РЕГЛАМЕНТ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ (ЕС) 2021/808 НА КОМИСИЯТА

от 22 март 2021 година

относно изпълнението на аналитични методи за остатъци от фармакологичноактивни субстанции, използвани при животни, отглеждани за производство на храни, и относно тълкуването на резултати, както и относно методите, които трябва да се използват за вземане на проби, и за отмяна на решения 2002/657/ЕО и 98/179/ЕО

(текст от значение за ЕИП)

ЕВРОПЕЙСКАТА КОМИСИЯ,

като взе предвид Договора за функционирането на Европейския съюз,

като взе предвид Регламент (ЕС) 2017/625 на Европейския парламент и на Съвета от 15 март 2017 г. относно официалния контрол и другите официални дейности, извършвани с цел да се гарантира прилагането на законодателството в областта на храните и фуражите, правилата относно здравеопазването на животните и хуманното отношение към тях, здравето на растенията и продуктите за растителна защита, за изменение на регламенти (ЕО) № 999/2001, (ЕО) № 396/2005, (ЕО) № 1069/2009, (ЕО) № 1107/2009, (ЕС) № 1151/2012, (ЕС) № 652/2014, (ЕС) 2016/429 и (ЕС) 2016/2031 на Европейския парламент и на Съвета, регламенти (ЕО) № 1/2005 и (ЕО) № 1099/2009 на Съвета и директиви 98/58/ЕО, 1999/74/ЕО, 2007/43/ЕО, 2008/119/ЕО и 2008/120/ЕО на Съвета, и за отмяна на регламенти (ЕО) № 854/2004 и (ЕО) № 882/2004 на Европейския парламент и на Съвета, директиви 89/608/ЕИО, 89/662/ЕИО, 90/425/ЕИО, 91/496/ЕИО, 96/23/ЕО, 96/93/ЕО и 97/78/ЕО на Съвета и Решение 92/438/ЕИО на Съвета (Регламент относно официалния контрол) ([1]), и по-специално член 34, параграф 6 от него,

като има предвид, че:

(1) С Регламент (ЕС) 2017/625 се определят правила за извършването на официален контрол и други официални дейности от компетентните органи на държавите членки, за да се провери спазването на законодателството на Съюза, *inter alia*, в областта на безопасността на храните на всички етапи от производството, преработката и разпространението. В него се предвиждат специални правила за официалния контрол във връзка с вещества, чиято употреба може да доведе до наличието на остатъци в храни и фуражи, и се посочват общи изисквания за методите, които трябва да се използват за вземане на проби, лабораторни анализи и изпитвания по време на официален контрол и други официални дейности.

(2) В Решение 2002/657/ЕО на Комисията ([2]) се посочват изискванията по отношение изпълнението на аналитични методи и тълкуването на резултати от анализи на определени вещества и остатъци от тях в живи животни и животински продукти, а в Решение 98/179/ЕО на Комисията ([3]) се определят подробни правила за официално вземане на проби за мониторинга на определени вещества и остатъци от тях в живи животни и животински продукти. И двете решения бяха приети въз основа на Директива 96/23/ЕО на Съвета ([4]), която беше отменена с Регламент (ЕС) 2017/625. С оглед на новите научни постижения тези правила следва да бъдат актуализирани и интегрирани в рамката относно официалния контрол, определена с Регламент (ЕС) 2017/625.

(3) В съответствие с член 1, параграф 2 от Решение 2002/657/ЕО това решение не се прилага за вещества, за които има определени подробни правила в други разпоредби на Общността. Такива вещества са микотоксини в храни, диоксини и диоксиноподобни полихлорирани бифенили (PCB) в храни, и олово, кадмий, живак и бензо[*a*]пирен в храни. Микотоксините в храните трябва да отговарят на изискванията, посочени в Регламент (ЕО) № 401/2006 на Комисията ([5]) за установяване на методи за вземане на проби и за анализ за целите на официалния контрол на нивата за микотоксини в храни. Регламент (ЕС) 2017/644 на Комисията ([6]) за определяне на методи за вземане на проби и анализ за целите на контрола на съдържанието на диоксини, диоксиноподобни PCB и недиоксиноподобни PCB в

([1]) ОВ L 95, 7.4.2017 г., стр. 1.

([2]) Решение 2002/657/ЕО на Комисията от 14 август 2002 г. за прилагане на Директива 96/23/ЕО на Съвета по отношение изпълнението на аналитични методи и тълкуването на резултати (ОВ L 221, 17.8.2002 г., стр. 8).

([3]) Решение 98/179/ЕО на Комисията от 23 февруари 1998 г. за определяне на подробни правила за вземане на официални проби за мониторинга на определени вещества и остатъци от тях в живи животни и животински продукти (ОВ L 65, 5.3.1998 г., стр. 31).

([4]) Директива 96/23/ЕО на Съвета от 29 април 1996 г. относно мерките за наблюдение на определени вещества и остатъци от тях в живи животни и животински продукти и за отмяна на директиви 85/358/ЕИО и 86/469/ЕИО и решения 89/187/ЕИО и 91/664/ЕИО (ОВ L 125, 23.5.1996 г., стр. 10).

([5]) Регламент (ЕО) № 401/2006 на Комисията от 23 февруари 2006 г. за установяване на методи за вземане на проби и за анализ за целите на официалния контрол на нивата за микотоксини в храни (ОВ L 70, 9.3.2006 г., стр. 12).

([6]) Регламент (ЕС) 2017/644 на Комисията от 5 април 2017 г. за определяне на методи за вземане на проби и анализ за целите на контрола на съдържанието на диоксини, диоксиноподобни PCB и недиоксиноподобни PCB в определени храни и за отмяна на Регламент (ЕС) № 589/2014 (ОВ L 92, 6.4.2017 г., стр. 9).

определени храни се прилага в случаите на диоксини и диоксиноподобни PCB. Разпоредбите за вземане на проби и за анализ за целите на официалния контрол, отнасящи се за олово, кадмий, живак и бензо[*a*]пирен в храни, са определени в Регламент (ЕО) № 333/2007 на Комисията ([7]).

(4) От съображения за яснота и правна сигурност разпоредбите, приложими за вземане на проби и за анализ на фармакологичноактивни субстанции, е уместно да се обединят в един правен акт, както е направено с разпоредбите за микотоксини, диоксини, диоксиноподобни PCB, олово, кадмий, живак и бензо[*a*]пирен в храни.

(5) Поради това решения 98/179/ЕО и 2002/657/ЕО следва да бъдат отменени и заменени с настоящия регламент.

(6) В съответствие с Регламент (ЕО) № 1831/2003 на Европейския парламент и на Съвета ([8]) коксидиостатиците и хистомоностатиците могат да се използват като фуражни добавки, поради което за извършването на анализи на съдържанието им във фуражите се прилага Регламент (ЕО) № 152/2009 на Комисията ([9]), в който се определят методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите. Настоящият регламент обаче следва да се прилага, когато фуражите се анализират като част от последващи действия по време на разследванията с цел установяване на източника на несъответстващи проби в случаите на предполагаеми или установени несъответствия с правилата на Съюза, приложими за употребата на фармакологичноактивни субстанции или за остатъците от тях, разрешени във ветеринарномедицински продукти или като фуражни добавки, или с правилата на Съюза, приложими за употребата на забранени или неразрешени фармакологичноактивни субстанции или за остатъците от тях.

(7) За да се осигури приемственост при извършването на официален контрол и на други официални дейности във връзка с остатъците от фармакологичноактивни субстанции и за да се избегне необходимостта от едновременно повторно валидиране на всички методи, методите, които са валидирани преди датата на влизане в сила на настоящия регламент, може да останат в употреба за ограничен период от време при спазване на изискванията на точки 2 и 3 от приложение I към Решение 2002/657/ЕО. Затова е уместно на държавите членки да се предостави достатъчно време за прилагане на изискванията, определени в настоящия регламент, към всички аналитични методи.

(8) Мерките, предвидени в настоящия регламент, са в съответствие със становището на Постоянния комитет по растенията, животните, храните и фуражите,

ПРИЕ НАСТОЯЩИЯ РЕГЛАМЕНТ:

Член 1

Предмет и приложно поле

С настоящия регламент се определят правилата относно методите за анализ, използвани за вземане на проби и за лабораторни анализи във връзка с остатъците от фармакологичноактивни субстанции в живи животни, отглеждани за производство на храни, в части от телата им, както и в телесни течности, екскременти, тъкани, продукти от животински произход, странични животински продукти, фуражи и вода. Освен това с него се определят правилата за тълкуване на аналитичните резултати от тези лабораторни анализи.

Настоящият регламент се прилага по отношение на официалния контрол, целящ проверка на спазването на изискванията за наличие на остатъци от фармакологичноактивни субстанции.

([7]) Регламент (ЕО) № 333/2007 на Комисията от 28 март 2007 г. за установяване на методите за вземане на проби и за анализ за целите на контрола на количествата на микроелементите и замърсителите при преработката в храни (ОВ L 88, 29.3.2007 г., стр. 29).

([8]) Регламент (ЕО) № 1831/2003 на Европейския парламент и на Съвета от 22 септември 2003 г. относно добавки за използване при храненето на животните (ОВ L 268, 18.10.2003 г., стр. 29).

([9]) Регламент (ЕО) № 152/2009 на Комисията от 27 януари 2009 г. за определяне на методите за вземане на проби и анализ за целите на официалния контрол на фуражите (ОВ L 54, 26.2.2009 г., стр. 1).

Член 2

Определения

За целите на настоящия регламент се прилагат определенията, установени в член 2 от Делегиран регламент (ЕС) 2019/2090 на Комисията ([10]), в Регламент (ЕС) 2019/1871 на Комисията ([11]), в член 2 от Регламент (ЕО) № 470/2009 на Европейския парламент и на Съвета ([12]) и в Регламент (ЕИО) № 315/93 на Съвета ([13]).

Прилагат се и следните определения:

(1) „абсолютен аналитичен добив“ е добивът на аналит в крайния етап на конкретен аналитичен процес, разделен на количеството аналит в първоначалната проба, изразен в проценти;

(2) „точност“ е близостта между резултат от изпитване и приетата истинска референтна стойност, определена чрез оценка на истинността и прецизността ([14]);

(3) „алфа (α) грешка“ е вероятността пробата от изпитването да е в съответствие дори ако резултатът, получен чрез измерване, е в несъответствие;

(4) „аналит“ е компонентът на система, който следва да бъде анализиран;

(5) „разрешена субстанция“ е фармакологичноактивна субстанция, разрешена за употреба при животни, отглеждани за производство на храни, в съответствие с Директива 2001/82/ЕО на Европейския парламент и на Съвета ([15]);

(6) „бета (β) грешка“ е вероятността пробата от изпитването да е истинно в несъответствие дори ако резултатът, получен чрез измерване, е в съответствие;

(7) „изместване“ е разликата между оценената стойност на резултата от изпитването и приета референтна стойност;

(8) „еталон за калибриране“ е проследим референтен елемент за измерване, който представя представляващото интерес количество на съответното вещество по начин, който обвързва стойността му с референтна основа;

(9) „сертифициран референтен материал“ (CRM) е референтен материал, придружен с документация, издадена от упълномощен орган и осигуряваща една или повече определени стойности на свойство с присъединени неопределености и проследимости, като се използват валидни процедури ([16]);

(10) „кохроматография“ е техника, при която неизвестно вещество се поставя върху хроматографски носител заедно с едно или повече известни съединения, като се очаква, че относителното поведение на неизвестните и известните вещества ще спомогне за идентифициране на неизвестното вещество;

(11) „съвместно изследване“ е анализиране на една(и) и съща(и) проба(и) с един и същ метод, за да се определят аналитичните характеристики на метода в различни лаборатории, като изследването дава възможност да се изчислят случайната грешка на измерване и лабораторното изместване за използвания метод;

([10]) Делегиран регламент (ЕС) 2019/2090 на Комисията от 19 юни 2019 г. за допълнение на Регламент (ЕС) 2017/625 на Европейския парламент и на Съвета по отношение на предполагаеми или установени несъответствия с правилата на Съюза, приложими за употребата на фармакологичноактивни субстанции или за остатъците от тях, разрешени във ветеринарномедицински продукти или като фуражни добавки, или с правилата на Съюза, приложими за употребата на забранени или неразрешени фармакологичноактивни субстанции или за остатъците от тях (ОВ L 317, 9.12.2019 г., стр. 28).

([11]) Регламент (ЕС) 2019/1871 на Комисията от 7 ноември 2019 г. относно референтните точки за действие за неразрешени фармакологичноактивни субстанции в храните от животински произход и за отмяна на Решение 2005/34/ЕО (ОВ L 289, 8.11.2019 г., стр. 41).

([12]) Регламент (ЕО) № 470/2009 на Европейския парламент и на Съвета от 6 май 2009 г. относно установяване на процедури на Общността за определяне на допустимите стойности на остатъчни количества от фармакологичноактивни субстанции в храни от животински произход, за отмяна на Регламент (ЕИО) № 2377/90 на Съвета и за изменение на Директива 2001/82/ЕО на Европейския парламент и на Съвета и на Регламент (ЕО) № 726/2004 на Европейския парламент и на Съвета (ОВ L 152, 16.6.2009 г., стр. 11).

([13]) Регламент (ЕИО) № 315/93 на Съвета от 8 февруари 1993 г. за установяване на общностни процедури относно замърсителите в храните (ОВ L 37, 13.2.1993 г., стр. 1).

([14]) ISO 3534-1: 2006 Статистика. Речник и означения. Част 1: Основни статистически термини и термини, използвани във вероятностите (глава 1).

([15]) Директива 2001/82/ЕО на Европейския парламент и на Съвета от 6 ноември 2001 г. относно кодекса на Общността за ветеринарните лекарствени продукти (ОВ L 311, 28.11.2001 г., стр. 1).

([16]) JCGM 200:2008, Международен речник по метрология — Основни и общи понятия и свързани термини (VIM), трето издание, 2008 г.: https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm (глава 5 „Еталони“).

(12) „метод за потвърждение“ е метод, чрез който се получава цялостна или допълнителна информация за недвусмислено идентифициране на веществото и, ако е необходимо, за количественото му определяне по един от следните начини:

а) при максимално допустимата граница на остатъчните вещества или при максимално допустимата граница на разрешените субстанции;

б) в референтните точки за действие (РТД) за забранени или неразрешени субстанции, за които е установена референтна точка за действие;

в) във възможно най-ниската разумно достижима концентрация за забранена или неразрешена субстанция, за която не е установена референтна точка за действие;

(13) „множител на покритие (k)“ е число, което изразява желаната доверителна вероятност и е свързано с разширената неопределеност на измерване;

(14) „граница за решение за потвърждение (CCα)“ е границата, при която и над която може да се заключи с вероятност за грешка, равна на α, че дадена проба е в несъответствие, а стойността 1 − α е статистическата сигурност в проценти, че допустимата граница е била надхвърлена;

(15) „откриваемост при скрининг (CCβ)“ е най-малкото съдържание на аналита, което може да бъде открито или определено количествено в проба с вероятност за грешка β:

а) в случая на забранени или неразрешени фармакологичноактивни субстанции CCβ е най-ниската концентрация, при която чрез даден метод може, със статистическа сигурност 1 − β, да се открият проби, съдържащи остатъци от забранени или неразрешени субстанции, или да се определи количествено съдържанието в тях;

б) в случая на разрешени субстанции CCβ е концентрацията, при която чрез метода може да се открият концентрации под допустимата граница със статистическа сигурност 1 − β;

(16) „проба с внесена добавка“ е проба, в която е внесено предварително известно количество от аналита, който следва да бъде открит или определен количествено;

(17) „междулабораторно изследване“ е организирането, провеждането и оценяването на изпитвания на една(и) и съща(и) проба(и) от две или повече лаборатории, под формата на съвместно изследване или изпитване за пригодност, съгласно предварително определени условия, за да се оцени изпитването на аналитични характеристики;

(18) „вътрешен стандарт (IS)“ е вещество, което не се съдържа в пробата и притежава физични и химични свойства, които са възможно най-подобни на тези на аналита, който следва да бъде идентифициран или определен количествено;

(19) „ниво от значение“ е концентрацията на вещество или аналит в дадена проба, която концентрация е значима за определяне на съответствието му със законодателството по отношение на:

а) максимално допустимата граница на остатъчните вещества или максимално допустимата граница на разрешените субстанции в съответствие с Регламент (ЕО) № 124/2009 на Комисията ([17]) и Регламент (ЕС) № 37/2010 на Комисията ([18]);

б) референтните точки за действие за забранени или неразрешени субстанции, за които е установена референтна точка за действие в съответствие с Регламент (ЕС) 2019/1871;

в) възможно най-ниската аналитично достижима концентрация за забранена или неразрешена субстанция, за които не е установена референтна точка за действие;

(20) „най-ниско калибрирано ниво“ (LCL) е най-ниската концентрация, за която е калибрирана измервателната система;

(21) „матрица“ е материалът, от който се взема проба;

(22) „матричен ефект“ е разликата в аналитичния отклик между еталон, разтворен в разтворителя, и еталон, наподобяващ матрица, било то без коригиране с помощта на вътрешен стандарт или след коригиране с помощта на вътрешен стандарт;

([17]) Регламент (ЕО) № 124/2009 на Комисията от 10 февруари 2009 г. за определяне на максимално допустимите граници за наличието на кокцидиостатици или хистомоностатици в храни в резултат на неизбежното преминаване на тези вещества в нецелеви фуражи (ОВ L 40, 11.2.2009 г., стр. 7).

([18]) Регламент (ЕС) № 37/2010 на Комисията от 22 декември 2009 г. относно фармакологичноактивните субстанции и тяхната класификация по отношение на максимално допустимите стойности на остатъчните количества в храните от животински произход (ОВ L 15, 20.1.2010 г., стр. 1).

(23) „еталон, наподобяващ матрица“ е празна матрица (т.е. без аналит), към която след обработването на пробата се добавя аналит в определен концентрационен обхват;

(24) „еталон с матрица с внесени добавки“ означава празна матрица (т.е. без аналит), към която преди извършването на екстракция с помощта на разтворител и обработването на пробата се внасят добавки от аналит в определен концентрационен обхват;

(25) „измервана величина“ е конкретната величина, която подлежи на измерване;

(26) „неопределеност на измерване“ е неотрицателен параметър, присъединен към резултата от измерването и характеризиращ дисперсията на стойностите, които могат да бъдат обосновано приписани на измерваната величина въз основа на използваната информация;

(27) „критерии към аналитични характеристики“ са изискванията към дадена аналитична характеристика, съгласно които може да се прецени, че аналитичният метод е пригоден за предвиденото използване и дава надеждни резултати;

(28) „прецизност“ е близостта на независими резултати от изпитване, получени при определени условия, и се изразява като стандартно отклонение или коефициент на вариация на резултатите от изпитването;

(29) „качествен метод“ е аналитичен метод, чрез който се откриват или идентифицират дадено вещество или група вещества въз основа на химичните, биологичните или физичните им свойства;

(30) „количествен метод“ е аналитичен метод, чрез който се определят количеството или масовата част на дадено вещество, така че да може да се изрази като числова стойност в подходящи единици;

(31) „аналитичен добив“ е количеството аналит, с корекция от аналитичен добив, разделено на количеството аналит, внесено като добавка в матричната проба, и изразено в проценти;

(32) „корекция от аналитичен добив“ е използването на вътрешни стандарти, използването на калибрационна крива за матрицата, както и използването на фактор за корекция от аналитичен добив, а също и комбинация от тези подходи;

(33) „референтен материал“ е материал, който е достатъчно хомогенен и стабилен по отношение на едно или повече определени свойства и е създаден да бъде подходящ за предвиденото използване в процес на измерване или изследване на номинални свойства ([19]);

(34) „относителен матричен ефект“ е разликата в аналитичния отклик между еталон, разтворен в разтворителя, и еталон, наподобяващ матрицата, след коригиране с помощта на вътрешен стандарт;

(35) „повторяемост“ е прецизност при условия, при които са получени независими резултати от изпитвания със същия метод от идентични изпитвани обекти в една и съща лаборатория от един и същи оператор, който използва същото оборудване, в кратки времеви интервали;

(36) „възпроизводимост“ е прецизност при условия, при които резултатите от изпитванията са получени със същия метод от идентични изпитвани обекти в различни лаборатории от различни оператори, които използват различно оборудване ([20]);

(37) „неподатливост“ е податливостта на даден аналитичен метод към промени в експерименталните условия, при които методът може да се приложи, както е посочено или с определени минимални промени;

(38) „скрининг метод“ е метод, който се използва за скрининг на вещество или клас вещества на нивото от значение;

(39) „целева концентрация на скрининга“ (STC) е концентрацията, по-малка или равна на CCβ, при която пробата се категоризира чрез скринингово измерване като потенциално несъответстваща, „положителна при скрининг“, в резултат от което се провежда изпитване с цел потвърждение;

(40) „селективност“ е способността на даден метод да разграничава аналита, който се измерва, от други вещества;

(41) „единично лабораторно изследване“ или „вътрешно валидиране“ е аналитично изследване, в което участва една лаборатория и се използва един метод, за да се анализират един и същ или различни материали за изпитване при различни условия през оправдано дълги интервали от време;

([19]) Комисия по Кодекс алиментариус, Организация на ООН за прехрана и земеделие, Световна здравна организация, Guidelines on analytical terminology (CAC/GL 72-2009).

([20]) ISO 5725-1:1994 Точност (истинност и прецизност) на методи и резултати от измерване. Част 1: Общи принципи и определения (глава 3).

(42) „стандартна добавка“ е процедура, при която едната част от пробата се анализира самостоятелно, а към другите порции за изпитване преди анализа се добавят известни количества стандартен аналит;

(43) „стандартен аналит“ е аналит, чиито съдържание и чистота са известни и сертифицирани, и който при анализ се използва като референтен елемент;

(44) „вещество“ е материя с постоянен състав, характеризирана от съставящите я обекти и от определени физични свойства;

(45) „порция за изпитване“ е количеството материал, взето от пробата, върху което се извършва изпитването или наблюдението;

(46) „истинност“ е близостта между средноаритметичната стойност, получена от голяма поредица резултати от изпитвания, и приета референтна стойност;

(47) „единици“ са единиците, описани в ISO 80000 ([21]) и в Директива 80/181/ЕИО на Съвета ([22]);

(48) „валидиране“ е доказване чрез проверка и представяне на ефективно доказателство, че конкретните изисквания за специфична предвидена употреба са изпълнени ([23]), което се извършва чрез единично лабораторно изследване или чрез съвместно изследване;

(49) „вътрешнолабораторна възпроизводимост“ или „междинна прецизност/вътрешна възпроизводимост“ е прецизност на измерването при набор от вътрешнолабораторни условия в конкретна лаборатория.

Член 3

Методи за анализ

Държавите членки гарантират, че пробите, взети в съответствие с член 34 от Регламент (ЕС) 2017/625, се анализират с използването на методи, които отговарят на следните изисквания:

1) документирани са в инструкции за изпитване, за предпочитане съгласно приложенията на ISO 78-2:1999 Химия. Представяне на стандарти. Част 2: Методи за химичен анализ ([24]);

2) отговарят на критериите към аналитичните характеристики и на другите изисквания за аналитични методи, определени в глава 1 от приложение I към настоящия регламент;

3) валидирани са в съответствие с изискванията, определени в глави 2 и 4 от приложение I към настоящия регламент;

4) позволяват прилагане на референтните точки за действие, установени в Регламент (ЕС) 2019/1871, идентифициране на наличието на забранени и неразрешени субстанции и прилагане на максимално допустимите граници (МДГ), които са определени въз основа на Регламент (ЕИО) № 315/93 и Регламент (ЕО) № 124/2009, както и на максимално допустимите стойности на остатъчните количества (МДСОК), които са определени въз основа на Регламент (ЕО) № 1831/2003 и Регламент (ЕО) № 470/2009.

Член 4

Контрол на качеството

Държавите членки гарантират качеството на резултатите от анализите, извършени съгласно Регламент (ЕС) 2017/625, в частност чрез мониторинг на изпитванията или резултатите от калибриране в съответствие със стандарт ISO/IEC 17025:2017 „Общи изисквания за компетентността на лаборатории за изпитване и калибриране“, както и с изискванията за контрол на качеството по време на рутинен анализ, определени в глава 3 от приложение I към настоящия регламент.

([21]) ISO 80000-1:2009 Величини и единици. Част 1: Общи положения (въведение).

([22]) Директива 80/181/ЕИО на Съвета от 20 декември 1979 г. за сближаване на законодателствата на държавите-членки относно мерните единици и за отмяна на Директива 71/354/ЕИО (ОВ L 39, 15.2.1980 г., стр. 40).

([23]) ISO/IEC 17025:2017 Общи изисквания за компетентността на лаборатории за изпитване и калибриране (глава 3).

([24]) ISO 78-2: 1999 Химия. Представяне на стандарти. Част 2: Методи за химичен анализ (приложения)

Член 5

Тълкуване на резултатите

1) Резултатът от даден анализ се счита за несъответстващ, ако е равен или надхвърли границата за решение за потвърждение (CCα).

2) За разрешени субстанции, за които е установена МДСОК или МДГ, границата за решение за потвърждение (CCα) е концентрацията, при достигане и надхвърляне на която може да се реши със статистическа сигурност с числова стойност 1 – α, че допустимата граница е надхвърлена.

3) За неразрешени или забранени субстанции или за разрешени субстанции, за които не е установена МДСОК или МДГ при конкретен вид или продукт, границата за решение за потвърждение (CCα) е най-ниското ниво на концентрацията, при което може да се реши със статистическа сигурност с числова стойност 1 – α, че конкретният аналит е наличен.

4) За неразрешени или забранени фармакологичноактивни субстанции α-грешката следва да е 1 % или по-малка. За всички други вещества α-грешката следва да е 5 % или по-малка.

Член 6

Методи за вземане на проби

Държавите членки гарантират, че пробите се вземат, обработват и етикетират в съответствие с методите за вземане на проби, определени и подробно описани в приложение II към настоящия регламент.

Член 7

Отмени и преходни мерки

Решения 2002/657/ЕО и 98/179/ЕО се отменят от датата на влизане в сила на настоящия регламент.

Въпреки това до 10 юни 2026 г. изискванията, определени в точки 2 и 3 от приложение I към Решение 2002/657/ЕО, продължават да се прилагат за методите, които са валидирани преди датата на влизане в сила на настоящия регламент.

Член 8

Влизане в сила

Настоящият регламент влиза в сила на двадесетия ден след деня на публикуването му в *Официален вестник на Европейския съюз*.

Настоящият регламент е задължителен в своята цялост и се прилага пряко във всички държави членки.

Съставено в Брюксел на 22 март 2021 година.

За Комисията
Председател
Ursula VON DER LEYEN

ПРИЛОЖЕНИЕ I

ГЛАВА 1

КРИТЕРИИ КЪМ АНАЛИТИЧНИ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ДРУГИ ИЗИСКВАНИЯ ЗА АНАЛИТИЧНИТЕ МЕТОДИ

1.1. **Изисквания за скрининг методите**

1.1.1. *Категории на подходящите скрининг методи*

Като подходящи скрининг методи се използват качествени, полуколичествени или количествени методи.

1.1.2. Изисквания за биологичните, биохимичните или физикохимичните скрининг методи

За забранени или неразрешени субстанции CCβ е толкова ниска, колкото е разумно постижимо, като във всички случаи е по-ниска от референтната точка за действие (РТД) за субстанциите, за които са установени РТД съгласно Регламент (ЕС) 2019/1871.

За разрешени фармакологичноактивни субстанции CCβ е по-ниска от МДСОК или МДГ.

За целите на скрининга се използват само тези аналитични методи, за които може да се докаже по документален начин, че са валидирани и имат степен на фалшиво съответствие, по-малка или равна на 5 % (β-грешка). В случай на съмнение за резултат на несъответствие този резултат се потвърждава чрез метод за потвърждение.

Количествените скрининг методи, използвани както за скрининг, така и за потвърждение, отговарят на еднакви изисквания за точност, обхват и прецизност, както е описано в 1.2.2.1 и 1.2.2.2.

1.2. **Изисквания за методите за потвърждение**

1.2.1. *Общи изисквания за методите за потвърждение*

За забранени или неразрешени субстанции CCα е толкова ниска, колкото е разумно постижимо. За забранени или неразрешени субстанции, за които са установени РТД съгласно Регламент (ЕС) 2019/1871, CCα е по-малка или равна на референтната точка за действие.

За разрешени субстанции CCα е по-голяма от МДСОК или МДГ, но е възможно най-близо до тази стойност.

За целите на потвърждението се използват само аналитични методи, за които може да се докаже по документален начин, че са валидирани и имат степен на фалшиво съответствие (α-грешка), която е по-малка или равна на 1 % за забранени или неразрешени субстанции или е по-малка или равна на 5 % за разрешени субстанции.

Методите за потвърждение предоставят информация за химичния състав и структурата на аналита. Следователно методи за потвърждение, основани само на хроматографски анализ без използване на масспектрометрично откриване, не са подходящи за самостоятелно използване като методи за потвърждение за забранени или неразрешени фармакологичноактивни субстанции. Ако при разрешени субстанции не е подходящо да се използва масспектрометрия, може да се използват други методи като HPLC-DAD и HPLC-FLD или комбинация от тях.

Когато е необходимо за изпълнението на метода за потвърждение, в началото на процедурата на екстракция към порцията за изпитване се добавя подходящ вътрешен стандарт. В зависимост от наличността се използват или стабилни, изотопно белязани форми на аналита, които са изключително подходящи при масспектрометрично откриване, или аналогични съединения, които структурно са много подобни на аналита. Когато не е възможно да се използва подходящ вътрешен стандарт, за предпочитане е идентифицирането на аналита да се потвърждава с кохроматография ([1]). В този случай се получава само един пик, като усилената височина на пика (или площ под него) е еквивалентна на количеството добавен аналит. Ако това не е практически осъществимо, се използват еталони, наподобяващи матрица, или еталони с матрица с внесени добавки.

([1]) Кохроматографията е процедура, при която екстрактът от пробата преди етапа(ите) на хроматография се разделя на две части. Първата част се хроматографира самостоятелно. Втората част се смесва със стандартния аналит, който трябва да бъде измерен. След това тази смес също се хроматографира. Количеството добавен стандартен аналит трябва да е близко до оцененото количество аналит в екстракта. Кохроматографията се използва за подобряване на идентифицирането на аналит с помощта на хроматографски методи, особено когато не може да се използва подходящ вътрешен стандарт.

1.2.2. *Общи критерии към аналитичните характеристики за методите за потвърждение*

1.2.2.1. Истинност чрез аналитичен добив

При повторни анализи на сертифициран референтен материал отклонението на експериментално определената средна стойност на масовата част с корекция от аналитичен добив, от сертифицираната стойност съответства на обхватите на минималните стойности на истинността, посочени в таблица 1.

Таблица 1

Минимална истинност на количествените методи

Масова част	Обхват
≤ 1 μg/kg	– 50 % до +20 %
> 1 μg/kg до 10 μg/kg	– 30 % до +20 %
≥ 10 μg/kg	– 20 % до +20 %

Когато не са налични сертифицирани референтни материали, приемливо е истинността на измерванията да се оценява по други начини, като например с помощта на материали с приписани стойности от междулабораторни изследвания или чрез добавяне на известни количества от аналита(ите) към празна матрица.

1.2.2.2. Прецизност

Коефициентът на вариация (CV) при повторен анализ на референтен материал или материал с внесена добавка при условия на вътрешнолабораторна възпроизводимост не надвишава нивото, изчислено с помощта на уравнението на Хорвиц. Това уравнение е:

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

където C е масовата част, изразена като степен (степенен показател) на 10 (напр. 1 mg/g = 10^{-3}). За масови части под 120 μg/kg при използване на уравнението на Хорвиц се получават неприемливо високи стойности. Следователно допустимият максимален коефициент на вариация не надвишава стойностите, представени в таблица 2.

Таблица 2

Приемлив коефициент на вариация

Масова част	**CV на възпроизводимостта (%)**
> 1 000 μg/kg	16 (адаптиран по уравнението на Хорвиц)
> 120 μg/kg — 1 000 μg/kg	22 (адаптиран по уравнението на Хорвиц)
10—120 μg/kg	25 *
< 10 μg/kg	30 *

* *Представените стойности на CV (%) са ориентировъчни и следва да бъдат възможно най-ниските разумно постижими.

За анализи, извършвани при условия на повторяемост, големината на коефициента на вариация при условия на повторяемост е равна на две трети от стойностите, посочени в таблица 2, или е по-малка от тях.

1.2.3. *Изисквания за хроматографско разделяне*

При течна хроматография (LC) или газова хроматография (GC) минималното приемливо време на задържане за проверявания(те) аналит(и) е равно на двукратната стойност на времето на задържане, съответстващо на празния обем на колоната. Времето на задържане на аналита в екстракта съответства на времето на задържане на еталона за калибриране, на еталон, наподобяващ матрицата, или на еталон с матрица с внесени добавки с толеранс ± 0,1 минути. При бърза хроматография, където времето на задържане е под 2 минути, е приемливо отклонение, по-малко от 5 % от времето на задържане. В случай че се използва вътрешен стандарт, съотношението на хроматографското време на задържане на аналита към времето на задържане на вътрешния стандарт, което

представлява относителното време на задържане на аналита, съответства на времето на задържане на еталона за калибриране, на еталона, наподобяващ матрицата, или на еталона с матрица с внесени добавки, с максимално отклонение 0,5 % при газова хроматография и 1 % при течна хроматография за методи, валидирани след датата на влизане в сила на настоящия регламент.

1.2.4. *Специфични критерии към аналитичните характеристики за масспектрометрия*

1.2.4.1. Масспектрометрично откриване

Масспектрометричното откриване се извършва с помощта на някои от следните възможности:

1. записване на масспектри при пълно сканиране (FS);

2. селективно йонно мониториране (SIM);

3. техники за многоетапна масспектрометрия (MS^n), като например мониториране на избрана реакция (SRM);

4. комбинация от техники за масспектрометрия (MS) или многоетапна масспектрометрия (MS^n) и подходящи режими на йонизация.

Подходящо е да бъдат използвани както масспектрометрия с ниска разделителна способност (LRMS, при разделителна способност около унифицираната атомна маса), така и масспектрометрия с висока разделителна способност (HRMS), в това число например сектори с двойно фокусиране, анализатори по време на прелитане (TOF) и апарати Orbitrap.

За потвърждаване на идентичността на аналита при масспектрометрия с висока разделителна способност (HRMS) отклонението на масата на всички диагностични йони е под 5 ppm (или при $m/z < 200$ под 1 mDa). Поради тази причина ефективната разделителна способност следва да бъде избрана като пригодна за целта, като разделителната способност обикновено е по-голяма от 10 000 за целия масов обхват при долина от 10 % или 20 000 за пълната ширина при половината от максимума (FWHM).

Когато масспектрометричното определяне се извършва чрез записване на масспектри при пълно сканиране (както LRMS, така и HRMS), е подходящо да се използват само диагностични йони с относителна интензивност над 10 % в референтния спектър на еталона за калибриране, на еталона, наподобяващ матрицата, или на еталона с матрица с внесени добавки. Диагностичните йони включват молекулния йон (ако е наличен при интензитет на основния пик ≥ 10 %) и характерни фрагментни йони или продуктови йони.

Избор на йон прекурсор: Когато определянето чрез масспектрометрия се извършва чрез фрагментиране след избор на йон прекурсор, изборът на йон прекурсор се извършва при разделителна способност около унифицираната атомна маса или по-висока. Избраният йон прекурсор е молекулният йон, характерни адукти на молекулния йон, характерни продуктови йони или един от изотопните им йони. Ако при избора на прекурсор се използва прозорец за избор на маса от повече от един Далтон (напр. в случай на независим от данните за прекурсора масспектър), техниката се счита за анализ за потвърждение при пълно сканиране.

Фрагментни и продуктови йони: Избраните фрагментни или продуктови йони са диагностичният фрагмент за измервания аналит/продукт. Неселективните преходи (напр. тропилиевият катион или загубата на вода) се пропускат, когато е възможно. Честотата на срещане на диагностични йони се определя от площта на пиковете или от височината на интегрираните хроматограми на екстрахираните йони. Това е приложимо и когато за идентифициране се използват измервания с пълно сканиране. Съотношението сигнал/шум (S/N) за всички диагностични йони е по-голямо или равно на три към едно (3:1).

Относителни интензитети: Относителните интензитети на диагностичните йони (йонно отношение) се изразяват като процент от интензитета на най-често срещания йон или преход. Йонното отношение трябва да се определи чрез сравняване на спектрите или чрез интегриране на сигналите от масовите числа на екстрахираните йони. Йонното отношение на аналита, който трябва да бъде потвърден, съответства на йонните съотношения на еталоните, наподобяващи матрицата, на еталоните с матрица с внесени добавки или на стандартните разтвори при сравними концентрации, измерени при същите условия, в рамките на относително отклонение ± 40 %.

За всички масспектрометрични анализи се определя поне едно йонно отношение. За предпочитане е това да са йони, получени в рамките на едно сканиране, но е възможно йоните да бъдат получени и от различни сканирания при едно и също инжектиране (т.е. пълно сканиране и сканиране след фрагментиране).

1.2.4.2. Идентифициране

При избора на подходящи режими за събиране на данни и на критерии за оценка се използва система от идентификационни точки. За потвърждаване на идентичността на субстанциите в дадена матрица, за които е установена МДСОК (разрешена употреба), са необходими минимум 4 идентификационни точки. За неразрешени или забранени субстанции са необходими 5 идентификационни точки. Една от точките може да бъде получена от хроматографското разделяне. В таблица 3 е показан броят на идентификационните точки, които се получават при всяка техника. За да се достигне броят на идентификационните точки, необходим за потвърждение, може да се сумира броят на идентификационните точки, получени чрез различни техники.

1. Всички масспектрометрични анализи се използват заедно с техника за разделяне с достатъчна мощност и селективност при разделяне за конкретното приложение. Някои от подходящите техники за разделяне са течна и газова хроматография, капилярна електрофореза (КЕ) и свръхкритична флуидна хроматография (SFC). В случай на аналит, който е представен чрез изобарно или изомерно съединение, е задължително времето на задържане да бъде приемливо (т.е. ±0,5 % при GC и ± 1 % при LC и SFC), за да може да се потвърди идентификацията на аналита.

2. За да се получи минималният брой идентификационни точки, може да се комбинират най-много три отделни техники.

3. Различните режими на йонизация (напр. електронна йонизация и химическа йонизация) се считат за различни техники.

Таблица 3

Идентификационни точки за всяка техника

Техника	Идентификационни точки
Разделяне (режим на GC, LC, SFC, CE)	1
LR-MS йон	1
Избор на йони прекурсори при масов обхват < ±0,5 Da	1 (индиректно)
LR-MS^n продуктов йон	1,5
HR-MS йон	1,5
HR-MS^n продуктов йон	2,5

Таблица 4

Примери на броя идентификационни точки, конкретни техники и комбинации от техники (n = цяло число)

Техника(и)	Разделяне	Брой йони	Идентификационни точки
GC-MS (EI или CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI и CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI или CI) 2 производни	GC	2 (производна А) + 2 (производна Б)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- или LC-MS/MS	GC или LC	1 прекурсор + 2 продуктови	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- или LC-MS/MS	GC или LC	2 прекурсори + 2 продуктови	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- или LC-MS^3	GC или LC	1 прекурсори + 1 MS^2 продуктов + 1 MS^3 дъщерен	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- или LC-HRMS	GC или LC	n	1 + n × 1,5

GC- или LC-HRMS/MS	GC или LC	1 прекурсор (масов обхват < ±0,5 Da) + 1 продуктов	1 + 1 + 2,5 = 4,5
GC- или LC-HRMS и HRMS/MS	GC или LC	1 йон при пълно сканиране + 1 продуктов йон за HRMS [a]	1 + 1,5 + 2,5 = 5
GC- и LC-MS	GC и LC	2 йона (GCMS) + 1 йон (LCMS)	1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6

[a] Не се получава допълнителна идентификационна точка за избора на йон прекурсор, ако това е същият йон (или адукт, или изотоп) като йона за HRMS, наблюдаван при пълно сканиране.

1.2.5. *Специфични критерии към аналитичните характеристики за определяне на аналит с помощта на течна хроматография с техники за откриване, различни от масспектрометрия*

Следните техники може да се използват, само за разрешени субстанции, като алтернатива на методите, базирани на масспектрометрия, при условие че са изпълнени съответните критерии за тези техники:

1. спектрофотометрия с фотодиодна матрица (DAD) с пълно сканиране, ако се използва заедно с HPLC;

2. Флуоресцентна спектрофотометрия (FLD), ако се използва заедно с HPLC.

Течната хроматография с UV/VIS откриване (единична дължина на вълната) не е подходяща за самостоятелно използване като метод за потвърждение.

1.2.5.1. Критерии към аналитичните характеристики за спектрофотометрия с фотодиодна матрица с пълно сканиране

Изпълняват се критериите към аналитичните характеристики за хроматографското разделяне, включени в точка 1.2.3.

Стойностите на абсорбционните максимуми в UV спектъра на аналита са със същите дължини на вълната като дължините на вълната на еталона за калибриране в матрицата в рамките на максимален диапазон, определен от разделителната способност на системата за откриване. При откриване с фотодиодна матрица този максимален диапазон обикновено е в рамките на ± 2 nm. Спектърът на аналита над 220 nm за тези части от двата спектъра с относителна абсорбция, по-голяма или равна на 10 %, не се различава видимо от спектъра на еталона за калибриране. Този критерий е изпълнен, когато, на първо място, са налични същите максимални стойности и, на второ място, когато разликата между двата спектъра в никоя точка не е по-голяма от 10 % от абсорбцията на еталона за калибриране. Когато се използва компютърно подпомогнато търсене и откриване на съответствия в база данни, при сравняването на спектралните данни в официалните проби с данните на калибриращия разтвор трябва да бъде превишен критичен фактор на съвпадение. Този фактор следва да се определи по време на процеса на валидиране за всеки аналит на базата на спектри, за които са изпълнени критериите, описани по-горе. Вариациите в спектрите, причинени от матрицата на пробата, и аналитичните характеристики на детектора подлежат на проверка.

1.2.5.2. Аналитични характеристики за флуоресцентна спектрофотометрия

Изпълняват се критериите към аналитичните характеристики за хроматографското разделяне, включени в точка 1.2.3.

Изборът на дължините на вълните на възбуждане и емисия в комбинация с хроматографските условия се прави по такъв начин, че да се сведат до минимум ефектите от пречещи компоненти в екстрактите от празната проба. Дължините на вълните на възбуждане и емисия следва да се различават с най-малко 50 нанометра.

Най-близкият максимум на пика в хроматограмата се отделя от определения пик на аналита с поне една цяла ширина на пика при 10 % от максималната височина на пика на аналита.

Това се отнася за молекули, които проявяват естествена флуоресценция, и за молекули, които флуоресцират или след трансформация, или след дериватизация.

ГЛАВА 2

ВАЛИДИРАНЕ

2.1. Аналитични характеристики, които трябва да бъдат определени за аналитичните методи

Чрез валидирането на метода се доказва, че аналитичният метод съответства на критериите, приложими към съответните аналитични характеристики. В зависимост от целите на контрола е необходимо да се използват различни категории методи. В таблица 5 е определено коя аналитична характеристика се проверява за съответния тип метод, като в настоящата глава е включено допълнително пояснение за всеки от параметрите.

Таблица 5

Класификация на аналитичните методи по аналитичните характеристики, които трябва да бъдат определени

Метод	Потвърждение		Скрининг		
	Качествени	Количествени	Качествени	Полуко-личествени	Количествени
Субстанции	А	А, Б	А, Б	А, Б	А, Б
Идентифициране в съответствие с 1.2	x	x			
CCα	x	x			
CCβ	—		x	x	x
Истинност		x			x
Прецизност		x		(x)	x
Относителен матричен ефект/абсолютен аналитичен добив *		x			x
Селективност/специфичност		x	x	x	x
Стабилност #		x	x	x	x
Неподатливост		x	x	x	x

x: Необходимо е да се докаже чрез валидиране, че са изпълнени изискванията за аналитичната характеристика.
(x) Изискванията за прецизност в точка 1.2.2.2 не е необходимо да бъдат изпълнени за полуколичествените скринингметоди. Прецизността обаче се определя, за да се докаже пригодността на метода за избягване на аналитични резултати на фалшиво съответствие.
А: забранени или неразрешени субстанции
Б: разрешени субстанции
Ако са налични данни за стабилността на аналити в матрица от научни публикации или от друга лаборатория, не е необходимо тези данни да се определят отново от съответната лаборатория. Позоваването на наличните данни за стабилността на аналити в разтвор е приемливо само ако са приложени идентични условия.
* Относимо към методите на MS, за да се докаже чрез валидиране, че са изпълнени изискванията към аналитичните характеристики. Относителният матричен ефект на метода се определя, когато не е оценен по време на процедурата за валидиране. Абсолютният аналитичен добив на метода се определя, когато не се използва калибриране с вътрешен стандарт или с еталон с матрица с внесени добавки.

2.2. Истинност, повторяемост и вътрешнолабораторна възпроизводимост

В настоящата глава са представени примери и препратки във връзка с процедурите за валидиране. Могат да се използват и други подходи за доказване на съответствието на метода с критериите към аналитични характеристики, при условие че се получава информация от същото ниво и със същото качество.

2.2.1. *Конвенционално валидиране*

За изчисляване на параметрите съгласно конвенционалните методи се изисква да се извършат няколко индивидуални експеримента. Всяка аналитична характеристика трябва да се определи за всяка основна промяна (вж. раздел 2.4). При методи с множество аналити могат едновременно да се анализират няколко аналита, стига да се изключат възможни относими пречения. По подобен начин могат да се определят няколко аналитични характеристики. Следователно, с цел да се сведе до минимум работното натоварване, е препоръчително експериментите да се комбинират във възможно най-голяма степен (напр. повторяемост и вътрешнолабораторна възпроизводимост със специфичност, анализ на празни проби за определяне на граница за решение за потвърждение, и изпитване за специфичност).

2.2.1.1. Истинност въз основа на сертифициран референтен материал

За предпочитане е истинността на даден аналитичен метод да се определя с помощта на сертифициран референтен материал (CRM). Процедурата за това е описана в ISO 5725-4:1994 ([2]).

По-долу е представен пример:

1. Анализират се шест повторни проби от CRM в съответствие с инструкциите за изпитването относно метода.
2. Определя се концентрацията на наличния аналит във всяка повторна проба.
3. Изчислява се средната стойност, стандартното отклонение и коефициентът на вариация (%) *за тези шест повторни проби*.
4. Изчислява се истинността като средната стойност на установената концентрация се разделя на сертифицираната стойност (измерена като концентрация) и се умножава по 100, за да се изрази резултатът в проценти.

Истинност (%) = (средна стойност на установената концентрация с корекция от аналитичен добив × 100/ сертифицирана стойност

2.2.1.2. Истинност въз основа на проби с внесени добавки

При липса на наличен сертифициран референтен материал истинността на метода се определя чрез експерименти, в които се използва празна матрица с внесена добавка и които се извършват най-малкото според следната схема:

1. За методите, валидирани от датата на влизане в сила на настоящия регламент нататък, се избира материал за матрична празна проба, в който се внасят добавки със следните концентрации:
   а) 0,5 ([3]), 1,0 и 1,5 пъти РТД; или
   б) 0,1 ([4]), 1,0 и 1,5 пъти МДСОК или МДГ за разрешени субстанции; или
   в) 1,0, 2,0 и 3,0 пъти LCL за неразрешени субстанции (за които не е установена РТД).
2. На всяко ниво анализът се извършва с шест повторни проби.
3. Пробите се анализират.
4. Изчислява се концентрацията, установена във всяка проба.
5. Изчислява се истинността за всяка проба с помощта на посоченото по-долу уравнение и след това се изчисляват средната стойност на истинността и коефициентът на вариация за шестте резултата при всяко ниво на концентрацията.

Истинност (%) = (установена средна концентрация с корекция от аналитичен добив) × 100/ниво на внесената добавка

За методите за разрешени субстанции, валидирани преди датата на прилагане на настоящия регламент, е достатъчно истинността на метода да се определи за 6 аликвотни части с внесени добавки при 0,5, 1,0 и 1,5 пъти МДСОК или МДГ.

([2]) ISO 5725-4:2020 Точност (истинност и прецизност) на методи и резултати от измерване. Част 4: Основни методи за определяне на истинността на стандартен метод за измерване (раздел 3).

([3]) Когато за неразрешена фармакологичноактивна субстанция не е разумно постижимо да се извърши валидиране при концентрация 0,5 пъти РТД, тази концентрация може да бъде заменена с най-ниската концентрация между 0,5 пъти и 1,0 пъти РТД, при която то е разумно постижимо.

([4]) Когато за конкретна фармакологичноактивна субстанция не е разумно постижимо да се извърши валидиране при концентрация 0,1 пъти МДСОК, тази концентрация може да бъде заменена с най-ниската концентрация между 0,1 пъти и 0,5 пъти МДСОК, при която то е разумно постижимо.

2.2.1.3. Повторяемост

1. За методите, валидирани след датата на влизане в сила на настоящия регламент, се подготвя набор от проби от идентични празни матрици от същия вид. В пробите се внасят добавки с аналита до резултантни концентрации, еквивалентни на:

   а) 0,5 ([5]), 1,0 и 1,5 пъти РТД; или

   б) 0,1 ([6]), 1,0 и 1,5 пъти МДСОК или МДГ за разрешени субстанции; или

   в) 1,0, 2,0 и 3,0 пъти LCL за неразрешени или забранени субстанции, ако няма приложима РТД.

2. На всяко ниво анализът се извършва с поне шест повторни проби.

3. Пробите се анализират.

4. Изчислява се концентрацията, установена във всяка проба.

5. Изчисляват се средната концентрация, стандартното отклонение и коефициентът на вариация (%) за пробите с внесени добавки.

6. Тези стъпки се повтарят поне още два пъти.

7. Изчисляват се общите средни концентрации, стандартните отклонения (чрез изчисляване на средната стойност на стандартното отклонение на квадрат за отделните случаи и определяне на квадратния корен от тази стойност) и коефициентите на вариация за пробите с внесени добавки.

За методи за разрешени субстанции, валидирани преди датата на влизане в сила на настоящия регламент, е достатъчно повторяемостта за матрици с внесени добавки да се определи при концентрации, равни на 0,5, 1,0 и 1,5 пъти МДСОК или МДГ.

Друга възможност е изчислението за повторяемостта да се извърши съгласно ISO 5725-2:2019 ([7]).

2.2.1.4. Вътрешнолабораторна възпроизводимост

1. За извършване на валидиране след датата на влизане в сила на настоящия регламент се подготвя набор от проби от конкретен материал за изпитване (идентични или различни матрици), с внесени добавки от аналита(ите) до резултантни концентрации, еквивалентни на:

   а) 0,5([5]), 1,0 и 1,5 пъти РТД; или

   б) 0,1([6]),1,0 и 1,5 пъти МДСОК или МДГ за разрешени субстанции; или

   в) 1,0, 2,0 и 3,0 пъти LCL за неразрешени или забранени субстанции, ако няма приложима РТД.

2. На всяко ниво на концентрацията анализът се извършва с поне шест повторни проби от материал за матрична празна проба.

3. Пробите се анализират.

4. Изчислява се концентрацията, установена във всяка проба.

([5]) Когато за неразрешена фармакологичноактивна субстанция не е разумно постижимо да се извърши валидиране при концентрация 0,5 пъти РТД, тази концентрация може да бъде заменена с най-ниската концентрация между 0,5 пъти и 1,0 пъти РТД, което е разумно постижимо.

([6]) Когато за конкретна фармакологичноактивна субстанция не е разумно постижимо да се извърши валидиране при концентрация 0,1 пъти МДСОК, тази концентрация може да бъде заменена с най-ниската концентрация между 0,1 пъти и 0,5 пъти МДСОК, което е разумно постижимо.

([7]) ISO 5725-2:2019 Точност (истинност и прецизност) на методи и резултати от измерване. Част 2: Основен метод за определянето на повторяемост и възпроизводимост при стандартен метод за измерване (раздел 3).

5. Стъпките се повтарят при поне два други случая с различни партиди материал за матрична празна проба, различни оператори и при колкото е възможно повече различни условия на околната среда, напр. различни партиди реактиви или разтворители, различни температури на помещенията, различни апарати или вариране на други параметри.

6. Определят се средната концентрация, стандартното отклонение и коефициентът на вариация (%) за пробите с внесени добавки.

За методи за разрешени субстанции, валидирани преди датата на влизане в сила на настоящия регламент, е достатъчно вътрешнолабораторната възпроизводимост за матрици с внесени добавки да се определи при концентрации, равни на 0,5, 1,0 и 1,5 пъти МДСОК или МДГ.

Друга възможност е изчислението на вътрешнолабораторната възпроизводимост/междинната прецизност да се извърши съгласно ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 ([8]), Кодекс CAC/GL 59-2006 ([9]).

2.2.2. *Валидиране съгласно алтернативни модели*

За изчисляване на параметрите съгласно алтернативните модели се изисква да се изпълни експериментален план. Експерименталният план се разработва в зависимост от броя на различните видове и различните фактори за проучване. Оттук като първа стъпка на цялата процедура за валидиране трябва да се разгледат популациите на обектите за вземане на проби, които ще бъдат анализирани в лабораторията в бъдеще, с цел да се определят най-важните видове и факторите, които могат да окажат влияние върху резултатите от измерването. Чрез свързания с фактори подход е възможно да се направи оценка на неопределеността на измерването за резултатите от изпитването, получени при различни условия на изпитване в дадена лаборатория, като например различни лица, извършващи анализа, различни апарати, различни партиди реактиви, различни матрици, различна продължителност на изследването и различна температура по време на изследването. Впоследствие обхватът на концентрациите трябва да бъде избран по начин, който е съобразен с целта, според МДСОК или МДГ за разрешените субстанции или РТД или LCL за забранените или неразрешените субстанции.

Целта на свързания с фактори подход е да се получат надеждни данни за прецизността и данни от измерването чрез едновременно контролирано вариране на избраните фактори. Чрез този подход може да се оцени комбинираното въздействие на ефектите на различните фактори и на случайните ефекти. Освен това дизайнът на експеримента дава възможност да се изследва неподатливостта ([10]) на аналитичния метод и да се определи стандартното отклонение при вътрешнолабораторната възпроизводимост за всички матрици.

По-долу е посочен пример за алтернативен подход, в който се използва план за ортогонален експериментален дизайн.

Възможно е да бъдат изследвани до седем фактора (шумови фактори). Изследването е разработено по такъв начин, че прецизността, истинността (въз основа на проби с внесени добавки), чувствителността, неопределеността на измерването и критичните концентрации могат да бъдат определени едновременно при изпълнението на експерименталния план.

Таблица 6

Примерен план за ортогонален експериментален дизайн със 7 фактора (I—VII), които варират на две нива (А/Б) в изследване за валидиране, включващо осем аналитични серии (комбинация нива-фактори)

Фактор	I	II	III	IV	V	VI	VII
Аналитична серия 01	А	А	А	А	А	А	А
Аналитична серия 02	А	А	Б	А	Б	Б	Б
Аналитична серия 03	А	Б	А	Б	А	Б	Б
Аналитична серия 04	А	Б	Б	Б	Б	А	А

([8]) ISO 11843-1:1997 Възможност за откриване на различия. Част 1: Термини и определения.

([9]) Комисия по Кодекс алиментариус, Организация на ООН за прехрана и земеделие, Световна здравна организация, Guidelines on estimation of uncertainty of results (CAC/GL 59-2006).

([10]) Споменатите тук промени в експерименталните условия могат да включват материала на пробите, аналитите, условията на съхранение, условията на околната среда и/или условията при подготовка на пробата. По отношение на всички експериментални условия, в които на практика е възможно да настъпят колебания (напр. стабилност на реактивите, състав на пробата, pH, температура), се посочват всякакви варирания, които биха могли да окажат влияние върху аналитичния резултат.

Аналитична серия 05	Б	А	А	Б	Б	А	Б
Аналитична серия 06	Б	А	Б	Б	А	Б	А
Аналитична серия 07	Б	Б	А	А	Б	Б	А
Аналитична серия 08	Б	Б	Б	А	А	А	Б

Изчисляването на характеристиките на метода се извършва по начина, описан от Jülicher et al. ([11]).

2.2.3. *Други подходи за валидиране*

Могат да се използват и други подходи за доказване на съответствието на метода с критериите към аналитичните характеристики, при условие че се получава информация от същото ниво и със същото качество. Валидирането може да се извърши също и чрез провеждане на междулабораторно изследване според установеното в Кодекс Алиментариус, ISO или IUPAC ([12]) или съгласно алтернативни методи, като например изследвания в една лаборатория или вътрешно валидиране ([13]). Когато се прилагат алтернативни процедури за валидиране, моделът и стратегията, на които се основават процедурите, заедно със съответните предпоставки, допускания и формули, се описват в протокола за валидиране или поне се упоменава тяхното наличие и се дава препратка.

2.3. **Селективност/специфичност**

Мощността за разграничаването на аналита от много подобните му вещества се определя възможно най-точно. Определя се пречещото влияние на хомолозите, изомерите, продуктите от разграждането, ендогенните вещества, аналозите, метаболитните продукти на представляващите интерес остатъци, на съединенията в матрицата или на всяко друго евентуално пречещо вещество, като при необходимост методът се изменя, за да се избегнат установените пречения. За определяне на специфичността на метода се използва следният подход:

1. Избира се група от химически сродни съединения или други вещества, за които е вероятно да се срещат заедно със съединението, представляващо интерес, и които може да са налични в пробите, и се проверява дали тези вещества биха могли да окажат пречещо влияние върху анализа на целевия(те) аналит(и).

2. Анализират се подходящ брой представителни празни проби, напр. различни партиди или партиди от различни животински видове ($n \geq 20$), и се проверява за наличие на пречения в сигнали, пикове или следи от йони в зоната, представляваща интерес, където се очаква да елуирането на целевия аналит.

3. Внася се добавка в представителни празни проби в относима концентрация с вещества, които биха могли да попречат на идентифицирането и/или на количественото определяне на аналита, и се изследва дали добавеното вещество:

   а) може да доведе до идентифициране, представляващо фалшив резултат;

   б) пречи на идентифицирането на целевия аналит;

   в) оказва забележимо влияние върху количественото определяне.

2.4. **Неподатливост**

Провежда се изпитване за изменението на аналитичните характеристики на аналитичния метод при различни експериментални условия, които включват например различни условия на вземане на проби и незначителни промени, които могат да възникнат при извършването на рутинно изпитване. За да се изпита неподатливостта на метода, промените, въведени в експерименталните условия, следва да бъдат малки. Оценява се важността на тези промени. Всяка аналитична характеристика се определя за всички малки промени, за които е доказано, че имат значим ефект върху аналитичните характеристики от изследването.

([11]) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173.

([12]) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Applied Chem, 67, 331.

([13]) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. J. Chromatogr., 716, 221.

2.5. **Стабилност**

Определя се стабилността на еталона за калибриране, на еталона, наподобяващ матрицата, и/или на еталони с матрица с внесени добавки и на аналита или на съставните елементи на матрицата в пробата по време на съхранение или анализ, тъй като нестабилностите могат да окажат влияние върху резултатите от изпитването.

Обикновено стабилността на аналита е добре охарактеризирана при различни условия за съхранение. Необходимата информация може да бъде получена от експериментите, проведени с цел мониторинг на условията за съхранение на еталоните и пробите, които се извършват като част от обичайната система за акредитация на лабораторията и контрол на качеството. Ако са налични данни за стабилността на аналитите в матрицата (напр. на базата на информация от РЛЕС, от публикувани данни и т.н.), не е необходимо тези данни да се определят от всяка лаборатория. Позоваването на наличните данни за стабилността на аналитите в разтвор и в матрица обаче е приемливо само ако се използват идентични условия.

В случай че необходимите данни за стабилността не са налични, следва да се използват описаните по-долу подходи.

2.5.1. *Определяне на стабилността на аналита в разтвор*

1. Приготвят се пресни изходни разтвори на аналита(ите) и се разреждат, както е посочено в инструкциите за изпитването, за да се получат достатъчен брой аликвотни части (напр. 40) от всяка избрана концентрация. Приготвят се проби от:

   а) разтворите на аналита, които се използват за внасяне на добавка;

   б) разтворите на аналита, използвани за крайния анализ;

   в) всеки друг разтвор, представляващ интерес (напр. дериватизирани еталони).

2. Измерва се съдържанието на аналита в прясно приготвения разтвор съгласно инструкциите за изпитването.

3. Подходящи обеми се разпределят в подходящи контейнери, етикетират и съхраняват според условията за осветеност и температура от схемата, представена в таблица 7. Времето за съхранение се избира в зависимост от използваната аналитична практика и в идеалния случай продължава, докато при идентифициране и/или количествено определяне бъдат забелязани първите признаци на разграждане. Ако по време на изследването за стабилност не бъде забелязано разграждане, продължителността на съхранение при изследването за стабилност ще бъде равна на максималния срок на съхранение на разтвора.

4. Изчислява се концентрацията на аналита(ите) във всяка аликвотна част спрямо концентрацията на аналита в прясно приготвения разтвор, като се използва формулата по-долу:

$$\text{Оставащо количество аналит (\%)} = C_i \times 100/C_{\text{пресен}}$$

C_i = концентрацията в момента време i

$C_{\text{пресен}}$ = концентрацията на пресния разтвор

Средната стойност от пет разтвора за повторно определяне, които са били съхранявани, не следва да се различава с повече от 15 % от средната стойност от пет прясно приготвени разтвора за повторно определяне. Средната стойност на петте прясно приготвени разтвора се използва като основа за изчисляване на процентната разлика.

Таблица 7

Схема за определяне на стабилността на аналита в разтвор

	− 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
На тъмно	10 аликвотни части	10 аликвотни части	10 аликвотни части
На светло			10 аликвотни части

2.5.2. *Определяне на стабилността на аналит(и) в матрица*

1. Когато е възможно, се използват проби, предварително подложени на въздействие на определяемия компонент. Когато не е налична матрица, предварително подложена на въздействие на определяемия компонент, се използва празна матрица, с внесена добавка от аналита.

2. Когато е налична матрица, предварително подложена на въздействие на определяемия компонент, концентрацията в нея се определя, докато матрицата е все още прясна. Допълнителните аликвотни части от хомогенизираната матрица, предварително подложена на въздействие на определяемия компонент, се съхраняват при температура – 20 °C или по-ниска, ако е необходимо, и се определят концентрациите на аналита, докато пробата се съхранява в лабораторията.

3. Ако няма налична матрица, предварително подложена на въздействие на определяемия компонент, се взема матрична празна проба и се хомогенизира. Матрицата се разделя на пет аликвотни части. Във всяка аликвотна част се внася добавка с аналита, който е за предпочитане да се подготви в малко количество воден разтвор. Незабавно се анализира една аликвотна част. Останалите аликвотни части се съхраняват при температура поне – 20 °C или по-ниска, ако е необходимо, и се анализират след краткосрочно, средносрочно и дългосрочно съхранение в зависимост от приложените аналитични методи.

4. Записват се максималното приемливо време за съхранение и оптималните условия за съхранение.

Средната стойност от пет разтвора за повторно определяне, които са били съхранявани, не следва да се различава с повече, отколкото стойността на вътрешнолабораторната възпроизводимост на метода, от средната стойност от пет прясно приготвени разтвора за повторно определяне. Средната стойност от петте прясно приготвени разтвора се използва като основа за изчисляване на процентната разлика.

2.6. **Граница за решение за потвърждение (CCα)**

Определя се CCα за методите за потвърждение. CCα се установява при условия, отговарящи на изискванията за идентифициране или за идентифициране плюс количествено определяне, които са определени в глава 1 „Критерии към аналитични характеристики и други изисквания за аналитичните методи“.

Комбинираната стандартна неопределеност на измерването вече е взета предвид в стойността на CCα (граница за решение за потвърждение) за целите на контрола на съответствието на пробите.

1. За неразрешени или забранени фармакологичноактивни субстанции CCα се изчислява, както следва:

   а) Метод 1: чрез процедурата на кривата на калибриране съгласно ISO 11843-1:1997 ([14]) (наречена „критична стойност на променливата на нетното състояние“). В този случай се използва материал за матрична празна проба, в който е внесена добавка при РТД или LCL или над тези стойности на стъпки с еднакво отстояние. Пробите се анализират. След идентифицирането стойността на сигнала, когато е възможно, или на преизчислената концентрация, се нанася срещу добавената концентрация. Съответстващата концентрация при отреза по „y“ плюс 2,33 пъти стандартното отклонение на вътрешнолабораторната възпроизводимост на в отреза е равна на границата за решение. Този метод е приложим само за количествени изследвания. Границите за решение, получени чрез този подход, се проверяват чрез анализиране на празна матрица, с внесена добавка при изчислената граница за решение.

   б) Метод 2: чрез анализиране на поне 20 представителни материала за матрична празна проба на матрица с цел изчисляване на отношението на сигнал към шум във времевия прозорец, в който се очаква аналитът. Като граница за решение може да се използва трикратната стойност на отношението сигнал към шум. Това е приложимо за количествени и качествени изследвания. Границите за решение, получени чрез този подход, се проверяват чрез анализиране на празна матрица, с внесена добавка при изчислената граница за решение.

   в) Метод 3: CCα = LCL + k (едностранен, 99 %) × (комбинирана) стандартна неопределеност на измерването при LCL

      За неразрешени или забранени фармакологичноактивни субстанции, в зависимост от експеримента за валидиране (и съответните му степени на свобода), е разумно да се приложи t-разпределението или, ако за основа се вземе Гаусовото разпределение (едностранно, $n = \infty$), да се използва коефициент k със стойност 2,33.

      Вътрешнолабораторната възпроизводимост и истинността са подходящи за дефиниране на (комбинираната) стандартна неопределеност на измерването, ако при определянето им се вземат предвид всички относими влияещи фактори.

   Метод 2 за изчисляване на CCα може да се използва само до 1 януари 2026 г. за методи, валидирани преди датата на влизане в сила на настоящия регламент. За методите, валидирани след влизането в сила на настоящия регламент, се използват само методи 1 или 3.

([14]) ISO 11843-1:1997 Възможност за откриване на различия. Част 1: Термини и определения.

2. За разрешени субстанции CCα се изчислява, както следва:

а) За разрешени субстанции в комбинации матрица/вид, за които е определена МДСОК или МДГ:

i) Метод 1: чрез процедурата на калибрационната крива съгласно ISO 11843-1:1997 (наречена тук „критична стойност на променливата на нетното състояние“). В този случай се използва материал за матрична празна проба, в който е внесена добавка при МДСОК или МДГ или над тези стойности на стъпки на еднакво отстояние. Пробите се анализират. След идентифицирането стойността на сигнала, когато е възможно, или на преизчислената концентрация, се нанася срещу добавената концентрация. Съответстващата концентрация при МДСОК или МДГ плюс 1,64 пъти стандартното отклонение на вътрешнолабораторната възпроизводимост при допустимата граница е равна на границата за решение (α = 5 %).

ii) Метод 2: CCα = МДСОК (или МДГ) + k (едностранен, 95 %) × (комбинирана) стандартна неопределеност на измерването при МДСОК или МДГ.

За разрешени субстанции, в зависимост от експеримента за валидиране (и съответните му степени на свобода), е разумно да се приложи t-разпределението или, ако за основа се вземе Гаусовото разпределение (едностранно, n = ∞), да се използва коефициент k със стойност 1,64.

Вътрешнолабораторната възпроизводимост и истинността са подходящи за дефиниране на (комбинираната) стандартна неопределеност на измерването, ако при определянето им се вземат предвид всички относими влияещи фактори.

За фармакологичноактивни субстанции, за които е установена МДСОК за сума от различни субстанции, CCα на субстанцията с най-висока концентрация в пробата се използва като CCα за оценка на сумата от субстанциите в измерената проба.

б) За разрешени субстанции в комбинации матрица/вид, за които не е определена МДСОК, не трябва да има остатъци, освен ако е извършено разрешено третиране в съответствие с член 11 от Директива 2001/82/ЕО. За разрешени субстанции, за които не е определена МДСОК, за изчисляването на CCα се използва верижната МДСОК, установена съгласно Регламент за изпълнение (ЕС) 2018/470 на Комисията ([15]). Прилагат се метод 1 или 2 от горния параграф, но „МДСОК“ се отнася до „0,5 пъти верижната МДСОК, с целева стойност 0,1 пъти верижната МДСОК, когато е разумно осъществимо“.

2.7. **Откриваемост при скрининг (CCβ)**

Определя се CCβ за скрининг методите. CCβ се установява по начина, определен в глава 1 „Критерии към аналитични характеристики и други изисквания за аналитичните методи“ на настоящото приложение, и в съответствие с изискванията, посочени в таблица 5. Пълните изисквания за идентифициране обаче (вж. 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5) не е необходимо да се прилагат за скрининг методи.

1. За неразрешени или забранени фармакологичноактивни субстанции се гарантира, че максималната стойност на β-грешката е 5 %. CCβ се изчислява, както следва:

а) Метод 1: процедурата на калибрационната крива съгласно ISO 11843-1:1997 (наречена „минимална откриваема стойност на променливата на нетното състояние“). В този случай се използва представителен материал за матрична празна проба, в който е внесена добавка при РТД или над тази стойност, или ако не е установена РТД, около STC на стъпки на равно отстояние. Пробите се анализират. Стойността на сигнала се нанася срещу добавената концентрация. Съответстващата концентрация при STC плюс 1,64 пъти стандартното отклонение на вътрешнолабораторната възпроизводимост на средното измерено съдържание при STC е равна на възможността за откриване. Екстраполацията за стойности, много по-малки от най-ниското ниво на внасяне на добавка (< 50 % от най-ниското ниво на внасяне на добавка), следва да се потвърждава от експериментални данни на етапа на валидиране.

б) Метод 2: изследване на материал за матрична празна проба с внесена добавка при нива на концентрация, равни на STC и над тази стойност. За всяко ниво на концентрация се анализират 20 празни проби с внесена добавка, за да се осигури надеждна основа за това определяне. Нивото на концентрация, при което остават само ≤ 5 % резултати на фалшиво съответствие, е равно на възможността за откриване на метода.

в) Метод 3: CCβ = LCL + k (едностранен, 95 %) × (комбинирана) стандартна неопределеност на измерването при STC или над тази стойност.

([15]) Регламент за изпълнение (ЕС) 2018/470 на Комисията от 21 март 2018 г. относно подробни правила за максимално допустимата стойност на остатъчни количества, която трябва да бъде взета предвид за целите на контрола на храни, произведени от животни, които са били лекувани в ЕС съгласно член 11 от Директива 2001/82/ЕО (ОВ L 79, 22.3.2018 г., стр. 16).

За неразрешени или забранени фармакологичноактивни субстанции, в зависимост от експеримента за валидиране (и съответните му степени на свобода), може разумно да се приложи t-разпределението или, ако за основа се вземе Гаусовото разпределение (едностранно, n = ∞), да се използва коефициент k със стойност 1,64.

Вътрешнолабораторната възпроизводимост и истинността са подходящи за дефиниране на (комбинираната) стандартна неопределеност на измерването, ако при определянето им се вземат предвид всички относими влияещи фактори.

2. За разрешени субстанции се гарантира, че максималната стойност на β-грешката е 5 %. CCβ се изчислява, както следва:

а) Метод 1: чрез процедурата на калибрационната крива съгласно ISO 11843-1:1997 (наречена тук „минимална откриваема стойност на променливата на нетното състояние“). В този случай се използва представителен материал за матрична празна проба, в който е внесена добавка при допустимата граница и под нея, на стъпки с еднакво отстояние, като се започва от STC. Анализират се пробите и се идентифицира (т) аналитът(ите). Изчислява се стандартното отклонение на средно измереното съдържание при STC.

Съответстващата концентрация при STC плюс 1,64 пъти стандартното отклонение на вътрешнолабораторната възпроизводимост на средното измерено съдържание при STC е равна на възможността за откриване.

б) Метод 2: чрез изследване на материал за матрична празна проба с внесена добавка при нива на концентрация под допустимата граница. За всяко ниво на концентрация се анализират 20 празни проби с внесена добавка, за да се осигури надеждна основа за това определяне. Нивото на концентрация, при което остават само ≤ 5 % резултати на фалшиво съответствие, е равно на възможността за откриване на метода.

в) Метод 3: CCβ = STC + k (едностранен, 95 %) × (комбинирана) стандартна неопределеност на измерването при STC или над тази стойност.

За разрешени субстанции, в зависимост от експеримента за валидиране (и съответните му степени на свобода), може разумно да се приложи t-разпределението или, ако за основа се вземе Гаусовото разпределение (едностранно, n = ∞), да се използва коефициент k със стойност 1,64 (при използване на верижната МДСОК или на стандартната МДСОК са приложими и двете възможности).

Вътрешнолабораторната възпроизводимост и истинността са подходящи за дефиниране на (комбинираната) стандартна неопределеност на измерването, ако при определянето им се вземат предвид всички относими влияещи фактори.

За фармакологичноактивни субстанции, за които е установена МДСОК за сума от различни субстанции, CCβ на субстанцията с най-висока концентрация в пробата се използва като CCβ за оценка на сумата от субстанциите в измерената проба.

2.8. **Калибрационни криви**

Когато за количествено определяне се използват калибрационни криви:

(1) при начертаването на кривата следва да се използват поне пет нива (включително нулевото ниво), които е за предпочитане да бъдат на равно отстояние;

(2) описва се работният обхват на кривата;

(3) описват се математическата формула на кривата и съгласуваността на данните с кривата (коефициент на детерминация R^2);

(4) описват се диапазоните на приемливост за параметрите на кривата.

За калибрационни криви, получени със стандартен разтвор, с еталони, наподобяващи матрица, или еталони с матрица с внесени добавки, се посочват приемливи диапазони за параметрите на калибрационната крива, които могат да варират при различните серии.

2.9. **Абсолютен аналитичен добив**

Абсолютният аналитичен добив на метода се определя, когато не се използва калибриране с вътрешен стандарт или с еталон с матрица с внесени добавки.

Когато са изпълнени изискванията за истинност, посочени в таблица 1, може да се използва коефициент за корекция с постоянна стойност. В противен случай се използва коефициентът на аналитичен добив, получен за конкретната партида. Друга възможност е да се използва процедурата на стандартната добавка ([16]) или вътрешен стандарт вместо коефициент за корекция от аналитичен добив.

Абсолютният аналитичен добив се изчислява за поне шест представителни партиди на матрицата.

В една аликвотна част от празната матрица се внася добавка с аналита преди екстракцията, а във втора аликвотна част от празната матрица се внася добавка след подготовката на пробата при относимо ниво на концентрация и се определя концентрацията на аналита.

Аналитичният добив се изчислява като:

Rec (аналит) = (за еталон с матрица с внесени добавки)/(за еталон, наподобяващ матрица) × 100

2.10. **Относителни матрични ефекти**

Относителният матричен ефект се определя във всички случаи. Това може да се направи или като част от валидирането, или в отделни експерименти. Изчисляването на относителния матричен ефект се извършва за поне 20 различни партиди празни проби (матрица/вид) в зависимост от обхвата на метода, напр. за обхващане на различни видове.

След екстракцията, в празната матрица следва да бъде внесена добавка с аналита при РТД, МДСОК или МДГ и тя следва да бъде анализирана заедно с чист разтвор на аналита.

Относителният матричен ефект или матричен фактор (MF) се изчислява като:

$$\text{MF (стандарт)} = \frac{\text{peak area of MMS standard}}{\text{peak area of solution standard}}$$

$$\text{MF (IS)} = \frac{\text{peak area of MMSIS}}{\text{peak area of solutionIS}}$$

$$\text{MF (стандарт, нормализиран за IS)} = \frac{\text{MF (standard)}}{\text{MF (IS)}}$$

IS: вътрешен стандарт

MMS: еталон, наподобяващ матрицата

Коефициентът на вариация на MF (стандарт, нормализиран за IS) следва да не е по-голям от 20 %.

ГЛАВА 3

КОНТРОЛ НА КАЧЕСТВОТО ПО ВРЕМЕ НА РУТИНЕН АНАЛИЗ — ТЕКУЩА ПРОВЕРКА НА АНАЛИТИЧНИТЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ НА МЕТОДА

Изпълняват се изискванията за осигуряване на качеството на аналитичните резултати от раздел 7.7 на ISO/IEC 17025:2017 ([17]).

По време на рутинния анализ предпочитаният вариант за осигуряване на доказателства за аналитичните характеристики на метода е анализирането на сертифицирани референтни материали (CRM). Тъй като в редки случаи са налични CRM, съдържащи съответните аналити при необходимите нива на концентрация, друга възможност е да се използват и референтни материали, предоставени и характеризирани от РЛЕС или от лаборатории, акредитирани по ISO/IEC 17043:2010 ([18]). Като още една възможност може да се използват редовно контролирани вътрешни референтни материали.

Текущата проверка на аналитичните характеристики на метода по време на рутинния анализ следва да се извършва на етапа на скрининг и на етапа на потвърждение.

([16]) Количеството добавен стандартен аналит може да бъде например между два и пет пъти оценената количество аналит в пробата. Тази процедура е създадена за определяне на съдържанието на аналит в дадена проба, като се вземе предвид аналитичният добив от аналитичната процедура.

([17]) ISO/IEC 17025: 2017 Общи изисквания за компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране (раздел 7.7).

([18]) ISO/IEC 17043:2010 Оценяване на съответствието. Общи изисквания за изпитванията за пригодност.

1. За етапа на скрининг:

   За всяка серия (партида) от извършени анализи се анализира едновременно набор от следните проби за контрол на качеството:

   а) контролна проба за всекидневно потвърждение на правилната работа на апарата, в идеалния случай специфична за метода;

   б) проби за контрол на качеството, в които са внесени добавки при концентрация, близка до STC, и в идеалния случай — при CCβ за скрининг за разрешените фармакологичноактивни субстанции, както и за забранените или неразрешените субстанции;

   в) контролна проба в съответствие (празни проби), а когато е приложимо, празни проби от реактиви.

2. За етапа на потвърждение:

   За всяка серия (партида) от извършени анализи се анализира едновременно набор от следните проби за контрол на качеството:

   а) контролна проба за всекидневно потвърждение на правилната работа на апарата, в идеалния случай специфична за метода;

   б) проби за контрол на качеството, в които са внесени добавки при концентрация, близка до МДСОК или МДГ за разрешените фармакологичноактивни субстанции или близка до РТД или LCL за забранените или неразрешените субстанции (контролни проби в несъответствие);

   в) контролна проба в съответствие (празни проби), а когато е приложимо, празни проби от реактиви.

Препоръчва се следният ред на пробите за контрол на качеството: контролна проба за всекидневно потвърждение на правилната работа на апарата, контролна проба в съответствие, проба(и) за потвърждение, отново контролна проба в съответствие и проба за контрол на качеството с внесена добавка (контролни проби в несъответствие).

При количествените методи с всяка партида официални проби се анализира и измерва калибрационна крива преди или след изброените по-горе проби.

Когато е практически осъществимо, истинността (на базата на проби с внесена добавка) на всички целеви аналити в контролните проби в несъответствие се оценява посредством карти за контрол на качеството съгласно раздел 7.7 от ISO/IEC 17025:2017. Ако за това се изисква непропорционално голям брой определяния на истинността, броят на аналитите може да бъде намален до няколко представителни аналита.

ГЛАВА 4

РАЗШИРЯВАНЕ НА ВАЛИДИРАНИЯ ОБХВАТ НА ПРЕДВАРИТЕЛНО ВАЛИДИРАН МЕТОД

Понякога е необходимо обхватът на предварително цялостно валидиран метод да бъде разширен. В тези случаи разширяването на обхвата следва да се извърши по ефикасен и аналитично обоснован начин. Това може да бъде постигнато чрез валидиране на по-малък брой проби (напр. на половината проби) в сравнение с необходимия брой за пълно валидиране.

Независимо от това видът и броят на промените, които трябва да бъдат валидирани с помощта на една схема за валидиране с по-малък брой проби, следва винаги да се основават на експертните познания и предишния опит, напр. при промяна в техниката на откриване при всички случаи се налага извършване на пълно валидиране.

Като цяло, за да се осигури текущата валидност на метода, аналитичните му характеристики се подлагат на непрекъснато наблюдение и се извършва сравнение с първоначално получените стойности на параметрите, подлежащи на валидиране. В идеалния случай текущият контрол на аналитичните характеристики на метода се проектира по такъв начин, че данните, които не достигат за извършване на пълно валидиране, могат да бъдат събрани с течение на времето (напр. с няколко стойности за данни от пробите за контрол на качеството във всяка аналитична серия).

4.1. **Разширяване на обхвата на методите по отношение на обхвата на концентрациите**

Поради промени в МДСОК, МДГ и РТД може да се наложи коригиране на обхвата на концентрациите, за който методът е валидиран. В такъв случай е допустимо да се приложи схема за валидиране с по-малък брой проби.

Калибрационните криви за променения обхват следва да се подготвят съгласно валидираната процедура. Следва да се анализират различни партиди, в които са внесени добавки при различни нива на концентрация (вж. 2.2.1, 2.2.2). Стойностите на истинността, повторяемостта и вътрешнолабораторната възпроизводимост/междинната прецизност следва да попадат в приемлив обхват в сравнение с обхвата на първоначално валидирания метод. Следва да се извърши преизчисляване на CCβ (за скрининг методи) и на CCα (за методи за потвърждение), където е приложимо.

4.2. **Разширяване на обхвата на методите по отношение на добавянето на субстанции**

По принцип разширяването на обхвата на метода чрез добавяне на съединения е възможно само за аналити, чиито структура и характеристики са подобни на структурата и характеристиките на аналитите, които вече са включени в аналитичния метод. В такъв случай е допустимо да се приложи схема за валидиране с по-малък брой проби. По същия начин не се допуска отклонение от описанието на метода.

Калибрационните криви за добавените субстанции следва да се подготвят съгласно валидираната процедура. Следва да се анализират различни партиди на матрични материали, в които са внесени добавки при различни нива на концентрация (вж. 2.2.1, 2.2.2). Стойностите на истинността, повторяемостта и вътрешнолабораторната възпроизводимост/междинната прецизност следва да попадат в сравним обхват по отношение на онези на другите аналити на първоначално валидирания метод, както и да отговарят на изискванията, посочени в 1.2.2. Трябва да се изчислят CCβ (скрининг методи) и CCα (методи за потвърждение) за новите аналити.

4.3. **Разширяване на обхвата на методите по отношение на матриците/видовете**

Решението за включване на нови матрици или видове във вече валидиран аналитичен метод винаги се взема за всеки отделен случай въз основа на знанията и опита, придобити до момента от използването на метода и от предварителните експерименти за оценяване на потенциалните матрични ефекти и пречения. По принцип това ще бъде възможно само за матрици с подобни свойства и за некритични аналити (стабилност, откриваемост).

Калибрационните криви (за стандарта или за матрицата) следва да се подготвят съгласно валидираната процедура. Следва да се анализират различни партиди от матричен материал, в които са внесени добавки при различни нива на концентрация (вж. 2.2.1, 2.2.2). Стойностите на истинността, повторяемостта и вътрешнолабораторната възпроизводимост/междинната прецизност следва да попадат в приемлив обхват спрямо онези от първоначално валидирания метод, както и да отговарят на изискванията, посочени в 1.2.2. В зависимост от подхода за валидиране може да е необходимо да се извърши преизчисляване на CCβ (за скрининг методи) и на CCα (за методи за потвърждение).

Ако резултатите не попадат в приемлив обхват в сравнение със стойностите за оригиналната матрица, ще бъде необходимо да се извърши допълнително пълно валидиране, за да се определят специфичните за матрицата/видовете аналитични параметри.

В случаите, при които МДСОК за конкретна субстанция се различават за определени матрици, най-вероятно ще се окаже трудно обхватът на метода да бъде адаптиран към допълнителната матрица/вид и допълнителната концентрация, тъй като в този случай трябва да се отчете наличието на две промени. В такива случаи се препоръчва да се извърши пълно валидиране.

ПРИЛОЖЕНИЕ II

ПРОЦЕДУРИ ЗА ВЗЕМАНЕ НА ПРОБИ И ОФИЦИАЛНА ОБРАБОТКА НА ПРОБИТЕ

1. **Количество на пробата**

Минималните количества на пробите се определят в националната програма за контрол на остатъците. Минималните количества на пробите следва да са достатъчни, за да бъде възможно одобрените лаборатории да проведат аналитичните процедури, необходими за извършването на анализите за скрининг и за потвърждение. По-конкретно при домашни птици, аквакултури, зайци, дивеч, отглеждан в стопанства, влечуги и насекоми пробата се състои от материал от едно или повече животни, в зависимост от изискванията на аналитичните методи. При яйцата размерът на пробата е поне 12 яйца или повече, в зависимост от използвания аналитичен метод. В случай че е необходимо да се анализират няколко категории субстанции в една и съща проба с помощта на различни аналитични методи, размерът на пробата съответно се увеличава.

2. **Разделение на подпроби**

Всяка проба се разделя на поне две еквивалентни подпроби, всяка от които позволява да бъде извършена пълната аналитична процедура, освен ако това е технически невъзможно или не се изисква от националното законодателство. Подразделянето може да се осъществи на мястото, където се взема пробата, или в лабораторията.

3. **Проследимост**

Всяка проба се взема по такъв начин, че винаги да е възможно да се проследи обратно до стопанството на произход и до партидата животни или до отделното животно, което е относимо. По-специално при млякото, в зависимост от избора на държавата членка, пробите могат да бъдат взети от едно от следните места:

1. в стопанството — от цистерната за събиране;
2. на равнище млечна промишленост — преди разтоварването на млякото.

4. **Контейнери за проби**

Пробите се събират в подходящи контейнери, за да се запазят целостта и проследимостта им. В частност контейнерите са такива, че да не се допуска заместване, кръстосано замърсяване и разграждане. Контейнерите следва да са официално запечатани.

5. **Доклад за вземане на проби**

Изготвя се доклад след всяка процедура за вземане на проба.

Инспекторът събира поне следната информация за доклада за вземането на проби:

1. адрес на компетентните органи;
2. име на инспектора или идентификационен код;
3. номер на официалния код на пробата;
4. дата на вземането на пробата;
5. име и адрес на притежателя или на лицето, отговорно за животните или животинските продукти;
6. име и адрес на стопанството, от което са животните (когато се взема проба от стопанство);
7. регистрационен номер на предприятието — номер на кланицата;
8. идентификация на животното или на продукта;
9. животински вид;
10. матрица на пробата;
11. където е относимо, лечение през последните четири седмици преди вземането на пробата (когато се взема проба от стопанство);
12. вещество или група вещества за изследване;
13. особени забележки.

В зависимост от процедурата за вземане на проби трябва да се предоставят копия на доклада на хартиен или на електронен носител. Докладът за вземане на проби и неговите копия се попълват по такъв начин, че автентичността и правната им валидност да бъдат гарантирани, което може да наложи тези документи да бъдат подписани от инспектора. В случай на вземане на проби от стопанството земеделският стопанин или неговият заместник могат да бъдат поканени да подпишат оригиналния доклад за вземане на проби.

Оригиналът на доклада за вземане на проби остава при компетентните органи, които трябва да гарантират, че до него нямат достъп неоправомощени лица.

Ако е необходимо, земеделският стопанин или собственикът на предприятието може да бъде информиран за вземането на пробата.

6. **Доклад за вземане на проби за лабораторията**

Докладът за вземане на проби за лабораторията, създадена от компетентните органи, следва да отговаря на изискванията, посочени в раздел 7 на ISO/IEC 17025:2017 ([1]), и да съдържа поне следната информация:

1. адрес на компетентните органи или на определените органи;
2. име на инспектора или идентификационен код;
3. номер на официалния код на пробата;
4. дата на вземането на пробата;
5. животински вид;
6. матрица на пробата;
7. вещество или група вещества за изследване;
8. особени забележки.

Докладът за вземане на проби за лабораторията придружава пробата при изпращането ѝ в лабораторията.

7. **Транспортиране и съхранение**

В програмите за контрол на остатъците се уточняват подходящите условия за съхранение и транспортиране за всяка комбинация от аналит и матрица, за да се гарантира стабилността на аналита и целостта на пробата. Времето за транспортиране следва да е възможно най-кратко, а температурата по време на транспортиране да е подходяща, за да се гарантира стабилността на аналита.

Специално внимание следва да се отдели на кутиите за транспортиране, температурата и времето за доставяне в носещата отговорност лаборатория.

В случай на неспазване на изискванията на програмата за контрол лабораторията незабавно уведомява компетентния орган.

([1]) ISO/IEC 17025: 2017 Общи изисквания за компетентността на лабораториите за изпитване и калибриране (раздел 7.7).