



**NMKL**

**NORDISK METODIKKOMITÉ FOR LEVNEDSMIDLER**  
www.nmkl.org

**NMKL-PROTOKOLL NR 1, 2005**  
(erstatte NMKL-RAPPORT NR. 11, 2. utg., 2000)

**REFERENTVEJLEDNING**  
**for det kemiske område**

**Udarbejdelse af analysemetoder indenfor**  
**NMKL**

**NORDISK METODIKKOMITÉ FOR LEVNEDSMIDLER**  
www.nmkl.org



**Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler**

<http://www.nmkl.org>

## **Forord**

Denne referentvejledning udleveres til alle personer, der af NMKL er bedt om - på baggrund af deres tekniske viden på et specielt område - at udføre et stykke analysearbejde. Da de mange referenter ofte er personer uden direkte tilknytning til NMKL, er der et behov for at forklare, dels hvordan NMKL arbejder, dels relationerne mellem NMKL og referenterne - det være sig arbejdets omfang, tidsplan, arbejdsgange, ansvarsfordeling under arbejdets udførelse og den statistiske behandling af evt. producerede data ved afprøvninger og sammenligninger.

Vejledningen er opdelt i en generel del med orientering om NMKL, dets arbejdsform og arbejdsgange samt en speciel del, der redegør for de opgaver, en referent kan komme ud for, samt detaljeret beskrive for hver opgavetype, hvordan man kommer igennem opgaven - både fagligt og "organisatorisk".

Vejledningen er udarbejdet af:

*Lars Thymark og Arne Højgård Jensen (Danmark),*

med assistance af

*Harriet Wallin (Finland), Kristin Ólafsdóttir (Island), Hilde Skår Norli (Norge), Per Lea (Norge), Georg Fuchs (Sverige).*

Læsere af vejledningen er altid velkomne med kommentarer, bemærkninger og forslag til forbedringer/ændringer i nærværende vejledning.

NMKLs generalsekretariat  
c/o Veterinærinstituttet,  
Att.: Hilde Skår Norli  
Postboks 8156, Dep.  
N-0033 Oslo, NORGE  
Fax.: +47 22 597475  
e-mail: [nmkl@vetinst.no](mailto:nmkl@vetinst.no)

**<http://www.nmkl.org>**

# Indholdsfortegnelse

side

1. Ordliste .....	4
2. Orientering om NMKL, dets arbejdsmetoder og rutiner.....	7
2.1 Organisation .....	7
2.2 Referent, medreferent og kontaktpersoner .....	8
2.3 Internationalt samarbejde .....	8
3. Behov for analysemetoder.....	8
3.1 Baggrund .....	8
3.2 Formål .....	9
3.3 Gennemførelse .....	9
3.4 Analysemetoderne .....	9
4. Litteraturgennemgang og udarbejdelse af metodetekst.....	9
5. Validering af metoden (i referentens laboratorium).....	10
6. Udarbejdelse af valideringsrapport.....	11
7. Afprøvning af metodeforslag ved metodeafprøvning .....	11
7.1 Udarbejdelse af afprøvningsplan.....	13
7.1.1 Statistiske modeller.....	14
7.1.2 Antal matricer og antal parameterniveauer.....	15
7.1.3 Forslag til tidsplan for afprøvningen.....	15
7.1.4 Metodeforslag.....	15
7.1.5 Kodningskema for prøverne.....	15
7.2 Godkendelse af afprøvningsplan.....	16
7.3 Udvalgelse af laboratorier .....	16
7.4 Fremsendelse af metodeforslag og tidsterminer til deltagende laboratorier .....	16
7.5 Fremstilling og forsendelse af afprøvningsprøver.....	17
7.6 Instruktioner til laboratorierne .....	17
8. Analyser og resultatskema.....	17
9. Statistisk behandling af tilbagesendte data .....	18
9.1 Undersøgelse af valide data .....	18
9.1.1 Variansanalyse på valide data.....	19
9.1.2 Outlier-tests ved Cochran og Grubbs.....	22
10. Kriterier for godkendelse af metoder.....	26
11. Udarbejdelse af afprøvningsrapport.....	27
11.1 Eksempel på en tabel, som repræsenterer statistiske resultater fra en metodeafprøvning.....	28
12. Referencer.....	29
13. Bilag.....	29

## 1. Ordliste

AFPRØVNING	Udføres på et antal laboratorier, for at få fastlagt blandt andet repeterbarhed og reproducerbarhed. Arrangeres af referenten.
AFPRØVNINGSLAB.	Laboratorium, udpeget af nationalkomiteerne, der deltager i en afprøvning af et metodeforslag
AFPRØVNINGSPLAN	Plan, der ligger til grund for en afprøvning af et godkendt metodeforslag. Indeholder blandt andet tidsplan, antal laboratorier, matricer, koncentrationsniveauer, samt beskrivelse af hvilken statistisk model referenten vil anvende. Udarbejdes af referent.
AFPRØVNINGSRAPPORT	Rapport, der opsummerer og dokumenterer det arbejde referenten har lavet. Rapporten er NMKL's grundlag for vurderingen af metoden og godkendelse af metodeforslaget. Den indeholder også data og kommentarer fra en evt. forafprøvning. Udarbejdes af referenten.
ARBEJDSUDVALG (AU)	Samling af alle formændene for de nationale komitéer, hvoraf én er udpeget til formand for NMKL. Desuden deltager generalsekretæren. Arbejdsudvalget mødes 1 gang årligt forskudt ca. ½ år fra årsmødet. AU behandler primært administrative spørgsmål og faglige emner, som ikke bør udsættes til behandling på ordinære årsmøder.
EK-LIVS	Embedsmandskomitéen for levnedsmiddelspørgsmål (nedsat af Nordisk Ministerråd)
FORAFPRØVNING	Afprøvning af metodetekst/-forslag på et eller flere laboratorier med henblik på at indhente tekniske kommentarer. Arrangeres af referenten.
GENERALSEKRETÆR (GS)	En akademisk uddannet person, der koordinerer NMKL's arbejde. Udnævnes af NMKL.
HEADER	Undertitel på en NMKL-metode, der angiver, hvilken grad af validering og øvrig dokumentation, der er for den pågældende metode. Udarbejdes af GS for hver metode, der skal publiceres. Dette med henblik på orientering om metodens status overfor brugeren.
KOMMISSORIUM	Opgaveformulering som årsmødet udsteder og som videre er referentens beskrivelse af omfanget af en stillet metodeopgave. (Af tidsmæssige grunde bør kommissoriet videst muligt omfang være formuleret inden årsmødet, så årsmødet alene skal tage stilling til kommissoriet.) Skal indeholde alle de parametre, som referenten skal tage hensyn til i sit arbejde. Efter kommissoriet er udarbejdet kompletteres det med en tidsplan.
KONTAKTPERSON	Person, der har en bred erfaring i det pågældende emne, men vil ikke nødvendigvis være medlem af nationalkomiteen. Kontaktpersonen bistår referenten i det faglige arbejde.

MATERIALE	Materiale er defineret ved en given kombination af en analyt, analytens koncentration, samt en given matrice.
MATRICE	Det pågældende levnedsmiddel med en given sammensætning indeholdende den søgte analyt. Eksempler på matricer er svinekød, fisk, grøntsager, cerealier med videre.
MEDREFERENT	Medreferenten skal være referentens støtte og rådgiver ikke mindst i forbindelse med at overholde referentvejledningens regler (procedurer og tidsplaner). Medreferenten er medansvarlig for at det udførte arbejde lever op til referentvejledningens procedurer og tidsrammer. Udpegning af medreferent skal ikke være obligatorisk, men vil især være nyttig hvor referenten er uerfaren eller ikke er medlem af nationalkomiteen. Medreferent og kontaktperson kan være en og samme person.
METODEFORSLAG	Metodebeskrivelse, der ligger til grund for en afprøvning / afprøvningsplan. Udarbejdes af referenten.
METODETEKST	Metodebeskrivelse, der ligger til grund for en validering af metoden. Udarbejdes af referent.
METODEUDKAST	Bearbejdning ( skrivebordsarbejde ) af eksisterende metode fra anden organisation/metodeforslag. Danner baggrund for godkendelse i NMKL som NMKL-metode. Udarbejdes af referenten.
NATIONALKOMITÉ	Samling af nationale eksperter indenfor kemi, mikrobiologi og sensorik, -primært fra de offentlige og private levnedsmiddelanalytiske laboratorier, samt fra undervisnings- og forskningsinstitutioner indenfor levnedsmiddelområdet.
NMKL	Nordisk Metodikkomité for Levnedsmidler.
xNK	Forkortelse for hver af de nationale komiteer: DNK (Danmark), FNK (Finland), INK (Island), NNK (Norge) og SNK (Sverige)
NMKL-METODE	Analysemetode til bestemmelse af en eller flere parametre i levnedsmidler (kemiske, fysisk/kemiske, sensoriske eller mikrobiologiske. Har været behandlet/bearbejdet/udviklet og godkendt i NMKL's regi.
REFERENT	Ekspert på et bestemt fagområde, som af NMKL er udpeget til at udføre et stykke analytisk arbejde indenfor det levnedsmiddelanalytiske område. Det er referenten alene, der bærer ansvaret for referentarbejdet.
REVISION	Metoder der er validerede ved sammenlignende metode-afprøvning revideres hvert 10 år. Metoder der ikke er validerede ved sammenlignende metodeafprøvning revideres hvert 5. år.
STATUSRAPPORT	Kort rapport - få linier - som referenten hvert ½ år udfylder og sender til GS på dennes opfordring (skema). Rapporten beskriver, hvor langt referenten er i sit arbejde.

SUBKOMITÉ	Faglig/teknisk inddeling af NMKL-medlemmerne på tværs af landenes nationalkomitéer. Forum på årsmøderne for de faglig/tekniske diskussioner og beslutninger.
TIDSPLAN	Opgørelse over sammenhæng mellem forventet faglig indsats, korrespondance mellem referent, kontaktperson/medreferent med mere og tidshorizonten. Tidsplan kan revideres på foranledning af både referent og nationalkomitéer.
VALIDERING	Fastlæggelse/vurdering af metodens karakteristika udføres på referentens laboratorium med henblik på at udarbejde et metodeforslag. Valideringen indeholder blandt andet oplysninger om detektionsgrænse, kvantificeringsgrænse, følsomhed, præcision, rigtighed, robusthed med videre.
VALIDERINGSRAPPORT	Rapport omhandlende dokumentation for den udførte validering.
ÅRSMØDE	NMKL's øverste organ. Samling af alle nationalkomitéer. Diskuterer, behandler og beslutter alt vedrørende metodearbejde. Alle nationalkomitéers medlemmer, samt generalsekretæren er delegerede til årsmøderne, der afholdes på skift i de nordiske lande ultimo august og forløber over 3-4 dage.

## 2. Orientering om NMKL, dets arbejdsmetoder og rutiner

### 2.1 Organisation

Nordisk Metodikkomité for Levnedsmidler (NMKL) er et selvstændigt nordisk samarbejdsorgan, der består af levnedsmiddelanalytiske eksperter fra de nordiske lande: Danmark, Finland, Island, Norge og Sverige. NMKL blev dannet i 1947 og henhører under Nordisk Ministerråds Embedsmandskomité for levnedsmiddelspørgsmål, "EK-Livs". NMKL har til opgave at udarbejde/validere, teste og publicere metoder til prøvetagning og undersøgelse af levnedsmidler med henblik på at harmonisere de metoder og procedurer, der benyttes på offentlige og private nordiske levnedsmiddelkontrollaboratorier. NMKL tilgodeser også i sine prioriteringer private levnedsmiddellaboratoriets og industriens behov for validerede og godkendte analysemetoder.

NMKL finansierer sin virksomhed dels gennem økonomisk støtte fra EK-Livs som yder støtte (deltidsstillinger) til NMKL's sekretariatsfunktion (generalsekretæren og dennes sekretær), dels gennem salg af NMKL-metoder og andre publikationer - primært rapporter og procedurer, udarbejdet af NMKL.

Hvert medlemsland har en nationalkomité, som består af en formand, en sekretær samt et antal menige medlemmer. De enkelte nationalkomitéer er selvsupplerende og medlemmerne rekrutteres fra levnedsmiddellaboratorier - både private og offentlige, samt andre levnedsmiddelanalytiske miljøer. Sammensætningen af Nationalkomitéerne afspejler til enhver tid de behov for tekniske ekspertiser NMKL har brug for, for at kunne løse sine opgaver. De respektive landes relevante levnedsmiddelmyndighed udnævner medlemmer efter indstilling fra de enkelte landes nationalkomitéer. NMKL består således af de 5 nationalkomitéers medlemmer samt generalsekretariatet.

NMKL's arbejde ledes af en formand, som vælges af årsmødet - blandt NMKL's medlemmer - for en periode af 4 år. Til at koordinere de 5 nationalkomitéers arbejde er der nedsat et generalsekretariat med en generalsekretær (GS) og en sekretær. GS vælges ligeledes på årsmødet for en 4-årig periode. Dette sekretariat går i princippet på skift i de nordiske lande - pt er det placeret i Norge. GS kan være - men behøver ikke - at være medlem af nogen nationalkomité.

Nationalkomitéernes organisation og arbejdsform bestemmes internt i det respektive medlemsland. Emner behandles på møder, der afholdes i de enkelte nationalkomitéer 3-4 gange om året. På disse møder gøres status over igangværende arbejde, emner prioriteres indenfor nationalkomitéens område og diverse referentrapporter drøftes. På disse møder drøftes også forslag til nye emner - opgaver, som det fra forskellig side ønskes, at NMKL skal løse. Forslag til nye emner/opgaver kan stilles enten af et medlem af nationalkomitéerne eller en person udenfor NMKL. Forslaget skal være skriftligt og motiveret. Forslag fra personer udenfor NMKL's kreds sendes direkte til GS, mens forslag fra nationalkomité-medlemmer først bliver drøftet i den aktuelle nationalkomité. Såfremt det besluttet at gå videre med forslaget, sendes dette til GS. GS sender alle modtagne forslag til nye emner til samtlige nationalkomitéer med henblik på vurdering og stillingtagen. De enkelte nationalkomitéers vurdering fremlægges samlet på førstkommande årsmøde, der tager beslutning om, hvorvidt forslaget skal optages på NMKL's dagsorden som nyt emne. Såfremt årsmødet godkender emnet, skal der udpeges en ansvarlig ekspert - en referent - til at behandle emnet. De enkelte nationalkomitéer bliver herefter bedt om at komme med forslag til referent. På baggrund af disse forslag udnævner GS en referent. Det er GS's opgave at informere om opgavens eksakte formål i form af et skriftligt mandat (kommissorium) inklusiv forslag til tidsplan for opgavens gennemførelse.

Arbejdet på årsmødet er organiseret i 4 subkomitéer. Subkomité 1 behandler administrative og overordnede politiske spørgsmål, subkomité 2 behandler alle emner af mikrobiologisk natur, subkomité 3 behandler alle kemiske emner, og subkomité 4 behandler alle sensoriske emner. Alle medlemmer af nationalkomitéerne er tilknyttet én af disse komitéer alt efter ekspertise og interesse. Hver subkomité ledes af en formand, der vælges blandt subkomitéens medlemmer og udpeges af årsmødet. Formanden vælges for en periode af 4 år ad gangen.

Fra såvel møderne i nationalkomitéerne som fra årsmøderne udfærdiges referat, der tilfalder alle, der deltager i møderne.

## **2.2 Referent, medreferent og kontaktpersoner**

Det ligger NMKL meget på sinde at støtte og opmuntre referenten i sit arbejde med at løse den pågældende opgave for NMKL.

Såfremt referenten ikke selv er medlem af en nationalkomité, eller er uerfaren kan referentens "egen" nationalkomité udpege en person - medreferent - fra sin egen midte således at referenten til enhver tid i forløbet kan hente NMKL-relevante oplysninger og anden back-up hos denne. De øvrige nationalkomitéer har udpeget en for emnet faglig kompetent person - kontaktperson. Medreferenten kan tillige være kontaktperson. Navn og adresse på medreferent og kontaktperson afleveres af de respektive nationalkomitéer til GS, som herefter meddeler referenten dette.

**Det er vigtigt at referenten på et tidligt tidspunkt i metodearbejdet inddrager kontaktpersonerne i arbejdet.**

Kontaktpersonerne skal kommentere metodeteksten og referenten skal indarbejde kommentarerne i metodeforslaget. Herefter sendes metodeforslaget til medreferenten til bedømmelse om hvorvidt forslaget kan sendes til egen nationalkomite til godkendelse. Efter egen nationalkomite har godkendt forslaget sendes det til de øvrige nationalkomiteer til godkendelse.

Hvert halve år (december og maj) udarbejder referenten en statusrapport og sender den til GS. Rapporten er på skemaform og udsendes på fortrykte skemaer fra GS. Såfremt der ikke indsendes statusrapport fra referent, er det referentens "nationalkomité", der har ansvar for at følge op på dette.

Såvel referenten som medlemmerne af NMKL's nationalkomitéer er ulønnede. Dog er der mulighed for at søge økonomisk støtte fra EK-Livs til konkret projektarbejde. GS kan kontaktes for at få information om dette.

## **2.3 Internationalt samarbejde**

Indenfor det videnskabelige arbejdsområde sker der et samarbejde og erfaringsudveksling med internationale organisationer som f.eks. AOAC INTERNATIONAL, den internationale standardiseringsorganisation ISO, den europæiske standardiseringsorganisation CEN, den internationale mejerierorganisation IDF.

NMKL har samarbejdsaftale med AOAC INTERNATIONAL og IDF om blandt andet informationsudveksling og godkendelse af hinandens analysemetoder. For at NMKL's metoder skal kunne accepteres internationalt, som af CEN (den Europæiske standardiseringsorganisationen), Codex Alimentarius eller internationale søster organisationer, er det vigtigt at resultatet fra metodeafprøvninger publiceres på engelsk og gerne i internationale tidsskrifter, f.eks. Journal of AOAC INTERNATIONAL.

# **3. Behov for analysemetoder**

## **3.1 Baggrund**

Levnedsmiddellovgivningen i de nordiske lande/EU kan give anledning til, at der opstår ønsker om at kunne analysere flere parametre i flere matricer, end man har gjort tidligere. F.eks. kan forureningsdebatten og debatten om tilsætningsstoffer af forskellig art udløse behov for nye analysemetoder. Desuden kan viden om opståede sygdomsudbrud, forårsaget af patogene bakteriers tilstedeværelse i levnedsmidler, også afstedkomme behovet for nye analysemetoder.



Det er i disse situationer, at NMKL kan iværksætte metodikarbejde med henblik på at udarbejde en valideret analysemetode, der kan benyttes i levnedsmiddelkontrollen i Norden og evt. internationalt.

### 3.2 Formål

Det er hensigten med opgaven at udarbejde/udvikle/validere en analysemetode, der benytter sig af tidsvarende analyseteknik - det være sig manuel eller hel/semi-automatisk, og som opfylder NMKL's retningslinier for validering og afprøvning af analysemetoder. Analysemetoden skal - når den er færdigudviklet/afprøvet og beskrevet - indgå i NMKL's metodesamling. Desuden tilstræbes det, at metoden også får international udbredelse i relevante organisationer.

### 3.3 Gennemførelse

Gennemførelse af referentopgaven:

- litteraturgennemgang og udarbejdelse af metodetekst
- validering af metode og beskrivelse af metodeforslag
- udarbejdelse af afprøvningsplan
- afprøvning af metodeforslag ved metode-afprøvning, efter de modificerede IUPAC-87 regler
- udarbejdelse af afprøvningsrapport
- udfærdigelse af endelig metode-udkast

Referenten har i forvejen modtaget det skriftlige kommissorium fra GS med tilhørende tidsplan og denne referentvejledning. Referentens opgaver er summarisk opstillet i bilag 1.

### 3.4 Analysemetoderne

Indtil dato – ultimo 2000 - har NMKL publiceret ca. 170 analysemetoder fordelt på de fleste levnedsmidler og mange parametre, både ved hjælp af traditionel teknik og moderne apparatteknik og bioteknologi. Især udviklingen af nye teknikker, gør det nødvendigt at sammenligne ældre, godkendte metoder med de nye muligheder, for at vurdere, hvorvidt ny teknik eventuelt kan erstatte/supplere godkendt analyseteknik.

Analysemetoderne bliver i stort omfang benyttet i forbindelse med offentlig levnedsmiddelkontrol indenfor Norden, men bliver i vidt omfang også benyttet af private laboratorier. Metoderne kan erhverves af alle, der køber dem hos generalsekretariatet. Alle metoder foreligger på svensk/norsk/dansk og engelsk. Metoder publiceret efter 1985 foreligger endvidere på finsk.

NMKL-metoder der er valideret ved kollaborativ sammenligning bliver hvert 10 år - regnet fra deres godkendelsesdato - gransket af NMKL med henblik på at vurdere, hvorvidt metoden skal bestå, revideres (fagligt/layout) eller udgå. NMKL-metoder der ikke er afprøvet kollaborativt vurderes hvert 5. år.

## 4. Litteraturgennemgang og udarbejdelse af metodetekst

Referenten, som typisk har et indgående kendskab til den teknik, (den relevante subkomité forventer at skulle benytte), udarbejder en litteraturoversigt, der beskriver forskellige tekniske løsningsforslag. Desuden opstiller referenten et forslag til metodetekst, der kan danne baggrund for en egentlig validering af den valgte analyseteknik - typisk i referentens eget laboratoriesystem. Denne litteraturgennemgang samt forslag til metodetekst samles i en rapport, med det aktuelle emne som overskrift og udgave nr. 1. Metodeteksten skal være nøje beskrevet, så man ikke får tolkningsproblemer. Den skal være opstillet efter gældende ISO-rekommendationer ISO 78-2:1999. Referenten skal kontrollere teksten nøje, specielt tal og formler til

beregninger. Det kan ofte være en god idé at lade en kollega læse teksten igennem.

Metodeteksten og eventuel en kort rapport over de litteraturstudier, der er foretaget sendes til kontaktpersoner og medreferent til kommentering. Disse sender deres kommentarer til referenten med en udtalelse om hvorvidt de principielt kan acceptere metodeteksten som grundlag for validering. Såfremt alle kontaktpersoner/medreferent kan godkende metodeteksten, kan rapporten sendes til egen nationalkomite. Såfremt metodeteksten kan godkendes sender referentens nationalkomite metodeteksten til de øvrige xNK for godkendelse. Såfremt alle kontaktpersoner - efter forhandling mellem referent og kontaktperson (referenten er her den koordinerende part) - ikke kan godkende teksten, skal referenten udarbejde en udgave 2, der er en sammenstilling mellem udgave 1, indkomne kommentarer fra kontaktperson, referentens kommentarer til disse og en henvisning til udgave 1. Rapporten skal have det aktuelle emne som titel, samt udgave 2. Rapporten sendes til nationalkomitéerne via GS, der behandler rapporten, hvorefter der tages endelig beslutning om metodeteksten på et AU-møde eller et årsmøde.

## 5. Validering af metoden (i referentens laboratorium)

Validering forstås i denne sammenhæng som en dokumentation af metodens egnethed og øvrige karakteristika - dog ikke bestemmelse af repeterbarhed og reproducerbarhed, der senere fastlægges ved metodeafprøvninger laboratorier imellem.

Behov for validering af en analysemetode afhænger meget af, hvad der er gjort af forarbejde, dels fra andre analysekemikere/organisationer, dels fra referentens eget laboratorium. Det afhænger i realiteten også meget af, hvilke økonomiske og menneskelige ressourcer man som referent har adgang til.

Grundlæggende skal en validering omfatte en undersøgelse/vurdering af følgende karakteristika:

- specificitet
- måleområde
- detektionsgrænse
- kvantificeringsgrænse
- rigtighed
- præcision
- følsomhed
- robusthed (kemikalier, reagenser, homogenitet af prøver, udstyr, personale med mere)
- falsk positive
- falsk negative

Det drejer sig blandt andet om testning af robusthed, det vil sige metodens følsomhed for mindre ændringer af analysevariablerne under normale analysebetingelser. Formålet med prøvning af metodens robusthed er at få en opfattelse af, i hvilken grad små og uundgåelige variationer i den analytiske procedure påvirker analyseresultatet.

Undersøgelse af en metodes robusthed omfatter instrumentelle faktorer, matrice-effekter, "forstyrrende" substanser (forskelle i sammensætning i kemikalie-batches, f.eks. substratsammensætning) og metodens variabler (f.eks. temperaturer, tid, fortyndinger og pH) som kan forventes at have indflydelse på metodens reproducerbarhed. De udvalgte eksperimentelle variable skal være uafhængige af hinanden, og ændringerne skal vælges i en størrelsesorden som vil forekomme mellem laboratorier, der rutinemæssigt benytter metoden.

Undersøgelse af robustheden er også af stor betydning for senere formulering af metodeforslaget, eftersom den medvirker til, at kritiske parametre af betydning for metoden bliver identificerede og kan udmøntes i form af advarsler/bemærkninger/fodnoter i den færdige NMKL-metode ( og også i metodeforslaget under afprøvning). Det er også vigtigt og naturligt, at der ved robusthedsundersøgelsen indgår levedsmiddelprøver i metodens anvendelsesområde og at koncentrationsniveauerne ligger indenfor det forventede måleområde.

Ved kvantitative analysemetoder er det specielt vigtigt at få fastlagt detektionsgrænse/ kvantificeringsgrænse samt blindværdi-størrelsen. En hel del parametre er instabile og nedbrydes af lys, fugt, høje (lave) temperaturer med videre. Dette har betydning ikke kun for karakterisering af standarder, standardopløsninger og substrater, men også for oplukning og generel prøveforberedelse samt forsendelse af prøver og standarder. Endelig er det vigtigt, at valideringen af metoden også omfatter stabilitetsforholdene omkring prøver, standarder og opløsninger.

Yderligere omtale af validering med mere baggrundsmateriale kan findes blandt andet i NMKL-Procedure nr 4: Validering af kemiske analysemetoder.

Behovet for validering afhænger således meget af den konkrete opgave, hvorfor omfanget og "dybden" af validering er beskrevet så udførligt som muligt i kommissoriet fra årsmødet.

Hvis referenten under valideringsarbejdet støder på omstændigheder, der medfører, at metoden skal videreudvikles/justeres væsentligt, skal en ny metodetekst formuleres, og valideringen skal gøres helt om på den nye metodetekst. Samtidig - og inden "re-valideringen" påbegyndes - fremsendes den reviderede metodetekst til kontaktperson/medreferent for kommentering. Såfremt disse ingen kommentarer har, påbegyndes re-valideringen, og den nye metodetekst fremsendes til GS. Metodeteksten, der skal herefter sendes til afprøvning, benævnes metodeforslag.

## 6. Udarbejdelse af valideringsrapport

Efter valideringsarbejdet opfordres referenten at udfærdige en rapport som indeholder data fra valideringsarbejdet, samt en vurdering af det øvrige indsamlede.

Rapporten indeholder alle data, referenten selv har produceret under valideringsarbejdet, samt en vurdering af øvrige indsamlede data fra andre valideringsstudier af samme metode, såfremt disse findes. Desuden kommenteres og vurderes de øvrige ovenfor nævnte valideringsparametre med skyldig hensyntagen til, hvorvidt der er tale om en kvantitativ eller kvalitativ metode, en kemisk, en sensorisk eller mikrobiologisk metode.

Valideringsrapporten sendes til kontaktperson/medreferent til kommentering. Såfremt kontaktperson/medreferent har kommentarer til denne, fremsendes de til referenten, der indarbejder dem i rapporten. Den endelige rapport sendes til GS til orientering, og arkiveres her som dokumentation for den senere NMKL-metode.

## 7. Afprøvning af metodeforslag ved metodeafprøvning

Referenten er den koordinerende person, igennem hvilken al kommunikation vedrørende afprøvningen foregår. Det drejer sig både før (metodeforslag, periode for afvikling, prøver og skemaer), under (opklarende spørgsmål til og fra laboratorium) og efter (dataevaluering). Referenten har altså det fulde ansvar for afprøvningens gennemførelse, evaluering og rapportering.

Metodeafprøvning (kollaborativ afprøvning) af en analysemetode udføres, for at man skal kunne fastlægge metodens præcision (engelsk precision). Præcisionen er et mål for overensstemmelsen mellem resultater, frembragt på et eller flere laboratorier. Præcisionen omfatter både metodens "indenfor-laboratorievariation" også kaldet repeterbarheden og dens mellem-laboratorievariation også kaldet reproducerbarheden. Metoder med god præcision er behæftet med få tilfældige fejl. Ved metodeafprøvninger kan man også få et skøn over rigtigheden (engelsk trueness), hvis man inkluderer prøver med kendt indhold, det vil sige, at man har tilsat kendte mængder af den undersøgte parameter. Dog bør fastlæggelse af metodens rigtighed primært ske under valideringsarbejdet - enten ved hjælp af certificerede referencematerialer eller ved hjælp af anden analyseteknik - f.eks. sammenligningsstudier. Oftest er det af størst interesse at estimere reproducerbarheden, det

vil sige få et mål for, hvor pålideligt metoden fungerer under forskellige betingelser, på forskellige laboratorier og i hænderne på forskellige kemikere/laboranter i forhold til estimering af repeterbarheden.

Metodeafprøvninger laboratorier imellem har været udført længe, men under meget varierende betingelser. Dette har gjort det vanskeligt at sammenligne metodeafprøvninger fra organisation til organisation, da de blandt andet har benyttet hver sin tolkningsmetodik af opnåede data. Derfor har IUPAC, ISO og AOAC sammen med andre organisationer gennemført et harmoniseringsarbejde omkring metodeafprøvninger. Resultatet af dette harmoniseringsarbejde er i stor udstrækning blevet accepteret/godkendt af alle vigtige organisationer - herunder NMKL, som arbejder med standardisering af analysemetoder. Harmoniseringsresultatet er samlet i dokumenter, der almindeligvis går under navnet IUPAC-1987 Protocol: Harmonized Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative Studies. Denne protokol er revideret i 1995 og har nu titlen Protocol for Design, Conduct and Interpretation of Method-performance studies. NMKL anvender den reviderede IUPAC-87 protokol som grundlag for metodeafprøvninger. Den reviderede protokol er vedlagt som Bilag 2, men er også i hovedtræk gennemgået nedenfor:

- 1) Metodeafprøvninger bør kun udføres på metoder, der har gennemgået en tilfredsstillende og tilstrækkelig validering
- 2) Resultater fra metodeafprøvninger skal analyseres statistisk - prøve for prøve med ensidet variansanalyse og outlier-analyser. I særlige tilfælde kan mere komplicerede statistiske analyser udføres.
- 3) Mindst 5 materialer med forskelligt indhold af den parameter, man ønsker at teste, skal indgå i metodeafprøvningen. Hvis afprøvningen kun gælder bestemmelse af én parameter i et snævert koncentrationsniveau, kan antallet af materialer reduceres til et absolut minimum på tre, (dette gælder ved udarbejdelse af horisontelle metoder).
- 4) Det primære mål med en metodeafprøvning er at skabe data, der kan danne grundlag for et pålideligt estimat af repeterbarheden og reproducerbarheden. Eftersom gentagne bestemmelser på samme prøve ikke er et acceptabelt grundlag, skal metodeafprøvninger helst ikke indbefatte sådanne.
- 5) Et estimat for repeterbarheden af en analysemetode opnås bedst gennem en af følgende modeller for metodeafprøvninger - prioriteret rækkefølge:
  - a) hvert materiale (koncentration/matrice/parameter) foreligger som split-level par (enkeltbestemmelser på to materialer med samme eller nær samme parameterkoncentration) (Split-level)
  - b) nogle materialer foreligger dels som split-level par, dels nogle som skjulte parallel-prøver (Split-level og Uniform-level)
  - c) materialet foreligger som skjulte parallel-prøver (Uniform-level)
  - d) materialet forekommer som enkeltprøve og der udføres gentagne bestemmelser på hver prøve (bør kun anvendes, når det er upraktisk at anvende nogen af de ovenstående modeller (a-c))
- 6) Antal laboratorier, der bør deltage, bør som hovedregel overstige 8. Der vil altid være nogle laboratorier, der misser noget i afprøvningen, eller andet går galt (f.eks. ikke indsender resultater). Der bør altid være mindst 8 laboratoriers data, der er valide, og som kan indgå i den statistiske beregning. 5 laboratorier kan dog accepteres, såfremt metodeafprøvningen omfatter meget specielt udstyr eller meget specialiseret med hensyn til tekniske kompetencer. Laboratorierne skal være kompetente og engagerede. Man bør dog højst vælge 15 laboratorier, da omfanget med at gennemføre afprøvningen med flere end 15 laboratorier bliver for omfattende - både med laboratoriarbejdet og datatolkningen.
- 7) Værdierne for metodens præcision skal beregnes dels for alle resultater, dels for resultater efter udelukkelse af out-liers. Outliers skal udelades på basis af Cochran og/eller Grubbs outlier-tests. Grubbs test skal udføres alene på laboratoriemiddelværdier og ikke på gentagelser. Udelukkelse af yderligere outliers skal afbrydes, når flere end 22% af resultaterne - det vil sige, når resultater fra flere end to af ni

laboratorier bliver udelukket som et resultat af gentagne outlier-tests. Signifikansniveauerne på outlier-testene er 2,5 %.

- 8) Når standardafvigelser udtrykkes som funktion af den absolutte værdi for den aritmetriske middelværdi, skal relativ standardafvigelse (RSD) anvendes. Den modsvarende ISO-term er variationskoefficient (CV).
- 9) Den endelige rapport - afprøvningsrapporten - skal som minimum indeholde blandt andet:
  - a) antal deltagende laboratorier
  - b) antal laboratorier med outliers
  - c) alle valide data
  - d) gennemsnit for hver prøve
  - e) repeterbarhedsdata for hver prøve, før og efter outlier-tests
  - f) reproducerbarhedsdata for hver prøve, før og efter outlier-tests
  - g) laboratoriernes kommentarer

IUPAC dokumentet er, som tidligere anført, et meget centralt skrift, som det er vigtigt at referenten er fortrolig med. Som tidligere nævnt vil NMKL gerne tilbyde sine metoder til brug i internationalt laboratoriearbejde, og dette er kun muligt, hvis NMKL's arbejde opfylder de internationale krav. Metoder, som med succes har gennemgået en solid validering og en god afprøvning, kan få stor international udbredelse, hvis alle formaliteter er i orden og resultaterne fra validering og afprøvning præsenteres i et format, som accepteres internationalt.

Såfremt man af den ene eller anden grund ikke kan følge IUPAC-reglerne, kan man godt gennemføre en modificeret/mindre afprøvning. Dette vil dels følge af kommissoriet, dels fremgå af den endelige NMKL-metode, hvor "header'n" vil oplyse om, under hvilke omstændigheder metoden er blevet til.

En metodeafprøvning i NMKL-regi indeholder følgende operationer:

- udarbejdelse af en afprøvningsplan
- udvælgelse af laboratorier
- fremsendelse af metodeforslag og tidsterminer til deltagende laboratorier
- fremskaffelse og forbehandling af prøver
- fremstilling og forsendelse af prøver
- analyse af prøver efter fremsendt metodetekst
- tilbagesendelse af resultater til referent
- statistisk behandling af data
- rapportering af data og evaluering af metode

## 7.1 Udarbejdelse af afprøvningsplan

Referenten skal udarbejde en afprøvningsplan for afprøvningen. I den skal angives afprøvningens statistiske model - se nedenfor. Planen skal benævnes: Afprøvningsplan, titlen på metoden og indeholder som minimum oplysninger om:

- statistiske modeller
- antal matricer og parameter-niveauer
- forslag til tidsplan for afprøvningen (fremsendelse af prøver, analyse, og retursvar samt databehandling og rapportering)
- metodeforslag
- kodningsskema for prøverne
- henvisninger til tidligere rapporter

HUSK: Afprøvningsplanen **skal ikke** fremsendes til deltagerlaboratorierne på noget tidspunkt.

## 7.1.1 Statistiske modeller

- i en "split-level" afprøvning repræsenteres hvert parameterniveau af to prøver med nærliggende men forskelligt indhold af parametren. Differensen mellem parameterniveauerne skal helst være 2 til 3 gange metodens forventede standardafvigelse (estimeret under valideringen)
- i en "uniform" afprøvning repræsenteres hvert parameterniveau og matrice af én prøve delt i 2 identiske underprøver (skjulte parallelprøver)
- Kombination af de ovenstående 2 modeller: nogle prøver kan afprøves efter split-level og nogle efter Uniform-level

Som det fremgår af IUPAC-protokollen, bør man primært vælge split-level modellen, da man der får de bedste estimater for repeterbarhed og reproducerbarhed, da der er "dobbelt så mange naturlige prøver". Hvilken statistisk model, man skal vælge i det konkrete tilfælde må derfor afhænge af en vurdering af, hvor let eller svært (praktisk og økonomisk) det er at fremskaffe relevante prøver for de matricer og i det/de koncentrationsniveau(er), man ønsker af estimere repeterbarhed og reproducerbarhed for. Planen bør indeholde argumentation for, hvilken af de tre modeller, referenten har valgt.

### 7.1.1.1 Eksempler på Uniform og Split-level modellen

#### Split-level model

I dette eksempel har man for hver og en af tre koncentrationsniveau to subniveauer. Forskellen i koncentrationsniveau mellem subniveauerne indenfor et niveau er 2-3 gange metodens forventede standardafvigelse. Referenten forventes at kende den forventede værdi - enten fra eget valideringsarbejde eller fra andre tilsvarende metodearbejder. Hvert subniveau repræsenteres af én prøve som kun skal analyseres én gang. Analyserne skal udføres indenfor et kort tidsinterval. I eksemplet nedenfor findes tre koncentrationsniveauer, to subniveauer og seks afprøvningsprøver.

Koncentration	Prøvekode	Split-level model		Forv. resultat
		Sub-niveau	Antal best.	
Lav	M	1	1	8
Lav	H	2	1	9
Mellem	C	1	1	36
Mellem	G	2	1	38
Høj	E	1	1	61
Høj	K	2	1	65

#### Uniform-level model

I dette eksempel repræsenteres hvert koncentrationsniveau af to forskelligt mærkede, men identiske prøver (skjulte parallelprøver, blind duplicates). Hver prøve skal kun analyseres én gang. Underniveauer forekommer ikke på koncentrationsniveau. Analyserne skal udføres indenfor et kort tidsinterval. I eksemplet nedenfor findes tre koncentrationsniveauer, tre prøvetyper og seks afprøvningsprøver.

Koncentration	Prøvekode	Uniform-level model		Forv. resultat
		Sub-niveau	Antal best.	
Lav	E	-	1	1
Lav	B	-	1	1
Mellem	A	-	1	8
Mellem	C	-	1	8
Høj	D	-	1	12
Høj	F	-	1	12

### 7.1.2 Antal matricer og antal parameterniveauer

Valget af afprøvningsprøver (matricer og koncentrationsniveauer) er af helt afgørende betydning for værdien af en metodeafprøvning. IUPAC-protokollen indeholder klare rekommandationer for antal prøver.

Der skal medtages mindst fem kombinationer af koncentration og materiale for hver parameter, der ønskes undersøgt. Hvis der er blindprøver med i afprøvningen, udgør disse én af de fem kombinationer. Prøverne skal repræsentere lavt, mellem og højt koncentrationsniveau. En metodeafprøvning som skal belyse repeterbarhed og reproducerbarhed i et snævert koncentrationsniveau kan undtagelsesvis begrænses til tre kombinationer.

Hvor mange matricer, man skal have med er et spørgsmål om hvor "bred", man vil gøre afprøvningen. Endvidere er det ikke arbejdet værd at medtage matricer, parametre og koncentrationsniveauer, der ikke er belyst/undersøgt/vurderet under valideringen af metoden. Det er også af betydning, hvor meget man kan analogisere fra levnedsmiddel til levnedsmiddel med hensyn til repeterbarhedsangivelse ved bestemte koncentrationsniveauer. Endelig er det også et økonomisk og tidsmæssigt spørgsmål, hvor mange matricer og prøver man skal tage med i sin afprøvning. Det udleverede kommissorium (titlen på det aktuelle emne) samt diskussioner med kontaktperson/medreferent kan også være med til at afklare dette.

Det skal eksplicit fremgå af afprøvningsplanen, hvilke matricer, koncentrationsniveauer og dermed også det antal analyser, det enkelte deltagende laboratorium skal udføre. Såfremt referenten anser det for nyttigt, kan der her også angives, hvorvidt det er tiltænkt at udsende øveprøver - med opgivet kendt indhold af parametren - som laboratoriet kan indøve metoden på før den endelige afprøvning.

### 7.1.3 Forslag til tidsplan for afprøvningen

En metodeafprøvning består tidsmæssigt af 5 trin:

- udvælgelse og fremstilling og homogenitetstestning af afprøvningsprøver
- dialog med de udpegede laboratorier før afprøvningen
- analyse af prøverne på laboratorierne og tilbagesendelse af data
- opgørelse af data og statistisk behandling af disse
- udarbejdelse af afprøvningsrapport

Afprøvningsplanen skal indeholde et forslag til tidsplan - ikke nødvendigvis tidspunkter - for forløbet af afprøvningen. Denne skal være opdelt på mindst de 5 ovenstående niveauer. Det er her specielt vigtigt at angive, hvornår referenten ønsker at prøverne skal analyseres på de deltagende laboratorier, f.eks. med angivelse af "okt-nov. måned". Disse oplysninger skal benyttes ved udpegningen af laboratorier, så de enkelte nationalkomitéer senere kan finde laboratorier, der også har tid i den ønskede periode. Den samlede længde af afprøvningen inklusive rapporteringsfasen bør dog ikke overstige ½ år.

### 7.1.4 Metodeforslag

Det godkendte metodeforslag skal gengives her i afprøvningsplanen. Metodeforslaget skal endvidere - når laboratorierne er udpeget - fremsendes til disse med henblik på at afklare forståelsesmæssige elementer i teksten ikke indholdsmæssige. Metodeforslaget skal være på et skandinavisk sprog. Referenten opfordres også at udarbejde en engelsk version. Gs kan være behjælpelig med oversættelser.

### 7.1.5 Kodningskema for prøverne

Afprøvningsplanen skal indeholde en oversigt over, hvordan referenten har tænkt sig at kode prøverne. Dette kan enten ske ved talkombinationer eller bogstavkombinationer. Det skal dog være umuligt for de deltagende laboratorier at gennemskue et eventuelt system i kodningen - et system referenten måske ønsker i forbindelse

med den efterfølgende opgørelse af data og den statistiske behandling.

## 7.2 Godkendelse af afprøvningsplan

Hvilke materialer som bør indgå i afprøvningen samt koncentrationsniveau diskuteres med kontaktperson/medreferent. Herefter sender referenten afprøvningsplanen til GS. GS gennemgår sammen med aktuel subkomité-formand planen, hvorefter planen godkendes - eventuelt efter kontakt med referenten (opklarende spørgsmål, tydeliggørelse af tekst eller lignende). Godkendelsen er skriftlig og meddeles som sådan til referenten fra GS. Herefter kan afprøvningen gennemføres i henhold til plan.

## 7.3 Udvælgelse af laboratorier

Hvert xNK skal udpege de relevante laboratorier, der **behersker og er rutinerede i den analyseteknik** - men selvfølgelig ikke den konkrete **metode**, der skal afprøves. Til brug for udvælgelse af laboratorier, kan xNK støtte sig til rapport indeholdende metodeforslag og tidsplan for det pågældende emne og metode. Det er nationalkomitéernes ansvar at de udpegede laboratorier er indstillet på at afprøve den validerede metode EKSACT som referenten udsiger, og i øvrigt udfører deres del af afprøvningen med den største omhu og respekt.

Nationalkomitéerne fremsender navn på afprøvningslaboratorierne samt på personer, som skal kontaktes på laboratorierne direkte til referenten med kopi til GS og de øvrige nationalkomitéer.

Præcision (repeterbarhed og reproducerbarhed) for en analysemetode kan kun bedømmes på basis af data fra et tilstrækkeligt stort antal valide data (data, der ikke ikke skyldes "forkerte data" såsom tabte prøver, defekt udstyr med mere).

For at dette krav skal kunne opfyldes, bør referenten sigte på af få mindst 10 laboratorier - gerne 12-15 med i afprøvningen. Årsagen hertil er, at det ikke er usædvanligt at et eller flere laboratorier, der er blevet tilmeldt afprøvningen, af forskellige årsager ikke kan fuldføre deltagelsen, samt at det ofte hænder at data fra et eller flere deltagende laboratorier af forskellige årsager må udelukkes før eller efter den statistiske behandling, f.eks. laboratorier som ikke har fulgt metoden og/eller som gennemgående har mange outliers.

## 7.4 Fremsendelse af metodeforslag og tidsterminer til deltagende laboratorier

Efter godkendelse af afprøvningsplanen kan referenten fastlægge tidsterminerne mere eksakt.

HUSK: Afprøvningsplanen skal ikke fremsendes til deltagerlaboratorierne på noget tidspunkt.

Metodeforslaget fremsendes herefter til de deltagende laboratorier mindst en måned før det forventes at afprøvningen skal foregå. På denne måde gives laboratorierne en mulighed for at gøre sig bekendt med metoden på forhånd og eventuelt træne analysen i praksis før afprøvningen. Laboratorierne får også mulighed for at anskaffe specialkemikalier og/eller udstyr de mangler for at kunne gennemføre afprøvningen. Sammen med metodeforslaget udsendes også oplysninger om, hvornår afprøvningen reelt foregår, hvor mange prøver, hvornår analyserne skal ske, samt tidsfrist for tilbagesendelse af analyseresultater til referenten.

Laboratorierne skal også have at vide, at det er en afprøvning af en metode og ikke af laboratoriets formåen. Under afprøvning af metoden må metoden ikke ændres!!

Referenten skal invitere de deltagende laboratorier til - før en fastsat tidsfrist - at kommentere metodeforslaget med hensyn til uklarheder og fortolkningsproblemer. Såfremt der indkommer relevante kommentarer, skal referenten udarbejde et nyt metodeforslag og fremsende den med udtrykkelig besked om, at den udgave, de har i forvejen, skal bortkastes. I visse tilfælde kan referenten søge NMKL om midler til at afholde møde med afprøvningslaboratorierne med det formål at diskutere gennemførelsen af afprøvningen.



## 7.5 Fremstilling og forsendelse af afprøvningsprøver

Der stilles store krav til prøvematerialet - uanset om det er flydende eller fast - når det gælder metodeafprøvninger. Det bør først og fremmest være et homogent materiale, således at alle deltagende laboratorier får identiske portioner af testmaterialet. Endvidere bør testmaterialet være stabilt, så at det tåler transport og opbevaring ved varierende omstændigheder. Metodeafprøvninger, hvor man bevidst ved, at prøvematerialet ændrer sig med tiden - f.eks. prøver til mikrobiologiske undersøgelser - skal logistikken omkring forsendelse og tidspunkt for analysering på de deltagende laboratorier styres meget stramt for at få et fornuftigt udbytte af afprøvningen. Prøver, som bør transporteres i frossen tilstand, kræver specialforanstaltninger ved emballering - se bilag 3.

Prøverne bør så vidt muligt være naturlige levnedsmidler, da det er disse matricer metoden til sin tid skal anvendes på. Dette medfører, at det kun i sjældne tilfælde er nødvendigt for referenten SELV at fremstille prøverne - ud over homogeniseringen. Ved split-level designet kan det komme på tale enten at tilsætte noget af parametren til matricen eller fortynde matricen med det mål at få "tætliggende" - ikke identiske - prøver.

Referenten bør fremstille en tilstrækkelig samlet prøvemængde, således at det er muligt dels at homogenitetsteste prøvemængden, dels at fremsende ekstra prøve til laboratorier om nødvendigt. Prøver kan ødelægges eller bortkomme under transport, ekstra afprøvningslaboratorier kan komme til, og afprøvningslaboratorier kan af forskellige årsager bede om nye/mere prøve. En prøvemængde, svarende til det dobbelte af det estimerede optimale behov, bør være tilstrækkelig.

Prøverne skal nummereres og distribueres som "blinde", det vil sige uden reference til statistisk model, indhold og identitet. Hvis det er kritisk at en vis mængde skal indvejes før analyse eller at prøven skal forbehandles på en speciel måde, kan man angive et passende koncentrationsniveau og eller prøvetype (matrice). Mængden af prøve/beholder skal afpasses til det faktum, at afprøvnings- laboratorierne kun skal analysere prøven én gang (man må ikke kunne gentage analysen). Sammen med afprøvningsprøverne fremsendes 1 "øveprøve", der overfor laboratoriet er identificeret - både med hensyn til matrice og koncentration.

Prøverne i de enkelte emballager til de deltagende laboratorier skal opbevares, emballeres og forsendes således, at man er sikker på, at alle deltagerne modtager prøver med identisk sammensætning.

## 7.6 Instruktioner til laboratorierne

Prøveforsendelserne skal forsynes med en opfordring til laboratorierne om at undersøge prøverne ved ankomsten og umiddelbart meddele det til referenten, hvis prøven/prøverne er blevet skadet og eller ødelagt under transport. Laboratorierne skal også skriftligt bekræfte at de har modtaget prøverne. Disse to breve skal følge med prøveforsendelsen. Endvidere skal prøveforsendelsen også indeholde oplysninger om, hvordan prøverne skal opbevares indtil analysetidspunktet samt - hvis nødvendigt - oplysninger om analysetidspunkt (dag og/eller uge).

## 8. Analyser og resultatskema

Referenten skal sammen med prøverne fremsende specifikke afprøvningsinstruktioner, hvoraf det skal fremgå, hvis f.eks. prøverne skal analyseres i en bestemt rækkefølge. Det er vigtigt at laboratorierne er opmærksomme på at prøverne skal analyseres under repeterbare forhold, (samme apparatur, laborant, og inden for kort tid). Alle deltagere skal endvidere have en kopi af NMKL's almene afprøvningsinstruktioner - bilag 4.

Prøvningslaboratoriet skal sammen med prøverne også have et resultatskema, hvoraf det fremgår, hvor mange prøver forsendelsen består af, deres koder, og hvor mange gange hver prøve skal analyseres.

Resultatskemaet skal også angive, med hvor mange cifres nøjagtighed eller med hvor mange decimaler, resultatet skal opgives. Alle data, der benyttes til at beregne resultatet skal også anføres på resultatskemaet - inklusiv enheder på data - undtaget er dog resultater, der produceres af analyseudstyret selv - typisk via indbyggede kalkulatorer.

Deltagerne skal opfordres til at udfylde resultatskemaet med skrivemaskine eller ekstra tydelige cifre for at udelukke risikoen for fejlagtige angivelser. Endelig skal skemaet give deltagerne mulighed for kommentarer. I bilag 5 er anført en checkliste for, hvilket indhold og oplysninger et resultatskema kan/bør have.

Laboratorierne skal endvidere have at vide, at de skal udføre analysen på "øveprøven" før de begynder på de egentlige afprøvningsprøver. Hvis "øveprøven" giver anderledes resultater end det fra referenten oplyste, må laboratoriet ikke analysere afprøvningsprøverne, før fejlen ved udstyr, betjening, forbehandling eller andre forhold er fundet og dokumenteret i orden ved en ny "øveprøve". Hvis der opstår problemer med "øveprøven" i øvrigt, skal laboratoriet uden tøven tage kontakt til referenten. Hvis problemerne ikke kan løses indenfor afprøvningens øvrige tidsplan, bør laboratoriet ikke deltage i afprøvningen.

Endelig skal laboratorierne indprentes, at deltagerne under ingen omstændigheder må afvige fra det fremsendte metodeforslag. Hvis dette alligevel sker, skal dette samt årsagen hertil angives på resultatskemaet. Referenten skal meddele laboratoriet ved fremsendelse af prøverne, at såfremt der konstateres afvigelser fra metodeforslaget, er det højst sandsynligt, at de producerede data bliver udelukket ved den efterfølgende statistiske behandling.

Hvis det er nødvendigt, at analyserne udføres en speciel dag, skal resultatskemaet også rumme et felt for udfyldelse af analysedato.

## 9. Statistisk behandling af tilbagesendte data

Når referenten har modtaget samtlige data fra laboratorierne, skal alle data behandles. Hvor der er modtaget rådata fra laboratorierne, skal resultaterne beregnes i medfør af de formler, der er beskrevet i metodeforslaget. Beregningerne skal gennemføres uden afrunding, mens der regnes og først afrundes til slut til det antal betydende cifre og/eller de antal decimaler, der er anført i metodeforslaget.

Den statistiske behandling består af syv trin:

- undersøgelse af valide data
- variansanalyse på valide data
- outlier-tests ved Cochran og Grubbs
- variansanalyse på ikke out-lier data
- estimering af gennemsnit, repeterbarhed og reproducerbarhed
- estimering af Horrat-værdier
- vurdering af metoden

### 9.1 Undersøgelse af valide data

Kun valide data må indgå i den efterfølgende statistiske analyse. Valide data er data, som det deltagende laboratorium ikke har nogen grund til at antage er forkerte. Invalide data forekommer, f.eks. når metoden ikke er blevet fulgt eksakt, en ikke-lineær kalibreringskurve er benyttet, selvom der forventedes en lineær, analyseudstyret har ikke fungeret tilfredsstillende, tabte delprøver, separation ikke tilfredsstillende (kromatografi), uventede reaktioner (kemiske eller mikrobiologiske) er opstået og andre atypiske fænomener har forekommet.

Vurderingen af valide data sker typisk fra de kommentarer til prøverne, som de deltagende laboratorier har anført på deres resultatskema.

Når alle data er modtaget og valide data er sat i tabelform (lab.kode med tilhørende prøvenumre =original

analysedata), bør disse sendes til hvert enkelt laboratorium med henblik på korrekturlæsning af tallene (hvert enkelt laboratorium skal dog kun have sin **egen** labkode at vide).

### 9.1.1 Variansanalyse på valide data

Afprøvningen gennemføres som enten Uniform-level (skjulte parallelprøver) eller Split-level (ikke identiske prøver, men to prøver med tætliggende koncentration) eller som en kombination af disse - nogle materialer som Uniform-level og andre som Split-level.

De statistiske analyser gennemføres for hver kombination af "par". Det vil sige, at resultaterne afkodes og parres to og to, så man opnår samhörrende talsæt for hvert materiale.

Der gennemføres først en ensidet variansanalyse på alle valide data og for hvert prøvepar uden eksklusion af outliers. Skemaer til opgørelse af statistiske data er vist i bilag 6.

#### 9.1.1.1 Beregning af statistiske parametre ud fra "uniform" afprøvning

Elve laboratorier har rapporteret resultat fra enkeltbestemmelser på to prøver (a og b), som forekom i afprøvningen som skjulte parallel-prøver. Differensen  $w = a - b$  samt middelværdien  $y$  beregnes. Eksemplet er en del af eksemplet under afsnitt 11.1. vedrørende Pølse 1.

Laboratorium	a	b	w	y
1	7,8	7,6	0,2	7,70
2	8,8	7,2	1,6	8,00
3	7,7	9,7	-2,0	8,70
4	8,7	8,5	0,2	8,60
5	7,8	7,4	0,4	7,60
6	9,0	9,2	-0,2	9,10
7	8,1	8,4	-0,3	8,25
8	9,9	9,7	0,2	9,80
9	7,6	7,9	-0,3	7,75
10	8,4	8,3	0,1	8,35
11	7,8	8,4	-0,6	8,10

Beräkning av statistiska parametrar från en "uniform" avprovning. I exemplet har använts de värden som finnes tabulerade på föregående sida.

Steg	Funktion	Display	Storhet
1.	Mata inn w-värdena		
2.	Beräkna summan av w-värdenas kvadrater	7,43000	$\Sigma w^{2*}$
3.	Beräkna $\Sigma w^2/2n$ , där n =1 antalet laboratorier. Detta värde är inom-laboratorievariansen	0,33773	$s_r^2$
4.	Radera ut w-värdena		
5.	Mata inn y-värdena		
6.	Beräkna summan av y och dividera med n, der n = antalet laboratorier ( $\Sigma y/n$ ). Detta är medelvärdet	8,35909	m
7.	Beräkna standardavvikelsen för y	0,66250	$s_y$
8.	Kvadrera standardavvikelsen för y	0,43891	$s_y^2$
9.	Beräkna mellanlaboratorievariansen ur formeln $s_L^2 = s_y^2 - (s_r^2/2)$	0,27004	$s_L^2$
10.	Beräkna variansen för reproducerbarhet ur $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$	0,60777	$s_R^2$
11.	Beräkna standardavvikelse för repeterbarhet $s_r$ och reproducerbarhet $s_r$ ur formlerna $s_r = \sqrt{s_r^2}$ $s_R = \sqrt{s_R^2}$	0,58114 0,77960	$s_r$ $s_R$
12.	Beräkna relativ standardavvikelse för repeterbarhet $RSD_r$ och reproducerbarhet $RSD_R$ ur formlerna $RSD_r = (s_r/m) \times 100$ $RSD_R = (s_R/m) \times 100$	6,95219 9,32637	$RSD_r$ $RSD_R$
13.	Beräkna repeterbarhets- och reproducerbarhetsvärdena r och R ur formlerna $r = 2,8 \times s_r$ $R = 2,8 \times s_R$	1,62720 2,18288	r R
14.	Teoretisk $RSD_R$ $(RSD_R)_{teoretisk} = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$	2,9058	$(RSD_R)_{teoretisk}$
15.	HorRat verdi: $(RSD_R)_{observert} / (RSD_R)_{teoretisk}$	3,2062	HorRat

\*) Detta värde kann antecknas för senare användning i samband med extremvärdesanalysen.

Teoretisk  $RSD_R$ : Da enheden er g/100g ganges med  $10^{-2}$

Observera, att om det erhållna värdet för  $s_R$  er **lägre** än värdet för  $s_r$ , skall  $s_R$  anges som =  $s_r$ .

Resultatene skal angis i tabell, se under 11.1, prøve Pølse 1. Merk spesielt med hvilken nøyaktighet de ovenfornevnte verdiene er angitt i tabellen under 11.1.

[På NMKLs intranettside: [www.nmkl.org/intranett](http://www.nmkl.org/intranett), er det tilgjengelig et program i Excel som beregner repeterbarhet, reproducerbarhet og HorRat verdier, samt sjekker for eventuelle outliers.

### 9.1.1.2 Beräkning av statistiska parametrar ut från en split-level avprövning

Ni laboratorier har rapporterat resultat från enkeltbestämmelser på två Split-level pröver (a och b), som förekom i avprövningen som skjutna provpar. Differensen  $w = a - b$  samt medelvärden  $y$  beräknas för varje resultatpar. Exemplet är från exemplet under 11.1.

Laboratorium	A	B	W	y
1	9,04	8,50	0,54	8,770
2	8,86	8,39	0,47	8,625
3	8,69	8,26	0,43	8,475
4	9,90	9,42	0,48	9,660
5	9,13	8,62	0,51	8,875
6	8,59	8,10	0,49	8,345
7	9,17	8,64	0,53	8,905
8	8,93	8,43	0,50	8,680
9	9,40	8,83	0,57	9,115

Beräkning av statistiska parametrar från en "split-level" avprövning. I exemplet har använts värden som finns tabulerade på föregående sida.

Steg	Funktion	Display	Storhet
1.	Mata in w-värdena *		
2.	Beräkna standardavvikelsen för w-värdena	0,04147	$s_w$
3.	Beräkna variansen för w-värdena genom att kvadrera standardavvikelsen. Dividera därefter detta värde med 2 ( $s_w^2/2$ ). Detta värde är inom-laboratorievariansen	0,00086	$s_r^2$
4.	Radera ut w-värdena		
5.	Mata in y-värdena		
6.	Beräkna summan av y och dividera med n, där n = antalet laboratorier ( $\Sigma y/n$ ). Detta är medelvärdet	8,82778	m
7.	Beräkna standardavvikelsen för y	0,38844	$s_y$
8.	Kvadrera standardavvikelsen för y	0,15089	$s_y^2$
9.	Beräkna mellan-laboratorievariansen ur formeln $s_L^2 = s_y^2 - (s_r^2/2)$	0,15046	$s_L^2$
10.	Beräkna variansen för reproducerbarhet ur $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$	0,15132	$s_R^2$
11.	Beräkna standardavvikelse för repeterbarhet $s_r$ och reproducerbarhet $s_R$ ur formlerna $s_r = \sqrt{s_r^2}$ $s_R = \sqrt{s_R^2}$	0,02932 0,38900	$s_r$ $s_R$
12.	Beräkna relativ standardavvikelse för repeterbarhet $RSD_r$ , och reproducerbarhet $RSD_R$ ur formlerna $RSD_r = (s_r/m) \times 100$ $RSD_R = (s_R/m) \times 100$	0,33213 4,40654	$RSD_r$ $RSD_R$
13.	Beräkna repeterbarhets- och reproducerbarhetsvärdena r och R ur formlerna $r = 2,8 \times s_r$ $R = 2,8 \times s_R$	0,08210 1,08920	r R
14.	Teoretisk $RSD_R$ $(RSD_R)_{teoretisk} = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$	2,88200	$(RSD_R)_{teoretisk}$
15.	HorRat värde: $(RSD_R)_{observerat} / (RSD_R)_{teoretisk}$	1,52899	HorRat

\*) Om alla w-värden har samma förtecken (+ eller -) kan de matas in utan förtecken. Om w-värdena har olika förtecken skall förtecknen också matas in.

Teoretisk  $RSD_R$ : Da enheden er g/100g ganges med  $10^{-2}$

Observera, att om det erhållna värdet för  $s_R$  er **lägre** än värdet för  $s_r$ , skall  $s_R$  anges som =  $s_r$ .

### 9.1.2 Outlier-tests ved Cochran og Grubbs

Præcisionsparametrene repeterbarhed og reproducerbarhed skal også angives for de accepterede data, det vil sige det resulterende datasæt, der fremkommer, når de (hvis de findes) ekstremværdier, der skal findes ifølge IUPAC-reglerne, er frasorteret.

Der skal udføres to tests: Cochran-testen og Grubbs-testen. De skal udføres i henhold til "flow-sheetet" (bilag 7) . Både Cochran- og Grubbs-testen skal udføres på samlige relevante talpar: Uniform-level på sammenhørende skjulte parallelprøver og Split-level på sammenhørende resultatpar for de 2 prøver, der indgår i Split-level-designet. Hvis man har afprøvet metoden på 4 matricer på hver sit koncentrationsniveau, har hvert laboratorium typisk lavet 8 prøver (4 x 2), hvorfor der skal laves 4 statistiske analyser for outliers.

**Cochran-testen** tester talmaterialet for ekstreme forskelle i talsættet fra det enkelte laboratorium i forhold til de øvrige laboratorier.

Fra parallelle resultat-par beregnes kvadratet på differensen for hvert af de deltagende laboratorier. Herefter summeres disse kvadrater. Den største kvadrat divideres med summen af alle kvadraterne og multipliceres med 100. Den beregnede kvotient kaldes Cochran-værdien, som indikerer en ekstremværdi, hvis kvotienten overstiger den kritiske værdi for det pågældende antal laboratorier, der deltager i afprøvningen. Tabel er angivet i bilag 8.

**Grubbs-testen** tester talmaterialet for ekstreme gennemsnit på enkelte laboratorier i forhold til de øvrige laboratorier. Grubbs-testen skal udføres på middelværdien af de indgående talpar for hvert laboratorium. Der er tale om to tests: en enkelt Grubbs og en dobbelt Grubbs.

Testene identificerer de laboratorier, som har opnået ekstreme middelværdier (=laboratiemiddel- værdier) for de enkelte sammenhørende resultatpar.

Fra parallelle resultat-par beregnes middelværdien for hvert laboratorium og derefter standardafvigelsen for laboratorie-middelværdierne ( $s$ ). Den fundne standardafvigelse sammenlignes med:

- 1) i en enkel Grubbs-test med den standardafvigelse, man kan beregne, når man enten udelukker laboratoriet med den højeste middelværdi eller laboratoriet med den laveste middelværdi, henholdsvis  $s_H$  og  $s_L$
- 2) i en dobbelt Grubbs-test med den standardafvigelse, man kan beregne, når man enten udelukker de 2 laboratorier med
  - a) de to højeste middelværdi  $s_{2H}$
  - b) de to laveste middelværdi  $s_{2L}$
  - c) den højeste og den laveste middelværdi  $s_{LH}$

Dobbelt Grubbs-test udføres kun, når der ikke er fundet ekstremværdier ved enkelt-Grubbs test, jævnfør flowsheetet i bilag 7.

Enkel Grubbs test-værdi: Udeluk det højeste laboratiemiddelværdi og beregn de resterende laboratiemiddelværdiers standardafvigelse  $s_H$ . Beregn på samme måde standardafvigelsen med det laveste laboratiemiddelværdi udelukket -  $s_L$ . Beregn herefter den procentuelle reduktion i standardafvigelse - enkel Grubbs-værdien:

Hvis  $s_H$  er mindre end  $s_L$ , beregnes værdien  $G_H = 100 \times (1 - s_H/s)$

Hvis  $s_L$  er mindre end  $s_H$ , beregnes værdien  $G_L = 100 \times (1 - s_L/s)$

Enkel-Grubbs værdien indikerer, at der er tale om en ekstremværdi, hvis den beregnede værdi er højere end den kritiske værdi, som kan findes i enkelt-værdi-kolonnen (kolonne 3) i tabel i bilag 8.

Dobbelt-Grubbs test-værdi: Beregn dobbelt Grubbs-værdien på samme måde som ved enkelt Grubbs, men udeluk de to højeste laboratiemiddelværdier og beregn de resterende laboratiemiddelværdiers standardafvigelse  $s_{2H}$ . Beregn på samme måde standardafvigelsen med de to laveste laboratiemiddelværdier udelukket -  $s_{2L}$ .

Dobbelt-Grubbs værdien indikerer, at der er tale om en ekstremværdi, hvis den beregnede værdi er højere end den kritiske værdi, som kan findes i dobbelt-værdi-kolonnen (kolonne 4) i tabel i bilag 8. Hvis den beregnede værdi er højere end tabel-værdien, udelukkes de berørte gennemsnit, hvis færre end 22% af samtlige gennemsnit bliver fjernet ved denne procedure. Husk at følge flowsheetet i bilag 7.

Hvis der ikke er ekstremværdier ved den foregående beregning, udføres følgende beregning:

Beregn standardafvigelsen med det laveste og det højeste laboratiemiddelværdi udelukket  $s_{HL}$ . Denne dobbelt-Grubbs værdi indikerer, at der er tale om ekstremværdier, hvis den beregnede værdi er højere end den kritiske værdi, som kan findes i dobbelt-værdi-kolonnen (kolonne 5) i tabel i bilag 8.

Hvis den beregnede værdi er højere end tabel-værdien, udelukkes de berørte gennemsnit, hvis færre end 22% af samtlige gennemsnit bliver fjernet ved denne procedure.

Cochran: Kritiske værdier ved 2,5%-forkastelsesniveau (1-sidet) for kvotienten mellem den maksimale varians og den totale varians, udtrykt som procent. Antal "gentagelser" i resultatparret er 2 for hvert laboratorium.

Hvis der er flere gentagelser end 2 pr. laboratorium, kan de relevante kritiske værdier fås fra den reviderede IUPAC-protokol.

Grubbs: Kritiske værdier ved 2,5%-forkastelsesniveau (2-sidet), 1,25 %-forkastelsesniveau (1-sidet), udtrykt som procent reduktion i standardafvigelse forårsaget af fjernelse af de(n) ekstreme værdi(er).

### 9.1.2.1 Eksempler på outliertest

Jvf. Bilag 7 (viser et flowdiagram for outliere).

*Eksempel på udelukkelse med Grubb's test.*

*Split-level afprøvning, samme eksempel fra 9.1.1.2, med undtagelse af værdierne for lab nr 4.*

TAB A

Lab nr	a	b	w	w*w	y
1	9,04	8,50	0,54	0,2916	8,77
2	8,86	8,39	0,47	0,2209	8,63
3	8,69	8,26	0,43	0,1849	8,48
<b>4</b>	<b>10,40</b>	<b>10,10</b>	0,30	0,0900	10,25
5	9,13	8,62	0,51	0,2601	8,88
6	8,59	8,10	0,49	0,2401	8,35
7	9,17	8,64	0,53	0,2809	8,91
8	8,93	8,43	0,50	0,2500	8,68
9	9,40	8,83	0,57	0,3249	9,12
$\Sigma$				2,143	

TAB B  
Steg

1	n	9
	Sw (standardafv. for w-værdierne)	0,07949
2	Sw <sup>2</sup> /2 (variansen for w-værdierne) Sr <sup>2</sup>	0,00316
3		
4		
5	Sum y	80,04
6	m = Sum y/n (middelværdi)	8,89
7	s <sub>v</sub> (standardafvigelsen for y)	0,5589
8	s <sub>v</sub> <sup>2</sup>	0,31232
9	s <sub>L</sub> <sup>2</sup> = s <sub>v</sub> <sup>2</sup> - (s <sub>r</sub> <sup>2</sup> /2) (varians mellem lab.)	0,31074
10	s <sub>R</sub> <sup>2</sup> = s <sub>L</sub> <sup>2</sup> + s <sub>r</sub> <sup>2</sup>	0,31390
11	s <sub>r</sub> = √s <sub>r</sub> <sup>2</sup>	0,0562
	s <sub>R</sub> = √s <sub>R</sub> <sup>2</sup>	0,5603
12	RSD <sub>r</sub> (s <sub>r</sub> /m)*100	0,6321
	RSD <sub>R</sub> = (s <sub>R</sub> /m)*100	6,2998
13	r = 2,8*s <sub>r</sub>	0,1574
	r = 2,8*s <sub>R</sub>	1,5687
	C	0,0889
	log c	-1,05
	1-(0,5*logC)	1,53
	log 2	0,3010
	log(RSD <sub>R</sub> teoretisk)	0,4592
14	RSD <sub>R</sub> teoretisk	2,880
	RSD <sub>R</sub> beregnet	6,300
15	Horrat-værdi	2,1874

Cochran-test for identificering af ekstem forskelle i parallel resultater

1)	Beregn (w*w) for hvert laboratorium og læg sammen (se TAB A)	2,143	Udeluk LAB. NR.
2)	Identificer den højeste differens, w*w max. Her lab 1	0,325	
3)	Beregn w*w max*100/sum w*w (= 0,3249*100/2,143)	15,2	
4)	Tabelværdi for laboratorie-antal	69,3	

Hvis den beregnede værdi > tabelværdien foreligger den højeste værdi en Cochran-ekstremværdi. Siden den beregnede værdi (15,2) < tabelværdi (69,3) er det ingen outlier i henhold til Cochran-test.

Enkelt Grubbs-test for identificering af høj og lav middelværdi.

1)	Middelværdiernes standardafvigelse (TAB B steg 6)	0,559	Udeluk LAB. NR.  4
2)	Find den højeste middelværdi (TAB A)	10,250	
3)	Middelværdiernes standardafv. (højeste værdi udeladt) s <sub>H</sub>	0,247	
4)	Find den laveste middelværdi	8,350	
5)	Middelværdiernes standardafv. (laveste værdi udeladt) s <sub>L</sub>	0,556	
6)	Find den mindste værdi af de to standardafvigelser	0,247	
7)	Beregn enkelt Grubbs-værdi G <sub>H</sub> =100*(1-(s <sub>H</sub> /s))	55,8	
8)	Tabelværdi for laboratorieantal:	46,8	

Siden den beregnede værdi (55,8) > tabelværdi (46,8) er lab nr 4 en outlier i henhold til enkelt Grubbs-test.

Dobbel Grubbs test udføres kun, når der ikke er fundet ekstremværdier med enkel Grubbs test.

Derefter beregnes gennemsnit og præcision på ny, med udeladelse af lab nr 4.



Eksempel på udelukkelse med Cochran's test.

Split-level afprøvning, samme eksempel fra 9.1.1.2, Pølse 2, med undtag af verdiene for lab nr 9.

Lab nr	a	B	w	w*w	y	Gens. max	Gens. min.	Evt. enkelt Grubbs	Gens. 2 max	Gens. 2 min.	Gens. min/max
1	9,04	8,50	0,54	0,2916	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77	8,77
2	8,86	8,39	0,47	0,2209	8,63	8,63	8,63	8,63	8,63	8,63	8,63
3	8,69	8,26	0,43	0,1849	8,48	8,48	8,48	8,48	8,48		8,48
4	9,90	9,42	0,48	0,2304	9,66		9,66	9,66		9,66	
5	9,13	8,62	0,51	0,2601	8,88	8,88	8,88	8,88	8,88	8,88	8,88
6	8,59	8,10	0,49	0,2401	8,35	8,35		8,35	8,35		
7	9,17	8,64	0,53	0,2809	8,91	8,91	8,91	8,91	8,91	8,91	8,91
8	8,93	8,43	0,50	0,2500	8,68	8,68	8,68	8,68	8,68	8,68	8,68
9	9,40	<b>7,25</b>	2,15	<b>4,6225</b>	8,33	8,33	8,33	8,33		8,33	8,33

Cochran-test for identificering af ekstrem forskelle i parallel resultater

1) Beregn (w*w) for hvert laboratorium og læg sammen	6,581	Udeluk LAB. NR. <b>9</b>
2) Identificer den højeste differens, w*w max. Her lab 1	<b>4,623</b>	
3) Beregn $w*w \max * 100 / \text{sum } w*w$	70,2	
Tabelværdi for laboratorie-antal	69,3	

Hvis den beregnede værdi > tabelværdien foreligger den højeste værdi en Cochran-ekstremværdi. Siden 70,2 > 69,3 er lab 9 outlier i henhold til Cochran-test.

Enkelt Grubbs-test for identificering af høj og lav middelværdi.

1) Middelværdiernes standardafvigelse	0,404	Udeluk LAB. NR.
2) Find den højeste middelværdi	9,660	
3) Middelværdiernes standardafv. (højeste værdi udeladt) Sh	0,225	
4) Find den laveste middelværdi	8,350	
5) Middelværdiernes standardafv. (laveste værdi udeladt) SL	0,402	
6) Find den mindste værdi af de to standardafvigelser	0,247	
7) Beregn enkelt Grubbs-værdi $GH = 100 * (1 - (Sh/s))$	44,2	
8) Tabelværdi for laboratorieantal:	46,8	

Siden den beregnede værdi (44,2) < tabelværdi (46,8) er LAB 4 ingen outlier.

Dobbel Grubbs-test for identificering af to ekstrem høje/lave eller en høj og en lav middelværdi

1) Middelværdiernes standardafv.	0,404	Udeluk LAB. NR.
2) Find de to højeste middelværdier		
3) Middelværdiernes standardafv. (hvor to højeste er udeladt) S2h	0,205	
4) Find de to laveste middelværdier		
5) Middelværdiernes standardafv. (hvor to laveste er udeladt) S2L	0,412	
6) Find den højeste og laveste middelværdi		
7) Middelværdiernes standardafv. (hvor høj. og laveste er udeladt) SLh	0,211	
8) Find den laveste af de 3 standardafv.	0,205	
9) Beregn dobb. Grubbs-værdi $G_{HL} = 100 * (1 - (SHL/S))$	49,2	
10) Tabelværdi for labantal:	61,0	

Hvis den beregnede Grubbs-værdi > tabelværdi er de pågældende. Middelværdier ekstremværdier, der udelukkes. I dette eksempel er der ingen outliers i henhold til dobbel Grubbs-test.

## 10. Kriterier for godkendelse af metoder

Samtidig med at IUPAC-1987 anbefalingerne for udførelse af metodeafprøvninger blev færdige, konstaterede man, at der var et behov for at harmonisere de kriterier, som skal benyttes ved bedømmelse af, hvorvidt en metode opfylder de krav, der kan stilles til en standardmetode. Efter et omfattende kortlægningsarbejde udført af IUPAC, blev deltagerne på et arbejdsmøde 1989 enige om kriterier, som skal anvendes ved godkendelse af metoder.

Man har kunnet vise, at såfremt præcisionen for en metode udtrykkes som relativ standardafvigelse for reproducerbarhed  $RSD_R$ , så er størrelsen af  $RSD_R$  stærkt afhængig af parameterkoncentrationen. Enslørende  $RSD_R$ - værdier opnås for samme parameterkoncentration uafhængig af parameterens natur, matrice, beregningsmetode med mere. Dette er baggrunden for, at man har lagt størrelsen af  $RSD_R$  til grund for, om en analysemetode skal anses for at have en acceptabel præcision.

IUPAC's acceptkriterier, som blandt andet kræver at afprøvningen har fulgt IUPAC-1987 anbefalingerne samtidig med at ikke alt for mange værdier er bestemt som outliers, går under navnet IUPAC-1989 anbefalingerne : Pocklington, W. D. (1990) Harmonized Protocol for the Adoption of Standardized Analytical Methods and for the Presentation of their Performance Characteristics og indebærer, at en metode kan godkendes som standardmetode, hvis følgende krav er opfyldt:

- 1) Metodeafprøvningen og den statistiske behandling af analyseresultaterne er gennemført efter principperne i de reviderede IUPAC-regler
- 2) Når samtlige relevante (valide) analysesvar er undersøgt for forekomst af outliers, og det viser sig at højst 1 ud af 5 prøver indeholder mere end 20% uforklarlige outliers (højst 2 outliers/10 laboratorier eller højst 2 prøver/10 prøver indeholder mere end 2 outliers)
- 3) De beregnede værdier for relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ( $RSD_R$ ) ved den aktuelle parameterkoncentration, udtrykt som koncentrationsforhold er mindre end værdierne i følgende tabel:

### Relation mellem koncentration og $RSD_R$

Koncentra- tionsforhold	$<10^{-7}$	$10^{-7}$	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$	$10^{-3}$	$10^{-2}$	$10^{-1}$	1
$RSD_R(\%)$	23	23	16	11	8	5,6	4	2,8	2

#### Bemærkning 1

Koncentrationsforholdet er 1 for koncentrationer omkring 100 %, koncentrationsforholdet er  $10^{-1}$  for koncentrationen 10% af parametren og så videre.

#### Bemærkning 2:

Værdierne i ovenstående tabel er for  $RSD_R$  beregnet ud fra formlen

$$RSD_R = 2^{(1 - 0,5 \log C)} = 2C^{-0,1505}$$

hvor C er parametrens koncentration. Ligningen er fremkommet empirisk fra undersøgelser af mange hundrede metodeafprøvninger, omfattende et stort antal analyter, matricer og måleteknikker.

Beregninger skal foretages ved hjælp af formlen, - ikke ud fra tabellen. Nogle af koncentrationerne i tabellen er estimerede.

IUPAC-1989 anbefalingerne konstaterer, at har man ikke anden information, skal værdien for relativ standardafvigelse for reproducerbarhed ( $RSD_R$ ) for den aktuelle parameterkoncentration, som er 0,5 - 2 gange højere end de i tabellen angivne, anses for at være acceptable. Dette benævnes også som HorRat værdier.

$$\text{HorRat værdien} = (RSD_R)_{\text{observeret}} / (RSD_R)_{\text{beregnet}}$$

(HorRat værdien bør være mellem 0,5 og 2.)

Den relative standardafvigelse for repeterbarhed (indenfor-laboratorievariationen)  $RSD_r$  er oftest 0,5 til 0,67 gange  $RSD_R$ .

Tolkningen af de statistiske resultater kan altså indebære, at metoden ikke kan godkendes i den afprøvede form, såfremt især punkt 2 (antallet af outliers) ikke er opfyldt. I nogle tilfælde bliver repeterbarheden ( $r$ ) større end reproducerbarheden ( $R$ ). I disse tilfælde sættes reproducerbarheden lig repeterbarheden.

## 11. Udarbejdelse af afprøvningsrapport

Det er referentens opgave at udarbejde en afprøvningsrapport.

Eksempel på afprøvningsrapport er vedlagt som Bilag 9. Den kan affattes på dansk, svensk, norsk eller engelsk.

Afprøvningsrapporten skal indeholde alle valide data, som afprøvningslaboratorierne har afleveret.

Rapporten skal indeholde den statistiske analyse, der er udført i forbindelse med evaluering af data. Rapporten skal specificere hvilke resultater, som eventuelt er fundet som outliers. De statistiske parametre skal medtages både for samtlige valide data og for de for outliers reducerede data. Eventuelle undersøgelser med hensyn til opklaring af årsagerne til outliers skal medtages.

Alle de deltagende laboratorier skal nævnes ved navn.

Resultatet af de statistiske analyser, udført separat for hver enkelt af prøverne skal præsenteres i tabelform, og følgende oplysninger skal medtages:

- Antal deltagende laboratorier
- antal modtagne valide data
- antal accepterede resultat (valide data - outliers)
- middelværdi for resultatet\*
- rigtigt eller accepteret værdi (hvis kendt)
- genfindning af parameter (recovery) - hvis relevant
- standardafvigelse for repeterbarhed  $s_r$ \*
- standardafvigelse for reproducerbarhed  $s_R$ \*
- relativ standardafvigelse for repeterbarhed  $RSD_r$ \*
- relativ standardafvigelse for reproducerbarhed  $RSD_R$ \*
- repeterbarhedsværdi ( $r$ )\*
- reproducerbarhedsværdi ( $R$ ) \*
- de beregnede HORRAT-værdier

\* *Disse data skal medtages både før og efter udelukkelse af eventuelt outliers*

Et eksempel på en resultattabel efter ovenstående model findes på næste side. Bemærk at prøverne listes i stigende koncentrationsrækkefølge. Laboratorierne skal ikke identificeres i rapporten sammen med deres prøver.

Rapporten identificeres med forside, hvorpå der er angivet: **Behov for ny analysemetode ...**, samt titlen på metoden. Rapporten sendes til kontaktperson/medreferent til kommentering. Disse kommentarer sendes tilbage til referenten, som herefter indarbejder disse - (I det omfang rapporten ændres som følge af kommentarer fra kontaktpersoner får rapporten et nyt udgave nr. Denne rapport sendes til GS, som videredistribuerer den til nationalkomitéerne. Nationalkomitéerne diskuterer rapporten, afgiver kommentarer til GS, som fremlægger sagen til beslutning på førstkommande AU eller årsmøde.

Sammen med rapporten mendsender referenten **al relevant skriftlig kommunikation mellem referent og deltagende laboratorier, som er foregået før, under og efter afprøvning**. Dette materiale arkiveres hos GS

som dokumentation og baggrundsmateriale for afprøvningen.

Såfremt årsmødet godkender afprøvningsrapporten, bedes referenten om at udarbejde den undersøgte metode i det omfang og det layout, som NMKL foreskriver (Bilag 10).

Referenten skal udarbejde teksten på enten dansk, norsk eller svensk samt engelsk.. Referentens arbejde er herefter i princippet slut. GS overtager det videre forløb og sørger for metodens trykning og videre granskning. Referenten forventes dog, at stille sig til rådighed for GS, når det gælder korrekturlæsning med videre af den endelige tekst samt udarbejdelse af "ledsagetekst", som sammen med metoden præsenteres på nordisk sprog i NMKL's informationsblad 'NMKL-nyt'. Desuden oversættelse af ledsageteksten til engelsk til brug for distributionen af engelske versioner af metoden til NMKL's internationale samarbejdspartnere.

I forlængelse af at årsmødet godkender afprøvningsrapporten og dermed godkender en metode til publicering som NMKL-metode, kan årsmødet beslutte, at man ønsker at nationalkomiteerne får den endelige metodetekst til behandling før trykning.

Metoden vil språkgranskes førhen den granskes af aktuell subkomiteformand og af NMKLs formand. Metoden vil bli publiceret på et skandinavisk sprog samt på engelsk og finsk.

### 11.1 Eksempel på en tabel, som repræsenterer statistiske resultater fra en metodeafprøvning: Bestemmelse af fedt i kødvarer. (1 matrice; 1-2 materialer) afhængig af typen af pølser.

	<i>Pølse 1</i>	<i>Pølse 2</i>
Antal laboratorier	11	9
Antal resultater	22	18
Antal accepterede laboratorier	11	8
Antal accepterede resultater	22	16
<u>Middelværdi og præcisionsparametre/ alle værdier</u>		
Middelværdi (g/100 g)	8,36	8,931
Standardafvigelse for repeterbarhed, sr (g/100 g)	0,58	0,035
Rel. Standardafvigelse for repeterbarhed, RSDr (%)	7,0	0,39
Repeterbarhedsværdi, r (g/100 g)	1,63	0,098
Standardafvigelse for reproducerbarhed, S <sub>R</sub> (g/100 g)	0,78	0,84
Rel. Standardafvigelse for reproducerbarhed, RSD <sub>R</sub> (%)	9,3	9,4
Reproducerbarhedsværdi, R (g/100 g)	2,2	2,4
HorRat	3,2	2,9
<u>Middelværdi og præcisionsparametre/ accepterede værdier</u>		
Middelværdi (g/100 g)	8,36	8,828
Standardafvigelse for repeterbarhed, sr (g/100 g)	0,58	0,029
Rel. Standardafvigelse for repeterbarhed, RSDr (%)	7,0	0,33
Repeterbarhedsværdi, r (g/100 g)	1,63	0,082
Standardafvigelse for reproducerbarhed, S <sub>R</sub> (g/100 g)	0,78	0,39
Rel. Standardafvigelse for reproducerbarhed, RSD <sub>R</sub> (%)	9,3	4,4
Reproducerbarhedsværdi, R (g/100 g)	2,2	1,09
HorRat	3,2	1,5

#### **Bemærkning:**

Pølse 1 forelå som to skjulte parallelprøver (to prøvebeholdere) og pølse 2 som et splitt-level par (to prøvebeholdere): dobbelt mængde pølse blev homogeniseret. Mængden halveredes. Til halvdelen af materialet tilsattes et inert emne, som "fortyndede fedt-indholdet" noget. Dette indebar, at pølse nr. 2 forekom som to prøver med lignende, men noget forskelligt analyt-koncentration (= split level par).

Her er altså anført resultater for to afprøvningsmaterialer og fire afprøvningsprøver i et snævert koncentrationsniveau (ca. 9,5 g/100 g). De elleve afprøvningslaboratorier har udført 4 enkeltbestemmelser. For pølse 1 er HorRat værdien over 2, og man må da spørge sig om resultaterne fra afprøvningen viser at metoden ikke holder mål eller om den likevel kan godkendes. Nationalkomiteene må nøje vurdere metoden sammen med referent og kontaktpersoner. For pølse 2 har 2 laboratorier indsendt irrelevante resultater (de har meddelt, at de har afvigelset fra metoden) og er derfor ikke medtaget. Dertil er et laboratorium udelukket for pølse 2's vedkommende på grund af rapporterede ekstremværdier.

## 12. Referencer

De reviderede IUPAC-regler: Horwitz, W. (1995) Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Method-performance Studies, Pure and Appl. Chem 67, 331-343

IUPAC-regler: Horwitz, W. (1988) Protocol for the Design, Conduct and Interpretation of Collaborative - Studies, Pure and Appl. Chem 60, 855-864 (IUPAC 1987-reglerne)

Pocklington, W.D. (1990) Guidelines for the Development of Standard Methods by Collaborative Study, 5th ED., Laboratory of the Government Chemist, Teddington, England

Pocklington, W. D. (1990) Harmonized Protocol for the Adoption of Standardized Analytical Methods and for the Presentation of their Performance Characteristics, Pure and Appl. Chem. 62, 149 -162.

Mulholland, M. (1988) Ruggedness Testing in Analytical Chemistry, trends in Analytical Chemistry 7, 383 - 389

Youden W.J. & Steiner E.H. (1975) Statistical Manual of the AOAC International, Washington DC, USA

NMKL-procedure nr. 4 (2005) Validering af kemiske analysemetoder

NMKL-rapport nr. 8: GLP-principper for kemiske levnedsmiddellaboratorier

Brøndum, L og Monrad, J.D. (1975) Sandsynlighedsteori og statistik, Ingeniørfonden, København

## 13. Bilag

Bilag 1: Summarisk skema over referentens arbejde

Bilag 2: De reviderede IUPAC-1995 regler

Bilag 3: Eksempel på forsendelse af prøver i forbindelse med afprøvninger

Bilag 4: Instruksjoner til deltakere i NMKLs afprøvninger

Bilag 5: Sjekklister for utarbejdelse af resultatskjema

Bilag 6: Skjema for statistisk analyse af resultat fra kollaborative afprøvninger.

Bilag 7: Eksempel på outliertest med flowdiagram.

Bilag 8: Tabell over kritiske verdier i Cochran og Grubbs test.

Bilag 9: Eksempel på afprøvningsrapport (Natrium)

Bilag 10: Eksempel på udformning af NMKL-metode (Natrium)