II

(Besluiten waarvan de publikatie niet voorwaarde is voor de toepassing)

COMMISSIE

BESCHIKKING VAN DE COMMISSIE

van 14 juli 1987

tot vaststelling van de methoden voor het opsporen van residuen van stoffen met hormonale werking en van stoffen met thyreostatische werking

(87/410/EEG)

DE COMMISSIE VAN DE EUROPESE GEMEENSCHAPPEN,

Gelet op het Verdrag tot oprichting van de Europese Economische Gemeenschap,

Gelet op Richtlijn 85/358/EEG van de Raad van 16 juli 1985 tot aanvulling van Richtlijn 81/602/EEG betreffende het verbod van bepaalde stoffen met hormonale werking en van stoffen met thyreostatische werking [1], gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3768/85 [2], en met name op artikel 5,

Overwegende dat krachtens artikel 5, lid 2, van Richtlijn 85/358/EEG de Commissie de analysemethoden voor het opsporen van residuen van stoffen met hormonale werking en van stoffen met thyreostatische werking in monsters overeenkomstig de procedure van artikel 11 van voornoemde richtlijn moet vaststellen ;

Overwegende dat krachtens artikel 4, lid 1, onder b), van Richtlijn 64/433/EEG van de Raad van 26 juni 1964 inzake gezondheidsvraagstukken op het gebied van het intracommunautaire handelsverkeer in vers vlees [3], laatstelijk gewijzigd bij Richtlijn 86/587/EEG [4], en krachtens artikel 11, lid 4, tweede alinea, van Richtlijn 85/397/EEG van de Raad van 5 augustus 1985 inzake hygiënische en veterinairrechtelijke problemen bij het intracommunautaire handelsverkeer in warmtebehandelde melk [5], gewijzigd bij Verordening (EEG) nr. 3768/85, residuen moeten worden opgespoord met wetenschappelijk erkende, in de praktijk beproefde methoden, inzonderheid die welke in de communautaire richtlijnen of in andere internationale normen zijn omschreven ;

Overwegende dat de vaststelling van de methoden voor de analyse van monsters de omschrijving van de toe te passen analysetechniek, de voorschriften voor de bemonstering, alsmede de criteria met betrekking tot de uitvoering van de analyse moet omvatten ;

Overwegende dat de vast te stellen analysemethoden voldoende verfijnd moeten zijn om de aanwezigheid van residuen van stoffen met hormonale werking en van stoffen met thyreostatische werking aan te tonen ;

Overwegende dat de bemonstering een wezenlijk onderdeel is van de analysemethode ; dat derhalve voorschriften inzake het nemen van monsters dienen te worden vastgesteld ;

Overwegende dat de Raad op 20 december 1985 Richtlijn 85/591/EEG betreffende de invoering van communautaire bemonsteringswijzen en analysemethoden voor de controle van voor menselijke voeding bestemde levensmiddelen [6] heeft vastgesteld ; dat in deze beschikking derhalve rekening moet worden gehouden met de in punt 1 van de bijlage van voornoemde richtlijn vastgestelde criteria ;

Overwegende dat de in deze beschikking vervatte maatregelen in overeenstemming zijn met het advies van het Permanent Veterinair Comité,

HEEFT DE VOLGENDE BESCHIKKING GEGEVEN :

Artikel 1

Residuen van stoffen met hormonale werking en van stoffen met thyreostatische werking in monsters worden met de volgende toegestane analysetechnieken opgespoord :

[1] PB nr. L 191 van 23. 7. 1985, blz. 46.
[2] PB nr. L 362 van 31. 12. 1985, blz. 8.
[3] PB nr. 121 van 29. 7. 1964, blz. 2012/64.
[4] PB nr. L 339 van 2. 12. 1986, blz. 26.
[5] PB nr. L 226 van 24. 8. 1985, blz. 13.
[6] PB nr. L 372 van 31. 12. 1985, blz. 50.

— immunoassay (IA),
— dunnelaagchromatografie (DLC),
— hogedrukvloeistofchromatografie (HPLC),
— gaschromatografie (GC),
— massaspectrometrie (MS),
— spectrometrie (SP).

Artikel 2

Bemonstering moet aan de onderstaande voorschriften voldoen :

1. de monsters moeten zodanig zijn dat een adequate analyse mogelijk is, de analyse kan worden herhaald en testen ter bevestiging kunnen worden uitgevoerd ;

2. de monsters moeten zodanig worden gemerkt dat in elk stadium identificatie mogelijk is ;

3. verpakking, bewaring en vervoer mogen het monster op geen enkele wijze aantasten en mogen geen invloed hebben op de uitkomsten van het onderzoek.

Artikel 3

De met betrekking tot de uitvoering van de analyse toe te passen criteria zijn in de bijlage vastgesteld.

Artikel 4

Deze beschikking wordt vóór 1 januari 1991 opnieuw bekeken om met de ontwikkeling van de wetenschappelijke en technische kennis rekening te kunnen houden.

Artikel 5

Deze beschikking is gericht tot de Lid-Staten.

Gedaan te Brussel, 14 juli 1987.

Voor de Commissie
Frans ANDRIESSEN
Vice-Voorzitter

BIJLAGE

HOOFDSTUK I : ALGEMENE CRITERIA

Inleiding

Om procedures voor de detectie van residuen objectief te kunnen beoordelen moeten er kwantitatieve gegevens beschikbaar zijn over een aantal standaardkarakteristieken van de procedures. Daarnaast moeten er voor sommige van deze karakteristieken kwantitatieve eisen worden vastgelegd, waarbij onder ander rekening wordt gehouden met het doel van de methode (bij voorbeeld screening, kwantitatieve analyse of bevestiging). In dit hoofdstuk worden de in de bijlage bij Richtlijn 85/591/EEG van de Raad van 20 december 1985 genoemde criteria gedefinieerd, zoals zij dienen te worden toegepast bij de bestudering van routinemethoden voor de analyse van residuen van stoffen met hormonale werking en stoffen met thyreostatische werking.

Definities

i) *Specificiteit*

Specificiteit is de geschiktheid van een methode om onderscheid te maken tussen de te analyseren verbinding en andere verbindingen. Dit kenmerk is vooral afhankelijk van het gebruikte meetprincipe. Er moeten tenminste bijzonderheden inzake de specificiteit worden vermeld met betrekking tot alle verbindingen waarvan kan worden verwacht dat zij bij gebruik van het beschreven meetprincipe een signaal veroorzaken, zoals homologe en analoge verbindingen en produkten van het metabolisme van het betrokken residu. Uit de bijzonderheden inzake specificiteit moet kwantitatief kunnen worden afgeleid in hoeverre de methode onder de experimentele omstandigheden een onderscheid kan maken tussen de te analyseren verbinding en de andere verbindingen.

ii) *Nauwkeurigheid*

In dit document wordt nauwkeurigheid gedefinieerd als de nauwkeurigheid van het gemiddelde. De definitie die hier zal worden gebruikt is vastgelegd in ISO-norm 3534-1977 in punt 2.83 (accuracy of the mean : The closeness of agreement between the true value and the mean result which would be obtained by applying the experimental procedure a very large number of times — nauwkeurigheid van het gemiddelde : de mate van overeenstemming tussen de werkelijke waarde en het gemiddelde resultaat dat zou worden bereikt door de experimentele procedure een zeer groot aantal malen toe te passen).

Nota bene : De nauwkeurigheid wordt vooral beperkt door :

a) toevalsfouten,

b) systematische fouten zoals bij voorbeeld een laag rendement. Bij een zeer groot aantal herhalingen benadert de nauwkeurigheid van het gemiddelde de systematische fout.

Het aantal herhalingen moet worden vermeld ten behoeve van de niet-experimentele beoordeling van de methode.

De te gebruiken maat voor de nauwkeurigheid is het verschil tussen de gemiddelde gemeten waarde voor referentiemateriaal en de werkelijke waarde, uitgedrukt als percentage van de werkelijke waarde.

iii) *Precisie ;* herhaalbaarheid in hetzelfde laboratorium (binnen laboratorium) en reproduceerbaarheid tussen laboratoria (binnen en tussen laboratoria).

De algemene statistische term „precisie" zal worden gebruikt zoals gedefinieerd in punt 2.84 van ISO-norm 3534-1977 (precision : The closeness of agreement between the results obtained by applying the experimental procedure several times under prescribed conditions — precisie : de mate van overeenstemming tussen de resultaten die worden verkregen door de experimentele procedure een aantal malen onder vastgelegde omstandigheden toe te passen).

Krachtens de bijlage van Richtlijn 85/591/EEG dienen de waarden voor de precisie van analysemethoden, die krachtens de bepalingen van deze richtlijn voor vaststelling in aanmerking komen, te worden verkregen door een collectief experiment dat bij voorkeur overeenkomstig ISO-norm 5725-1986 is uitgevoerd. Hiertoe zijn de termen herhaalbaarheid en reproduceerbarheid gedefinieerd in ISO-norm 5725-1986.

Voor een niet-experimentele voorselectie van kandidaat-methoden is het voldoende dat er gegevens beschikbaar zijn over de herhaalbaarheid. Hiertoe wordt de term herhaalbaarheid gebruikt zoals gedefinieerd in punt 2.85 a) van ISO-norm 3534-1977 (repeatability : The closeness of agreement between successive results obtained with the same method on identical test material, under the same conditions (same operator, same apparatus, same laboratory and short intervals of time) — herhaalbaarheid : de mate van overeenstemming tussen opeenvolgende resultaten die worden verkregen met dezelfde methode bij identiek testmateriaal en onder dezelfde omstandigheden (uitvoering door dezelfde persoon, met dezelfde apparatuur, in hetzelfde laboratorium en met een korte tussentijd)).

De te gebruiken maat voor de herhaalbaarheid is de variatiecoëfficiënt, zoals gedefinieerd in punt 2.35 van ISO-norm 3534-1977 (coefficient of variation : The ratio of the standard deviation to the absolute value of the arithmetic mean — variatiecoëfficiënt : het quotiënt van de standaardafwijking en de absolute waarde van het rekenkundig gemiddelde).

iv) *Aantoonbaarheidsgrens*

De aantoonbaarheidsgrens is de kleinste gemeten concentratie waaruit de aanwezigheid van de analyt met een redelijke statistische zekerheid kan worden afgeleid. Deze is gelijk aan het gemiddelde van de gemeten concentratie bij representatieve blancomonsters ($n \geq 20$) plus driemaal de standaardafwijking van het gemiddelde.

Nota bene: Indien kan worden verwacht dat factoren zoals soort, geslacht, ouderdom enz. de karakteristieken van de methoden zouden kunnen beïnvloeden, is voor iedere afzonderlijke homogene populatie waarop de methode zal worden toegepast, een partij blancomonsters vereist.

v) *Gevoeligheid*

Gevoeligheid is een maat voor de mogelijkheden van een methode om kleine verschillen in de concentratie van een analyt waar te nemen. In dit document wordt gevoeligheid gedefinieerd als de helling van de ijklijn bij de betrokken concentratie.

vi) *Uitvoerbaarheid en toepasbaarheid*

Uitvoerbaarheid is een niet-standaardkarakteristiek van een analyseprocedure. Deze is afhankelijk van het toepassingsgebied van de methode en wordt bepaald door de eisen die worden gesteld aan bij voorbeeld de verwerkingssnelheid van monsters en de kosten.

Toepasbaarheid is een lijst met de produkten waarvoor de kandidaat-methode zoals beschreven of met geringe wijzigingen kan worden toegepast.

vii) *Andere criteria die naar behoefte kunnen worden gekozen*

Beslissingsgrens

De beslissingsgrens is de laagste concentratie van de analyt die — indien aanwezig — met redelijke statistische zekerheid kan worden waargenomen en overeenkomstig de identificatiecriteria van de methode kan worden geïdentificeerd. Indien nauwkeurigheid en precisie constant blijven in het concentratiegebied rond de waarnemingsdrempel, is de beslissingsdrempel gelijk aan het gemiddelde van de gemeten concentratie bij representatieve blancomonsters plus zesmaal de standaardafwijking van het gemiddelde.

Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is de ondergrens, waarboven de concentratie van de analyt kan worden bepaald met een gespecificeerde mate van nauwkeurigheid en herhaalbaarheid (binnen hetzelfde laboratorium).

Eisen ten aanzien van nauwkeurigheid en herhaalbaarheid

Nauwkeurigheid

Bij herhaalde analyse van het referentiemonster mag de afwijking van het gemiddelde ten opzichte van de werkelijke waarde, uitgedrukt als percentage van de werkelijke waarde, niet buiten de volgende grenzen liggen :

	Grenzen
— werkelijke waarde tot en met 1 µg/kg :	—50 % tot +20 %
— werkelijke waarde meer dan 1 µg/kg en tot en met 10 µg/kg :	—30 % tot +10 %
— werkelijke waarde meer dan 10 µg/kg :	—20 % tot +10 %

Herhaalbaarheid

Bij herhaalde analyse van het referentiemonster mag de variatiecoëfficiënt (VC) van het gemiddelde niet hoger zijn dan de volgende waarde :

	VC
— gemiddelde tot en met 1 µg/kg :	0,30
— gemiddelde hoger dan 1 µg/kg en tot en met 10 µg/kg :	0,20
— gemiddelde hoger dan 10 µg/kg :	0,15

IJklijnen

Als bij de methode gebruik wordt gemaakt van ijklijnen, moet de volgende informatie worden gegeven :

— de mathematische formule waarmee de ijklijn wordt beschreven ;

— getalswaarden van de parameters van de ijklijnen met 95 % betrouwbaarheidsintervallen (onder optimale omstandigheden) ;

— aanvaardbaar gebied waarbinnen de parameters van de ijklijn van dag tot dag mogen variëren ;

— het werkgebied van de ijklijn ;

— bijzonderheden over de variatie van de variabelen die ten minste voor het werkgebied van de ijklijn geldig is.

Gevoeligheid voor storingen

Voor alle experimentele omstandigheden die in de praktijk aan fluctuaties onderhevig zouden kunnen zijn (bij voorbeeld stabiliteit van de reagentia, samenstelling van het monster, pH, temperatuur) moeten alle afwijkingen die invloed zouden kunnen hebben op de resultaten van de analyse, worden aangegeven.

Als bekend is dat bepaalde verbindingen de bepaling van de analyt kunnen storen, moet dit tevens worden aangegeven, alsmede voorstellen voor methoden om dit probleem op te lossen. Het is van het hoogste belang dat mogelijke storingen ten gevolge van matrixcomponenten worden bestudeerd. Derhalve moet ten minste het grootste monsterequivalent worden vermeld, dat geen storend effect heeft op de bepaling van de analyt (na een eventuele gespecificeerde voorzuivering van het monster).

Relatie tussen tolerantiewaarden en analysegrenzen

Voor verbindingen met een tolerantie gelijk aan nul moet de beslissingsgrens van de analysemethode voldoende laag zijn om ervoor te zorgen dat concentraties van residuen die in het algemeen zouden worden verwacht na illegaal gebruik, met een waarschijnlijkheid van ten minste 95 % zullen worden gedecteerd.

Voor verbindingen met een tolerantieniveau dat is vastgesteld op het maximale natuurlijke fysiologische niveau, mag de bepaalbaarheidsgrens niet hoger zijn dan deze tolerantie minus driemaal de standaardafwijking die optreedt bij gebruik van de methode voor een monster met een concentratie gelijk aan deze tolerantie.

Referentiemateriaal

Een referentiemateriaal is een monster van een verbinding of een afzonderlijk vervaardigd object waarvan één of verschillende eigenschappen voldoende nauwkeurig zijn bepaald, zodat het kan worden gebruikt voor de ijking van een apparaat of voor de controle op de meetmethode. Voor de certificering moet worden uitgegaan van een technisch betrouwbare methode.

Wanneer geen referentiemateriaal beschikbaar is, kunnen de relevante parameters worden bepaald door analyse van verrijkt testmateriaal.

HOOFDSTUK II : KWALITEITSCRITERIA VOOR DE INTERPRETATIE VAN RESULTATEN

1. Lijst van afkortingen en symbolen

Algemeen :

GC	= gaschromatografie.
HPLC	= hogedrukvloeistofchromatografie.
HPDLC	= hogeprestatiedunnelaagchromatografie.
HRMS	= hogeresolutiemassaspectrometrie.
IA	= immunoassay.
IR	= infrarood.
UV	= ultraviolet.
LRMS	= lageresolutiemassaspectrometrie.
MS	= massaspectrometrie.
RIA	= radioimmunoassay.
SP	= spectrometrie, bij voorbeeld diodearray.
DLC	= dunnelaagchromatografie.
/	= off-line gekoppelde technieken.
—	= on-line gekoppelde technieken.

Bij voorbeeld : HPLC/GC-MS = HPLC off-line, gevolgd door GC met on-line MS.

Voor RIA :

cpm	= tellingen per minuut.
dpm	= desintegraties per minuut.
T	= totale aan een monster toegevoegde radioactiviteit (cpm of dpm).
B	= radioactiviteit van de gebonden fractie van een monster.
Bo	= radioactiviteit van de gebonden fractie van een vlancomonster.
B/Bo	= quotiënt van de radioactiviteit van de gebonden fractie van een monster en die van een blancomonster („quotiënt binding en blanco binding").
%B/Bo	= radioactiviteit van de gebonden fractie van een monster, uitgedrukt als percentage van de blanco.
Bo/T	= quotiënt van de radioactiviteit van de gebonden fractie van een blanco en de toegevoegde activiteit („quotiënt blanco binding en totaal").
NSB	= niet-specifieke binding = aspecifieke binding (ASB).

Voor MS :

amu	= atomaire massaeenheid.
CI	= chemische ionisatie.
EI	= electron impact ionisatie.
MID	= meervoudige ionendetectie.
M	= massa.
Z	= lading.
HFB	= heptafluorboterzuur of derivaat daarvan.
MOX	= methoxime-derivaat.
TMS	= trimethylsilyl-derivaat.
MOX-TMS	= methoxime- en trimethylsilyl-derivaat.
F^+	= fragmention.
$(F+1)^+$	= natuurlijk-isotoopsateliet, 1 M/Z hoger dan het overeenkomstige isotoop-fragmention.
M^+	= molekuulion.
$(M+1)^+$	= natuurlijk-isotoopsateliet, 1 M/Z hoger dan het overeenkomstige hoofdisotoop-molekuulion.

2. Inleiding

De kwaliteitscriteria voor de interpretatie van via analysemethoden verkregen resultaten dienen overeenkomstig de in dit hoofdstuk vastgelegde eisen te worden toegepast door laboratoria die tests uitvoeren voor de detectie van residuen van verbindingen die een hormonale werking hebben en van verbindingen die een thyreostatische werking hebben. De kwaliteitscriteria zijn ontworpen met het oog op kwalitatieve analyse en zijn erop gericht fout positieve resultaten te voorkomen. Voor een positief resultaat moeten de analyseresultaten voldoen aan de kwaliteitscriteria die voor de gebruikte detectiemethode zijn vastgesteld.

3. **Definities met betrekking tot de aanwezigheid van een analyt**

3.1. Analyt : een verbinding waarvan de aanwezigheid in een testmonster moet worden aangetoond. Onder het begrip „analyt" vallen, indien van toepassing, ook de derivaten die tijdens de analyse uitgaande van de analyt worden gevormd.

3.2. Standaardmateriaal : een welbepaalde verbinding met een zo hoog mogelijke zuiverheid, die bij de analyse als referentie kan worden gebruikt.

3.3. Positief : de aanwezigheid van de analyt in het monster is volgens de methode bewezen, wanneer aan de algemene criteria en de specifieke criteria voor de gebruikte detectiemethode is voldaan. Het resultaat van de analyse is „positief".

3.4. Negatief : het resultaat van de analyse wordt als „negatief" beschouwd indien niet is voldaan aan de specifieke criteria van de gebruikte methode of indien bij de analyse de aanwezigheid van het analyt in een concentratie groter dan de beslissingsdrempel niet wordt aangetoond.

3.5. Co-chromatografie : de volgende procedure wordt uitgevoerd : de gezuiverde testoplossing wordt voor de chromatografiestap in tweeën gedeeld :

a) een deel wordt als zodanig chromatografisch gescheiden ;

b) aan het andere deel wordt het standaardmateriaal, dat moet worden aangetoond, toegevoegd en deze gemengde oplossing van analyt en standaardmateriaal wordt chromatografisch gescheiden.

De hoeveelheid toegevoegd standaardmateriaal moet ongeveer gelijk zijn aan de geschatte hoeveelheid analyt.

4. **Algemene overwegingen voor de gehele analyseprocedure**

4.1. *Algemene criteria voor de gehele procedure*

Er moet zijn aangetoond dat met de methode onderscheid kan worden gemaakt tussen de analyt en alle bekende storende materialen in de betrokken matrix.

Het fysische en chemische gedrag van de analyt tijdens de analyse mag niet te onderscheiden zijn van het gedrag van het bijbehorende standaardmateriaal in de betrokken matrix.

4.2. *Algemene criteria voor scheidingstechnieken*

In de analyse van elke partij testmonsters moeten referentiemonsters worden opgenomen die bekende hoeveelheden analyten bevatten en gelijktijdig met de testmonsters de volledige procedure doorlopen. Een andere mogelijkheid is een interne standaard aan de testmonsters toe te voegen.

4.3. *Criterium voor een eventueel toegepaste off-line fysische en/of chemische preconcentrering, zuivering en scheiding*

De analyt moet aanwezig zijn in de fractie die karakteristiek is voor het overeenkomstige standaardmateriaal in het onderhavige matrixmateriaal.

4.4. *Criterium voor een eventueel toegepaste on-line scheiding (bij voorbeeld GC)*

De analyt moet worden geëlueerd bij de retentietijd die karakteristiek is voor het overeenkomstige standaardmateriaal in het onderhavige matrixmateriaal.

4.5. *Voorbehandeling van het analysemonster*

Het analysemonster moet uitgaande van het laboratoriummonster zodanig worden voorbehandeld dat de kans op detectie van de analyt, als deze aanwezig is, maximaal is.

4.6. *Voorbehandeling van de analyseportie*

De analyseportie moet uitgaande van het analysemonster zodanig worden voorbehandeld dat de kans van detectie van de analyt, als deze aanwezig is, maximaal is.

5. **Kwaliteitseisen voor de bepaling van een analyt via RIA**

Gebruik voor screening

5.1. Het werkgebied van de ijklijn moet worden gespecificeerd en moet in het algemeen concentraties omvatten, die ten minste een factor tien verschillen.

5.2. In elke bepaling moeten controlemonsters worden opgenomen. Concentraties : nul en in het lagere, middelste en hogere gedeelte van het werkgebied. De resultaten voor deze monsters moeten overeenkomen met die van eerdere bepalingen.

5.3. Bij de beslissingsdrempel moet de variatiecoëfficiënt voor de controlemonsters minder dan 0,15 zijn.

5.4. Er zijn ten minste zes ijkpunten vereist, die adequaat moeten zijn verdeeld over de ijklijn.

5.5. De hoeveelheid teruggevonden materiaal moet worden gecontroleerd en gespecificeerd.

5.6. De ijklijn moet zijn hoogste precisie hebben in de buurt van de beslissingsgrens.

5.7. Bruikbare parameters voor kwaliteitscontrole moeten overeenkomen met die van eerdere bepalingen, bij voorbeeld Bo/T, NSB en helling en intercept van de ijklijn.

Nota bene : Fout positieve resultaten voortkomende uit systematische fouten zoals gekruiste reacties met het antilichaam en uit storingen door niet-representatief materiaal van het monster, worden niet uitgesloten door de naleving van deze kwaliteitsvoorschriften.

6. **Criteria voor de identificatie van een analyt via GC**

6.1. De analyt moet elueren bij de retentietijd die karakteristiek is voor het overeenkomstige standaardmateriaal.

6.2. De afstand tussen de karakteristieke piek van de analyt en de top van de dichtstbijzijnde piek in het chromatogram moet ten minste eenmaal de breedte op halve maximumhoogte zijn.

6.3. Voor identificatie moet bij de GC-analyse tevens co-chromatrografie worden uitgevoerd. Hierbij mag van de piek, waarvan men aanneemt dat hij wordt veroorzaakt door de analyt, alleen de intensiteit toenemen, hetgeen betekent dat de breedte op halve maximumhoogte binnen een marge van ± 10 % gelijk moet zijn aan de oorspronkelijke breedte. Hieraan wordt geacht te zijn voldaan wanneer de retentietijden identiek zijn binnen een marge van 10 % van de breedte van de piek op halve maximumhoogte.

7. **Criteria voor de identificatie van een analyt via DLC of HPDLC**

7.1. De R_f-waarde(n) van de analyt moet(en) overeenstemmen met de R_f-waarde(n) die karakteristiek is (zijn) voor het standaardmateriaal. Hieraan wordt voldaan wanneer het verschil tussen de R_f-waarde(n) van de analyt en de R_f-waarde(n) van het standaardmateriaal onder dezelfde omstandigheden kleiner is dan ± 3 %.

7.2. De vlekken van de analyt mogen visueel niet te onderscheiden zijn van de vlekken van het standaardmateriaal.

7.3. De afstand tussen de vlek van de analyt en het middelpunt van de dichtstbijzijnde vlek moet ten minste de helft van de som van de diameters van de vlekken zijn.

7.4. Voor identificatie moet bij de DLC-stap tevens co-chromatografie worden uitgevoerd. Hierbij mag van de vlek, waarvan men aanneemt dat hij wordt veroorzaakt door de analyt, alleen de intensiteit toenemen ; er mag geen nieuwe vlek verschijnen en de vlek mag visueel niet van uiterlijk veranderen.

7.5. Voor bevestiging is tweedimensionale DLC verplicht.

8. **Criteria voor de identificatie van een analyt via HPLC-SP**

8.1. De golflengte met maximale absorptie in het UV-spectrum van de analyt moet gelijk zijn aan die van het standaardmateriaal met een marge die afhankelijk is van de resolutie van het detectiesysteem. Voor detectie met diodearray is de karakteristieke marge ± 2 nm.

8.2. Het spectrum van de analyt mag voor de delen van de twee spectra met een relatieve absorptie > 10 % niet visueel verschillen van het spectrum van het standaardmateriaal. Aan dit criterium wordt voldaan wanneer dezelfde maxima aanwezig zijn en het verschil tussen de twee spectra op geen enkel waarnemingspunt groter is dan 10 % van de absorptie van het standaardmateriaal.

8.3. Voor identificatie moet bij de HPLC-analyse co-chromatografie worden uitgevoerd. Hierbij mag van de piek, waarvan men aanneemt dat hij wordt veroorzaakt door de analyt, alleen de intensiteit toenemen.

9. **Criteria voor de identificatie van een analyt via DLC-SP of HPDLC-SP**

9.1. De R_f-waarde(n) van de analyt moet(en) overeenkomen met de R_f-waarde(n) die karakteristiek is (zijn) voor het standaardmateriaal. Hieraan wordt voldaan als het verschil tussen de R_f-waarde(n) van de analyt en de R_f-waarde(n) van het standaardmateriaal onder dezelfde omstandigheden kleiner is dan 3 %.

9.2. De vlekken van de analyt mogen visueel niet te onderscheiden zijn van de vlekken van het standaardmateriaal.

9.3. De afstand tussen de vlek van de analyt en het middelpunt van de dichtstbijzijnde vlek moet ten minste de helft van de som van de diameters van de vlekken zijn.

9.4. Voor identificatie moet bij de DLC-stap bovendien co-chromatografie worden uitgevoerd. Hierbij mag van de vlek, waarvan men aanneemt dat hij wordt veroorzaakt door de analyt, alleen de intensiteit toenemen ; er mag geen nieuwe vlek verschijnen.

9.5. De golflengte met maximale absorptie in het spectrum van de analyt moet gelijk zijn aan die van het standaardmateriaal met een marge die wordt bepaald door de resolutie van het detectiesysteem.

9.6. Het spectrum van de analyt mag niet zichtbaar verschillen van het spectrum van het standaardmateriaal.

10. **Criteria voor de identificatie van een analyt via GC-HRMS**

10.1. Om in aanmerking te komen voor de benaming hoge resolutie moeten de resultaten worden verkregen met een resolutie hoger dan 9 500, waarbij de hoogte in een dal tussen twee aangrenzende pieken maximaal 10 % van de piekhoogten mag zijn.

10.2. De intensiteitsverhouding van de respons van de ionen F^+ en $(F+1)^+$ of M^+ en $(M+1)^+$ van de derivaten van het standaardmateriaal moeten gelijk zijn aan de theoretische waarde binnen een marge van A %.

10.3. De fragmentmassa van het derivaat van de analyt (bepaald door vergelijking van pieken) moet gelijk zijn aan de theoretische waarde van de overeenkomstige derivaat van het referentiemateriaal binnen een marge van B amu.

Nota bene: Voor een aantal anabole verbindingen zijn in tabel 1 van het aanhangsel voorbeelden gegeven van waarden voor A en B. De methode is echter niet beperkt tot anabole verbindingen, maar is algemeen toepasbaar.

11. **Criteria voor de identificatie van een analyt via GC-LRMS**

11. *Gaschromatografische criteria*

11.1.1. De retentietijd van de analyt bij GC moet gelijk zijn aan die van de referentiemonsters binnen een marge van ± 5 seconden.

11.1.2. Als een interne standaard wordt gebruikt, moet de relatieve retentietijd (B/A) van de analyt gelijk zijn aan die van het standaardmateriaal binnen een marge van ± 5/A in de onderhavige matrix.

Hierbij is :

A = de absolute retentietijd van een interne standaard in seconden ;

B = de absolute retentietijd van de analyt in seconden ;

11.2. *Massaspectrometrische criteria*

11.2.1. Alle gemeten ionen moeten afkomstig zijn van analyt dat met één enkele retentietijd wordt geëlueerd.

11.2.2. De intensiteit van ten minste twee en bij voorkeur meer ionen moet worden bepaald.

Nota bene: Voor een betrouwbare identificatie van een analyt moet een adequaat aantal ionen worden geselecteerd waarbij het aantal afhankelijk is van de desbetreffende verbinding en van de specificiteit van de gekozen ionen. Voor de meeste derivaten van anabole verbindingen die zijn opgenomen in de tabellen 2 tot en met 6 van het aanhangsel, wordt de selectie van ten minste vier ionen aanbevolen.

11.2.3. De relatieve intensiteiten van de gedetecteerde ionen, uitgedrukt als percentage van de intensiteit van het ion met de hoogste intensiteit (basispiek), moet gelijk zijn aan die voor het desbetreffende referentiemonster binnen een marge van ± 20 % (CI-ionisatie) of ± 10 % (EI-ionisatie).

11.2.4. Het molekuulion van het standaardmateriaal moet, indien mogelijk, voorkomen in het MID-spectrum van de analyt

Nota bene: In de tabellen 2 tot en met 6 van het aanhangsel worden als voorbeeld bijzonderheden over de molekuulionen en fragmentionen van de TMS-, MOX-TMS-, MOX- en HFB-derivaten van een aantal anabole verbindingen en verwante stoffen gegeven. De criteria gelden echter niet alleen voor deze derivaten, maar zijn algemeen toepasbaar.

12. **Criteria voor de identificatie van een analyt via IR-spectrometrie**

12.1. *Definitie van adequate pieken*

Adequate pieken zijn absorptiemaxima in het IR-spectrum van een standaardmateriaal, die voldoen aan de volgende eisen.

12.1.1. Het absorptiemaximum ligt in het golfgetalgebied van 1 800-500 cm^{-1}.

12.1.2. De intensiteit van de absorptie is niet minder dan :

12.1.2.1. een specifieke molaire absorptiecoëfficiënt van

— 40 ten opzichte van de nullijn en

— 20 ten opzichte van de basislijn

of

12.1.2.2. een relatieve absorptie van :

— 12,5 % van de piek met maximale absorptie in het gebied 1 800-500 cm^{-1}, wanneer beide ten opzichte van de nullijn worden gemeten en

— 5 % van de piek met maximale absorptie in het gebied 1 800-500 cm^{-1}, wanneer beide ten opzichte van de basislijn van de piek worden gemeten.

Nota bene: Hoewel adequate pieken volgens punt 12.1.2.1 vanuit theoretisch oogpunt de voorkeur verdienen, zijn adequate pieken volgens punt 12.1.2.2 in de praktijk gemakkelijker te bepalen.

12.2. *Aantal adequate pieken*

Er moeten minimaal zes adequate pieken zijn.

12.3. *Aanduiding van adequate pieken*

De exacte positie van de adequate pieken, in gehele golfgetallen, fungeert als een objectieve, gedigitaliseerde parameter voor de beoordeling van spectra van monsters.

Nota bene: In tabel 7 van het aanhangsel worden de adequate pieken in de IR-spectra van 49 anabole stoffen en verwante verbindingen vermeld. De methode is echter niet alleen bruikbaar voor anabole verbindingen, maar is algemeen toepasbaar.

12.4. *Gebruik van tabellen met adequate pieken*

12.4.1. De positie van de pieken in het IR-spectrum van de analyt wordt vergeleken met de positie van de adequate pieken in het IR-spectrum van het standaardmateriaal.

12.4.2. Het aantal pieken in het IR-spectrum van de analyt, waarvan de frequentie binnen een marge van ± 1 cm^{-1} overeenkomt met een adequate piek in het IR-spectrum van het standaardmateriaal, wordt bepaald.

12.4.3. De „score" van het standaardmateriaal in het spectrum van de analyt wordt berekend.

12.4.4. Definitie van „score"

De „score" is het percentage van de adequate pieken dat in het IR-spectrum van de analyt wordt teruggevonden.

12.5. *Criteria*

12.5.1. De score moet ten minste 50 % zijn.

12.5.2. De procedure is alleen van toepassing op de absorptiepieken in het spectrum van het monster met een intensiteit van ten minste driemaal de piek-tot-piek-ruis.

AANHANGSEL

TABEL 1

Gegevens voor bevestiging van de aanwezigheid van anabole verbindingen via HRMS

Derivaat (1)	Ionenmassa		Intensiteitsverhouding		Ionenmassa	
	F^+-ion of M^+-ion, M/Z nominale waarde (amu)	$(F+1)^+$-ion of $(M+1)^+$-ion, M/Z nominale waarde (amu)	Theoretische waarde	A-marge (%)	M/Z theoretische waarde (2) (amu)	B M/Z marge (amu)
DES-TMS	M^+ 412	413	0,3777	8	412,2254	0,0012
DE-TMS	M^+ 410	411	0,3772	8,5	410,2097	0,0012
HEX-TMS	F^+ 207	208	0,1889	17	207,1205	0,0007
NT-TMS	M^+ 346	347	niet toegepast		346,2328	0,0015
NT-TMS	F^+ 256	257	niet toegepast		256,1827	0,0015
NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	niet toegepast		375,2593	0,0015
epiNT-MOX-TMS	M^+ 375	376	niet toegepast		375,2593	0,0015
E2-di-TMS	M^+ 416	417	niet toegepast		416,2567	0,0015

(1) DES = diëthylstilboestrol.
DE = dieenoestrol.
HEX = hexoestrol.
NT = 19-nortestosteron-17β (nandrolone).
epiNT = 19-nortestosteron-17α.
E2 = oestradiol-17β.

(2) Berekend op basis van ^{12}C-isotoop = 12,0000 amu.

TABEL 2

TMS-derivaten van een aantal anabole stoffen en verwante verbindingen. Voor bevestiging met LRMS (EI-ionisatie) te gebruiken ionen

	MW	M/Z (1)			
Dieenoestrol	410	410	395	381	
Diëthylstilboestrol	412	412	397	383	
5α-Oestraan-(3β,17α)-diol	422	407	332	242	201
17α-Oestradiol	416	416	401	326	285
17β-Oestradiol	416	416	401	326	285
17β-Oestradiol-16,16,17(d3) (2)	419	419	404	329	285
Ethinyloestradiol	440	440	425	300	285
Hexoestrol	414	207	191	179	
Methandrostenolon	372	372	357	302	282
Methyltestosteron	374	359	317	304	284
α-Nortestosteron	346	346	331	256	215
β-Nortestosteron	346	346	331	256	215
Testosteron	360	360	345	270	226
17α-Trenbolqn	342	342	252	237	211
17β-Trenbolon	342	342	252	237	211
α-Zearalanol	538	538	523	433	307
β-Zearalanol	538	538	523	433	307
Zearalanon	464	464	449	335	307
Zearalenon	462	462	429	333	305

(1) Onderstreept ion : basispiek.
(2) Interne standaard.

TABEL 3

MOX-TMS-derivaten van een aantal anabole stoffen en verwante verbindingen. Voor bevestiging met LRMS (EI-ionisatie) te gebruiken ionen

	MW	M/Z (1)			
Medroxyprogesteron	474	474	459	443	353
Methandrostenolon	401	401	386	370	280
Methyltestosteron	403	403	313	298	282
α-Nortestosteron	375	375	360	344	285
β-Nortestosteron	375	375	360	344	285
Testosteron	389	389	374	358	268
α-Trenbolon	371	371	281	266	253
β-Trenbolon	371	371	281	266	253
Zearalanon	493	493	478	462	406
Zearalenon	491	491	460	444	333

(1) Onderstreept ion : basispiek.

TABEL 4

MOX-derivaten van een aantal anabole stoffen en verwante verbindingen. Voor bevestiging met LRMS (EI-ionisatie) te gebruiken ionen

	MW	M/Z (1)			
Medroxyprogesteronacetaat	415	415	330	312	287
Megoestrolacetaat	413	413	353	338	310
Melengoestrolacetaat	425	425	365	350	322
Trenbolonacetaat	341	341	298	281	266

(1) Onderstreept ion : basispiek.

TABEL 5

HFB-derivaten van een aantal anabole en verwante verbindingen. Voor bevestiging met LRMS (EI-ionisatie) te gebruiken ionen

	MW	M/Z (1)			
Diëthylstilboestrol	660	660	631	447	341
Dieenoestrol	658	658	629	445	341
Hexoestrol	662	332	331	304	303
17β-Oestradiol-16,16,17(d3) (2)	667	667	454	412	359

(1) Onderstreept ion : basispiek.
(2) Interne standaard.

TABEL 6

HFB-derivaten van stilbenen. Voor bevestiging met LRMS (CI-ionisatie) te gebruiken ionen

a) *Ammoniak-CI*

	MW	M/Z (1)			
Hexoestrol	662	681	<u>680</u>	484	466
Diëthylstilboestrol	660	678	482	<u>464</u>	

(1) Onderstreept ion : basispiek.

b) *Methaan-CI*

	MW	M/Z (1)			
Diëthylstilboestrol	660	661	465	<u>464</u>	
Dieenoestrol	658	659	463	462	<u>369</u>

(1) Onderstreept ion : basispiek.

Opmerkingen

1. Van sommige van bovengenoemde ionen is de relatieve intensiteit te laag (ca. 10 %) om betrouwbaar te kunnen worden gebruikt voor bevestiging.
2. De relatieve intensiteit van de ionen kan variëren met de hoeveelheid op de kolom geïnjecteerd analyt. Bij diëthylstilboestrol in lage concentraties met methaan-CI wordt ion 661 de basispiek (d.w.z. er is minder fragmentatie bij de mono-HFB-vorm). Het is derhalve van belang de relatieve intensiteit van de ionen bij de analyt te vergelijken met die voor een referentiemonster bij ongeveer dezelfde concentratie.
3. Bij ionisatie met methaan breekt het hexoestrol-molekuul in tweeën. De fragmentionen met een kleinere massa kunnen niet goed worden gescheiden van andere geëxtraheerde verbindingen.

TABEL 7

Bruikbare pieken in het IR-spectrum van anabole en verwante verbindingen

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
βE2	αE2	E2Ac	E2diAc	E2P	E2diP	E2S	E2Bz	E2ME	EE
		1 701	1 766 1 734	1 712	1 763 1 757 1 733		1 729		
1 610	1 610	1 620		1 696 1 619			1 600	1 610	1 615
1 586	1 586 1 500	1 584		1 583				1 577 1 502	1 584 1 501
1 498 1 449 1 416	1 443	1 498 1 460	1 494	1 499 1 460 1 444	1 492 1 460 1 419	1 494 1 420	1 498 1 451	1 469 1 444	1 473 1 449 1 433
1 382 1 357 1 320 1 302	1 379 1 352	1 373 1 351	1 375	1 350	1 381 1 351	1 392 1 307	1 380 1 315	1 374 1 334 1 313	1 384 1 358
1 283 1 250 1 231	1 284 1 253 1 234	1 292 1 276 1 248 1 235	1 262 1 248	1 288 1 249 1 225 1 212	1 273 1 247 1 224	1 241	1 266 1 223 1 216	1 291 1 278 1 252 1 236	1 299 1 257 1 203
1 156 1 130 1 118 1 102	1 154 1 119 1 101	1 152	1 198 1 177 1 149	1 151	1 197 1 154 1 139	1 176	1 176 1 152 1 128	1 183 1 153 1 130 1 120	1 184 1 160 1 147 1 135 1 122 1 111
1 056 1 021 1 012	1 074 1 054 1 036 1 013	1 017	1 040 1 015	1 086 1 072 1 012	1 078 1 055 1 033 1 014	1 097 1 075 1 049 1 018	1 067 1 025 1 012	1 055 1 042 1 025	1 069 1 055 1 043 1 022 1 006
962 930 917 905	994 970 945 919		946	962	917	932 908			971 930 914
874 820	866 821	873	885	878 871 816	897 807	887 866 847 822 808	889	898 870 818	880 857 823
786 733	787					770	705	785	789
		624				650	688		646 622
	573					579 519			568

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	E1	E3	Eq	Eqln	βT	αT	TAc	TP	TiC
	1 719		1 719	1 717			1 741	1 729	1 733
1 612	1 621	1 610	1 623	1 622	1 666 1 658 1 612	1 654 1 610	1 672 1 618	1 669 1 611	1 667 1 617
1 580 1 506	1 584	1 501	1 588 1 509 1 500	1 599					
1 467 1 449	1 499	1 452	1 470 1 407	1 480 1 460 1 423	1 470 1 432	1 432	1 449 1 433	1 450	1 470 1 450
1 377 1 352 1 325	1 396 1 361	1 384 1 353 1 322	1 354	1 389	1 378 1 360	1 380	1 377 1 362 1 333	1 331	1 378 1 331
1 291 1 255 1 242	1 287 1 250	1 285 1 254 1 238 1 201	1 278 1 246	1 225 1 208	1 277 1 233	1 276 1 231	1 274 1 232	1 270 1 240	1 294 1 272 1 230
1 183 1 165 1 146 1 133 1 121 1 109		1 174 1 149 1 118 1 103	1 158 1 148	1 169	1 199 1 131 1 114	1 189		1 185	1 182 1 125 1 103
1 062 1 036 1 019	1 055	1 068 1 062 1 034	1 056	1 066	1 067 1 056 1 017		1 041 1 022	1 080 1 043 1 020	1 043 1 009
967 905	920	964 943 928 917			957 943		945		941
862 844 833 823	877 819	886 871 851 818	875 810	849 817	870		863	863	864
789 702	788	787							
658 620	673	662							
		582							

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
TD	TUn	TPP	TBz	MT	MT-D9 (11)	βNT	αNT	NTP	NTD
1 734	1 738	1 734	1 709					1 741	1 734
1 670 1 618	1 674 1 610	1 672 1 615	1 673 1 617	1 664 1 611	1 651 1 607	1 666 1 619	1 663 1 643 1 615	1 650 1 620	1 676 1 619
1 471 1 415	1 473	1 455 1 424	1 452 1 435	1 450		1 412		1 448 1 422	1 465 1 453
1 379 1 352 1 327	1 379 1 335 1 315	1 381	1 316	1 374	1 370 1 348 1 332	1 335		1 346	1 381 1 332
1 291 1 256 1 216	1 276 1 249 1 208	1 298 1 270 1 229	1 275 1 229	1 297 1 278 1 234	1 274 1 232	1 259 1 228 1 206	1 258 1 211	1 265 1 202	1 258 1 212
1 180	1 172	1 171	1 178 1 110	1 190 1 156	1 188 1 173 1 153 1 128 1 104	1 133	1 135		1 177
		1 068 1 009	1 070 1 023	1 091		1 075 1 052 1 023	1 051	1 085 1 052 1 025	
		944	998 941	950	956 937	967	968	968	
867	887	862	866	873	882	885	880	884	
		748 709	719						
		699	688		692				

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
NTL	NTPP	Eti	βTB	αTB	TBA	P	MP	MPA	MGA
1 735	1 730				1 737			1 732 1 717	1 731 1 710
1 676 1 619	1 675 1 618	1 659 1 612	1 639	1 643	1 660	1 699 1 663 1 616	1 696 1 664 1 603	1 673 1 608	1 664 1 629
	1 501		1 569	1 578	1 573				1 584
1 473 1 418	1 447	1 430 1 418	1 438	1 450 1 435	1 439	1 439	1 448		1 460 1 447
1 381 1 335	1 330	1 383 1 331	1 379 1 353 1 346 1 322	1 391 1 369 1 346 1 321 1 310	1 375	1 386 1 358 1 328	1 349	1 365	1 390 1 366
1 299 1 269 1 240 1 205	1 297 1 259 1 205	1 288 1 232	1 288 1 267 1 226	1 279 1 240 1 229	1 245	1 279 1 237 1 228 1 204	1 271 1 233	1 261 1 253	1 269 1 260 1 247 1 224
1 175	1 177	1 191 1 125	1 199 1 101	1 198 1 150 1 126		1 162	1 186 1 123	1 187	1 167 1 143 1 127 1 109
1 053	1 080 1 049	1 068 1 060	1 075 1 054 1 017	1 088 1 028 1 011	1 096 1 053 1 023		1 093	1 080 1 056	1 083 1 059 1 014
	965			937	987	948		965	963
	879	869		852		871	871		878
	752 704	724		795 762					
		697							
							597		

41	42	43	44	45	46	47	48	49
MLGA	DE	DES	HEX	DEdiAc	DESdiP	Z	Cort	HCort
1 738 1 716				1 757	1 763 1 754			1 714
1 666 1 625	1 619 1 608	1 609	1 613			1 644 1 615	1 694 1 648 1 618	1 644 1 610
1 579	1 591 1 513	1 590 1 514	1 598 1 516	1 503	1 504	1 587		
1 444 1 416	1 426	1 462 1 427	1 458 1 440		1 459	1 464	1 447 1 413	1 432
1 389 1 372 1 318	1 333	1 337		1 368	1 363	1 381 1 353 1 311	1 391	
1 260 1 245 1 231 1 205	1 247 1 205	1 282 1 247 1 204	1 218	1 218	1 210	1 259 1 200	1 269	1 271 1 237
1 123	1 171 1 102	1 173 1 114	1 174 1 107	1 196 1 164	1 157	1 167	1 186 1 159	1 133 1 115
1 037		1 012		1 019	1 076 1 019	1 096 1 075	1 075 1 064 1 037	1 047 1 006
972 953 930				910		989		942 900
881	853 834 826	851 831 805	847 830 804	865	895	840	875	865
	775	721	716					
627 612	649 620	646	646	679				
551	520	586	573 510					

Gebruikte afkortingen

1. βE2	Oestradiol-17β
2. αE2	Oestradiol-17α
3. E2Ac	Oestradiol-17-acetaat
4. E2diAc	Oestradioldiacetaat
5. E2P	Oestradiol-17-propionaat
6. E2diP	Oestradioldipropionaat
7. E2S	Oestradiol-3-sulfaat
8. E2Bz	Oestradiol-3-benzoaat
9. E2ME	Oestradiol-3-methylether
10. EE	Ethinyloestradiol
11. M	Mestranol
12. E1	Oestron
13. E3	Oestriol
14. Eq	Equiline
15. Eqln	Equilenine
16. βT	Testosteron-17β
17. αT	Testosteron-17α
18. TAc	Testosteronacetaat
19. TP	Testosteronpropionaat
20. TiC	Testosteronisocaproaat
21. TD	Testosterondecanoaat
22. TUn	Testosteronundecanoaat
23. TPP	Testosteronfenylpropionaat
24. TBz	Testosteronbenzoaat
25. MT	Methyltestosteron-17α
26. MT-D9(11)	Methyltestosteron-D9(11)
27. βNT	Nortestosteron-17β
28. αNT	Nortestosteron-17α
29. NTP	Nortestosteronpropionaat
30. NTD	Nortestosterondecanoaat
31. NTL	Nortestosteronlauraat
32. NTPP	Nortestosteronfenylpropionaat
33. Eti	Ethisteron
34. βTB	Trenbolon-17β
35. αTB	Trenbolon-17α
36. TBA	Trenbolonacetaat
37. P	Progesteron
38. MP	Medroxyprogesteron
39. MPA	Medroxyprogesteronacetaat
40. MGA	Megoestrolacetaat
41. MLGA	Melengoestrolacetaat
42. DE	Dieenoestrol
43. DES	Diëthylstilboestrol
44. HEX	Hexoestrol
45. DEdiAc	Dieenoestroldiacetaat
46. DESdiP	Diëthylstilboestroldipropionaat
47. Z	Zeranol
48. Cort	Corticosteron
49. HCort	Hydrocortison