryca, wykorzystuje się matrycę zerową wzbogaconą analitem.

2. Jeżeli dostępna jest pobrana matryca, określa się stężenie w matrycy, gdy jest ona jeszcze świeża. Kolejne podwielokrotności homogenizowanej pobranej matrycy przechowuje się w temperaturze $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub niższej, jeśli jest to wymagane, i określa się stężenia analitu, dopóki próbka znajduje się w laboratorium.
3. Jeżeli nie jest dostępna żadna pobrana matryca, należy zhomogenizować matrycę zerową. Matrycę należy podzielić na pięć podwielokrotności. Każdą podwielokrotność należy wzbogacić analitem, który najlepiej jest przygotować w niewielkiej ilości roztworu wodnego. Jedną podwielokrotność należy przeanalizować bezzwłocznie. Pozostałe podwielokrotności należy przechowywać w temperaturze co najmniej $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lub w razie potrzeby niższej i przeanalizować po krótko-, średnio- i długoterminowym przechowywaniu, biorąc pod uwagę zastosowane metody analityczne.
4. Należy odnotować maksymalny dopuszczalny czas przechowywania i optymalne warunki przechowywania.

Średnia wartość pięciu roztworów replik, które były przechowywane, nie może się różnić o więcej, niż wynosi odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna metody, od średniej wartości pięciu świeżo przygotowanych roztworów replik. Jako podstawę do obliczenia różnicy procentowej należy zastosować średnią wartość pięciu świeżo przygotowanych roztworów.

2.6. Decyzyjna wartość graniczna na potrzeby potwierdzenia (CCa)

CCa ustala się dla metod potwierdzających. CCa należy ustalić w warunkach zgodnych z wymogami dotyczącymi identyfikacji lub identyfikacji z kwantyfikacją określonymi w rozdziale 1 „Kryteria wydajności i inne wymogi dla metod analitycznych”.

W celu kontroli zgodności próbek złożona standardowa niepewność pomiaru została już uwzględniona w wartości CCa (decyzyjna wartość graniczna na potrzeby potwierdzenia).

1. W przypadku niedopuszczonych lub zakazanych substancji farmakologicznie czynnych CCa oblicza się w następujący sposób:
 - a) Metoda 1: poprzez procedurę krzywej wzorcowej zgodnie z normą ISO 11843-1:1997⁽¹⁴⁾ (określoną tutaj jako wartość krytyczna zmiennej stanu netto). W tym przypadku należy użyć materiału zerowego, który zostaje wzbogacony na poziomie i powyżej RPA lub LCL w jednakowo odległych krokach. Należy przeanalizować próbki. Po identyfikacji należy sporządzić wykres sygnału, o ile to możliwe, lub ponownie obliczonego stężenia w stosunku do dodanego stężenia. Odpowiadające stężenie w punkcie przecięcia z osią y plus 2,33-krotność odchylenia standardowego odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej w punkcie przecięcia równa się decyzyjnej wartości granicznej. Metodę tę stosuje się wyłącznie do analiz ilościowych. Decyzyjne wartości graniczne uzyskane w ramach tego podejścia należy zweryfikować poprzez analizę matrycy zerowej wzbogaconej na poziomie obliczonej decyzyjnej wartości granicznej.
 - b) Metoda 2: analizując co najmniej 20 reprezentatywnych materiałów zerowych dla każdej matrycy, aby móc obliczyć stosunek sygnału do szumu w oknie czasowym, w którym spodziewany jest analit. Jako decyzyjną wartość graniczną można wykorzystać trzykrotność stosunku sygnału do szumu. Metodę tę stosuje się do analiz ilościowych i jakościowych. Decyzyjne wartości graniczne uzyskane w ramach tego podejścia należy zweryfikować poprzez analizę matrycy zerowej wzbogaconej na poziomie obliczonej decyzyjnej wartości granicznej.
 - c) Metoda 3: $CCa = LCL + k$ (jednostronny, 99 %) \times (złożona) standardowa niepewność pomiaru na poziomie LCL

W przypadku niedopuszczonych lub zakazanych substancji farmakologicznie czynnych w zależności od doświadczenia dotyczącego walidacji (i jego odpowiednich stopni swobody) można rozsądnie zastosować rozkład t lub – jeżeli za podstawę przyjmuje się rozkład Gaussa (jednostronny, $n=\infty$) – należy zastosować współczynnik k równy 2,33.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna i poprawność są odpowiednie do określenia (złożonej) standardowej niepewności pomiaru, jeżeli zostały wyznaczone z uwzględnieniem wszystkich odpowiednich oddziałujących czynników.

Metodę 2 służącą do obliczania CCa można stosować wyłącznie do dnia 1 stycznia 2026 r. w przypadku metod zwalidowanych przed datą wejścia w życie niniejszego rozporządzenia. W przypadku metod zwalidowanych po dacie wejścia w życie niniejszego rozporządzenia należy stosować wyłącznie metody 1 lub 3.

⁽¹⁴⁾ ISO 11843-1:1997 Zdolność wykrywania – Część 1: Terminologia.

2. W przypadku substancji dopuszczonych CC α oblicza się w następujący sposób:

- a) W przypadku substancji dopuszczonych w układach matryca/gatunek, dla których określono MLP lub MZ:
- Metoda 1: poprzez procedurę krzywej wzorcowej zgodnie z normą ISO 11843-1:1997 (określona tutaj jako wartość krytyczna zmiennej stanu netto). W tym przypadku należy użyć materiału zerowego, który zostaje wzbogacony na poziomie i powyżej MLP lub MZ w jednakowo odległych krokach. Należy przeanalizować próbki. Po identyfikacji należy sporządzić wykres sygnału, o ile to możliwe, lub ponownie obliczonego stężenia w stosunku do dodanego stężenia. Odpowiadające stężenie na poziomie MLP lub MZ plus 1,64-krotność odchylenia standardowego odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej przy dopuszczalnej wartości granicznej równa się decyzyjnej wartości granicznej ($\alpha = 5\%$).
 - Metoda 2: $CC\alpha = MLP \text{ (lub MZ)} + k \text{ (jednostronny, } 95\% \text{)} \times \text{(złożona) standardowa niepewność pomiaru na poziomie MLP lub MZ.}$

W przypadku substancji dopuszczonych w zależności od doświadczenia dotyczącego walidacji (i jego odpowiednich stopni swobody) można rozsądnie zastosować rozkład t lub – jeżeli za podstawę przyjmuje się rozkład Gaussa (jednostronny, $n=\infty$) – należy zastosować współczynnik k równy 1,64.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna i poprawność są odpowiednie do określenia (złożonej) standardowej niepewności pomiaru, jeżeli zostały wyznaczone z uwzględnieniem wszystkich odpowiednich oddziałujących czynników.

W przypadku substancji farmakologicznie czynnych, dla których MLP jest ustalony dla sumy różnych substancji, w celu oceny sumy substancji w mierzonej próbce – jako CC α należy stosować CC α substancji o najwyższym stężeniu w próbce.

- b) W przypadku substancji dopuszczonych w układach matryca/gatunek, dla których nie określono MLP, pozostałości nie występują, chyba że miało miejsce dopuszczone leczenie, o którym mowa w art. 11 dyrektywy 2001/82/WE. W przypadku substancji dopuszczonych, w odniesieniu do których nie wyznaczono MLP, do celów obliczenia CC α należy wykorzystać kaskadowy MLP wyznaczony zgodnie z rozporządzeniem wykonawczym Komisji (UE) 2018/470⁽¹⁵⁾. Należy zastosować metodę 1 lub 2 określone w powyższym punkcie, jednak „MLP” odpowiada „0,5-krotności kaskadowego MLP, przy docelowym założeniu 0,1-krotności kaskadowego MLP, jeżeli jest to racjonalnie wykonalne”.

2.7. Zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych(CC β)

CC β ustala się dla metod przesiewowych. CC β należy ustalić zgodnie z rozdziałem 1 niniejszego załącznika „Kryteria wydajności i inne wymogi dla metod analitycznych” oraz z uwzględnieniem wymogów zawartych w tabeli 5. Pełne wymogi w zakresie identyfikacji (por. rozdziały 1.2.3, 1.2.4 i 1.2.5) nie muszą być jednak stosowane w odniesieniu do metod przesiewowych.

1. W przypadku niedopuszczonych lub zakazanych substancji farmakologicznie czynnych należy zapewnić, by błąd β wynosił maksymalnie 5%. CC β oblicza się w następujący sposób:

- Metoda 1: procedura krzywej wzorcowej zgodnie z normą ISO 11843-1:1997 (określona tutaj jako minimalna wykrywalna wartość zmiennej stanu netto). W tym przypadku należy użyć reprezentatywnego materiału zerowego, który zostaje wzbogacony na poziomie RPA i poniżej lub – jeżeli nie wyznaczono RPA – około STC (przesiewowe stężenie docelowe), w jednakowo odległych krokach. Należy przeanalizować próbki. Należy sporządzić wykres sygnału w stosunku do dodanego stężenia. Odpowiadające stężenie na poziomie STC plus 1,64-krotność odchylenia standardowego odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej średniej zmierzonej zawartości przy STC równa się zdolności wykrywania. Ekstrapolację znacznie poniżej najniższego poziomu wzbogacania (< 50% najniższego poziomu wzbogacania) należy potwierdzić danymi doświadczalnymi na etapie walidacji.
- Metoda 2: badanie wzbogaconego materiału zerowego przy stężeniu na poziomie STC i powyżej. Dla każdego poziomu stężenia należy przeanalizować 20 wzbogaconych próbek zerowych w celu zapewnienia rzetelnej podstawy tego oznaczenia. Poziom stężenia, przy którym pozostaje jedynie $\leq 5\%$ fałszywie zgodnych wyników, równa się zdolności wykrywania metody.
- Metoda 3: $CC\beta = STC + k \text{ (jednostronny, } 95\% \text{)} \times \text{(złożona) standardowa niepewność pomiaru na poziomie lub powyżej STC}$

⁽¹⁵⁾ Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) 2018/470 z dnia 21 marca 2018 r. w sprawie szczegółowych przepisów dotyczących maksymalnych limitów pozostałości, które należy uwzględnić do celów kontroli środków spożywczych uzyskanych ze zwierząt leczonych w UE na podstawie art. 11 dyrektywy 2001/82/WE (Dz.U. L 79 z 22.3.2018, s. 16).

W przypadku niedopuszczonych lub zakazanych substancji farmakologicznie czynnych w zależności od doświadczenia dotyczącego walidacji (i jego odpowiednich stopni swobody) można rozsądnie zastosować rozkład t lub – jeżeli za podstawę przyjmuje się rozkład Gaussa (jednostronny, $n=\infty$) – należy zastosować współczynnik k równy 1,64.

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna i poprawność są odpowiednie do określenia (złożonej) standardowej niepewności pomiaru, jeżeli zostały wyznaczone z uwzględnieniem wszystkich odpowiednich oddziałujących czynników.

2. W przypadku substancji dopuszczonych należy zapewnić, by błąd β wynosił maksymalnie 5 %. $CC\beta$ oblicza się w następujący sposób:

a) Metoda 1: poprzez procedurę krzywej wzorcowej zgodnie z normą ISO 11843-1:1997 (określoną tutaj jako minimalna wykrywalna wartość zmiennej stanu netto). W tym przypadku należy użyć reprezentatywnego materiału zerowego, który zostaje wzbogacony na poziomie dopuszczalnej wartości granicznej i poniżej, począwszy od STC, w jednakowo odległych krokach. Należy przeanalizować próbki i zidentyfikować analit lub anality. Należy obliczyć odchylenie standardowe średniej zmierzonej zawartości przy STC.

Odpowiadające stężenie na poziomie STC plus 1,64-krotność odchylenia standardowego odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej średniej zmierzonej zawartości przy STC równa się zdolności wykrywania.

b) Metoda 2: poprzez badanie wzbogaconego materiału zerowego przy poziomach stężenia poniżej dopuszczalnej wartości granicznej. Dla każdego poziomu stężenia należy przeanalizować 20 wzbogaconych próbek zerowych w celu zapewnienia rzetelnej podstawy tego oznaczenia. Poziom stężenia, przy którym pozostaje jedynie $\leq 5\%$ fałszywie zgodnych wyników, równa się zdolności wykrywania metody.

c) Metoda 3: $CC\beta = STC + k$ (jednostronny, 95 %) \times (złożona) standardowa niepewność pomiaru na poziomie STC lub powyżej

W przypadku substancji dopuszczonych w zależności od doświadczenia dotyczącego walidacji (i jego odpowiednich stopni swobody) można rozsądnie zastosować rozkład t lub – jeżeli za podstawę przyjmuje się rozkład Gaussa (jednostronny, $n=\infty$) – należy zastosować współczynnik k równy 1,64 (niezależnie od tego, czy w ramach zastosowania kaskadowego, czy też w ramach zwykłego zastosowania MLP).

Odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna i poprawność są odpowiednie do określenia (złożonej) standardowej niepewności pomiaru, jeżeli zostały wyznaczone z uwzględnieniem wszystkich odpowiednich oddziałujących czynników.

W przypadku substancji farmakologicznie czynnych, dla których MLP jest ustalony dla sumy różnych substancji, jako $CC\beta$ w celu oceny sumy substancji w mierzonej próbce należy stosować $CC\beta$ substancji o najwyższym stężeniu w próbce.

2.8. Krzywe wzorcowe

W przypadku stosowania krzywych wzorcowych do kwantyfikacji:

- 1) w budowaniu krzywej należy wykorzystać co najmniej pięć poziomów (w tym poziom zero), najlepiej równo od siebie oddalonych;
- 2) należy opisać zakres roboczy krzywej;
- 3) należy opisać wzór matematyczny krzywej oraz zgodność danych z krzywą (współczynnik determinacji R^2);
- 4) należy opisać zakresy akceptowalności dla parametrów krzywej.

W przypadku krzywych wzorcowych opartych na roztworze wzorcowym, wzorcach przygotowanych w ekstrakcie z matrycy lub wzorcach przygotowanych z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją należy wskazać dopuszczalne zakresy dla parametrów krzywej wzorcowej, które mogą się różnić w zależności od serii.

2.9. Odzysk bezwzględny

Odzysk bezwzględny metody należy ustalić wówczas, gdy nie zastosowano żadnego wzorca wewnętrznego ani kalibracji z użyciem wzorca przygotowanego z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją.

Jeżeli wymogi dotyczące poprawności są spełnione zgodnie z tabelą 1, można zastosować stały współczynnik korekty. W przeciwnym razie należy zastosować współczynnik odzysku uzyskany dla tej konkretnej partii. Alternatywnie zamiast współczynnika korekty odzysku stosuje się procedurę dodawania wzorca ⁽¹⁶⁾ lub wzorzec wewnętrzny.

Odzysk bezwzględny oblicza się dla co najmniej sześciu reprezentatywnych partii matrycy.

Podwielokrotność matrycy zerowej należy wzbogacić analitem przed ekstrakcją, a drugą podwielokrotność matrycy zerowej należy wzbogacić po przygotowaniu próbki przy odpowiednim poziomie stężenia oraz ustalić stężenie analitu.

Odzysk oblicza się w następujący sposób:

Odzysk (analitu) = (wzorzec przygotowany z matrycy wzbogaconej przed ekstrakcją)/(wzorzec przygotowany w ekstrakcie z matrycy) × 100

2.10. Względne efekty matrycowe

Względne efekty matrycowe należy określić we wszystkich przypadkach. Może się to odbyć w ramach procesu walidacji albo odrębnych doświadczeń. Względny efekt matrycowy oblicza się dla co najmniej 20 różnych próbek zerowych (matryca/gatunek) zgodnie z zakresem metody, np. ujmując różne gatunki.

Matrycę zerową należy wzbogacić po ekstrakcji analitem na poziomie RPA, MLP lub MZ oraz poddać analizie wraz z czystym roztworem analitu.

Względny efekt matrycowy lub współczynnik matrycy (MF) oblicza się w następujący sposób:

$$\text{MF (wzorzec)} = \frac{\text{powierzchnia piku wzorca MMS}}{\text{powierzchnia piku roztworu wzorcowego}}$$

$$\text{MF (IS)} = \frac{\text{powierzchnia piku MMS IS}}{\text{powierzchnia piku roztworu IS}}$$

$$\text{MF (wzorzec znormalizowany dla IS)} = \frac{\text{MF (wzorzec)}}{\text{MF (IS)}}$$

IS: wzorzec wewnętrzny

MMS: wzorzec przygotowany w ekstrakcie z matrycy

Współczynnik zmienności nie może być większy niż 20 % dla MF (wzorca znormalizowanego dla IS).

ROZDZIAŁ 3

KONTROLA JAKOŚCI PODCZAS RUTYNOWYCH ANALIZ – CIĄGŁA WERYFIKACJA WYDAJNOŚCI METODY

Spełnione muszą być wymagania dotyczące zapewniania jakości wyników analiz określone w rozdziale 7.7 normy ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁷⁾.

Podczas rutynowych analiz preferowaną formą dowodu potwierdzającego wydajność metody jest analiza certyfikowanego materiału odniesienia (CRM). Ponieważ CRM, które zawierają odpowiednie anality przy wymaganych poziomach stężenia, są rzadko dostępne, jako wariant alternatywny można wykorzystać również materiały odniesienia dostarczone i scharakteryzowane przez laboratoria referencyjne UE lub laboratoria posiadające akredytację ISO/IEC 17043:2010 ⁽¹⁸⁾. Innym wariantem alternatywnym są wewnętrzne materiały odniesienia podlegające regularnej kontroli.

Ciągłą weryfikację wydajności metody podczas rutynowych analiz należy przeprowadzać na etapie badania przesiewowego i etapie potwierdzania.

⁽¹⁶⁾ Ilość dodanego wzorca analitycznego może być na przykład dwa do pięciu razy większa od szacowanej ilości analitu w próbce. Procedura ta ma na celu ustalenie zawartości analitu w próbce, uwzględniając odzysk procedury analitycznej.

⁽¹⁷⁾ ISO/IEC 17025: 2017 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących (rozdział 7.7).

⁽¹⁸⁾ ISO/IEC 17043:2010 Ocena zgodności – Ogólne wymagania dotyczące badania biegłości.

1. Etap badania przesiewowego

W przypadku każdej serii (partii) przeprowadzonych analiz należy jednocześnie przeanalizować zestaw następujących próbek do celów kontroli jakości:

- a) próbkę kontrolną służącą do oceny przydatności przyrządu do pracy w systemie, najlepiej specyficzną dla danej metody;
- b) próbki do celów kontroli jakości wzbogacone na poziomie stężenia bliskiego STC, a najlepiej na poziomie CC β w badaniach przesiewowych w przypadku dopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych, a także w przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych;
- c) zgodne próbki kontrolne (próbki zerowe) oraz – w stosownych przypadkach – odczynniki do próbek zerowych.

2. Etap potwierdzenia

W przypadku każdej serii (partii) przeprowadzonych analiz należy jednocześnie przeanalizować zestaw następujących próbek do celów kontroli jakości:

- a) próbkę kontrolną służącą do oceny przydatności przyrządu do pracy w systemie, najlepiej specyficzną dla danej metody;
- b) próbki do celów kontroli jakości wzbogacone na poziomie stężenia bliskiego MLP lub MZ w przypadku dopuszczonych substancji farmakologicznie czynnych bądź bliskiego RPA lub LCL w przypadku substancji zakazanych lub niedopuszczonych (niezgodne próbki kontrolne);
- c) zgodne próbki kontrolne (próbki zerowe) oraz – w stosownych przypadkach – odczynniki do próbek zerowych.

Zaleca się następującą kolejność w przypadku próbek do celów kontroli jakości: próbka kontrolna służąca do oceny przydatności przyrządu do pracy w systemie, zgodna próbka kontrolna, próbka lub próbki do potwierdzenia, ponownie zgodna próbka kontrolna oraz wzbogacona próbka do celów kontroli jakości (niezgodne próbki kontrolne).

W przypadku metod ilościowych w odniesieniu do każdej partii próbek urzędowych należy przeanalizować i zmierzyć krzywą wzorcową przed wyżej wymienionymi próbkami lub po tych próbkach.

W miarę możliwości należy ocenić poprawność (na podstawie próbek wzbogaconych) wszystkich docelowych analiz w niezgodnych próbkach kontrolnych za pośrednictwem tabel kontroli jakości zgodnie z rozdziałem 7.7 normy ISO/IEC 17025:2017. Jeżeli wymaga to nieproporcjonalnie dużej liczby oznaczeń poprawności, liczbę analiz można zmniejszyć do liczby analiz reprezentatywnych.

ROZDZIAŁ 4

ROZSZERZENIE ZWALIDOWANEGO ZAKRESU UPRIEDNIO ZWALIDOWANEJ METODY

Czasami konieczne jest rozszerzenie zakresu uprzednio kompleksowo zwalidowanej metody. W takich przypadkach zakres powinien zostać rozszerzony w sposób skuteczny i uzasadniony z analitycznego punktu widzenia. Cel ten można osiągnąć, dokonując walidacji na zmniejszonej liczbie próbek (np. połowie liczby próbek) w porównaniu z pełną walidacją.

Rodzaj i liczbę zmian, które mają zostać zwalidowane w ramach pojedynczego ograniczonego schematu walidacji, należy jednak każdorazowo ustalić w oparciu o wiedzę specjalistyczną i wcześniejsze doświadczenia, np. zmiana techniki wykrywania wymagałaby w każdym przypadku pełnej walidacji.

Co do zasady w celu zapewnienia ciągłości ważności metody jej wydajność należy stale monitorować i porównywać z pierwotnie uzyskanymi parametrami walidacyjnymi. W idealnym scenariuszu ciągła kontrola wydajności metody powinna być zaplanowana w taki sposób, by brakujące dane na potrzeby pełnej walidacji mogły być gromadzone w czasie (np. za pomocą kilku punktów danych pochodzących z próbek do celów kontroli jakości w każdej serii analitycznej).

4.1. Rozszerzenie zakresu metod w odniesieniu do zakresu stężeń

Ze względu na zmiany MLP, MZ i RPA konieczne może być dostosowanie zakresu stężenia, w odniesieniu do którego metoda została zwalidowana. W takim przypadku dopuszcza się zastosowanie ograniczonego schematu walidacji.

Krzywe wzorcowe w odniesieniu do zmienionego zakresu należy sporządzić zgodnie ze zwalidowaną procedurą. Należy przeanalizować różne partie wzbogacone na różnych poziomach stężenia (por. rozdziały 2.2.1 i 2.2.2). Wartości poprawności, powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej/precyzji pośredniej powinny mieścić się w dopuszczalnym zakresie w porównaniu z odpowiadającymi wartościami w ramach pierwotnie zwalidowanej metody. W stosownych przypadkach należy ponownie obliczyć CC β (metody przesiewowe) oraz CC α (metody potwierdzające).

4.2. **Rozszerzenie zakresu metod w odniesieniu do dodatkowych substancji**

Co do zasady rozszerzenie zakresu metody na dodatkowe związki możliwe jest wyłącznie w przypadku analitów, które są podobne pod względem struktury i cech charakterystycznych do analitów objętych już daną metodą analityczną. W takim przypadku dopuszcza się zastosowanie ograniczonego schematu walidacji. Podobnie nie dopuszcza się żadnych odstępstw od opisu metody.

Krzywe wzorcowe w odniesieniu do dodatkowych substancji należy sporządzić zgodnie ze zwalidowaną procedurą. Należy przeanalizować różne partie materiałów matrycowych wzbogacone na różnych poziomach stężenia (por. rozdziały 2.2.1 i 2.2.2). Wartości poprawności, powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej/precyzji pośredniej powinny mieścić się w zakresie porównywalnym z zakresem odpowiadających wartości pozostałych analitów w ramach pierwotnie zwalidowanej metody oraz być zgodne z wymogami określonymi w rozdziale 1.2.2. Dla nowych analitów należy obliczyć $CC\beta$ (metody przesiewowe) oraz $CC\alpha$ (metody potwierdzające).

4.3. **Rozszerzenie zakresu metod w odniesieniu do matryc/gatunków**

Decyzja o włączeniu nowych matryc lub gatunków do zwalidowanej już metody analitycznej musi być zawsze podejmowana indywidualnie w oparciu o wiedzę i doświadczenie zdobyte do tej pory podczas stosowania tej metody oraz wstępne doświadczenia służące ocenie potencjalnych efektów matrycowych i interferencji. Co do zasady będzie to możliwe wyłącznie w przypadku matryc o podobnych właściwościach oraz w przypadku analitów niekrytycznych (stabilność, wykrywalność).

Krzywe wzorcowe (w odniesieniu do wzorca lub matrycy) należy sporządzić zgodnie ze zwalidowaną procedurą. Należy przeanalizować różne partie materiału matrycowego wzbogacone na różnych poziomach stężenia (por. rozdziały 2.2.1 i 2.2.2). Wartości poprawności, powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej/precyzji pośredniej powinny mieścić się w dopuszczalnym zakresie porównywalnym z zakresem odpowiadających wartości w ramach pierwotnie zwalidowanej metody oraz być zgodne z wymogami określonymi w rozdziale 1.2.2. W zależności od podejścia walidacyjnego konieczne może być ponowne obliczenie $CC\beta$ (metody przesiewowe) lub $CC\alpha$ (metody potwierdzające).

Jeżeli wyniki nie mieszczą się w dopuszczalnym zakresie w porównaniu z wartościami osiągniętymi dla pierwotnej matrycy, konieczna jest dodatkowa pełna walidacja w celu określenia parametrów wydajności specyficznych dla danej matrycy/danego gatunku.

Jeżeli MLP dla danej substancji różnią się w przypadku określonych matryc, najprawdopodobniej trudno będzie dostosować zakres metody do dodatkowej matrycy/dodatkowego gatunku oraz stężenia, ponieważ w takim przypadku należy rozważyć dwie zmiany. W tego rodzaju przypadkach zaleca się pełną walidację.

—

ZAŁĄCZNIK II

PROCEDURY POBIERANIA PRÓBEK I POSTĘPOWANIE Z URZĘDOWYMI PRÓBKAMI**1. Liczba próbek**

Minimalną liczbę próbek należy określić w krajowym programie kontroli pozostałości. Minimalna wielkość próbek powinna być wystarczająca, aby umożliwić zatwierdzonym laboratoriom przeprowadzenie procedur analitycznych niezbędnych do zakończenia badań przesiewowych i analiz potwierdzających. W szczególności w przypadku drobiu, akwakultury, królików, zwierząt dzikich utrzymywanych w warunkach fermowych, gadów i owadów próbka składa się z jednego zwierzęcia lub ich większej liczby, w zależności od wymagań metod analitycznych. W przypadku jaj wielkość próbki wynosi co najmniej 12 jaj, w zależności od stosowanych metod analitycznych. Jeżeli kilka kategorii substancji należy przeanalizować w jednej próbce i z wykorzystaniem różnych metod analitycznych, należy odpowiednio zwiększyć wielkość próbki.

2. Podział na podpróbki

Z wyjątkiem przypadków, w których jest to technicznie niemożliwe lub nie jest wymagane przez ustawodawstwo krajowe, każda próbka musi zostać podzielona co najmniej na dwie jednakowe podpróbki, by możliwe było poddanie ich pełnej procedurze analitycznej. Podpodziału można dokonywać w miejscu pobrania próbek lub w laboratorium.

3. Identyfikowalność

Każdą próbkę pobiera się w taki sposób, by każdorazowo można było prześledzić jej drogę od gospodarstwa pochodzenia i partii zwierząt lub – w stosownych przypadkach – konkretnego zwierzęcia. W szczególności w przypadku mleka w zależności od wyboru państwa członkowskiego próbki można pobierać w jednym z następujących miejsc:

1. w gospodarstwie – z pojemnika zbiorczego;
2. na poziomie przemysłu mleczarskiego – przed rozładunkiem mleka.

4. Pojemniki na próbki

Próbki należy zbierać do odpowiednich pojemników gwarantujących utrzymanie integralności próbki i jej identyfikowalność. Pojemniki na próbki muszą w szczególności uniemożliwiać podmianę próbek, ich zanieczyszczenie krzyżowe oraz degradację. Pojemniki muszą być urzędowo zaplombowane.

5. Sprawozdanie z pobrania próbek

Z każdego pobrania próbek sporządza się sprawozdanie.

W sprawozdaniu z pobrania próbek inspektor podaje co najmniej następujące dane:

1. adres właściwych organów;
2. imię i nazwisko lub kod identyfikacyjny inspektora;
3. urzędowy numer kodu próbki;
4. datę pobrania próbek;
5. nazwę (imię i nazwisko) i adres właściciela lub osoby odpowiedzialnej za zwierzęta lub produkty pochodzenia zwierzęcego;
6. nazwę i adres gospodarstwa pochodzenia zwierząt (jeżeli próbki pobrano w gospodarstwie);
7. numer rejestracyjny zakładu – numer rzeźni;
8. dane identyfikacyjne zwierząt lub produktów;
9. gatunki zwierząt;
10. matrycę próbki;
11. w stosownych przypadkach – przyjmowane leki w okresie ostatnich czterech tygodni przed pobraniem próbek (jeżeli odbyło się ono w gospodarstwie);
12. określenie substancji lub grup substancji, pod kątem badania;
13. uwagi szczególne.

W zależności od procedury pobierania próbek należy dostarczyć kopie sprawozdania w wersji papierowej lub elektronicznej. Sprawozdanie z pobrania próbek i jego kopie należy sporządzić w sposób zapewniający ich autentyczność i ważność prawną, co może się wiązać z koniecznością opatrzenia tych dokumentów podpisem inspektora. Gdy próbki są pobierane w gospodarstwie, rolnik lub osoba go zastępująca mogą zostać poproszeni o podpisanie oryginału sprawozdania z pobrania próbek.

Oryginał sprawozdania z pobrania próbek pozostaje w posiadaniu właściwego organu, który musi zagwarantować, by żadne osoby nieupoważnione nie miały dostępu do oryginału sprawozdania.

W razie potrzeby rolnik lub właściciel zakładu może zostać powiadomiony o przeprowadzonym pobraniu próbek.

6. Sprawozdanie z pobrania próbek na potrzeby laboratorium

Sprawozdanie z pobrania próbek na potrzeby laboratorium sporządzone przez właściwe organy musi spełniać wymogi określone w rozdziale 7 normy ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁾ oraz zawierać co najmniej następujące informacje:

1. adres właściwych organów lub wyznaczonych podmiotów;
2. imię i nazwisko lub kod identyfikacyjny inspektora;
3. urzędowy numer kodu próbki;
4. datę pobrania próbek;
5. gatunki zwierząt;
6. matrycę próbki;
7. określenie substancji lub grup substancji, pod kątem badania;
8. uwagi szczególne.

Sprawozdanie z pobrania próbek na potrzeby laboratorium musi być dołączone do próbki podczas wysyłki do laboratorium.

7. Transport i przechowywanie

Właściwe warunki przechowywania i transportu każdego układu analit/matryca w celu zapewnienia stabilności analitu oraz integralności próbki należy określić w programach kontroli pozostałości. Czas transportu powinien być możliwie najkrótszy, a temperatura podczas transportu powinna być odpowiednia, aby zapewnić stabilność analitu.

Należy zwracać szczególną uwagę na właściwe obchodzenie się z pojemnikami transportowymi, na temperaturę i terminy dostarczenia próbek do właściwego laboratorium.

O każdym przypadku niezgodności z wymogami programu kontroli laboratorium musi niezwłocznie powiadomić właściwy organ.

⁽¹⁾ ISO/IEC 17025: 2017 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących (rozdział 7.7).