



Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler  
Veterinærinstituttet  
PB 750 Sentrum  
N-0106 Oslo  
Norway  
[www.nmkl.org](http://www.nmkl.org)

**NMKL-Protokoll nr 4, 2010:**

**MANUAL FOR NMKL  
MELLOM-LABORATORIE-VERIFISERING  
(PEER-VERIFICATION)  
AV METODER**

**Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler**

# MANUAL FOR NMKL MELLOM-LABORATORIE- VERIFISERING (PEER-VERIFICATION) AV METODER

## INNHOLDSFORTEGNELSE

1. INTRODUKSJON .....	3
2. INTERMEDIÆR VALIDERING AV METODER – PROSESSEN .....	3
3. ESTIMERING AV METODEKARAKTERISTIKKER .....	4
3.1. Minimumskrav til validering og metodekarakteristikker .....	4
3.2. Andre parametere for kvalitative metoder .....	7
3.3. Generelle beskrivelser .....	8
4. KRAV TIL UAVHENGIGE LABORATORIER .....	8
4.1. Identifikasjon og utvelgelse av uavhengig laboratorium .....	8
4.2. Metodeformat .....	9
4.3. Utvelgelse av prøver .....	9
4.4. Presisjon og riktighet .....	9
4.5. Evaluering .....	9
5. SJEKKLISTE FOR UTVIKLING, BESKRIVELSE AV KARAKTERISTIKKER OG TESTING AV ROBUSTHET FOR METODER (se også [1] og [2]) .....	10
5.1. Metodens omfang .....	10
5.2. Metodens robusthet .....	10
5.3. Innen-laboratorievariansen (ytelsen) til optimalisert metode .....	10
5.4. Karakteristikker/spesifikasjoner for intermediær validert metode .....	10
5.5. Kvalitetskontroll av metodekarakteristikker .....	10
5.6. Dokumentasjon .....	11
6. SJEKKLISTE FOR PROTOKOLL FOR UAVHENGIG LABORATORIUM .....	11
7. RAPPORTSKJEMA FOR UAVHENGIG LABORATORIUM .....	12
8. SKJEMA FOR TEKNISK EVALUERING FOR INTERMEDIÆR VALIDERING AV METODER .....	13
TILLEGG A. PROSEDYRE FOR TESTING AV ROBUSTHET .....	14
REFERANSER .....	16

## 1. INTRODUKSJON

Formålet med NMKLs program for intermediær validering av metoder er å kunne tilby et utvalg av validerte metoder som ikke har gjennomgått en full kollaborativ avprøvning.

Sentralisering av laboratorietjenester og bruk av mer avansert, dyrt og spesialisert analytisk utstyr har skapt et behov for en prosedyre som kan brukes til å validere metoder i situasjoner der det ikke er mulig å gjennomføre en full kollaborativ avprøvning på grunn av mangel på deltakende laboratorier.

Intermediær validering av en metode omfatter beskrivelse, validering og testing av metodens egnethet i henhold til anerkjente internasjonale standarder, samt

- etablering av akseptable metodekarakteristikker innenfor et laboratorium
- demonstrasjon av metodekarakteristikkene (metodens ytelse) i minst ett annet, uavhengig laboratorium

Programmet er bare ment for kjemiske metoder.

Protokollen er utarbeidet i en arbeidsgruppe i NMKL under ledelse av **Torben Leth, Fødevarer instituttet**, DTU, Danmark. Øvrige prosjektmedlemmer har vært Flemming Hansen, Danmark, Lenna Saari, Finland, Guðjon Atli Auðunsson, Island, Per Lea, Norge, Lars Jorhem, Åsa Rosengren og Gunnar Forsgren, Sverige.

NMKL inviterer lesere og brukere av denne manualen til å kommentere og komme med innspill på dets innhold. Kommentarene bes sendes til NMKLs generalsekretariat.

© NMKL

## 2. INTERMEDIÆR VALIDERING AV METODER – PROSESSEN

På grunnlag av anbefalinger fra NMKLs nasjonalkomiteer utpeker generalsekretæren en metodereferent. I samarbeid med formannen i den aktuelle subkomiteen utpeker generalsekretæren en teknisk referent.

Metodereferenten velger et uavhengig laboratorium [4].

Metodereferenten

- skriver metoden i NMKL-format i henhold til ISO 78-2 [7]
- gjennomfører en full validering av metoden i samsvar med NMKL-prosedyren for validering av kjemiske metoder [1] eller NMKL-prosedyren for evaluering av resultater fra kvalitative metoder [2]
- utarbeider en protokoll for testing ved andre laboratorier av metodekarakteristikker i henhold til NMKL-protokollen for kjemiske analyser [3]
- velger et tredje laboratorium dersom det er aktuelt [4]
- klargjør nødvendig prøvemateriale og sender metodebeskrivelse, prøver, protokoll og rapportskjema til det andre laboratoriet

- analyserer dataene fra det andre laboratoriet og sender metodevalideringsrapporten og rapporten fra det uavhengige laboratoriet til den tekniske referenten

Det uavhengige laboratoriet

- utfører metodeavprøvingen i samsvar med metoden og protokollen
- sender resultatene til metodereferenten i samsvar med rapportskjemaet

Den tekniske referenten

- velger minst 2 eksperter som skal gi tekniske evalueringer innen 3 uker og informerer generalsekretæren om navn og adresser
- handler på følgende måte:
  - Hvis begge evalueringene er negative; underretter metodereferenten om at metoden er uakseptabel.
  - Hvis begge evalueringene er positive med ubetydelige kommentarer; underretter metodereferenten om at metoden er akseptabel med ubetydelige endringer.
  - Hvis evalueringene er delt; søker råd hos ytterligere en eller flere eksperter for å innhente flere evalueringer.
  - Hvis begge evalueringene er positive med mindre endringer; ber om de nødvendige endringene fra metodereferenten før metoden aksepteres.

Formannen i NMKL og formannen i subkomiteen utfører den endelige godkjenningen, og sekretariatet publiserer metoden som en NMKL-metode, som er intermediær validert.

### **3. ESTIMERING AV METODEKARAKTERISTIKKER**

#### ***3.1. Minimumskrav til validering og metodekarakteristikker***

##### **Riktighet**

Riktigheten til en metode bestemmes ved hjelp av sertifiserte referansematerialer, referansemetoder med kjent usikkerhet eller gjenvinning fra spikede prøver.

Referansematerialer skal kjøres gjennom hele prosedyren for hver batch. Ved bruk av spikede prøver eller prøver med tilsetning skal tilsetningsmetoden beskrives.

##### **Gjenvinning**

For kvantitative metoder måles graden av gjenvinning for følgende konsentrasjoner:

- Negativ
- Lav (maks. 3×LOD)
- Middels (f.eks. MRL-verdi (Maximum Residue Limit) hvis aktuelt)
- Høy

med minst 3 replikater for analyse av både prøver med opprinnelig mengde og prøver med tilsatt mengde.

Graden av gjenvinning beregnes på følgende måte:

$$\%Gjenvinning = \frac{\text{Mengde funnet} - \text{Mengde i opprinnelig prøve}}{\text{Mengde tilsatt}}$$

Det finnes retningslinjer for forventet grad av gjenvinning på spesifikke analyseområder. Utformingen av gjenvinningsforsøk må være egnet for metodens tiltenkte formål, og må dekke alle relevante matriser for horisontale metoder.

### **Standardkurve**

Et tilstrekkelig antall standardløsninger må til for å definere responsen i forhold til konsentrasjonen. Antallet standardløsninger er en funksjon av konsentrasjonsområdet. I de fleste tilfeller er standardløsninger med minst 5 konsentrasjoner (ikke null) tilstrekkelig for å lage en standardkurve. Kurven bør testes og uttrykkes statistisk. For ikke-lineære kurver er det nødvendig med flere standardløsninger.

### **Deteksjonsgrense – LOD (limit of detection)**

Deteksjonsgrensen beregnes på følgende måte:

$$\text{LOD} = \bar{X} + 3s$$

der  $\bar{X}$  er middelveien av avlesningene for matriseblindprøver ( $n=20$ ), og  $s$  er standardavviket for middelveien, uttrykt ved analyttkonsentrasjon.

Uten signal for blindprøven, som i mange kromatografiske metoder, øker den instrumentelle støyen. Mål bredden på grunnlinjen minst 10 ganger med 1 minutt intervaller, og beregn standardavviket. For metoder med mindre enn 100 % gjenvinning må deteksjonsgrensen korrigeres for gjenvinning.

### **Bestemmelsesgrense – CC $\alpha$**

EU krever nå at man bestemmer bestemmelsesgrensen ( $CC\alpha$ ) i stedet for deteksjonsgrensen (LOD) for metoder som brukes til å analysere næringsmidler for innhold av visse reststoffer [4].

For stoffer som det ikke er fastsatt noen tillatt grense for, kan  $CC\alpha$  bestemmes ved hjelp av fremgangsmåte 1) eller 2) nedenfor.

1) Ved bruk av standardkurve i henhold til ISO 11843 [5].

Her benyttes blindprøver med tilsetning i konsentrasjoner til og over laveste påvisbare/identifiserbare mengde. Analyser prøvene. Etter identifikasjon skal signalet plottes mot den tilsatte konsentrasjonen. Bestemmelsesgrensen er lik den tilsvarende konsentrasjonen ved skjæringspunktet på y-aksen pluss 2,33 ganger standardavviket for den interne reproduserbarheten for skjæringspunktet. Dette gjelder bare for kvantitative bestemmelser ( $\alpha = 1\%$ ).

2) Ved å analysere minst 20 blindprøver per matrise for å beregne signal/støy-forholdet i det tidsintervallet der analytten forventes.

Tre ganger signal/støy-forholdet kan brukes som bestemmelsesgrense. Dette gjelder for både kvantitative og kvalitative bestemmelser.

For stoffer som det er fastsatt en tillatt grense for, kan  $CC\alpha$  bestemmes ved hjelp av fremgangsmåte 3) eller 4) nedenfor.

3) Ved bruk av standardkurve i henhold til ISO 11843 [5].

Som i fremgangsmåte 1), brukes det også her blindprøver med tilsetning rundt den tillatte grensen. Analyser prøvene. Etter identifikasjon skal signalet plottes mot den tilsatte konsentrasjonen.

Bestemmelsesgrensen er lik den tilsvarende konsentrasjonen ved den tillatte grensen pluss 1,64 ganger standardavviket for den interne reproduserbarheten ( $\alpha = 5\%$ ).

4) Ved å analysere minst 20 blindprøver per matrise med tilsetning av analytten(e) til den tillatte grensen. Bestemmelsesgrensen er lik konsentrasjonen ved den tillatte grensen pluss 1,64 ganger det tilsvarende standardavviket ( $\alpha = 5\%$ ).

### **Kvantifiseringsgrense – LOQ (Limit of Quantification)**

Kvantifiseringsgrensen beregnes på følgende måte:

$$LOD = \bar{X} + 10s$$

der  $\bar{X}$  er middelerdien av avlesningene for matriseblindprøver ( $n=20$ ) pluss 10 ganger standardavviket for middelerdien, uttrykt ved analyttkonsentrasjon.

For metoder med mindre enn 100 % gjenvinning, må kvantifiseringsgrensen korrigeres for gjenvinning.

### **Påvisningsgrense - $CC\beta$**

EU krever nå at man bestemmer påvisningsgrensen ( $CC\beta$ ) i stedet for kvantifiseringsgrensen (LOQ) for metoder som brukes til å analysere næringsmidler for innhold av visse reststoffer [4].

For stoffer som det ikke er fastsatt noen tillatt grense for, kan  $CC\beta$  bestemmes ved hjelp av fremgangsmåte 1), 2) eller 3) nedenfor.

1) Ved bruk av standardkurve i henhold til ISO 11843 [5].

I denne fremgangsmåten skal det brukes en representativ blindprøve med tilsetning til og under laveste påvisbare/identifiserbare mengde. Analyser prøvene. Etter identifikasjon skal signalet plottes mot den tilsatte konsentrasjonen. Påvisningsgrensen er lik den tilsvarende konsentrasjonen ved bestemmelsesgrensen pluss 1,64 ganger standardavviket for den interne reproduserbarheten for gjennomsnittet av det målte innholdet ved bestemmelsesgrensen ( $\beta = 5\%$ ).

2) Ved å analysere minst 20 blindprøver per matrise, tilsatt analytt(er) til bestemmelsesgrensen. Analyser prøvene og identifiser analyttene. Påvisningsgrensen er lik verdien av bestemmelsesgrensen pluss 1,64 ganger standardavviket for den interne reproduserbarheten for det målte innholdet ( $\beta = 5\%$ ).

3) Dersom det ikke finnes noen kvantitative resultater, kan påvisningsgrensen bestemmes ved å undersøke blindprøver med tilsetning til og over bestemmelsesgrensen. I så fall er metodens påvisningsgrense lik konsentrasjonsnivået der bare  $\leq 5\%$  falske negative resultater gjenstår. Derfor skal det utføres minst 20 undersøkelser for minst ett konsentrasjonsnivå for å sikre et pålitelig grunnlag for denne bestemmelsen.

For stoffer som det er fastsatt en tillatt grense for, kan  $CC\beta$  bestemmes ved hjelp av fremgangsmåte 4) eller 5) nedenfor.

4) Ved bruk av standardkurve i henhold til ISO 11843 [5].

I denne fremgangsmåten skal det brukes en representativ blindprøve med tilsetning rundt den tilsatte grensen. Analyser prøvene og identifiser analytten(e). Beregn standardavviket for gjennomsnittet av det målte innholdet ved bestemmelsesgrensen. Påvisningsgrensen er lik den tilsvarende

konsentrasjonen ved verdien av bestemmelsesgrensen pluss 1,64 ganger standardavviket for den interne reproduserbarheten ( $\beta = 5 \%$ ).

5) Ved å analysere minst 20 blindprøver per matrise, tilsatt analytt(er) til bestemmelsesgrensen. Påvisningsgrensen er lik verdien av bestemmelsesgrensen pluss 1,64 ganger det tilsvarende standardavviket ( $\beta = 5 \%$ ).

### **Presisjon**

Det relative standardavviket for enkeltresultater bør baseres på resultater fra ulike dager, ulike analytikere, ulike standardkurver, ulike reagensbatcher og ulike matriser. Presisjon uttrykkes vanligvis gjennom reproduserbarhet og repeterbarhet:

#### **Reproduserbarhet**

Ideelt sett bør presisjonen måles som reproduserbarhet for å fastslå forskjeller i metodekarakteristikker/ ytelsen (method performance) mellom laboratorier. Resultater bør undersøkes for ulike prøver, ulike konsentrasjoner ( $\frac{1}{2}x$ ,  $1x$  og  $1\frac{1}{2}x$  eller  $2x$ ) og ulike dager. Reproduserbarhetsdata genereres i referentens eget laboratorium i tillegg til ett eller to uavhengige laboratorier.

#### **Repeterbarhet**

Denne komponenten av presisjonen bidrar til reproduserbarheten og kan bestemmes innen et laboratorium.

### **Spesifisitet**

Analyser med reagensblindprøver og matriseblindprøver bør kjøres for å sikre at det ikke finnes stoffer som kan interferere. For å fastslå en metodes spesifisitet for analytten(e) den skal brukes til, må resultatene testes under forskjellige eksperimentelle betingelser, f.eks. 2 ulike analytiske prinsipper eller 2 ulike deteksjonsteknikker. Metoden skal kunne skjelne analytten fra kjente stoffer som skaper interferens, og atferden til analytten under analysen skal være identisk med atferden til det tilsvarende standardmaterialet i egnet matrise.

### **Sammenlikning med eksisterende metoder**

Når det er aktuelt, anbefales det sterkt å sammenlikne metoden som skal valideres, med en eksisterende metode (fortrinnsvis en annen intermediær validert eller kollaborativt avprøvd metode). Avhengig av analyseområdet er det som regel tilstrekkelig å utføre et passende antall sammenliknende analyser for å vise at de to metodene har tilsvarende karakteristikker/egnethet. Hvis det er mulig, bør disse analysene utføres på nivåer som er analysert i en kollaborativ avprøving av den "gamle" metoden.

## **3.2. Andre parametere for kvalitative metoder**

### **Kryssreaksjon**

Prøver bør testes for kryssreaksjon med andre kjente stoffer.

### **Spesifisitet**

Bestemmes vanligvis på samme måte som kryssreaksjon. Alle prøver bør testes for kryssreaksjon med andre kjente stoffer.

### **Forekomst av falske positive/falske negative resultater**

For kvalitative metoder kan presisjon uttrykkes som ratene av sanne og falske positive (eller negative) resultater. Disse ratene bør bestemmes ved flere konsentrasjoner, inkludert spesifikasjonsnivået. Data fra en bekreftende kollaborativ metodeavprøving skal legges ved dersom metoden(e) kan brukes for samme matrise (r) og konsentrasjonsområde(r). Hvis det ikke finnes noen kollaborativ metodeavprøving, kan man i stedet utføre analyser av grupper av negative og positive prøver med tilsetning. Formler som brukes i beregninger, må defineres og tas med i metoden. Responsrater kan også uttrykkes som spesifisitet-, sensitivitet- og predikasjonsrater. Eksakte definisjoner av de brukte spesifisitet-, sensitivitet- og predikasjonsratene må tas med. Statistiske utregninger og evaluering av resultatene må utføres i samsvar med NMKL-prosedyre nr. 20 [2].

### **3.3. Generelle beskrivelser**

#### **Beskrivelser av reagenser og apparatur**

Apparatur og reagenser som er angitt i metodene, skal spesifiseres ved hjelp av karakteristikk eller generelle beskrivelser, og ikke med merkenavn. For å unngå å nevne spesifikke merkeprodukter, må kritiske parametere identifiseres og defineres. Standarder og tester for systemegnethet skal være fastslått og klart beskrevet slik at produktet blir definert på en generell måte, slik at det er enkelt å finne tilsvarende produkter. Forhandler- og merkenavn kan tas med og omtales som "eksempler". Det bør da settes inn en fotnote med følgende innhold: "NMKL støtter ikke merkenavnene som er nevnt i denne metoden, disse er kun tatt med som eksempler".

#### **Tester for systemegnethet (System Suitability Tests, SST)**

Der det er aktuelt, skal metoder omfatte tester for egnethet som brukes til å fastslå om reagenser og apparatur er akseptable. En SST er en klar, konsis og spesifikk teknisk beskrivelse av en eller flere avgjørende tester, som viser at alle kontrollerbare variabler for et bestemt produkt som brukes i en metode, er innenfor akseptable grenser. Testen(e) utføres for å fastslå om et produkt som brukes i metoden, har en målbar virkning på metoderesultatene.

## **4. KRAV TIL UAVHENGIGE LABORATORIER**

### **4.1. Identifikasjon og utvelgelse av uavhengig laboratorium**

Metodereferenten velger et uavhengig laboratorium som skal verifisere og evaluere metoden. Laboratoriet forventes ikke å duplisere alle dataene som er generert av referenten, men det skal verifisere metodekarakteristikkene. Det uavhengige laboratoriet kan være en del av metodereferentens organisasjon så lenge personalet som gjennomfører den uavhengige valideringen

- ikke rapporterer til personen som er involvert i utviklingen eller innleveringen av metoden og
- ikke bruker samme utstyr eller materialer.

Laboratoriet som velges ut, bør være et som utfører den aktuelle typen tester og matriser rutinemessig.

#### **4.2. Metodeformat**

Det uavhengige laboratoriet bør få metoden i trinn-for-trinn-formatet som er angitt i ISO 78-2 [7], og som er innlevert til NMKL for publisering. Dette er svært viktig fordi det gjør det enkelt å identifisere og avklare hvert enkelt trinn hvis laboratoriet får problemer.

#### **4.3. Utvelgelse av prøver**

Referenten skal velge ut prøver som omfatter alle relevante matriser og tilfredsstillende kravene til at det uavhengige laboratoriet kan underbygge bruksområdet og innen-laboratoriepresisjonen og riktigheten. Det uavhengige laboratoriet skal, om mulig, bli gitt i hvert fall noen av de samme prøvene som er testet av referenten, slik at det er mulig å bestemme mellom-laboratoriepresisjonen. Hvis dette ikke er mulig, skal minst halvparten av prøvene, avhengig av antall prøver, være kjente (referansematerialer) eller tidligere testet med andre metoder. Test- eller øvelsesprøver bør også gjøres tilgjengelig for det uavhengige laboratoriet, slik at analytikerne får mulighet til å gjøre seg kjent med materialet.

#### **4.4. Presisjon og riktighet**

Det uavhengige laboratoriet skal verifisere presisjonen og riktigheten til metoden. Presisjonen skal bestemmes i det minste i noen representative matriser av aktuelle prøvene. Riktigheten bestemmes ved hjelp av referansematerialer, andre kjente prøver eller standardtilsetninger – eller hvis mulig, med alle tre.

#### **4.5. Evaluering**

Det uavhengige laboratoriet skal utarbeide en skriftlig evaluering av metoden, inkludert forslag til alternative trinn eller prosedyrer. Andre punkter som bør omtales, er laboratoriets erfaringer når det gjelder riktighet og presisjon, metodens brukervennlighet, spesielle krav til glassutstyr, instrumenter osv., samt generelle kommentarer. Det uavhengige laboratoriet skal dokumentere all kommunikasjon med metodereferenten angående metoden og tolkningen av resultater. Denne dokumentasjonen skal leveres sammen med evalueringen. Det uavhengige laboratoriet skal ta vare på all dokumentasjon (kromatogrammer, spektre osv.) for alle analyserte prøver, inkludert blindprøver og standarder, og levere disse sammen med metodeevalueringen. Dersom resultatene fra det uavhengige laboratoriet ikke stemmer overens med referentens, skal metoden ikke publiseres før alle spørsmål er avklart. For kvantitative metoder kreves en HorRat-verdi  $\leq 2$  for at en metode skal bli godkjent.

## **5. SJEKKLISTE FOR UTVIKLING, BESKRIVELSE AV KARAKTERISTIKKER OG TESTING AV ROBUSTHET FOR METODER (se også [1] og [2])**

### **5.1. Metodens omfang**

Beskriv omfanget til metoden på følgende måte:

- Metodens formål (f.eks. kontroll, overvåking, kvalitetskontroll)
- Type metode (f.eks. referansemetode, screening-metode, bekreftende metode)
- Anvendelsesområde for metoden (f.eks. konsentrasjonsområde, analytt(er), matrise(r))

### **5.2. Metodens robusthet**

Følg fremgangsmåtene for testing av robusthet slik som beskrevet, for eksempel, følgende dokumenter: Youden & Steiner (1975) Statistical Manual of the AOAC, AOAC International, Arlington, VA. (Se APPENDIX A), Dols & Armbrrecht (1976) J. Assoc. Off. Anal. Chem. **59**, 1204-1207 eller i Tillegg A til dette dokumentet.

### **5.3. Innen-laboratorievariansen (ytelsen) til optimalisert metode**

Oppgi data om følgende:

- Riktighet eller bias (systematisk feil)
- Gjenvinning
- Responsfaktor /Likning for standardkurve (respons vs konsentrasjon i løsning)
- Analytisk funksjon (respons vs konsentrasjon i matrise, inkludert blindprøver)
- Deteksjonsgrense, kvantifiseringsgrense
- Repeterbarhet
- Evt. nødvendige matematiske omregninger

### **5.4. Karakteristikk/spesifikasjoner for intermediær validert metode**

Oppgi informasjon om følgende:

- Interferenser (spesifisitet): urenheter, forurensende stoffer, tilsetninger, matriser, metabolske produkter
- Karakteristikk/spesifikasjoner og kriterier for reagenser og instrumenter
- Tester for systemegnethet (SST)
- Kritiske trinn eller parametere
- Sammenlikning med andre metoder, hvis tilgjengelig

### **5.5. Kvalitetskontroll av metodekarakteristikk**

Oppgi informasjon/spesifikasjoner/krav for følgende:

- Akseptansgrenser
- Standard- / Kalibreringskontroller
- Referansematerialer
- Blindkontroller
- Standarder

- Prøver med tilsetning

### **5.6. Dokumentasjon**

Kopier av kromatogrammer, spektre, absorbansavlesninger osv. for prøver, standarder og kontroller, klart merket.

## **6. SJEKKLISTE FOR PROTOKOLL FOR UAVHENGIG LABORATORIUM**

### 1. Metode

- NMKL-format for omfattende metodeverifisering i samsvar med ISO 78-2 [7]

### 2. Prøver og standarder

- Klart merket med identifikasjon, mengde, styrke (for standarder) og oppbevaringsbetingelser

### 3. Laboratorieevaluering

- Instruksjoner for klargjøring av standarder og standardkurve
- Instruksjoner for å gjøre seg kjent med materialet (minst 2 kontrollprøver og 2 prøver med tilsetning)

### 4. Underbygging av metodekarakteristikker innen-laboratoriet

- Riktighet og/eller gjenvinning
- Repeterbarhet

### 5. Metodekarakteristikker mellom-laboratoriene

- Reproduserbarhet

### 6. Rapportskjema

- Angi antall signifikante siffer som kreves i henhold til aktuelt analyseområde

## 7. RAPPORTSKJEMA FOR UAVHENGIG LABORATORIUM

Forfatter(e):

Metode:

Uavhengig laboratorium:

Kontaktperson ved uavhengig laboratorium (navn, adresse, telefon, e-post):

<b>Tekniske evalueringskriterier:</b>	<b>Ja</b>	<b>Nei</b>
1. Er metoden teknisk gjennomførbar?		
2. Dekker metodebeskrivelsen og den intermediære valideringen alle relevante punkter på Sjekkliste for utvikling, beskrivelse av karakteristikker og testing av robusthet for metoder?		
3. Er konklusjonene og uttalelsene om metodens anvendelsesområde som foreslås av referenten, gyldige på grunnlag av dataene?		
4. Er tilstrekkelig mange datapunkter evaluert?		
5. Er metoden praktisk gjennomførbar, også med tanke på sikkerhet og miljø?		
6. Er kritiske trinn identifisert?		
7. Er tiltak for kvalitetskontroll identifisert/tilstrekkelige?		
<b>Redigeringsmessige evalueringskriterier:</b>		
8. Er metodebeskrivelsen klar og fullstendig?		
9. Er alle tabeller, figurer, likninger og termer tilstrekkelig forklart?		
10. Er reagenser og apparatur beskrevet ved hjelp av karakteristikker med tester for systemegnethet (SST) der det er nødvendig?		

Skal legges ved rapportskjemaet: Alle data: kromatogrammer, absorpsjonskurver osv. for blindprøver, standarder, kontrollprøver og prøver.

Kommentarer:

## 8. SKJEMA FOR TEKNISK EVALUERING FOR INTERMEDIÆR VALIDERING AV METODER

Forfatter(e):

Metode:

Teknisk anbefaling:

\_\_\_\_\_ Dataene indikerer at metoden er akseptabel.

\_\_\_\_\_ Evalueringen av metoden kan ikke fullføres før ytterligere informasjon foreligger som angitt nedenfor eller på et eget ark.

\_\_\_\_\_ Dataene indikerer at metoden ikke er akseptabel.

<b>Tekniske evalueringskriterier:</b>	<b>Ja</b>	<b>Nei</b>
1. Er metoden teknisk gjennomførbar?		
2. Dekker metodebeskrivelsen og den omfattende verifiseringen alle relevante punkter på Sjekkliste for utvikling, beskrivelse av karakteristikk og testing av robusthet for metoder?		
3. Er kommentarene fra det andre laboratoriet tatt til følge?		
4. Er konklusjonene og uttalelsene om metodens anvendelsesområde gyldige på grunnlag av de presenterte dataene?		
5. Er tilstrekkelig mange datapunkter evaluert?		
<b>Redigeringsmessig anbefaling:</b>		
Presentasjonen av rapporten er akseptabel.		
Presentasjonen av rapporten krever endringer som angitt nedenfor eller på et eget ark.		
<b>Redigeringsmessige evalueringskriterier:</b>		
6. Er metoden presentert i riktig format?		
7. Er metodebeskrivelsen klar og entydig?		
8. Er alle tabeller, figurer, likninger og termer forklart?		
9. Er reagenser og apparatur beskrevet ved hjelp av karakteristikk med tester for systemegnethet (SST) der det er nødvendig?		

Kommentarer:

## TILLEGG A. PROSEDYRE FOR TESTING AV ROBUSTHET [6]

Når referentens laboratorium utvikler og standardiserer prosedyrene for en metode som skal valideres, kan det være at data innhentes for et sett med operasjoner og utstyr som ikke forandres vesentlig. Denne prosessen sier imidlertid ingenting om hva som vil skje ved metodeavprøvinger i flere laboratorier, der hvert laboratorium har sitt eget sett med reagenser, utstyr og rutiner. Klargjøring av standarder, variasjoner i tid og temperatur, instrumentkalibrering og -ytelse, samt ulike analytikers ferdigheter er alle faktorer som bidrar til mindre variasjoner selv når en prosedyre følges "nøyaktig". Den eneste måten å forutsi karakteristikkene til en metode ved ulike laboratoriebetingelser på, er å innføre tilsiktede, rimelige variasjoner og se hva som skjer. Hvis prosedyren er "robust", bør den kunne håndtere mindre variasjoner uten at resultatene blir påvirket.

Å utføre en robusthetstest er en tilnæringsmåte som vil spare arbeid, men samtidig være følsom nok til å fange opp små virkninger av variasjon. Denne typen test undersøker ikke én endring om gangen. I stedet innføres flere endringer samtidig på en slik måte at det er mulig å påvise virkningene av hver enkelt endring for seg.

### EKSEMPEL:

La A, B, C, D, E, F og G representere de nominelle verdiene for sju ulike faktorer som kan påvirke resultatene dersom verdiene deres blir noe endret. La de alternative verdiene betegnes som a, b, c, d, e, f og g.

Betingelsene for gjennomføringen av en analyse kan i sin helhet angis av kombinasjoner av de sju bokstavene, der hver bokstav er enten liten eller stor. Det vil da finnes  $2^7$  eller 128 ulike kombinasjoner, og dette er upraktisk å teste. Det er imidlertid mulig å velge et delsett bestående av åtte kombinasjoner som gir tilstrekkelig balanse mellom betingelsene ved store og små bokstaver.

Åtte kombinasjoner av sju faktorer som brukes til å teste robustheten til en analytisk metode								
Kombinasjon eller analyse nr.								
Faktorverdi	1	2	3	4	5	6	7	8
A eller a	A	A	A	A	a	a	A	a
B eller b	B	B	b	b	B	B	B	b
C eller c	C	c	C	c	C	c	C	c
D eller d	D	D	d	d	d	d	D	D
E eller e	E	e	E	e	e	E	E	E
F eller f	F	f	f	F	F	f	f	F
G eller g	G	g	g	G	g	G	G	g
Observert resultat	s	t	u	v	w	x	y	z

Tabellen angir verdien for sju faktorer som skal brukes ved gjennomføringen av åtte analyser. Resultatene betegnes med bokstavene s til z. Hvordan er det mulig å isolere de atskilte virkningene av faktorendringene når det alltid er 4 faktorer som endres i forhold de opprinnelige prosedyrebetingelsene med bare store bokstaver?

For å finne ut om det å endre faktor A til a hadde noen virkning, kan man sammenlikne gjennomsnittet  $(s + t + u + v)/4$  med gjennomsnittet  $(w + x + y + z)/4$ . Analyse 1, 2, 3 og 4 ble gjennomført med faktorverdi A, og analyse 5, 6, 7 og 8 med faktorverdi a. Dette gir to grupper á 4 analyser, og hver gruppe inneholder de seks andre faktorene to ganger med stor bokstav-betingelser og to ganger med liten bokstav-betingelser. Dermed vil virkningen av disse faktorene, dersom de er tilstede, utlikne hverandre, og det er bare virkningen av endringen fra A til a som gjenstår.

Når de åtte kombinasjonene deles inn i to grupper á fire på grunnlag av én av bokstavene, vil altså alle de andre faktorene utliknes. På den måten kan hver av kombinasjonene testes ved hjelp av bare åtte analyser. Virkningen av å endre G til g undersøkes for eksempel ved å sammenlikne gjennomsnittet  $(s + v + x + y)/4$  med  $(t + u + w + z)/4$ .

Finn de sju forskjellene i gjennomsnitt for A - a, B - b, osv., og sett dem opp på en liste sortert etter størrelse. Hvis en eller to av faktorene har en innvirkning på resultatene, vil forskjellen i gjennomsnittet for disse faktorene være vesentlig større enn forskjellene tilknyttet de andre faktorene. Denne rangeringen er en direkte veiledning for metodens følsomhet overfor mindre variasjoner. En anvendelig – altså robust – metode skal ikke bli påvirket av endringer som ganske sikkert vil oppstå når metoden brukes i forskjellige laboratorier.

Hvis denne rangeringen ikke viser noen markante forskjeller, blir det mest realistiske målet på analysefeilen gitt ved de sju forskjellene mellom gjennomsnittet for stor bokstav-betingelsene minus gjennomsnittet for tilsvarende liten bokstav-betingelser. Kall disse sju forskjellene Da, Db, ... Dg. Beregn standardavviket ved å kvadrere forskjellene og ta kvadratroten av  $2/7$  \* summen av kvadratene.

Kontroller beregningen ved å regne ut standardavviket oppnådd for de åtte resultatene s til z, og beregn middelveiden for de åtte resultatene. Kvadrer de åtte forskjellene fra middelveiden, summer kvadratene, del med  $8 - 1$  og ta kvadratroten.

## REFERANSER

- 1] NMKL-prosedyre nr. Procedure No. 4, 2009, 3. utg., Validering av kjemiske analysemetoder
- 2] NMKL-prosedyre nr. 20, 2007, Evalering av resultater fra kvalitative metoder
- 3] NMKL-protokoll nr. 1, 2005 Referentvejledning for det kemiske område
- 4] Kommisjonsforordning av 12 august 2002 om implementering av direktiv 96/23/EC vedrørende metodekarakteristikker og tolking av resultater
- 5] ISO 11843: 1997 Capability of detection – Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case
- 6] Youden & Steiner (1975) Statistical Manual of the AOAC, AOAC International, Arlington, VA
- 7] ISO 78-2:1999. Chemistry – Layouts for standards – Part 2: Methods of chemical analysis