II

(Retsakter hvis offentliggørelse ikke er obligatorisk)

KOMMISSIONEN

KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 14. juli 1987

om metoder, der skal anvendes til påvisning af restkoncentrationer af stoffer med hormonal virkning og stoffer med thyreostatisk virkning

(87/410/EØF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til Traktaten om Oprettelse af Det Europæiske Økonomiske Fællesskab,

under henvisning til Rådets direktiv 85/358/EØF af 16. juli 1985 om supplering af direktiv 81/602/EØF om forbud mod visse stoffer med hormonal virkning og mod stoffer med thyreostatisk virkning [1], ændret ved forordning (EØF) nr. 3768/85 [2], særlig artikel 5, og

ud fra følgende betragtninger:

Ifølge artikel 5, stk. 2, i direktiv 85/358/EØF påhviler det Kommissionen efter fremgangsmåden i artikel 11 i nævnte direktiv at fastsætte analysemetoderne for prøver, der skal anvendes til undersøgelse for restkoncentrationer af stoffer med hormonal virkning og stoffer med thyreostatisk virkning;

ifølge artikel 4, stk. 1, litra b), i Rådets direktiv 64/433/EØF af 26. juni 1964 om sundhedsmæssige problemer i forbindelse med handel med fersk kød inden for Fællesskabet [3], senest ændret ved direktiv 86/587/EØF [4], og artikel 11, stk. 4, andet afsnit, i Rådets direktiv 85/397/EØF af 5. august 1985 om sundhedsmæssige og veterinærpolitimæssige problemer i forbindelse med handelen inden for Fællesskabet med varmebehandlet mælk [5], ændret ved forordning (EØF) nr. 3768/85, skal undersøgelserne for restkoncentrationer foretages efter videnskabeligt anerkendte og i praksis gennemprøvede metoder, særlig sådanne som er fastsat i EF-direktiver eller i andre internationale forskrifter;

bestemmelsen af analysemetoder for prøver omfatter definition af de analyseprocesser, der skal anvendes, de regler, der skal følges for prøveudtagningen og kriterierne vedrørende analysernes gennemførelse;

de analyseprocesser, der benyttes, skal være tilstrækkeligt følsomme til påvisning af tilstedeværelsen af restkoncentrationer af stoffer med hormonal virkning og stoffer med thyreostatisk virkning;

prøveudtagningen udgør en væsentlig del af analysemetoden; der bør derfor vedtages regler vedrørende indsamlingen af prøver;

Rådet vedtog den 20. december 1985 direktiv 85/591/EØF om indførsel af fælles prøveudtagnings- og analysemetoder til kontrol af levnedsmidler [6]; med henblik på denne beslutning bør der tages hensyn til de kriterier, der omhandles i punkt 1 i bilaget til nævnte direktiv;

de i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra Den stående Veterinærkomité —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

Artikel 1

Følgende analysemetoder er tilladt til påvisning af restkoncentrationer af stoffer med hormonal virkning og stoffer med thyreostatisk virkning:

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

— Immunoassay (IA)
— Tyndtlagskromatografi (TLC)
— Højtryksvæskekromatografi (HPLC)
— Gaskromatografi (GC)
— Massespektrometri (MS)
— Spektroskopi (SP).

Artikel 2

Prøveudtagningen foretages efter følgende regler:

1. prøven skal være stor nok til at muliggøre en korrekt analyse, til at gentage denne analyse og foretage bekræftende prøver;

2. prøverne skal mærkes, således at det er muligt at identificere dem på alle undersøgelsens trin;

3. pakning, opbevaring og transport af prøverne må ikke beskadige dem eller forringe undersøgelsesresultatet.

Artikel 3

Kriterierne vedrørende gennemførelse af analyserne er fastlagt i bilaget.

Artikel 4

Inden den 1. januar 1991 vil denne beslutning blive taget op til revision på grundlag af den nyeste videnskabelige og tekniske viden.

Artikel 5

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 14. juli 1987.

På Kommissionens vegne

Frans ANDRIESSEN

Næstformand

BILAG

KAPITEL I : GENERELLE KRITERIER

Indledning

Til objektiv bedømmelse af metoder til påvisning af reststoffer er der behov for kvantitative oplysninger om visse standardkarakteristika ved disse metoder. Herudover skal der opstilles kvantitative krav til nogle af disse karakteristika, bl.a. under hensyntagen til formålet med metoden (f. eks. screening, kvantitativ bestemmelse, bekræftelse). I dette kapitel defineres de i bilaget til direktiv 85/591/EØF fastlagte kriterier, når de skal anvendes til kontrol med rutinemetoder til analyse af rester af stoffer med hormonal virkning og stoffer med thyreastatisk virkning.

Definitioner

i) *Specificitet*

Specificeret er en metodes evne til at skelne mellem analysanden og andre stoffer. Dette karakteristikum afhænger først og fremmest af det anvendte måleprincip. Oplysninger om specificitet skal i hvert fald vedrøre alle de stoffer, som må forventes at give udslag, når det beskrevne måleprincip anvendes, f. eks. det pågældende reststofs homologe og analoge stoffer samt metabolitter. På grundlag af oplysninger om metodens specificitet skal det være muligt kvantitativt at beregne i hvilken grad, metoden kan skelne mellem analysanden og de andre stoffer under de givne forsøgsbetingelser.

ii) *Rigtighed*

I nærværende dokument benyttes rigtighed om gennemsnitsværdiens rigtighed. Den definition, der skal anvendes her, er fastlagt i ISO 3534-1977 under 2.83 (gennemsnitsværdiens rigtighed : graden af overensstemmelse mellem den sande værdi og den gennemsnitlige værdi, som ville blive opnået ved anvendelse af forsøgsmetoden et meget stort antal gange).

Bemærk : De vigtigste begrænsninger for rigtighed er :

a) tilfældige fejl

b) systematiske fejl, f. eks. genfinding i ringe omfang

Ved et meget stort antal forsøg nærmer gennemsnitsværdiens rigtighed sig den systematiske fejl.

Med henblik på gennemgang af en metode på grundlag af skriftlig dokumentation skal antallet af forsøg anføres.

Det mål for rigtighed, der skal anvendes, er forskellen mellem referencematerialets målte gennemsnitsværdi og den sande værdi, udtrykt i procent af den sande værdi.

iii) *Præcision :*

Repeterbarhed (i samme laboratorium) og reproducerbarhed (i samme laboratorium og i andre laboratorier) ; variation.

Den statistiske betegnelse »præcision« skal anvendes i henhold til definitionen i ISO 3534-1977 2.84 (præcision : graden af overensstemmelse mellem resulater, der er opnået ved at anvende forsøgsmetoden flere gange under nærmere fastsatte betingelser).

I henhold til bilaget til direktiv 85/591/EØF skal præcisionsværdierne for analysemetoder, der skal anvendes i henhold til direktivets bestemmelser, fastlægges på grundlag af en fællesafprøvning, så vidt muligt udført i henhold til ISO 5725-1986. Repeterbarhed og reproducerbarhed er defineret i ISO 5725-1986.

Til foreløbig udvælgelse af mulige metoder på grundlag af skriftlig dokumentation er det tilstrækkeligt, at der foreligger oplysninger om repeterbarhed. Betegnelsen repeterbarhed, som anvendes her, er defineret i ISO 3534-1977, punkt 2.85 a) (repeterbarhed : graden af overensstemmelse mellem på hinanden følgende resultater, der opnås med den samme metode på identisk prøvemateriale og under de samme betingelser (samme person, samme apparatur, samme laboratorium og med korte tidsintervaller)).

Det mål for repterbarhed, der skal anvendes, er variationskoefficientensom defineret i ISO 3534-1977, punkt 2.35 (variationskoefficient : forholdet mellem standardafvigelsen og det aritmetiske gennemsnits absolutte værdi).

iv) *Påvisningsgrænse*

Påvisningsgrænsen er det mindste målte indhold, på grundlag af hvilket det med rimelig statistisk sikkerhed er muligt at påvise analysandens tilstedeværelse. Påvisningsgrænsen svarer til gennemsnittet af det målte indhold i repræsentative blindprøveopløsninger ($n \geqslant 20$) plus tre gange gennemsnittets standardafgivelse.

Bemærk Hvis faktorer som f. eks. køn eller alder ventes at kunne indvirke på metodens karakteristika, kræves der et sæt blindprøver for hver enkelt homogen population, som metoden skal anvendes på.

v) *Følsomhed*

Følsomhed er et mål for en metodes evne til at skelne mellem små forskelle i indholdet af analysand. I nærværende dokument defineres følsomhed som kalibreringskurvens hældning ved det givne niveau.

vi) *Praktisk anvendelighed og anvendelsesområde*

Praktisk anvendelighed er en ikke-standardiseret egenskab ved en analysemetode. Den afhænger af formålet med metoden og bestemmes af diverse krav, som f. eks. produktivitet og omkostninger.

Anvendelsesområdet angives med en fortegnelse over de produkter, som den udvalgte metode kan anvendes på i den foreliggende form eller med mindre ændringer.

vii) *Andre kriterier, som kan fastsættes efter behov*

Bestemmelsesgrænse

Bestemmelsesgrænsen er det laveste indhold af analysand, som, hvis den faktisk er til stede, kan påvises med rimelig statistisk sikkerhed, og som kan identificeres efter metodens identifikationskriterier. Hvis både rigtighed og præcision er konstant i et koncentrationsområde omkring påvisningsgrænsen, svarer bestemmelsesgrænsen til gennemsnittet af det målte indhold i repræsentative blindprøveopløsninger plus seks gange gennemsnittets standardafvigelse.

Grænse for kvantitativ bestemmelse

Grænsen for kvantitativ bestemmelse er det mindste målte indhold af analysanden, som det er muligt at bestemme med en nærmere fastlagt grad af rigtighed og repeterbarhed (i samme laboratorium).

Krav med hensyn til rigtighed og repeterbarhed

Rigtighed:

Ved gentagne analyser af referencestoffet må gennemsnitsværdiens afvigelse fra den sande værdi, udtrykt i procent af den sande værdi, ikke overskride følgende grænser:

	Grænser
— sand værdi op til 1 µg/kg:	— 50 % til + 20 %
— sand værdi over 1 µg/kg og op til 10µg/kg:	— 30 % til + 10 %
— sand værdi over 10 µg/kg:	— 20 % til + 10 %

Repeterbarhed:

Ved gentagne analyser af referencestoffet må gennemsnittels variationskoefficient (C.V.) ikke overskride følgende værdier:

	C.V.
— gennemsnit op til 1 µg/kg:	0,30
— gennemsnit over 1 µg/kg og op til 10 µg/kg:	0,20
— gennemsnit over 10 µg/kg:	0,15

Kalibreringskurver:

Hvis metoden afhænger af kalibreringskurver, skal følgende oplysninger gives:

— den matematiske formel, som beskriver kalibreringskurven
— tilværdierne for kalibreringskurvernes parametre med 95 % konfidensintervaller (under optimale betingelser)
— acceptable intervaller, inden for hvilke kalibreringskurvens parametre kan variere fra dag til dag
— kalibreringskurvens arbejdsområde
— oplysninger om variablernes varians, som i hvert fald gælder for kalibreringskurvens arbejdsområde.

Følsomhed over for påvirkninger

For alle forsøgsbetingelser, som kan variere i praksis (f. eks. reagensernes stabilitet, prøvestoffets sammensætning, pH, temperatur), skal alle ændringer, som kan påvirke analyseresultaterne, angives.

Hvis det vides, at visse stoffer kan påvirke bestemmelsen af analysanden, skal dette ligeledes angives, sammen med eventuelle forslag til løsning af problemet. Det er af største betydning, at påvirkninger fra det pågældende mediums bestanddele undersøges. Derfor skal den største prøveækvivalens, som ikke har nogen indflydelse på bestemmelsen af analysanden (efter en nærmere angivet oprensning af prøver), i hvert fald angives.

Forholdet mellem toleranceværdier og analysegrænser

For stoffer med en tolerance på nul skal analysemetodens bestemmelsesgrænse være tilstrækkelig lav til, at sådanne reststofniveauer, som generelt kan forventes efter ulovlig brug, vil blive opdaget med en sandsynlighed på mindst 95 %.

For stoffer, hvis toleranceniveau er fastsat til det højeste naturlige fysiologiske niveau, må grænsen for kvantitativ bestemmelse ikke overskride den pågældende tolerance minus tre gange den standardafvigelse, som metoden udviser for et prøvestof på toleranceniveauet.

Referencestof

Et referencestof er en stofprøve eller et tilberedt stof, hvoraf en eller flere egenskaber er bestemt med tilstrækkelig nøjagtighed til, at det kan anvendes til kalibrering af et apparat eller efterprøvning af en målemetode. Certificeringen skal være baseret på en teknisk tilfredsstillende procedure.

Hvis der ikke er noget referencestof, kan de relevante parametre vurderes ved at analysere prøveopløsningen tilsat en kendt mængde analysand.

KAPITEL II: KVALITETSKRITERIER FOR FORTOLKNING AF RESULTATERNE

1. Fortegnelse over forkortelser og symboler

Analyse generelt

GC	= gaschromatografi
HPLC	= højtryksvæskechromatografi
HPTLC	= højtydende tyndtlagschromatografi
HRMS	= massespektrometri med høj opløsningsevne
IA	= immunoassay
IR	= infrarød
UV	= ultraviolet
LRMS	= massespektrometri med lav opløsningsevne
MS	= massespektrometri
RIA	= radioimmunoassay
SP	= spektroskopi, f.eks. diodearray
TLC	= tyndtlagschromatografi
/	= off-line koblede teknikker
—	= on-line koblede teknikker

f.eks. HPLC/GC-MS = off-line HPLC efterfulgt af GC med on-line MS.

For RIA:

cpm	= counts per minut
dpm	= disintegrations per minut
T	= samlet radioaktivitet (cpm eller dpm) tilført en prøve (impulser pr. minut) [henfald pr. minut]
B	= radioaktiviteten i den bundne del af en prøve
Bo	= radioaktiviteten i den bundne del af en blindprøve
B/Bo	= radioaktiviteten i den bundne del af en prøve i forhold til radioaktiviteten i en blindprøve (»del af binding i forhold til nul-binding«)
%B/Bo	= radioaktiviteten i den bundne del af en prøve udtrykt som procent af blindprøven
Bo/T	= radioaktiviteten i den bundne del af en blindprøve i forhold til den tilførte aktivitet (»del af nul-binding i forhold til den samlede radioaktivitet«)
NSB	= ikke-specifik binding = aspecifik binding (ASB)

For MS:

amu	= atommasseenhed
CI	= kemisk ionisering
EI	= electron impact ionisering
MID	= multipel ion detektion
M	= masse
Z	= ladning
HFB	= heptafluorsmørsyre eller heptafluorbutyrylderivat
MOX	= methoximderivat
TMS	= trimethylsilylderivat
MOX-TMS	= methoxim- og trimethylsilyderivat
F^+	= fragmention
$(F+1)^+$	= naturlig isotopsatellit, 1 M/Z højere end den tilsvarende fragmention, der består af de dominerende isotoper
M^+	= molekylarion
$(M+1)^+$	= naturlig isotopsatellit, 1 M/Z højere end den tilsvarende molekylarion, der består af de dominerende isotoper.

2 Indledning

Kvalitetskriterierne for fortolkning af analyseresultater skal anvendes af laboratorier, der udfører analyser til påvisning af rester af hormonalt eller thyreostatisk virkende stoffer, i overensstemmelse med kravene i dette kapitel. Kvalitetskriterierne gælder for kvalitativ analyse og tager sigte på at undgå falske positive resultater. Analyseresultaterne skal opfylde de kvalitetskriterier, der er fastlagt for den anvendte påvisningsmetode, for at kunne føre til en positiv konklusion.

3. **Definitioner vedrørende tilsstedeværelsen af en analysand**

3.1. *Analysand:* en bestanddel af en prøveopløsning, hvis tilstedeværelse skal påvises. Betegnelsen »analysand« omfatter i givet fald derivater af analysanden, der dannes under analysen.

3.2. *Standardstof:* et veldefineret stof af den størst mulige renhed, således at det kan anvendes som referencestof i analysen.

3.3. *Positiv:* analysandens tilstedeværelse i prøveopløsningen er bevist efter denne metode, når de generelle kriterier og kriterierne for den relevante påvisningsmetode er opfyldt. Resultatet af analysen er »positivt«.

3.4. *Negativ:* resultatet af analysen anses for »negativt«, hvis kriterierne for den pågældende metode ikke er opfyldt, eller hvis analysen ikke viser, at analysanden er til stede i prøveopløsningen over bestemmelsesgrænsen.

3.5. *Co-chromatografi:* følgende metode anvendes. Inden chromatograferingen opdeles den oprensede prøveopløsning i to dele:

(a) den ene del chromatograferes uden videre

(b) det standardstof, der svarer til det stof, der skal påvises, tilsættes til den anden del, og denne blandede opløsning af analysand og standardstof chromatograferes.

Mængden af tilsat standardstof skal nogenlunde svare til den skønnede mængde analysand.

4. **Almindelige betragtninger vedrørende den samlede analysemetode**

4.1. *Generelle kriterier for metoden som helhed*

Det skal være bevist, at metoden kan skelne mellem analysanden og alle kendte interfererende stoffer i det givne medium.

Analysandens fysiske og kemiske adfærd under analysen bør ikke kunne skelnes fra standardstoffets adfærd i det givne medium.

4.2. Generelle kriterier for separtionsmetoder

Referenceprøveopløsninger, der indeholder kendte mængder af analysanden, skal gennemgå hele analyseproceduren samtidig, sammen med hver enkelt serie prøveopløsninger, der analyseres. Subsidiært kan der tilsættes en intern standard til prøveopløsningerne.

4.3. *Kriterium for eventuel off-line fysisk og/eller kemisk forudgående opkoncentrering, oprensning og separation*

Analysanden er til stede i den fraktion, der er karakteristisk for det tilsvarende standardstof i det givne medium.

4.4. *Kriterium for eventuel on-line separation* (f.eks. GC)

Analysanden elueres med den retentionstid, der er karakteristisk for det tilsvarende standardstof i det givne medium.

4.5. *Tilberedning af prøveopløsningen*

Prøveopløsningen tilberedes på grundlag af laboratorieprøveopløsningen på en sådan måde, at der er størst mulig chance for at påvise analysanden, såfremt denne er til stede.

4.6. *Tilberedning af analyseprøven*

Analyseprøven tilberedes på grundlag af prøveopløsningen på en sådan måde, at der er størst mulig chance for at påvise analysanden, såfremt denne er til stede.

5. **Kvalitetskrav til bestemmelse af en analysand ved hjælp af RIA**

Til screening-formål:

5.1. Kalibreringskurvens arbejdsområde skal specificeres og skal normalt dække et koncentrationsområde på mindst én dekade.

5.2. Der skal medtages kontrolprøveopløsninger i hvert assay. Koncentrationsniveauer: 0 samt i den nedre, mellemliggende og øvre del af arbejdsområdet. Resultaterne herfor skal være på linje med tidligere assays.

5.3. Ved bestemmelsesgrænsen skal variationskoefficienten være mindre end 0,15 for kontrolprøveopløsningerne.

5.4. Der kræves mindst seks kalibreringspunkter, passende fordelt på kalibreringskurven.

5.5. Genfindingen skal kontrolleres og specificeres.

5.6. Kalibreringskurven skal have sit højeste præcisionsniveau omkring bestemmelsesgrænsen.

5.7. Passende kvalitetskontrolparametre skal være på linje med parametrene for foregående analyser, f.eks. Bo/T, NSB samt kalibreringskurvens hældning og skæringspunkt.

Bemærk: Selv om disse kvalitetskrav opfyldes, kan man ikke udelukke muligheden for falske positive resultater, som skyldes systematiske fejl, såsom antistof-krydsreaktioner, eller indflydelse fra ikke-repræsentativt prøvestof.

6. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af GC**

6.1. Analysanden bør elueres med den retentionstid, der er karakteristisk for den tilsvarende standardopløsning.

6.2. Det nærmeste top-maksimum i chromatogrammet bør være adskilt fra den top, der tilskrives analysanden, med mindst én hel bredde i halv højde.

6.3. Til identifikation skal der desuden altid gennemføres co-chromatografi i GC-fasen. Herved skal kun den top, der antages at tilhøre analysanden, blive større, og bredden i halv højde skal være inden for den oprindelige bredde ± 10 %. Dette krav kan betragtes som opfyldt, når retentionstiderne er identiske inden for 10 % af topbredden i halv højde.

7. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af TLC eller HPTLC**

7.1. Analysandens R_f-værdi(er) skal stemme overens med den (de) R_f-værdi(er), der er karakteristisk(e) for standardstoffet. Dette krav er opfyldt, når analysandens R_f-værdi(er) ligger inden for ± 3 % af standardstoffets R_f-værdi(er) under de samme betingelser.

7.2. Analysandens udseende må ikke kunne skelnes fra standardstoffets udseende.

7.3. Centrum af den stofplet, der er nærmest den plet, der tilhører analysanden, skal være adskilt herfra med mindst halvdelen af summen af pletternes diameter.

7.4. Til identifikation skal der desuden altid gennemføres co-chromatografi i TLC-fasen. Herved skal kun den plet, der antages at tilhøre analysanden, blive kraftigere ; der må ikke fremkomme en ny plet, og udseendet må ikke ændres.

7.5. Til bekræftelse er todimensional TLC obligatorisk.

8. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af HPLC-SP**

8.1. Bølgelængden for maksimal absorption i analysandens UV-spektrum skal være den samme som standardstoffets med en afvigelsesmargen, der afhænger af detektionssystemets opløsning. Ved diode-array-detektion ligger denne typisk inden for ± 2 nm.

8.2. Analysandens spektrum må ikke visuelt adskille sig fra standardstoffets spektrum for de dele af de to spektre, hvor den relative absorbans er 10 %. Dette kriterium er opfyldt, når de samme maksima er til stede, og når forskellen mellem de to spektre ikke på noget iagttaget punkt overstiger 10 % af standardstoffets absorbans.

8.3. Til identifikation skal der altid gennemføres co-chromatografi i HPLC-fasen. Herved skal kun den top, der antages at tilhøre analysanden, blive større.

9. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af TLC-SP eller HPTLC-SP**

9.1. Analysandens R_f-værdi(er) skal stemme overens med den (de) R_f-værdi(er), der er karakteristiske(e) for standardstoffet. Dette krav er opfyldt, når analysandens R_f-værdi(er) ligger inden for ± 3 % af standardstoffets R_f-værdi(er) under de samme betingelser.

9.2. Analysandens udseende må ikke kunne skelnes fra standardstoffets udseende.

9.3. Centrum af den stofplet, der er nærmest den plet, der tilhører analysanden, skal være adskilt herfra med mindst halvdelen af summen af pletternes diameter.

9.4. Til identifikation skal der desuden altid gennemføres co-chromatografi i TLC-fasen. Herved skal kun den plet, der antages at tilhøre analysanden, blive kraftigere ; der må ikke fremkomme en ny plet.

9.5. Bølgelængden for maksimal absorption i analysandens spektrum skal være den samme som standardstoffets med en afvigelsesmargen, der afhænger af detektionssystemets opløsning.

9.6. Analysandens spektrum må ikke visuelt adskille sig fra standardstoffets spektrum.

10. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af GC-HRMS**

10.1 For at kunne klassificere resultaterne som målinger med høj opløsningsevne, skal de være opnået med en opløsningsevne over 9 500, med et minimum mellem nabotoppe på højst 10 % af tophøjderne.

10.2. Forholdet mellem intensiteterne af ionerne F^+ og $(F+1)^+$ eller af M^+ og $(M+1)^+$ fra standardstofderivatet skal svare til den teoretiske værdi inden for en margen på A %.

10.3. Analysandderivatets fragmentmasse (bestemt ved hjælp af topsammenligning) skal svare til den teoretiske værdi af tilsvarende referencestofderivat inden for en margen på B amu.

Bemærk: For en række anaboliske stoffer er der i tabel 1 i tillægget som eksempel angivet værdier for A og B. Metoden er imidlertid ikke begrænset til anaboliske stoffer, men kan anvendes generelt.

11. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af GC-LRMS**

11.1. *Kriterier for gaschromatografi*

11.1.1. Analysandens retentionstid ved GC skal være den samme som referencestandardernes med en margen på ± 5 sekunder.

11.1.2 Hvis der anvendes intern standard, skal analysandens relative retentionstid (B/A) svare til standardstoffets relative retentionstid med en margen på ± 5/A i det givne medium, hvor

A = den interne standards absolutte retentionstid i sekunder

B = analysandens absolutte retentionstid i sekunder.

11.2. *Kriterier for massespektroskopi*

11.2.1. Alle de undersøgte ioner skal være afledt af analysand, der er elueret med én bestemt retentionstid.

11.2.2. Mindst to og helst flere ioners intensitet skal bestemmes.

Bemærk: Til utvetydig identifikation af en analysand må der udvælges et passende antal ioner, idet antallet afhænger af det pågældende stof og de valgte ioners specificitet. For hovedparten af derivaterne af de i tabel 2 til 6 i tillægget anførte anaboliske stoffer anbefales det, at der udvælges mindst fire ioner.

11.2.3. De påviste ioners relative intensitet, udtrykt i procent af intensiteten af den ion, der har højest intensitet (basistop), skal være den samme som de relative intensiteter for den pågældende referencestandard, inden for en margen på ± 20 % (CI mode) eller ± 10 % (EI mode).

11.2.4. Standardstoffets molekylarion skal om muligt være til stede i analysandens MID-spektrum.

Bemærk: I tabel 2 til 6 i tillægget er der som eksemplar anført nogle oplysninger om molekylarionerne og fragmentionerne af TMS- MOX-TMS-, MOX- og HFB-derivaterne af et antal anaboliske stoffer og beslægtede forbindelser. Kriterierne er imidlertid ikke begrænset til disse derivater, men kan anvendes generelt.

12. **Kriterier for identifikation af en analysand ved hjælp af IR-spektorskopi**

12.1. *Definition af egnede toppe*

Egnede toppe er absorptionsmaksima i standardstoffets IR-spektrum, der opfylder følgende krav:

12.1.1. Absorptionsmaksimummet ligger i bølgetalsområdet 1 800-500 cm^{-1}.

12.1.2. Absorptionens intensitet er ikke mindre end:

12.1.2.1. en specifik molær absorbanskoefficient på

— 40 i forhold til nullinjen og

— 20 i forhold til grundlinjen

eller

12.1.2.2. en relativ absorbans på

— 12,5 % af absorbansen af den mest intense top i området 1 800-500 cm^{-1}, når begge måles i forhold til nullinjen, og

— 5 % af absorbansen af den mest intense top i området 1 800-500 cm^{-1}, når begge måles i forhold til deres grundlinje.

Bemærk: Skønt egnede toppe i henhold til 12.1.2.1 kan foretrækkes af teoretiske grunde, er toppene i henhold til 12.1.2.2 lettere at bestemme i praksis.

12.2. *Antal egnede toppe*

Der kræves mindst seks egnede toppe.

12.3. *Kodning af egnede toppe*

De egnede toppes nøjagtige placering i hele bølgetal fungerer som objektive og digitaliserede parametre for bedømmelsen af prøvestoffers spektre.

Bemærk: I tabel 7 i tillægget er egnede toppe i TR-spektrene af 49 anaboliske stoffer og beslægtede forbindelser anført. Metoden er imidlertid ikke begrænset til anaboliske stoffer, men kan anvendes generelt.

12.4. *Anvendelse af tabeller over egnede toppe*

12.4.1. Toppenes placering i analysandens IR-spektrum sammenlignes med placeringen af de egnede toppe i standardstoffets IR-spektrum.

12.4.2 Antallet af toppe i analysandens IR-spektrum, hvis frekvenser svarer til en egnet top i standardstoffets IR-spektrum, inden for en margen på ± 1 cm^{-1}, bestemmes.

12.4.3. Standardstoffets »overensstemmelse« med analysandens spektrum beregnes.

12.4.4. Definition af »overensstemmelse«

»Overensstemmelse« er den procentdel af egnede toppe, der findes i analysandens IR-spektrum.

12.5. *Kriterier*

12.5.1. »Overensstemmelsen« skal være mindst 50 %.

12.5.2. Denne fremgangsmåde kan kun anvendes på absorptionstoppe i prøveopløsningens spektrum med en intensitet på mindst tre gange støjen mellem toppene.

TILLÆG

TABEL 1

Oplysninger til bekræftelse af anabolika ved hjælp af HRMS

Derivat (1)	Ion-masse		Intensitetsforhold		Ion-masse	
	F^+ ion eller M^+ ion, M/Z nominel værdi (amu)	$(F+1)^+$ ion eller $(M+1)^+$ ion, M/Z nominel værdi (amu)	Teoretisk værdi	A margen (%)	Ion-masse M/Z Teoretisk værdi (2) (amu)	B M/Z margen (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	anv. ikke		346,2328	0,0015
NT-TMS	F^+ 256	257	anv. ikke		256,1827	0,0015
NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	anv. ikke		375,2593	0,0015
epi NT-MOX-TMS	M^+ 375	376	anv. ikke		375,2593	0,0015
E2-di-TMS	M^+ 416	417	anv. ikke		416,2567	0,0015

(1) DES = diethylstilboestrol,
DE = dienoestrol,
HEX = hexoestrol,
NT = 19-nortestosteron-17β (nandrolon),
epi NT = 19-nortestosteron-17α,
E2 = oestradiol-17-β.

(2) Beregnet på basis af C^{-12}-isotop = 12,0000 amu.

TABEL 2

TMS-derivater af en række anabolika og beslægtede forbindelser
Ioner, der skal anvendes til bekræftelse ved hjælp af LRMS (EI mode)

	MV	M/Z (1)			
Dienoestrol	410	410	395	381	
Diethylstilboestrol	412	412	397	383	
5-α-Oestran-(3-β,17-α)-diol	422	407	332	242	201
17-α-Oestradiol	416	416	401	326	285
17-β-Oestradiol	416	416	401	326	285
17-β-Ostradiol-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
17-α-Trenbolon	342	342	252	237	211
17-β-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) Understreget ion : basistop
(2) Intern standard

TABEL 3

MOX-TMS-derivater af en række anabolika og beslægtede forbindelser
Ioner, der skal anvendes til bekræftelse ved hjælp af LRMS (EI mode)

	MV	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) Understreget ion : basistop.

TABEL 4

MOX-derivater af en række anabolika og beslægtede forbindelser
Ioner, der skal anvendes til bekræftelse ved hjælp af LRMS (EI mode)

	MV	M/Z (1)			
Medroxyprogesteronacetat	415	415	330	312	287
Megestrolacetat	413	413	353	338	310
Melengestrolacetat	425	425	365	350	322
Trenbolonacetat	341	341	298	281	266

(1) Understreget ion : basistop.

TABEL 5

HFB-derivater af en række anabolika og beslægtede forbindelser
Ioner, der skal anvendes til bekræftelse ved hjælp af LRMS (EI mode)

	MV	M/Z (1)			
Diethylstilboestrol	660	660	631	447	341
Dienoestrol	658	658	629	445	341
Hexoestrol	662	332	331	304	303
17-β-Oestradiol-16,16,17(D3) (2)	667	667	454	412	359

(1) Understreget ion : basistop.
(2) Intern standard.

TABEL 6

HFB-derivater af stilbener
Ioner, der skal anvendes til bekræftelse ved hjælp af LRMS (CI mode)

a) *Ammoniak-CI*

	MV	M/Z (1)			
Hexoestrol	662	681	680	484	466
Diethylstilboestrol	660	678	482	464	

(1) Understreget ion : basistop.

b) *Methan-CI*

	MV	M/Z (1)			
Diethylstilboestrol	660	661	465	464	
Dienoestrol	658	659	463	462	369

(1) Understreget ion : basistop.

Bemærkninger

1. De relative intensiteter for nogle af ovenstående ioner er for lave (omkring 10 %) til, at de kan bruges til pålidelig beskræftelse.
2. Ionernes relative intensiteter kan variere med mængden af analysand, der indsprøjtes i kolonnnen. For diethylstilboestrol bliver 661-ionen basistop (dvs. at der er mindre fragmentering af mono-HFB-formen) ved lave koncentrationer under methan-CI. Det er derfor vigtigt at sammenligne analysandens relative ionintensiteter med referencestandardens ved omtrent samme koncentration.
3. Ionisering med methan medfører spaltning af hexoestrol-molekylet. Fragmentionerne med lavere masse adskilles dårligt fra ledsagestoffer fra ekstraktionen.

TABEL 7

Egnede toppe i IR-spektrene for 49 anabolika og beslægtede forbindelser

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					

Fortegnelse over forkortelser

1	βE2	Oestradiol-17β
2	αE2	Oestradiol-17α
3	E2Ac	Oestradiol-17-acetat
4	E2diAc	Oestradiol-diacetat
5	E2P	Oestradiol-17-propionat
6	E2diP	Oestradiol dipropionat
7	E2S	Oestradiol-3-sulfat
8	E2Bz	Oestradiol-3-benzoat
9	E2ME	Oestradiol-3-methylether
10	EE	Ethinyloestradiol
11	M	Mestranol
12	E1	Oestron
13	E3	Oestriol
14	Eq	Equilin
15	Eqln	Equilenin
16	βT	Testosteron-17β
17	αT	Testosteron-17α
18	TAc	Testosteron-acetat
19	TP	Testosteron-propionat
20	TiC	Testosteron-isocaproat
21	TD	Testosteron-decanoat
22	TUn	Testosteron-undecanoat
23	TPP	Testosteron-phenylpropionat
24	TBz	Testosteron-benzoat
25	MT	Methyltestosteron-17α
26	MT-DP(11)	Methyltestosteron-D9(11)
27	βNT	Nortestosteron-17β
28	αNT	Nortestosteron-17α
29	NTP	Nortestosteron-propionat
30	NTD	Nortestosteron-decanoat
31	NTL	Nortestosteron-laurat
32	NTPP	Nortestosteron-phenylpropionat
33	Eti	Ethisteron
34	βTB	Trenbolon-17β
35	αTB	Trenbolon-17α
36	TBA	Trenbolon-acetat
37	P	Progesteron
38	MP	Medroxyprogesteron
39	MPA	Medroxyprogesteron-acetat
40	MGA	Megestrol-acetat
41	MLGA	Melengestrol-acetat
42	DE	Dienoestrol
43	DES	Diethylstilboestrol
44	HEX	Hexoestrol
45	DEdiAc	Dienoestrol-diacetat
46	DESdiP	Diethylstilboestrol-dipropionat
47	Z	Zeranol
48	Cort	Corticosteron
49	HCort	Hydrocortison