

URDHËR
Nr. 163, datë 23.3.2023

**MBI PERFORMANCËN E METODAVE ANALITIKE PËR MBETJET E
SUBSTANCAVE FARMAKOLOGJIKISHT AKTIVE TË PËRDORURA NË
KAFSHËT QË PRODHOJNË USHQIM, INTERPRETIMIN E REZULTATEVE, SI
DHE METODAT QË DO TË PËRDOREN PËR MARRJEN E MOSTRAVE¹**

(Ndryshuar me urdhër nr. 347, datë 2.4.2026)

(i përditësuar)

Në mbështetje të nenit 102, pika 4 e Kushtetutës, pikës 3 të nenit 42, të ligjit nr. 9863, datë 28.1.2008, “Për ushqimin”, i ndryshuar dhe pikës 3 të nenit 81, të ligjit nr. 10465, datë 29.9.2011, “Për shërbimin veterinar në Republikën e Shqipërisë”, i ndryshuar,

URDHËROJ:

1. Miratimin e rregullave për performancën e metodave analitike për mbetjet e substancave farmakologjike aktive të përdorura në kafshët që prodhojnë ushqim, interpretimin e rezultateve, si dhe metodat që do të përdoren për marrjen e mostrave sipas tekstit bashkëlidhur të këtij urdhri.

2. Për zbatimin e këtij urdhri ngarkohen Drejtoria e Përgjithshme e Zhvillimit në Fushën e Sigurisë Ushqimore, Veterinarisë, Mbrojtjes së Bimëve dhe Peshkimit, Autoriteti Kombëtar i Veterinarisë dhe Mbrojtjes së Bimëve, Autoriteti Kombëtar i Ushqimit dhe Instituti i Sigurisë Ushqimore dhe Veterinarisë.

Ky urdhër hyn në fuqi pas botimit në Fletoren Zyrtare.

MINISTËR I BUJQËSISË DHE ZHVILLIMIT RURAL
Frida Krifca

**MBI PERFORMANCËN E METODAVE ANALITIKE PËR MBETJET E
SUBSTANCAVE FARMAKOLOGJIKISHT AKTIVE TË PËRDORURA NË KAFSHËT QË
PRODHOJNË USHQIM, INTERPRETIMIN E REZULTATEVE, SI DHE METODAT QË
DO TË PËRDOREN PËR MARRJEN E MOSTRAVE**

Neni 1

Lënda dhe qëllimi

(Ndryshuar me urdhër nr. 347, datë 2.4.2026)

1. Kjo rregullore përcakton rregulla në lidhje me metodat e analizave të përdorura për marrjen e kampioneve dhe për analizat laboratorike që u përkasin mbetjeve të substancave farmakologjike aktive, në kuadër të Planit Kombëtar të përcaktuar në nenin 3 të rregullores “Për miratimin e rregullave për praktikën uniforme në kryerjen e kontrolleve mbi përdorimin e substancave farmakologjike aktive të autorizuar si PMV ose si aditivë për ushqimet e kafshëve dhe mbetjeve të tyre, mbi substancat farmakologjike aktive të ndaluara, ose të paautorizuara, të përdorura në kafshët, që prodhojnë ushqim, mbetjet e tyre, si dhe për përmbajtjen specifike të planeve të kontrollit dhe mënyrat e hartimit të tyre, për zbatimin e planit kombëtar të monitorimit të mbetjeve”, të miratuar me urdhrin nr. 122, datë 6.3.2023, të ndryshuar.

¹ Ky urdhër përaftron Rregulloren Zbatuese të Komisionit (BE) 2021/808 e datës 22 mars 2021 “Mbi performancën e metodave analitike për mbetjet e substancave farmakologjike aktive të përdorura në kafshët prodhuese ushqimore, interpretimin e rezultateve, si dhe metodat që do të përdoren për marrjen e mostrave”

2. Kjo rregullore zbatohet për kontrollet që synojnë verifikimin e përputhshmërisë me kërkesat ligjore për praninë e mbetjeve të substancave farmakologjikisht aktive.

Neni 2

Përkufizimet

(Ndryshuar pika 36 dhe 47 me urdhër nr. 347, datë 2.4.2026)

Për qëllimet e këtij urdhri, përkufizimet në urdhrin nr. 123, datë 6.3.2023 “Për miratimin e Rregullores “Mbi rregullat që duhet të zbatohen për rastet e dyshuara ose të konstatuara në mospërputhshmëri me rregullat kombëtare të zbatueshme për përdorimin e substancave farmakologjikisht aktive të autorizuar në produktet mjekësore veterinarë dhe mbetjeve të tyre ose aditivëve për ushqimin për kafshëve dhe përdorimin e substancave farmakologjike aktive të ndaluara ose të paautorizuara dhe mbetjeve të tyre”, urdhrin nr. 134, datë 10.3.2023 “Për miratimin e Rregullores “Mbi pikat e referencës për veprim për substancat farmakologjikisht aktive të palejuara të pranishme në ushqimet me origjinë shtazore”, urdhrin nr. 363, datë 3.1.2013, “Për miratimin e rregullores “Mbi procedurat për vendosjen e kufijve të mbetjeve të lëndëve aktive farmakologjike në ushqimet me origjinë shtazore”

Përkufizimet e mëposhtme do të zbatohen gjithashtu:

1. “rifitimi absolut” nënkupton raportin e sasisë së analitit, i cili i është nënshtruar procesit analitik me sasinë e analitit në kampionin origjinal, shprehur kjo në përqindje;

2. “saktësia “nënkupton sa afër është rezultati i marrë nga testimi me vlerën e “vërtetë”, e cila përcaktohet duke vlerësuar vërtetësinë dhe përpikërinë;

3. “gabim alfa (α)” nënkupton probabilitetin që kampioni i testuar të jetë konform, edhe pse është marrë nga një rezultat matjeje jokonform;

4. “analit” nënkupton komponentin që do të analizohet;

5. “substancia e autorizuar” nënkupton një substancë farmakologjikisht aktive e autorizuar të përdoret në kafshët që prodhojnë produkte ushqimore;

6. “gabim beta (β)” nënkupton probabilitetin që kampioni i testuar të jetë vërtet jokonform, edhe pse është marrë nga një rezultat matjeje konform;

7. “bias/shmangia”, nënkupton ndryshimin midis vlerës së rezultatit të testit me vlerën e testit të referencës;

8. “standard kalibrimi” nënkupton sasinë e substancës, me një referencë të gjurmushme, për matjet që përfaqëson në një mënyrë që e lidh vlerën e saj me një bazë referimi;

9. “material reference i certifikuar” (CRM) nënkupton një material reference, i shoqëruar me dokumentacion të lëshuar nga një organ i deleguar dhe që ofron një ose më shumë vlera të specifikuar të karakteristikave me pasiguri dhe gjurmueshmëri, duke përdorur procedura të vlefshme;

10. “co-chromatography” nënkupton një teknikë në të cilën një substancë e panjohur aplikohet në një sistem kromatografik së bashku me një ose më shumë kampionime të njohura, me qasje që sjellja relative e substancave të panjohura dhe atyre të njohura që do të ndihmojë në identifikimin e të panjohurës;

11. “studim i përbashkët” nënkupton analizimin e të njëjtit kampion/e me të njëjtën metodë, me qëllim përcaktimin e karakteristikave të performancës së metodës në laboratorë të ndryshëm. Studimi mundëson llogaritjen e gabimit të rastësishëm të matjes dhe shmangiet laboratorike për metodën e përdorur;

12. “metodë konfirmatore” nënkupton një metodë që ofron informacion të plotë ose plotësues, i cili mundëson identifikimin e qartë të substancës dhe nëse është e nevojshme, përcaktimin sasiore në një nga mënyrat e mëposhtme:

a) në nivelin maksimal të mbetjes ose nivelin maksimal për substancat e autorizuar;

b) në pikën e referimit për veprim (RPA) për substancat e ndaluara ose të pa autorizuar, për të cilat është vendosur një pikë referimi për veprim;

c) në një përqendrim sa më poshtë të jetë e mundur për substancën e ndaluar ose të pa autorizuar, për të cilën nuk është vendosur asnjë pikë referimi për veprim;

13. “faktor mbulimi (k)” nënkupton një numër që shpreh nivelin e besueshmërisë dhe që shoqërohet me pasigurinë e zgjeruar të matjes;

14. kufiri i vendimit për konfirmim ($CC\alpha$)” nënkupton kufirin në dhe mbi të cilin mund të vlerësohet me një probabilitet gabimi α që një kampion është jokonform dhe vlera $1-\alpha$ do të thotë siguri statistikore në përqindje që kufiri i lejuar është tejkaluar;

15. “aftësia e dedektimit për *screening* ($CC\beta$)” nënkupton sasinë më të vogël të analitit, që mund të dedektohet ose vlerësohet në një kampion me një probabilitet gabimi β ;

a) në rastin e substancave farmakologjike aktive të ndaluara ose të pa autorizuar, $CC\beta$ është përqendrimi më i ulët, në të cilin një metodë është në gjendje të dedektojë ose të përcaktojë sasinë, me një siguri statistikore prej $1-\beta$, mostrat që përmbajnë mbetje të substancave të ndaluara ose të paautorizuara;

b) në rastin e substancave të autorizuar, $CC\beta$ është përqendrimi në të cilin metoda është në gjendje të dedektojë përqendrime nën kufirin e lejuar me një siguri statistikore prej $1-\beta$;

16. “material mostër i fortifikuar” do të thotë një mostër e fortifikuar (ndotur) me një sasi të njohur të analitit që do të dedektohet ose matet;

17. “studim ndërlaboratorik” nënkupton organizimin, vlerësimin e performancës dhe rezultateve të testeve në të njëjtin kampion/e nga dy ose më shumë laboratorë në përputhje me kushtet e paracaktuara për të vlerësuar performancën e testimit, qoftë si një studim i përbashkët ose si një test zotësie;

18. “standardi i brendshëm (IS)” nënkupton një substancë që nuk gjendet në kampion dhe që ka veti fiziko-kimike sa më të ngjashme me ato të analitit që do të identifikohet ose kuantifikohet;

19. “niveli i interesit” do të thotë përqendrimi i një substance ose analiti në një kampion që është i rëndësishëm për të përcaktuar përputhshmërinë e tij me legjislacionin në lidhje, me:

a) niveli maksimal i mbetjes ose niveli maksimal për substancat e autorizuar në përputhje me udhëzimin nr. 12, datë 13.7.2022 “Mbi përcaktimin e niveleve maksimale të pranishme të koksidiostatikëve dhe histomonostatikëve në qumësht, mëlçi, veshka, si dhe ushqime të tjera” dhe urdhrin nr. 139/1, datë 7.4.2017, “Për substancat aktive farmakologjike dhe klasifikimin e tyre në lidhje me kufijtë maksimalë të mbetjeve në produktet ushqimore me origjinë shtazore”, i ndryshuar;

b) pikat e referencës për veprim për substancat e ndaluara ose të paautorizuara, për të cilat është vendosur një pikë referimi për veprim në përputhje me urdhrin nr. 134, datë 10.3.2023 “Për miratimin e rregullores “Mbi pikat e referencës për veprim për substancat farmakologjike aktive të palejuara të pranishme në ushqimet me origjinë shtazore”;

c) një përqendrim aq i ulët sa mund të arrihet analitikisht për substancën e ndaluar ose të paautorizuar, për të cilën nuk është vendosur asnjë pikë referimi për veprim;

20. “niveli më i ulët i kalibrimit” (LCL) nënkupton përqendrimin më të ulët të lakores së kalibrimit. ‘matrice’ nënkupton materialin nga i cili është marrë një kampion;

21. “matricë” nënkupton materialin nga i cili është marrë një kampion;

22. “efekti i matricës” nënkupton ndryshimin në përgjigjen analitike midis një standardi të tretur në tretës dhe një standardi të tretur në matricë pas procesit analitik me ose pa korrektim të një standardi të brendshëm;

23. “mostër e fortifikuar (ndotur) në fund të procesit analitik” nënkupton një mostër blank (d.m.th. pa prani të analitëve), së cilës i shtohet analit në një seri përqendrimesh pas procesit analitik të mostrës;

24. “mostër e fortifikuar (ndotur) në fillim të procesit analitik” nënkupton një mostër blank (d.m.th. pa prani të analitëve), të cilës në fillim të procesit analitik, ndotet me analitin në një seri përqendrimesh;

25. “*measurand*” nënkupton sasinë që i nënshtrohet matjes;

26. “pasiguria e matjes” është një parametër jonegativ i lidhur me rezultatin e matjes, i cili karakterizon shpërndarjen e vlerave që mund t’i atribuohen në mënyrë të arsyeshme sasisë që i nënshtrohet matjes, bazuar në informacionin e përdorur;

27. “kriteret e performancës” janë kërkesat të performancës sipas të cilave mund të gjykohej se metoda analitike është e përshtatshme për përdorimin e kërkuar dhe gjeneron rezultate të besueshme;

28. “përpikmëria” nënkupton afërsinë midis rezultateve të testit të pavarur të marra në kushte të përcaktuara dhe shprehet si shmangia standarde ose si koeficienti i variacionit të rezultateve të testit;

29. “metodë cilësore” është një metodë analitike, e cila zbulon ose identifikon një substancë ose një grup substancash në bazë të vetive të saj kimike, biologjike ose fizike;

30. “metodë sasiore” nënkupton një metodë analitike, e cila përcakton sasinë të një substance në mënyrë që ajo të mund të shprehet si një vlerë numerike e njësive të përshtatshme;

31. “rifitim” nënkupton raportin e sasisë e korrigtuar të analitit të pjesëtuar me sasinë e analitit të fortifikuar (ndotur) në mostër, e shprehur në përqindje;

32. “korrektimi i rifitimit” nënkupton përdorimin e standardeve të brendshme, përdorimin e një lakore kalibrimi në matricë, si dhe përdorimin e një faktori korrigjimi të rifitimit dhe gjithashtu kombinimin e këtyre qasjeve;

33. “material reference” është një material mjaftueshëm homogjen dhe i qëndrueshëm në lidhje me një ose më shumë veti të specifikuar, i cili është vërtetuar se është i përshtatshëm për përdorimin e caktuar në një proces matjeje ose në ekzaminimin e materialit nominal²;

34. “efekti relativ i matricës” nënkupton ndryshimet në përgjigjet analitike midis një standardi të tretur në tretës dhe atij të tretur në mostër të fortifikuar (ndotur) në fund të procesit analitik i korrigtuar me standard të brendshëm;

35. “përsëritshmëria” nënkupton përpikërinë në kushtet, ku rezultatet e pavarura të testit merren me të njëjtën metodë, në të njëjtat matrica, në të njëjtin laborator, nga i njëjti operator duke përdorur të njëjtat pajisje brenda intervaleve të shkurtra kohore;

36. “riprodhueshmëria” është saktësia në kushte në të cilat rezultatet e testeve përfitohen me të njëjtën metodë, në të njëjtën matricë, në laboratorë të ndryshëm, me operatorë të ndryshëm, që përdorin aparatura të ndryshme;

37. “qëndrueshmëria” nënkupton ndjeshmërinë e një metode analitike ndaj ndryshimeve të kushteve të eksperimentit në të cilat metoda mund të aplikohet siç është ose me modifikime të vogla të specifikuar;

38. “metodë *screening*” nënkupton një metodë që përdoret për ekzaminimin e një substance ose klase substancash në nivelin e dëshiruar;

39. “përqendrimi target i *Screening*” (STC) nënkupton përqendrimi më i ulët ose i barabartë me CCβ në të cilin një matje *screening* e kategorizon kampionin si “*Screen Positive*” pra potencialisht jokonform dhe të orientojnë drejt kryerjes së një testimi konfirmues;

40. “selektivitet” do të thotë aftësia e një metode për të dalluar analitin që matet me substancat e tjera;

41. “studim i vetëm laboratorik” ose “validim i brendshëm” nënkupton një studim analitik që përfshin një laborator të vetëm duke përdorur një metodë për të analizuar materiale të njëjta ose të ndryshme në kushte të ndryshme, në intervale të gjata kohore të justifikuara;

42. “shëtesa e standardeve” nënkupton një procedurë në të cilën një pjesë e kampionit analizohet ashtu siç është dhe sasi të njohura të standardit analitik i shtohen kampionit përpara analizës;

43. “standard analitik” nënkupton një analit me përmbajtje dhe pastërti të njohur dhe të certifikuar që do të përdoret si referencë në analizë;

44. “substancë” nënkupton lëndën me përbërje konstante e karakterizuar nga entitetet që e përbëjnë atë dhe nga vetitë fizike të caktuara;

45. “mostër laboratorik” nënkupton sasinë e materialit të nxjerrë nga kampioni mbi të cilin kryhet testi ose vëzhgimi;

² Komisioni Codex Alimentarius, Organizata për Ushqim dhe Bujqësi e Kombeve të Bashkuara/Organizata Botërore e Shëndetësisë, udhëzues për terminologjinë analitike (CAC/GL 72-2009).

46. “vërtetësi” nënkupton afërsinë e rezultateve ndërmjet vlerës mesatare të marrë nga një seri e madhe rezultatesh testimi dhe një vlere referimi të pranuar;

47. “njësi” nënkupton ato njësi të përshkruara në ISO 80000-1:2022 dhe sipas legjislacionit në fuqi për sa u përket njësive të matjes;

48. “validim” nënkupton demonstrimin me anë të testimit dhe sigurimin e provave efektive që kërkesat e veçanta të një përdorimi specifik të kërkuar janë përmbushur, nëpërmjet një studimi të vetëm laboratorik ose një studimi i përbashkët;

49. “riprodhueshmëria brenda laboratorit” ose “përpikëria në kushtet e riprodhueshmërisë” nënkupton përpikërinë e matjeve në një laborator në kushtet e këtij.

Neni 3

Metodat e analizës

(Ndryshuar pika 4 me urdhër nr. 347, datë 2.4.2026)

ISUV siguron që mostrat e marra në përputhje me Planin Kombëtar të Kontrollit të mbetjeve të analizohen duke përdorur metoda që përputhen me kërkesat e mëposhtme:

1. Të jenë të dokumentuara në udhëzimet e provës, mundësisht sipas shtojcave të ISO 78-2:1999 Kimi-Layouts për standardet – Pjesa 2: Metodat e analizës kimike³.

2. Ato janë në përputhje me kriteret e performancës dhe kërkesat e tjera për metodat analitike të përcaktuara në kapitullin 1 të aneksit I të këtij urdhri;

3. Ato janë vërtetuar në përputhje me kërkesat e përcaktuara në kapitujt 2 dhe 4 të aneksit I të këtij urdhri;

4. Ato lejojnë zbatimin e pikave të referencës për veprim të përcaktuara në urdhrin nr. 134, datë 10.3.2023, “Për miratimin e rregullores ‘Mbi pikat e referencës për veprim për substancat farmakologjikisht aktive të palejuara të pranishme në ushqimet me origjinë shtazore’”, zbulimin e pranisë së substancave të ndaluara dhe të paautorizuara dhe zbatimin e niveleve maksimale të përcaktuara nga legjislacioni në fuqi, dhe në udhëzimin nr. 12, datë 13.7.2022, “Mbi përcaktimin e niveleve maksimale të pranisë së koksidiostatikëve dhe histomonostatikëve në qumësht, mëlçi, veshka, si dhe ushqime të tjera”, si dhe limiteve maksimale (MRL) të përcaktuara në urdhrin nr. 991, datë 13.10.2025, “Mbi substancat farmakologjikisht aktive dhe klasifikimin e tyre, në lidhje me kufijtë maksimalë të mbetjeve në produktet ushqimore me origjinë shtazore”.

Në rastet kur gjatë validimit vërehen mospërputhje me kërkesat e tabelave 1 dhe 2 bashkëlidhur kësaj rregulloreje, ndikimi i këtyre mospërputhjeve mbi rezultatin e validimit analizohet në mënyrë të dokumentuar dhe bëhet i gjurmueshëm.

Neni 4

Interpretimi i rezultateve

1. Rezultati i një analize do të konsiderohet i papajtueshëm kur është i barabartë me kufirin limit për konfirmim ($CC\alpha$).

2. Për substancat e autorizuara për të cilat ka qene e vendosur një MRL ose ML, kufiri i vendimit për konfirmim ($CC\alpha$) do të jetë përqendrimi në dhe mbi të cilin mund të vendoset me një siguri statistikore të vlerës numerike $1 - \alpha$ që kufiri i lejuar është tejkaluar.

3. Për substancat e paautorizuara ose të ndaluara ose për substancat e autorizuara për të cilat nuk është përcaktuar MRL ose ML në një specie ose produkt specifik, kufiri i vendimit për konfirmim ($CC\alpha$) do të jetë niveli më i ulët i përqendrimit në të cilin mund të vendoset me një siguri statistikore të vlera numerike $1 - \alpha$ që është i pranishëm analiti i posaçëm.

4. Për substancat farmakologjikisht aktive të paautorizuara ose të ndaluara, gabimi α duhet të jetë 1% ose më i ulët. Për të gjitha substancat e tjera, gabimi α duhet të jetë 5% ose më i ulët.

Neni 5

³ ISO 80000-1:2009 Sasitë dhe njësitë – Pjesa 1: Të përgjithshme (Hyrje).

Metoda për marrjen e mostrave

AKVMB-ja siguron që mostrat të merren, trajtohen dhe etiketohen në përputhje me metodat e detajuara për marrjen e mostrave të përcaktuara në aneksin II të këtij urdhri.

ANEKSI I

KAPITULLI 1

KRITERET E PERFORMANCËS DHE KËRKESA TË TJERA PËR METODAT ANALITIKE

1.1 Kërkesat e metodave *screening*

1.1.1 Kategoritë e metodave të përshtatshme *screening*

Metodat cilësore, gjysmë sasiore ose sasiore do të përdoren si metoda të përshtatshme *screening*.

1.1.2 Kërkesat për analizimin biologjik, biokimik ose fiziko-kimike me metoda *screening*

Për substancat e ndaluara ose të paautorizuara, CC β , duhet të jetë aq i ulët sa të arrihet në mënyrë të arsyeshme dhe në çdo rast më i ulët se pika e referencës së veprimit (RPA) për substancat, për të cilat RPA janë krijuar sipas urdhrit nr. 134, datë 10.3.2023 Për miratimin e rregullores “Mbi pikat e referencës për veprim për substancat farmakologjikisht aktive të palejuara të pranishme në ushqimet me origjinë shtazore”.

Për substancat e autorizuara farmakologjikisht aktive, CC β duhet të jetë më e ulët se MRL ose ML.

Vetëm ato metoda analitike, për të cilat mund të demonstrohet në një mënyrë të dokumentuar dhe të validuara dhe kanë gabimin në matje të përputhshmërisë më të ulët ose të barabartë me 5% (gabim β), do të përdoren për qëllime ekzaminimi. Në rastin e një rezultati të dyshuar që nuk përputhet, ai rezultat do të konfirmohet me një metodë konfirmuese.

Metodat sasiore *screening*, të përdorura për të dyja *screening* dhe konfirmatore duhet të plotësojnë të njëjtat kërkesa për saktësinë, diapazonin dhe saktësinë siç përshkruhet në 1.2.2.1 dhe 1.2.2.2.

1.2 Kërkesat e metodave konfirmuese

1.2.1 Kërkesat e përgjithshme për metodat konfirmuese

Për substancat e ndaluara ose të paautorizuara, CC α duhet të jetë aq i ulët sa është e arsyeshme të arrihet. Për substancat e ndaluara ose të paautorizuara, për të cilat është përcaktuar një vlerë e referencës për ndërhyrje (RPA), sipas urdhrit nr. 134, datë 10.3.2023, “Për miratimin e rregullores ‘Mbi pikat e referencës për veprim për substancat farmakologjikisht aktive të palejuara të pranishme në ushqimet me origjinë shtazore’”, CC α është më e ulët ose e barabartë me vlerën e referencës për veprim.

Për substancat e autorizuara, CC α duhet të jetë më e madhe ose sa me afër që të jetë e mundshme me MRL-në ose ML-në.

Për qëllime konfirmimi përdoren vetëm metodat analitike për të cilat mund të demonstrohet në mënyrë të dokumentuar se ato janë të validuara dhe të gjurmueshme, dhe kanë një nivel fals të papërputhshmërisë (gabim α), që është më i vogël ose i barabartë me 1% për substancat e ndaluara dhe të paautorizuara, ose që është më i vogël ose i barabartë me 5% për substancat e autorizuara.

Metodat konfirmuese duhet të japin informacione mbi përbërjen kimike dhe strukturën e analitit. Rrjedhimisht, metodat konfirmuese të bazuara vetëm në analiza kromatografike pa përdorimin të detektimit nëpërmjet spektrometrisë së masës, nuk janë të përshtatshme për t’u përdorur si metoda konfirmuese për substancat farmakologjikisht aktive të ndaluara ose të paautorizuara. Në rastin kur spektrometria e masës nuk është e përshtatshme për substanca të autorizuara, mund të përdoren metoda të tjera si HPLC-DAD dhe HPLC -FLD, ose një kombinim i tyre.

Kur kërkohet, sipas metodës së konfirmimit, në fillim të procedurës së ekstraktimit, sasisë që analizohet i shtohet një standard i brendshëm i përshtatshëm. Në varësi të disponueshmërisë,

përdoren forma të stabilizuara të analitit të markuar me izotope, të cilat janë të përshkruara veçanërisht për detektimin me psikometrinë e masës, ose përbërje analoge ngushtësisht të bashkëlidhura në mënyrë strukturale me analitin.

1.2.1(a) Përdorimi specifik i Ko-kromatografisë, kur nuk janë të disponueshëm standarde të brendshme.

Kur nuk është e mundur të përdoren standarde të brendshme të përshtatshme, caktimi i analitit, në mënyrë të preferueshme, përcaktohet nga Ko-kromatografia. Në këtë rast përfitohet vetëm një pikë më e lartë dhe pika (ose zona) më lartë e zmadhuar është e barasvlershme me sasinë e analitit të shtuar. Nëse kjo nuk është e mundur, duhet të përdoren standarde me matricë të kombinuar ose një matricë e përforcuar.

1.2.2 Kriteret e përgjithshme të performancës për metodat konfirmuese

1.2.2.1 Vërtetësia nga rifitimi

Për analizat e përsëritura të një materiali referues të certifikuar, devijimi i përcaktimit eksperimental rifiton korrektimin mesatar të pjesës së masës nga vlera e certifikuar, duhet të përputhet me kufijtë minimalë të vërtetësisë të listuara në tabelën 1.

Tabela 1. Minimumi i saktësisë (vërtetësisë) e metodës sasiore

Fraksioni i masës	Kufijtë
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	-50% deri +20%
$> 1 \mu\text{g/kg}$ deri në $10 \mu\text{g/kg}$	-30% deri +20%
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	-20% deri +20%

Kur nuk ka materiale referencë të certifikuar, është e pranueshme që vërtetësia e matjeve të vlerësohet në mënyra të tjera, të tilla si përdorimi i materialeve me vlera të caktuara nga studimet ndërlaboratorike ose nëpërmjet shtimit të sasive të njohura të analitit/eve në një matricë të pastër.

1.2.2.2 Saktësia

Koeficienti variancë (CV) për analizën e përsëritur të një materiali reference ose të fortifikuar, në kushte të riprodhueshmërisë brenda laboratorit, nuk duhet të kalojë nivelin e llogaritur nga ekuacioni i Horwitz-it. Ekuacioni është:

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

ku C: është fraksioni i masës i shprehur si fuqi (eksponent) prej 10 (p.sh. $1 \text{ mg/g} = 10^{-3}$). Për fraksionet e masës nën $120 \mu\text{g/kg}$ aplikimi i ekuacionit të Horwitz-it jep vlera të papranueshme të larta. Prandaj, koeficienti maksimal i lejuar i variancës nuk duhet të jetë më i madh se vlerat e paraqitura në tabelën 2.

Tabela 2. Koeficienti i pranueshëm i variacionit

Fraksioni i masës	CV e riprodhueshmërisë (%)
$> 1000 \mu\text{g/kg}$	16 (përshtatur nga ekuacioni Horwitz)
$> 120 \mu\text{g/kg} - 1000 \mu\text{g/kg}$	22 (përshtatur nga ekuacioni Horwitz)
$10 - 120 \mu\text{g/kg}$	25 *
$< 10 \mu\text{g/kg}$	30 *

* CV (%) e paraqitur është një udhëzues dhe duhet të jetë sa më i ulët të jetë e mundur.

Për analizat e kryera në kushtet e përsëritshmërisë, koeficienti i variancës në kushtet e përsëritshmërisë është përgjithësisht më i vogël se dy të tretat e vlerave të listuara në tabelën 2 dhe duhet të jetë e barabartë ose me i vogël se koeficienti i variancës në kushtet e përsëritshmërisë.

1.2.3 Kërkesat për ndarjen kromatografike

1.2.3.1 Koha e retencionit minimal të pranueshëm (koha e mbajtjes)

Për kromatografinë e lëngët (LC) ose gaz-kromatografinë (GC), koha minimale e pranueshme e retencionit për analitin/tet, që i nënshtrohen analizës, është e barabarte me dyfishin e kohës së retencionit që korrespondon me vëllimin e zbrazët të kolonës.

1.2.3.2 Koha e retencionit të analitit në ekstrakt

Koha e retencionit të analitit në ekstrakt duhet të korrespondojë me atë të standardit të kalibrimit, të një standardi me matricë të përshtatur, ose të një standardi me matricë të fortifikuar me një tolerancë prej $\pm 0,1$ minuta. Për kromatografinë e shpejtë, me një kohë të retencionit më të vogël se 2 minuta, është i pranueshëm një devijim prej më pak se 5% të kohës së retencionit.

1.2.3.3 Koha e retencionit në rastin e përdorimit të një standardi të brendshëm.

Në rast se përdoret një standard i brendshëm, raporti i kohës së retencionit kromatografik të analitit me atë të standardit të brendshëm, që nënkupton kohën relative të retencionit të analitit, duhet të korrespondojë me atë të standardit të kalibrimit, të standardit me matricë të përshtatur, ose të standardit me matricë të përforcuar, me një devijim maksimal prej 0,5% për gaz-kromatografinë dhe 1% për kromatografinë e lëngët, për metodat e validuara nga dita e hyrjes në fuqi të këtij urdhri.

1.2.4 Kriteret specifike të performancës për spektrometrinë e masës

1.2.4.1 Dedektimi me spektrometrinë e masës

Dedektimi me spektrometrinë e masës do të kryhet duke përdorur disa nga opsionet e mëposhtme:

1. regjistrimi i skanimit të plotë (FS) të spektrave të masës;
2. monitorimi i joneve të zgjedhur (SIM);
3. teknikat e spektrometrisë së masës së shumëfishtë (MS^n) të tilla si Monitorimi i Reaksionit të Përzgjedhur (SRM);
4. një kombinim i teknikave të spektrometrisë së masës (MS) ose spektrometrisë së masës së shumëfishtë (MS^n) me mënyrat e duhura të jonizimit.

Të dyja spektrometrinë e masës ajo me rezolucion të ulët (LRMS, në njësinë e rezolucionit të masës) dhe ajo me rezolucion të lartë (HRMS), duke përfshirë p.sh. sektorët e fokusimit të dyfishtë, instrumentët Time of Flight (TOF) dhe Orbitrap janë të përshtatshme.

Për konfirmimin e identitetit të një analiti në spektrometrinë e masës me rezolucion të lartë (HRMS), devijimi në masë i të gjithë joneve identifikuese duhet të jetë nën 5 ppm (ose në rastin e $m/z < 200$ nën 1 mDa). Mbi bazën e kësaj, rezolucioni efektiv duhet të zgjidhet i përshtatshëm për qëllimin e kërkuar dhe zakonisht duhet të jetë më i madh se 10 000 për të gjithë diapazonin e masës në 10% të luginës ose 20 000 në gjerësinë e plotë në gjysmën e maksimumit (FWHM).

Kur përcaktimi i spektrometrisë së masës kryhet me regjistrimin e spektrit të plotë të skanimit (si LRMS ashtu edhe HRMS), vetëm jonet identifikuese me një intensitet relativ më shumë se 10% në spektrin e referencës së standardit të kalibrimit, mostrës së fortifikuar në fillim të procesit analitik ose mostrës së fortifikuar në fund të procesit analitik janë të përshtatshme. Jonet identifikuese do të përfshijnë jonin molekular (nëse është i pranishëm me intensitet $\geq 10\%$ të pikut bazë) dhe fragmentin karakteristik ose jonet e produktit.

Përzgjedhja e jonit prekursor: kur përcaktimi i spektrometrisë së masës kryhet me fragmentim pas përzgjedhjes së jonit prekursor, kjo kryhet në njësinë e matjes së rezolucionit ose më lart. Joni prekursor i përzgjedhur do të jetë joni molekular, joni bijë i jonit molekular, produkt joni karakteristik ose një nga jonet izotop të tyre. Në rast se përzgjedhja e prekursorit ka një dritare përzgjedhjeje prej më shumë se një Dalton (p.sh. në rastin e Data Independent Acquisition), teknika konsiderohet si analizë konfirmatore me skanim të plotë.

Jonet produkt dhe fragment: Joni produkt ose fragment i zgjedhur do të jenë fragmente identifikues për analitin/produktin e analizuar. Tranzicionet joselektive (p.sh. kationi i tropilit ose humbja e ujit) duhet të hiqen sa herë që është e mundur. Intensiteti i joneve identifikuese do të përcaktohet nga sipërfaqja e pikut ose lartësia e joneve të marra nga kromatograma. Kjo është gjithashtu e zbatueshme kur për identifikim përdoren matjet me skanim të plotë. Raporti sinjal-zhurmë (S/N) i të gjithë joneve identifikuese duhet të jetë më i madh ose i barabartë se tre me një (3:1).

Intensitetet relative: intensiteti relativ i joneve identifikuese (*ion ratio*) shprehet si përqindje e intensitetit të jonit ose tranzicionit më intensiv. Ion Ratio duhet të përcaktohet duke krahasuar spektrat ose duke integruar sinjalet joneve të nxjerra. Raporti i joneve të analizit që do të konfirmohet duhet të korrespondojë me ato të standardeve të mostrave të ndotura në fund të procesit analitik, standardeve në mostrat e ndotura në fillim të procesit analitik ose tretësirave standarde në përqendrimet të krahasueshme, të matura në të njëjtat kushte, brenda shmangies relative $\pm 40\%$.

Për të gjitha analizat e spektrometrisë së masës, duhet të përcaktohet të paktën një raport jonesh. Preferohet që këto janë jone të marra brenda një skanimit të vetëm, por jonet mund të vijnë edhe nga skanime të ndryshme në të njëjtin injektim (d.m.th. skanimi i plotë dhe skanimi i fragmentimit).

1.2.4.2 Identifikimi

Një sistem pikash identifikimi do të përdoret për të zgjedhur mënyrat e duhura të analizimit dhe kriteret e vlerësimit. Për konfirmimin e identitetit të substancave në një matricë për të cilën është vendosur një MRL (përdorim i autorizuar), kërkohet një minimum prej 4 pikash identifikimi. Për substancat e paautorizuara ose të ndaluara kërkohen 5 pika identifikimi. Një pikë identifikimi gjenerohet nga ndarja kromatografike. Tabela 3 tregon numrin e pikave të identifikimit që jep secila nga teknikat. Për të përcaktuar pikat e tjera të identifikimit që duhen për konfirmim, mund të shtohen pikë identifikimi të marra nga teknika të ndryshme.

1. Të gjitha analizat e matjes me spektrometrinë e masës duhet të kombinohen me një teknikë ndarjeje që tregon fuqi të mjaftueshme ndarëse dhe selektivitet për aplikimin specifik. Teknikat e përshtatshme të ndarjes janë ndër të tjera kromatografia e lëngët dhe e gaztë, elektroforeza kapilare (CE) dhe kromatografia me lëng superkritik (SFC). Në rastin e analizit që paraqet ndonjë komponim izobar ose izomer, dhe kriteret e kohës së mbajtjes (d.m.th. $\pm 0,5\%$ në GC dhe $\pm 1\%$ në LC dhe SFC) janë të detyrueshme për të konfirmuar identitetin e tij.

2. Një maksimum prej tri teknikash ndarjesh mund të kombinohen për të arritur numrin minimal të pikave të identifikimit.

3. Mënyra të ndryshme jonizimi (p.sh. jonizimi elektronik dhe jonizimi kimik) konsiderohen si teknika të ndryshme.

Tabela 3. Identifikimi i pikave për teknikën

Teknika	Identifikimit i pikave
Ndarja (GC, LC, SFC, CE)	1
Joni LR-MS	1
Joni prekursor $<\pm 0,5$ Da diapazoni i masës	1 (indirekt)
LR-MS ⁿ produkti jon	1,5
Jon HR-MS	1,5
Produkti jon HR-MS ⁿ	2,5

Tabela 4. Shembuj të numrit të pikave të identifikimit për teknika specifike dhe kombinime teknikash
(n = një numër i plotë)

Teknika/t	Ndarja	Numri i joneve	Pikat e identifikimit
GC-MS (EI ose CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI dhe CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI ose CI) 2 derivate	GC	2 (Derivati A) + 2 (Derivati B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- ose LC-MS/MS	GC ose LC	1 pararendës + 2 produkte	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5

GC- ose LC-MS/MS	GC ose LC	2 prekursor + 2 produkte	$1 + 2 + 2 \times 1,5 = 6$
GC- ose LC-MS ³	GC ose LC	1 prekursor + 1 produkt MS ² + 1 produkt MS ³	$1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5$
GC- ose LC-HRMS	GC ose LC	n	$1 + n \times 1,5$
GC- ose LC-HRMS/MS	GC ose LC	1 prekursor ($< \pm 0,5$ diapazon të masës Da) + 1 produkt	$1 + 1 + 2,5 = 4,5$
GC- ose LC-HRMS dhe HRMS/MS	GC ose LC	1 jon skanimi i plotë + 1 jon produkt HRMS ^a	$1 + 1,5 + 2,5 = 5$
GC- dhe LC-MS	GC dhe LC	2 jone (GCMS) + 1 jon (LCMS)	$1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6$

^a Nuk merret asnjë pikë identifikimi shitesë për përzgjedhjen e joneve prekursor, nëse ky jon prekursor është i njëjti jon (ose një jon mëmë ose izotop) si joni HRMS i monitoruar në skanimin e plotë.

1.2.5 Kriteret specifike të performancës për përcaktimin e një analiti duke përdorur kromatografinë e lëngët me teknika dedektimi të ndryshme nga spektrometria e masës

Vetëm për substancat e autorizuara, teknikat e mëposhtme mund të përdoren si alternativë për metodat e bazuara në spektrometrinë e masës, me kusht që të plotësohen kriteret përkatëse për këto teknika:

1. Skanim i plotë me DAD rastin kur është i lidhur me HPLC;
2. Spektrofotometria e dedektimit me fluoreshencë (FLD) në rastin kur është e lidhur me HPLC.

Kromatografia e lëngët me dedektim UV/VIS (me një gjatësi vale të vetme) nuk është e përshtatshme për t'u përdorur si metodë konfirmatore.

1.2.5.1 Kriteret e performancës për dedektimin me DAD

Kriteret e performancës që duhet të plotësohen për ndarjen me kromatografi përfshihen në kapitullin 1.2.3. Maksimumi i absorbimit në spektrin UV të analitit duhet të jetë në të njëjtat gjatësi vale si ato të standardit në lakoren e kalibrimit në matricë brenda një kufiri maksimal, i cili përcaktohet nga rezolucioni i sistemit i dedektimit. Për dedektimin me DAD, kufijtë maksimalë zakonisht janë ± 2 nm. Diferenca midis spektrit të analitit mbi 220 nm me spektrin e analitit në lakoren e standardeve duhet të jetë, më e madhe ose e barabartë me 10. Ky kriter plotësohet kur së pari janë të njëjta maksimume të absorbancës dhe së dyti kur diferenca midis dy spektrave nuk është më e madhe se 10% e absorbancës të standardit të lakores së kalibrimit. Në rastin e përdorimit të librarisë së programeve kompjuterike, krahasimi i të dhënave spektrale në mostrat zyrtare me atë të standardit të lakores së kalibrimit në tretësirë duhet të përmbushë një faktor kritik përputhshmërie. Ky faktor do të përcaktohet gjatë procesit të validimit për çdo analit në bazë të spektrave për të cilat plotësohen kriteret e përshkruara më sipër. Duhet të kontrollohet variacioni i spektrave të shkaktuar nga mostra, si dhe performance e dedektorit.

1.2.5.2 Kriteret e performancës për spektrofotometrinë e dedektimit të fluoreshencës

Duhet të plotësohen kriteret e performancës për ndarjen kromatografike të përfshira në kapitullin 1.2.3.

Duhet bërë përzgjedhja e gjatësisë së valës së eksitimit dhe emisionit në kombinim me kushtet kromatografike në mënyrë të tillë që të minimizohen efektet e komponentëve interferues në ekstraktet e mostrës "bardhë". Duhet të ketë një minimum prej 50 nanometra ndërmjet gjatësisë së valës së eksitimit dhe emisionit.

Maksimumi i pikut më të afërt në kromatogram duhet të ndahet nga piku i analitit me të paktën një distancë prej 10% të lartësisë maksimale të pikut të analitit.

Kjo vlen për molekulat që kanë veti fluoreshente dhe për molekulat që shfaqin veti të tilla pas transformimit ose derivatizimit.

2.1 Kriteret e performancës që duhet të përcaktohen për metodat analitike

Nëpërmjet validimit të metodës do të demonstronhet që metoda analitike është në përputhje me kriteret e zbatueshme për karakteristikat përkatës të performancës. Qëllime të ndryshme kontrolli, kërkojnë kategori të ndryshme metodash. Tabela 5 përcakton se cilat nga karakteristika e performancës do të verifikohen dhe për cilën metodë. Shpjegim i mëtejshëm i secilit parametër jepet në këtë kapitull.

Tabela 5. Klasifikimi i metodave analitike sipas kriterëve të performancës që duhet të përcaktohen

Metoda	Konfirmatore		Screening		
	Cilësor e	Sasior e	Cilësor e	Gjysmësasiore⁽¹⁾)	Sasior e
Substancat	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identifikimi në përputhje me pikën 1.2	x	x			
CC α	x	x			
CC β	-		x	x	x
Vërtetësi		x			x
Përpikëria		x		(x)	x
Efekti relativ i matricës/rifitimi absolut ^(*)		x			x
Selektiviteti/specificiteti		x	x	x	x
Stabiliteti ⁽²⁾		x	x	x	x
Qëndrueshmëria		x	x	x	x

⁽¹⁾ Një metode *Screening* gjysmësasiore është një metode *Screening*, që jep rezultate sasiore, porse nuk plotëson kërkesat e përpikërisë sipas përshkrimeve në aneksit I, tabela 2 të kësaj rregulloreje.

^(*) Për metodat MS, plotësimi i kërkesave, që u përkasin karakteristikave të rendimentit duhet të plotësohen nëpërmjet provave të validimit. Efekti relativ i matricës së metodës duhet të përcaktohet nëse ky efekt nuk është vlerësuar gjatë procedurës së validimit. Rifitimi absolut i metodës duhet të përcaktohet, kur nuk përdoret standard i brendshëm ose lakore kalibrimi në mostër të fortifikuar.

⁽²⁾ Nëse të dhënat e stabilitetit për analitet në një matricë janë të disponueshme në literaturën shkencore ose në të dhënat e një laborator tjetër, nuk është e nevojshme që këto të dhëna të përcaktohen përsëri nga laborator. Referimi në të dhënat e disponueshme mbi stabilitetin e analiteve në tretësirë është e pranueshme, vetëm nëse zbatohen kushte identike.

x: Kërkohej të vërtetohet me anë të validimit, se janë përmbushur kërkesat për kriteret e performancës.

x) Nuk është e nevojshme që të respektohen të gjitha kërkesat përpikërisë të përshkruara në pikën 1.2.2.2 për metodat e *Screening* gjysmësasiore. Përpikëria duhet të përcaktohet për të demonstruar përshtatshmërinë e metodës, me qëllim që të parandalohen rezultate analitike false konforme.

A: substanca të ndaluara ose të paautorizuara.

B: substanca të autorizuar.

2.2 Vërtetësia, përsëritshmëria dhe riprodhueshmëria brenda laboratorit

Ky kapitull ofron shembuj dhe referenca për procedurat e validimit. Mund të përdoren qasje të tjera për të demonstruar se metoda përputhet me kriteret e performancës, me kusht që ato të arrijnë të njëjtin nivel dhe cilësi informacioni.

2.2.1 Validimi konvencional

Llogaritja e parametrave në bazë të metodave konvencionale kërkon kryerjen e shumë eksperimenteve individuale (shiko tabelën 5 të këtij aneksi). Për kryerjen e ndryshimeve të rëndësishme është e nevojshme të verifikohet ruajtja e validitetit të karakteristikave të performancës. Për metodat që përdoren ndaj një analiti të shumëfishtë është e mundur të analizohen njëkohësisht shumë analite, me kusht që të jenë përjashtuar më parë mundësitë e interferencave përkatëse. Në këtë mënyrë është e mundur të përcaktohen shumë karakteristika të performancës.

Për këtë, më qëllim uljen e ngarkesës së punës është e këshillueshme, për sa është e mundur, të kombinohen eksperimentet (të tilla si: përsëritshmëria dhe riprodhueshmëria ndërlaboratorike me specificitetin, analizat e kampioneve të bardha për të përcaktuar kufirin e vendimmarrjes së konfirmimit dhe të provës së specificitetit).

2.2.1.1 Vërtetësia në bazë të materialit të referencës së certifikuar

Preferohet të përcaktohet vërtetësia e një metode analitike me anë të një materiali reference të certifikuar (CRM). Procedura për këtë është përshkruar në ISO 5725-4:1994 (2).

Një shembull është dhënë më poshtë:

1. Analizohen 6 replikata të CRM në përputhje me udhëzimet e metodës;
2. Përcaktohet përqendrimi i analitit të pranishëm në çdo replikatë të mostrës;
3. Llogaritet mesatarja, shmangia standarde dhe koeficienti i variacionit (%) për këto gjashtë replikate;
4. Llogaritet vërtetësia duke pjesëtuar përqendrimin mesatar të matur me vlerën e certifikuar (e shprehur si përqendrim) dhe shumëzohet me 100, për të shprehur rezultatin në përqindje.

$$\text{Vërtetësia (\%)} = (\text{përqendrimi mesatar i matur i korrigjuar për rifitim}) \times 100 / \text{vlerën e certifikuar}$$

2.2.1.2 Vërtetësia në bazë të mostrave të fortifikuara

Nëse nuk disponohet asnjë material reference i certifikuar, vërtetësia e metodës minimalisht duhet të përcaktohet me anë të eksperimenteve duke përdorur një matricë të bardhë të fortifikuar, në përputhje me skemën e mëposhtme:

1. Për metodat e validuara, duke filluar nga data e hyrjes në fuqi të këtij urdhri, përzgjidhet material i bardhë dhe fortifikohet në përqendrime prej:

- a) 0,5⁴, 1,0 dhe 1,5 herë RPA; ose
- b) 0,1⁵, 1,0 dhe 1,5 herë MRL ose ML për substancat e autorizuara; ose
- c) 1,0, 2,0 dhe 3,0 herë LCL për substancat e paautorizuara (për të cilat nuk ka RPA).

2. Në çdo nivel, analiza do të kryhet me gjashtë replikate.
3. Analizohen mostrat.
4. Llogaritet përqendrimi i matur në çdo mostër.
5. Llogaritet vërtetësia për çdo mostër duke përdorur ekuacionin e mëposhtëm dhe më pas llogaritet vërtetësia mesatare dhe koeficientin e variancës për gjashtë rezultatet në çdo nivel përqendrimi.

$$\text{Vërtetësia (\%)} = (\text{përqendrimi mesatar i matur i korrigjuar për rifitim}) \times 100 / \text{niveli i fortifikimit}$$

⁴ Nëse për një substancë farmakologjike aktive të palejuar, vlera e një përqendrimi është barabartë me 0.5 herë vlerën RPA, për arsye që në mënyrë të arsyeshme nuk është mundur të realizohet, përqendrimi 0.5 herë vlerën e RPA mund të zëvendësohet me përqendrimin më të ulët, të arritshëm në mënyrë të arsyeshme, në mes 0,5 dhe 1.0 herë vlerën e RPA-së ose nga niveli i minimal i kalibrit, nëse është më i vogël se 0.5 herë vlerën e RPA-së.

⁵ Nëse për një substancë farmakologjike aktive, validimi i një përqendrimi është barabartë me 0.1 herë vlerën MRL, për arsye që në mënyrë të arsyeshme nuk është mundur të realizohet përqendrimi 0.1 herë vlerën e MRL-së mund të zëvendësohet me përqendrimin më të ulët, të arritshëm në mënyrë të arsyeshme, në mes 0,1 dhe 1.5 herë vlerën e MRL-së.

Për metodat për substancat e autorizuar të validuara, mjafton përcaktimi i vërtetësisë së metodës duke përdorur 6 replikate të fortifikuara në 0,5, 1,0 dhe 1,5 herë MRL ose ML.

2.2.1.3 Përsëritshmëria

1. Për metodat e validuara, duke filluar nga data e hyrjes në fuqi të këtij urdhri, përgatitet një grupmostrash të matricave identike të bardha të së njëjtës specie, që fortifikohen me analitin për të përfutur përqendrime të barasvlershme, me:

a) 0,5⁶, 1,0 dhe 1,5 herë RPA; ose

b) 0,1⁷, 1,0 dhe 1,5 herë MRL ose ML për substancat e autorizuar; ose

c) 1,0, 2,0 dhe 3,0 herë LCL për substancat e paautorizuara, ose të ndaluara, në rast se nuk aplikohet RPA.

2. Në çdo nivel, analiza do të kryhet me të paktën gjashtë replikate.

3. Analizohen mostrat.

4. Llogaritet përqendrimi i matur në çdo mostër.

5. Llogaritet përqendrimi mesatar, shmangia standarde dhe koeficienti i variancës (%) të mostrave të fortifikuara.

6. Përsëriten këta hapa në të paktën dy raste të tjera, për të paktën 18 përsëritës (dublime) për çdo nivel.

7. Llogaritet përqendrimi mesatar, shmangia standarde dhe koeficientët e variancës për mostrat e fortifikuara.

Për substancat e autorizuar, metodat e validuara, mjafton përcaktimi i përsëritshmërisë me matrica të fortifikuara në përqendrime në 0,5, 1,0 dhe 1,5 herë MRL ose ML.

Përndryshe, llogaritja për përsëritshmërinë mund të kryhet sipas ISO 5725-2:2019⁸.

2.2.1.4 Riprodhueshmëria brenda laboratorit

1. Për validimet e kryera, përgatitet një grup mostrash të materialit të specifikuar për testim (matrica identike ose të ndryshme), të fortifikuara me analitin/ët për të dhënë përqendrime ekuivalente me:

a) 0,5⁹, 1,0 dhe 1,5 herë RPA; ose

b) 0,1¹⁰, 1,0 dhe 1,5 herë MRL ose ML për substancat e autorizuar; ose

c) 1,0, 2,0 dhe 3,0 herë LCL për substancat e paautorizuara ose të ndaluara në rast se nuk aplikohet RPA.

2. Kryhen analizat e të paktën 6 replikateve të mostrave të bardha të ndotura në çdo nivel përqendrimi.

3. Analizohen mostrat.

4. Llogaritet përqendrimi i matur në çdo mostër.

5. Përsëriten këta hapa në të paktën dy raste të tjera (për të paktën 18 përsëritës (dublim) për çdo nivel), me lote të ndryshme të materialit të bardhë, operatorë të ndryshëm në kushte mjedisore sa më shume të ndryshme, si p.sh., lote të reagjentëve ose të tretësirave të ndryshme

⁶ Nëse për një substancë farmakologjikisht aktive të palejuar, validimi i një përqendrimi i barabartë me 0.5 herë vlerën RPA, për arsye që në mënyrë të arsyeshme nuk është mundur të realizohet përqendrimi 0.5 herë vlerën e RPA-së mund të zëvendësohet me përqendrimin më të ulët, të arritshëm në mënyrë të arsyeshme, në mes 0,5 dhe 1.0 herë vlerën e RPA-së ose nga niveli i minimal i kalibrimit, nëse është më e vogël se 0.5 herë vlerën e RPA-së

⁷ Nëse për një substancë farmakologjikisht aktive, validimi i një përqendrimi i barabartë me 0.1 herë vlerën MRL, për arsye që në mënyrë të arsyeshme nuk është mundur të realizohet, përqendrimi 0.1 herë vlerën e MRL-së mund të zëvendësohet me përqendrimin më të ulët, të arritshëm në mënyrë të arsyeshme, në mes 0,1 dhe 1.5 herë vlerën e MRL-së.

⁸ ISO 5725-2:2019 Saktësia (vërtetësia dhe përpikëria) e metodave dhe rezultateve të matjes – Pjesa 2: Metoda bazë për përcaktimin e përsëritshmërisë dhe riprodhueshmërisë së një metode standarde të matjes (Klauzola 3).

⁹ Nëse për një substancë farmakologjikisht aktive të palejuar, vlera e një përqendrimi i barabartë me 0.5 herë vlerën RPA, për arsye që në mënyrë të arsyeshme nuk është mundur të realizohet, përqendrimi 0.5 herë vlerën e RPA-së mund të zëvendësohet me përqendrimin më të ulët, të arritshëm, në mënyrë të arsyeshme, në mes 0,5 dhe 1.0 herë vlerën e RPA-së ose nga niveli i minimal i kalibrimit, nëse është më e vogël se 0.5 herë vlerën e RPA-së.

¹⁰ Kur, për një substancë specifike farmakologjikisht aktive, vërtetimi i një përqendrimi prej 0,1 herë MRL nuk është i arritshëm në mënyrë të arsyeshme, përqendrimi prej 0,1 herë MRL mund të zëvendësohet nga përqendrimi më i ulët midis 0,1 herë dhe 0,5 herë MRL, e cila është e arritshme në mënyrë të arsyeshme.

etj., temperatura të ndryshme të ambientit, instrumente të ndryshme ose variacione të parametrave të tjerë.

6. Përcaktohet përqendrimi mesatar, shmangia standarde dhe koeficienti i variancës (%) i mostrave të fortifikuara.

Për substancat e autorizuara metodat e validuara, mjafton përcaktimi i riprodhueshmërisë brenda laboratorit me matrica të fortifikuara në përqendrimet në 0,5, 1,0 dhe 1,5 herë MRL ose ML.

Përndryshe, llogaritja për riprodhueshmërinë brenda laboratorit / përpikëria e ndërmjetme gjithashtu mund të llogaritet sipas ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 (8), Codex CAC/GL 59-2006 ¹¹.

2.2.2. Validimi sipas modeleve alternative

Llogaritja e parametrave në përputhje me modelet alternative kërkon kryerjen e një plani eksperimental. Plani eksperimental do të hartohet në varësi të numrit të specieve të ndryshme dhe faktorëve të ndryshëm që mund të ndikojnë në analizë. Prandaj, hapi i parë i të gjithë procedurës së validimit është marrja në konsideratë e të gjithë llojet e mostrave që do të analizohen në laborator në të ardhmen, në mënyrë që të përcaktohen speciet më të rëndësishme dhe faktorët që mund të ndikojnë në rezultatet e analizës. Qasja faktoriale lejon vlerësimin e pasigurisë së matjes së rezultateve të testit, të marra në kushte të ndryshme analizimi në një laborator të caktuar, si p.sh. analistë të ndryshëm, instrumente të ndryshëm, prodhime të ndryshme reagjentësh, matrica të ndryshme, kohë të ndryshme të ruajtjes së mostrave për t'u analizuar, si dhe temperatura të ndryshme analizimi. Kufijtë e përqendrimeve që do të analizohen përzgjidhen në mënyrë të tillë që të jenë në përputhje me MRL ose ML për substancat e autorizuara, RPA ose LCL për substancat e ndaluara ose të paautorizuara.

Qasja faktoriale synon krijimin e të dhënave të sakta e të besueshme dhe të dhëna të matura me anë kontrollit të njëkohshëm të faktorëve të përzgjedhur. Ai lejon vlerësimin e ndikimit të kombinuar të efekteve faktoriale dhe atyre të rastësishme. Modeli eksperimental lejon gjithashtu hetimin e qëndrueshmërisë ¹² të metodës analitike dhe përcaktimin e riprodhueshmërisë brenda laboratorit me anë të shmangies standarde për matricat.

Në vijim jepet një shembull për një qasje alternative duke përdorur një plan projektimi eksperimental ortogonal.

Mund të përzgjidhen deri në shtatë faktorë (faktorët e zhurmës). Studimi është projektuar në atë mënyrë që përpikëria, vërtetësia (bazuar në mostrat e fortifikuara), ndjeshmëria, pasiguria në matje dhe përqendrimet kritike të mund të përcaktohen njëkohësisht nga zbatimi i planit eksperimental.

Tabela 6. Shembull i një plani projektimi eksperimental ortogonal me 7 faktorë (I–VII) të ndryshueshëm në dy nivele (A/B) në një studim validimi me tetë run (kombinimi i nivelit të faktorëve)

Faktori	I	II	III	IV	V	VI	VII
Niveli 01	A	A	A	A	A	A	A
Niveli 02	A	A	B	A	B	B	B
Niveli 03	A	B	A	B	A	B	B
Niveli 04	A	B	B	B	B	A	A
Niveli 05	B	A	A	B	B	A	B
Niveli 06	B	A	B	B	A	B	A
Niveli 07	B	B	A	A	B	B	A
Niveli 08	B	B	B	A	A	A	B

¹¹ Komisioni Codex Alimentarius, Organizata e Kombeve të Bashkuara për Ushqimin dhe Bujqësinë, Organizata Botërore e Shëndetësisë, udhëzimet për vlerësimin e pasigurisë së rezultateve (CAC/GL 59-2006).

¹² Ndryshimet në kushtet eksperimentale të përmendura këtu mund të përbëhen nga materialet e mostrës, analitet, kushtet e ruajtjes, kushtet mjedisore dhe/ose të përgatitjes së mostrës. Për të gjitha kushtet eksperimentale, të cilat në praktikë mund të jenë subjekt i ndryshimeve (p.sh. stabiliteti i reagjentëve, përbërja e mostrës, pH, temperatura) duhet të tregohen çdo ndryshim që mund të ndikojë në rezultatin analitik.

Llogaritja e kriterëve të metodës kryhet siç përshkruhet nga Jülicher et al¹³ ose nga norma ISO/TS 23471:2022.

2.2.3 Qasje të tjera të validimit

Mund të përdoren qasje të tjera për të demonstruar se metoda përputhet me kriteret e performancës për karakteristikat e performancës, me kusht që ato të arrijnë të njëjtin nivel dhe cilësi informacioni. Validimi mund të kryhet gjithashtu duke kryer një studim ndërlaboratorik siç është përshkruar nga Codex Alimentarius, **ISO** ose **IUPAC**¹⁴ ose sipas metodave alternative siç janë studimet e vetme laboratorike ose validimi brenda **laboratorit**¹⁵. Kur aplikohen procedura alternative të validimit, modeli dhe strategjia bazë me parakushtet, supozimet dhe formulat përkatëse do të përshkruhen në protokollin e validimit ose të paktën do të jepen referenca për disponueshmërinë e tyre.

2.3 Selektiviteti/specifikimi

Aftësia e dallimit ndërmjet analitit dhe substancave të afërta do të përcaktohet në masën më të mirë të mundshme. Duhet të përcaktohen interferencat e homologëve, izomerëve, produkteve të degradimit, substancave endogjene, analogëve, produkteve metabolitë të mbetjeve për të cilat interesohemi, të komponimeve të matricës ose të çdo substance tjetër që mund të interferojë dhe nëse është e nevojshme, metoda duhet të ndryshohet për të shmangur interreferencat e identifikuar. Për të përcaktuar specificitetin e metodës, do të përdoret qasja e mëposhtme:

1. Zgjidhet një seri komponimesh të afërta kimikisht ose substanca të tjera që ka të ngjarë të hasen me komponimin me interes që mund të jenë të pranishme në mostra dhe verifikohen nëse ato mund të ndikojnë në analizën e analitit/eve të kërkuar.

2. Analizohet një numër i përshtatshëm mostrash të bardha përfaqësuese, p.sh. lote të ndryshme ose lote të ndryshme specimesh të kafshëve ($n \geq 20$) dhe kontrollohet për çdo interferencë të sinjaleve, pikeve ose gjurmëve të joneve në zonën e interesit ku pritet të eluohet analiti i kërkuar.

3. Fortifikohen mostrat e bardha përfaqësuese në një përqendrim të përshtatshëm me substanca që mund të interferojnë në identifikimin dhe/ose përcaktimin sasior të analitit, si dhe hetohet nëse substanca e shtuar:

- a) mund të çojë në një identifikim të rremë;
- b) pengon identifikimin e analitit të kërkuar;
- c) ndikon dukshëm në kuantifikim.

2.4 Qëndrueshmëria

Metoda analitike do të testohet për performancën e saj të vazhdueshme në kushte të ndryshme eksperimentale, të cilat përfshijnë për shembull kushte të ndryshme të marrjes së mostrave dhe ndryshime të vogla që mund të ndodhin në testimin rutinë. Për testimin e qëndrueshmërisë së metodës, ndryshimet e paraqitura në kushtet eksperimentale duhet të jenë të vogla. Rëndësia e këtyre ndryshimeve duhet të vlerësohet. Çdo karakteristikë e performancës do të përcaktohet për të gjitha ndryshimet e vogla që kanë treguar të kenë një efekt të rëndësishëm në performancën e analizës.

2.5 Stabiliteti

Nevojitet të përcaktohet stabiliteti i standardeve të kalibrimit, standardit me matricë krahasuese (matrix-matched) dhe/ose i standardit të përforcuar dhe i përbërësve të analitit, ose i matricës në përbërje të kampionit gjatë ruajtjes ose analizave, pasi që paqëndrueshmëritë mund të ndikojnë në rezultatet e testeve.

¹³ Jülicher, B., Gowik, P. e Uhlig, S. (1998), "Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept". *Analyst*, 123, 173.

¹⁴ IUPAC (1995), *Protokolli për hartimin, kryerjen dhe interpretimin e studimeve të performancës së metodës*, *Pure & Applied Chem*, 67, 331.

¹⁵ Gowik, P., Jülicher, B. dhe Uhlig, S. (1998) Metoda me shumë mbetje për barnat antiinflamatore josteroide në plazmë duke përdorur kromatografi të lëngshme me performancë të lartë - DAD. *Përshkrimi i metodës dhe validimi i brendshëm*. *J. Chromatogr.*, 716, 221.

Zakonisht, stabiliteti i analitit karakterizohet mirë në kushte të ndryshme ruajtjeje. Eksperimentet e kryera për monitorimin e kushteve të ruajtjes së standardeve dhe mostrave, të cilat kryhen në kuadër të sistemi normal të akreditimit të laboratorit dhe të kontrollit të cilësisë mund të japin informacionin e kërkuar.

Nëse të dhënat e stabilitetit për analitët në matricë janë të disponueshme (p.sh. në bazë të informacionit nga EURL-të, të dhënat e publikuara etj.), këto të dhëna nuk kanë nevojë të përcaktohen nga secili laborator. Referimi në të dhënat e disponueshme mbi stabilitetin e analiteve në tretësira dhe në matricat është e pranueshme vetëm nëse zbatohen në kushte teknike identike.

Në rast se nuk janë të disponueshme të dhëna mbi stabilitetin e kërkuar, duhet të përdoren qasjet që vijnë. Gjithashtu, është e mundur të përqasja e “isochronous approach” (“barazisë kohore”)¹⁶, me një skemë të temperaturës së ruajtjes të ngjashme me skemën e përcaktuar në tabelën 7 të këtij aneksi, e cila bën të mundur që të përcaktohet paqëndrueshmëria e mundshme e analitit dhe të kryhet një vlerësim i periudhave të ruajtjes së përshtatshme.

2.5.1 Përcaktimi i stabilitetit të analitit në tretësirë

1. Përgatiten tretësira të freskëta stoku të analitit/ëve dhe hollohen siç specifikohet në udhëzimet e provës për të dhënë sasi të mjaftueshme (p.sh. 40) të çdo përqendrimi të zgjedhur. Mostrat do të përgatiten nga:

- a) tretësirat e analitit, të cilat përdoren për fortifikim;
- b) tretësirat e analitit, të përdorura për analizën përfundimtare;
- c) çdo tretësirë tjetër që është me interes (p.sh. standardet e derivatuara).

2. Matet sasia e analitit në tretësirën e sapo përgatitur sipas udhëzimeve të analizës.

3. Shpërndahen vëllimet e duhura në viale të përshtatshme, etiketohen dhe ruhen sipas kushteve të dritës dhe temperaturës të skemës në tabelën 7. Koha e ruajtjes duhet të zgjidhet duke marrë parasysh praktikën analitike të aplikuar, në mënyrë ideale derisa fenomenet e para të degradimit të jenë të dukshme gjatë identifikimit dhe /ose kuantifikimit. Nëse gjatë studimit të stabilitetit nuk vërehet degradim, kohëzgjatja e ruajtjes së studimit të qëndrueshmërisë do të jetë e barabartë me kohëzgjatjen e periudhës maksimale të ruajtjes së tretësirës.

4. Llogaritet përqendrimi i analitit/ëve në çdo alikuotë në krahasim me përqendrimin e analitit në tretësirën e sapo përgatitur, duke ndjekur formulën e mëposhtme:

$$\text{Analit i mbetur (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{freskët}}$$

C_i = përqendrimi në pikën kohore i

$C_{\text{freskët}}$ = përqendrimi i tretësirës së freskët

Vlera mesatare e pesë replikave të tretësirave të cilat janë ruajtur, nuk duhet të ndryshojë më shumë se 15% nga vlera mesatare e pesë replikatave të tretësirave të sapo përgatitura. Vlera mesatare e pesë tretësirave të sapo përgatitura do të përdoret si bazë për llogaritjen e diferencës në përqindje.

Tabela 7. Skema për përcaktimin e stabilitetit të analitit në tretësirë

	-20°C	+4°C	+20°C
Errësirë	10 alikuota	10 alikuota	10 alikuota
Dritë			10 alikuota

2.5.2 Përcaktimi i stabilitetit të analitit/ analiteve në matrice

1. Aty ku është e mundur përdoren mostrat “incurred”¹⁷. Kur nuk ka matricë të tillë, do të përdoret një matricë e bardhë e fortifikuar me analitin.

2. Kur është e disponueshme matrica “incurred”, homogjenizohet, në mënyrë të preferueshme për sa kohë është e freskët. Matrica ndahet në pesë pjesë dhe analizohet një sasi e secilës pjesë.

¹⁶ Lambert, A., Schimmel, H. and Pauwels, J. (1998) The study of the stability of reference materials by isochronous measurements. *Fres. J. Anal. Chem.* 360, 359.

¹⁷ Kampione në të cilat analiti (substancë farmakologjike aktive, pesticide ose alergjene) është prezente, pasi kafsha e merr në rrugë natyrale ose biologjike, ose shtohet qëllimisht në laborator për qëllime studimi.

3. Nëse nuk ka matricë “incurred”, merret një pjesë e matricës së bardhë dhe homogjenizohet. Matrica ndahet në pesë pjesë. Fortifikohet secila pjesë me analitin, deri në afërsi të nivelit të kërkuar, që në mënyrë të preferueshme përgatitet në një sasi të vogël të tretësirës ujore. Analizohet menjëherë një sasi për secilën pjesë.

4. Pjesët (nënkampionet) e matricës “incurred” së homogjenizuar ose të matricës së bardhë të përforcuar ruhen në një temperaturë, e cila pasqyron kushtet e ruajtjes të krijuara në laborator për një ndërlidhje të caktuar analit/matrice dhe përcaktohen përqendrimet e analitit pas ruajtjes në një kohe të shkurtër, të mesme ose gjatë (të paktën për kohën në të cilën kampioni zakonisht ruhet në laborator).

5. Vlera mesatare e pesë pjesëve të një sasie të ruajtur nuk duhet të ketë diferencë me të madhe se riprodhueshmëria ndërlaboratorike e metodës nga vlera mesatare e pjesëve të sapopërgatitura. Vlera mesatare e pesë pjesëve të porsapërgatitura përdoret si bazë për të llogaritur diferencën në përqindje.

6. Regjistrohet koha maksimale e pranueshme e ruajtjes dhe kushtet optimale të ruajtjes.

2.6 Kufiri i vendimit për konfirmim (CC α)

CC α duhet të përcaktohet për metodat konfirmatore. CC α do të përcaktohet duke respektuar kushtet në përputhje me kërkesat për identifikim ose identifikimin dhe kuantifikimin siç përcaktohet në “Kriteret e performancës dhe kërkesat e tjera për metodat analitike”, siç përcaktohet në kapitullin 1.

Për kontrollin e mostrave, pasiguria standard e kombinuar e matjeve tashmë është përfshirë në vlerën CC α (kufiri i vendimit për konfirmim).

1. Për substancat farmakologjike aktive të paautorizuara ose të ndaluara, CC α do të llogaritet si më poshtë:

a) Metoda 1: me procedurën e lakores së kalibrimit sipas ISO 11843-1:1997¹⁸ (këtu referuar si vlera kritike e ndryshores). Në këtë rast, do të përdoret materiali bardhë, i cili fortifikohet në dhe mbi RPA ose LCL në nivele të barazlanguar. Analizohen mostrat. Pas identifikimit, ndërtohet grafiku i sinjalit aty ku është e mundur, ose të përqendrimit të rillogaritur kundrejt përqendrimit të shtuar. Përqendrimi që i korrespondon ndërprerjes në boshtin y plus 2,33 herë shmangien standarde të riprodhueshmërisë brenda laboratorit në ndërprerje është i barabartë me kufirin e vendimit për konfirmim. Kjo metodë është e zbatueshme vetëm për metodat sasiore. Kufiri i vendimit i marrë me këtë qasje duhet të verifikohet duke analizuar matricën bardhë të fortifikuar në kufirin e llogaritur të vendimit.

b) Metoda 2: duke analizuar të paktën 20 mostra të bardha përfaqësuese për matricë për të qenë në gjendje të llogaritet raporti sinjal ndaj zhurmës në kohën e mbajtjes në të cilën pritët analiza. Trefishi i raportit sinjal-zhurmë mund të përdoret si kufi vendimi. Kjo është e zbatueshme për metodat sasiore dhe cilësore. Kufiri i vendimit i marrë me këtë qasje do të verifikohet duke analizuar matricën e bardhë të fortifikuar në kufirin e llogaritur të vendimit.

c) Metoda 3: CC α = LCL + k (one-side, 99%) $\times$ pasiguria (e kombinuar) standarde e matjes në LCL

Për substancat farmakologjike aktive të paautorizuara ose të ndaluara, në varësi të eksperimentit të validimit (dhe gradëve përkatëse të lirisë), shpërndarja t mund të zbatohet në mënyrë të arsyeshme, ose – nëse shpërndarja Gaussiane (one side, $n=\infty$) merret si bazë – do të përdoret një faktor k 2,33.

Riprodhueshmëria brenda laboratorit dhe vërtetësia janë të përshtatshme për të përcaktuar pasigurinë standarde (të kombinuar) të matjes, nëse përcaktohet duke marrë parasysh të gjithë faktorët e përshtatshëm që mund të ndikojnë në analizë.

Metoda 2 për llogaritjen e CC α mund të përdoret vetëm deri më 1 janar 2026. Për metodat e validuara pas hyrjes në fuqi të këtij urdhri, do të përdoren vetëm metodat 1 ose 3.

2. Për substancat e autorizuara, CC α do të llogaritet si më poshtë:

a) Për substancat e autorizuara në kombinimet e matricës/specieve për të cilat është vendosur një MRL ose ML:

¹⁸ ISO 11843-1:1997 Aftësia e zbulimit – Pjesa 1: Termat dhe përkufizimet.

i. Metoda 1: me procedurën e lakores së kalibrimit sipas ISO 11843-1:1997 (këtu referuar si vlera kritike e ndryshores). Në këtë rast, do të përdoret mostër e bardhë, e cila fortifikohet në dhe mbi MRL ose ML në nivele të barazlanguar. Analizohen mostrat. Pas identifikimit, ndërtohet grafiku i sinjalit, aty ku është e mundur, ose të përqendrimit të rillogarit, kundrejt përqendrimit të shtuar. Përqendrimi përkatës në MRL ose ML plus 1,64 herë shmangien standarde të riprodhueshmërisë brenda laboratorit në kufirin e lejuar është i barabartë me kufirin e vendimit ($\alpha = 5\%$).

ii. Metoda 2: $CC\alpha = MRL \text{ (ose ML)} + k \text{ (one side, 95\%)} \times \text{pasiguria e (i kombinuar) e matjes standarde në MRL ose ML}$.

Për substancat e autorizuar, në varësi të eksperimentit të validimit (dhe gradëve respektive të lirisë), shpërndarja e studentit t mund të zbatohet në mënyrë të arsyeshme, ose – nëse shpërndarja Gaussian (one side, $n=\infty$) merret si bazë, do të përdoret faktor k prej 1,64.

Riprodhueshmëria brenda laboratorit dhe vërtetësia janë të përshtatshme për të përcaktuar pasigurinë e (të kombinuar) standarde të matjes, nëse përcaktohet duke marrë parasysh të gjithë faktorët që ndikojnë në analizë.

Për substancat farmakologjike aktive për të cilat është vendosur MRL për shumën e substancave të ndryshme, $CC\alpha$ e substancës me përqendrimin më të lartë në kampion do të përdoret si $CC\alpha$ për të vlerësuar shumën e substancave në kampionin e matur.

b) Për substancat e autorizuar në kombinimet e matricës/specieve për të cilat nuk është caktuar MRL, nuk duhet të ketë mbetje përveç rastit kur është kryer një trajtim i autorizuar. Për substancat e autorizuar, për të cilat nuk është caktuar MRL, do të përdoret për llogaritjen e $CC\alpha$. Metoda 1 ose 2 e paragrafit të mësipërm do të zbatohet, por ‘MRL’ i referohet ‘0,5 herë MRL së kaskadës me objektiv 0,1 herë MRL në kaskadë, kur është e mundur të arrihet në mënyrë të arsyeshme’.

2.7 Aftësia e dedektimit për *screening* ($CC\beta$)

$CC\beta$ duhet të përcaktohet për metodat *screening*. $CC\beta$ duhet të përcaktohet siç jepet në “Kriteret e performancës dhe kërkesat e tjera për metodat analitike”, e cituar në kapitullin 1 të kësaj shtojce dhe sipas kërkesave të përcaktuara në tabelën 5. Megjithatë, të gjitha kërkesat për identifikimin (pika. 1.2. 3, 1.2.4, 1.2.5) nuk kanë nevojë të aplikohen për metodat *screening*.

1. Për substancat farmakologjike aktive të paautorizuara ose të ndaluara, mund të aplikohet një gabim maksimal β prej 5%. $CC\beta$ do të llogaritet si më poshtë:

a) Metoda 1: Procedura e lakores së kalibrimit sipas ISO 11843-1:1997 (këtu referuar si vlera minimale e detektueshme e ndryshores). Në këtë rast, duhet të përdoret mostër e bardhë përfaqësuese, i cili është i fortifikuar në ose poshtë RPA-së, ose nëse nuk aplikohet RPA, rreth STC në nivele të barazlanguara. Analizohen mostrat. Ndërtohet grafiku i sinjalit kundrejt përqendrimit të shtuar. Përqendrimi përkatës në STC plus 1,64 herë shmangien standarde të riprodhueshmërisë brenda laboratorit të sasisë mesatare të matur në STC është i barabartë me aftësinë e dedektimit. Ekstrapolimi në nivele shumë të ulët të fortifikimit ($< 50\%$ e nivelit më të ulët të fortifikimit) duhet të konfirmohet nga të dhënat eksperimentale gjatë procesit të validimit.

b) Metoda 2: Studimi i materialit të bardhë të fortifikuar në nivel STC të përzgjedhur fillimisht. Në këtë nivel të përqendrimit analizohen 20 kampion të bardha të fortifikuar me qëllim që të garantohet një bazë e besueshme për këtë përcaktim. Nëse në një nivel të tillë të përqendrimit, rezultati i rezultateve false konforme ngelet $\leq 5\%$, niveli është i barasvlershëm me aftësinë përcaktuese të metodës. Nëse përftohet $> 5\%$ e rezultateve false konforme, STC-ja rritet dhe studimi përsëritet për të verifikuar përputhshmërinë me kërkesën prej $\leq 5\%$ të rezultateve false konforme.

c) Metoda 3: $CC\beta = STC + k \text{ (one side, 95\%)} \times \text{pasiguria standarde (e kombinuar) e matjes në ose mbi STC}$.

Për substancat farmakologjike aktive të paautorizuara ose të ndaluara, në varësi të eksperimentit të validimit (dhe shkallës respektive të lirisë), shpërndarja e studentit t mund të zbatohet në mënyrë të arsyeshme, ose nëse merret si bazë shpërndarja Gaussian (one side $n=\infty$), do të përdoret një faktor k 1,64.

Riprodhueshmëria brenda laboratorit dhe vërtetësia janë të përshtatshme për të përcaktuar pasigurinë standarde (e kombinuar) të matjes , nëse përcaktohet duke marrë parasysh të gjithë faktorët që ndikojnë në analizë.

2. Për substancat e autorizuar, mund të aplikohet një gabim maksimal β prej 5%. $CC\beta$ do të llogaritet si më poshtë:

a) Metoda 1: me procedurën e lakores së kalibrimit sipas ISO 11843-1:1997 (këtu referuar si një vlerë minimale e dallueshme e ndryshores). Në këtë rast, do të përdoret mostër e bardhë përfaqësuese, e cila fortifikohet në dhe nën kufirin e lejuar, duke filluar nga STC në nivele të barazlanguar. Analizohen mostrat dhe identifikohet analitin/ët. Llogaritet shmangia standarde e sasisë mesatare të matur në STC.

Përqendrimi përkatës në STC plus 1,64 herë shmangien standarde të riprodhueshmërisë brenda laboratorit të sasisë mesatare të matur në STC është i barabartë me aftësinë e dedektimit,

b) Metoda 2: me analizimin e mostrave të bardha të fortifikuara në nivele përqendrimi nën kufirin e lejuar. Për çdo nivel përqendrimi do të analizohen 20 mostra të bardha të fortifikuara për të siguruar një bazë të besueshme për këtë përcaktim. Niveli i përqendrimit, ku mbeten vetëm $\leq 5\%$ rezultate falls konform, është i barabartë me aftësinë dedektuese të metodës.

c) Metoda 3: $CC\beta = STC + k$ (one side, 95%) $\times$ pasiguria (e kombinuar) e matjes standarde në ose mbi STC.

Për substancat e autorizuar, në varësi të eksperimentit të validimit (dhe gradëve të lirisë respektive), t -shpërndarja mund të zbatohet në mënyrë të arsyeshme, ose nëse shpërndarja është Gaussiane (one side, $n=\infty$) merret si bazë, një faktor k prej 1,64 (cilido qoftë rasti ose përdorim në kaskadë ose sipas rregullave të MRL).

Riprodhueshmëria brenda laboratorit dhe vërtetësia janë të përshtatshme për të përcaktuar pasigurinë standarde (e kombinuar) e matjes , nëse përcaktohet duke marrë parasysh të gjithë faktorët që ndikojnë në analiza.

2.8 Lakorja e kalibrimit

Kur lakoret e kalibrimit përdoren për kuantifikim:

1) në ndërtimin e lakores duhet të përdoren të paktën pesë nivele të barazlanguara (duke përfshirë nivelin zero);

2. duhet të përshkruhet diapazoni i punës së lakores;

3. duhet të përshkruhet formula matematikore e lakores dhe përshtatshmëria e të dhënave (koeficienti i përcaktimit R^2) me të;

4. duhet të përshkruhen diapazoni i provueshmërisë për parametrat e lakores.

Për lakoret e kalibrimit në tretës, të mostrave të ndotura në fund të procesit analitik dhe/ose të mostrave të ndotura në fillim të procesit analitik duhet të tregohen për parametrat e lakores së kalibrimit, të cilat mund të ndryshojnë

2.9 Rifitimi absolut

Nuk nevojitet të përcaktohet rifitimi absolut i metodës nëse është i disponueshëm një standard i brendshëm, ose një kalibrim i matricës së fortifikuar, ose nëse janë të disponueshëm që të dy, në të gjitha rastet e tjera përcaktohet rifitimi absolut i metodës.

Kur plotësohen kërkesat për vërtetësinë, siç përcaktohet në tabelën 1, mund të përdoret një faktor korrigjimi fiks. Përndryshe, do të përdoret rifitimi i marrë për atë *batch* specifik. Si alternativë mund të përdoret procedura e shtesave standard ¹⁹, ose një standard i brendshëm mund të përdoret në vend të përdorimit të korrigjimit të rifitimit.

Rifitimi absolut do të llogaritet për të paktën gjashtë lote përfaqësuese të matricës.

Një pjesë e mostrës së bardhë do të fortifikohet me analit përpara ekstraktimit, dhe një pjesë do të fortifikohet pas procesit analitik që i është nënshtruar mostra e bardhë në një nivel përqendrimi të përshtatshëm dhe do të përcaktohet përqendrimi i analitit.

Rifitimi do të llogaritet si:

¹⁹ *Sasia e analitit standard të shtuar mund të jetë, për shembull, midis dy dhe pesë herë sasia e vlerësuar e analizës në mostër. Kjo procedurë është projektuar për të përcaktuar përmbajtjen e një analiti në një kampion, duke marrë parasysh rifitimin e procedurës analitike.*

$\text{Rec (analiti)} = (\text{sipërfaqja e standardit të ndotur në fillim të procesit analitik}) / (\text{sipërfaqja e standardit të ndotur në fund të procesit analitik}) \times 100$

2.10 Efekti relativ i matricës

Efekti relativ i matricës duhet të përcaktohet në të gjitha rastet. Kjo mund të bëhet ose si pjesë e validimit ose në eksperiment të veçantë. Llogaritja e efektit relativ të matricës do të bëhet për të paktën 20 lote të ndryshme të bardha (matricë/specie), sipas qëllimit të metodës p.sh. specie të ndryshme që do të mbulohen.

Matrica e bardhë duhet të fortifikohet pas procesit analitik me analit në RPA, MRL ose ML dhe duhet të analizohet së bashku me një tretësirë të pastër të analitit në të njëjtin nivel.

Efekti relativ i matricës ose faktori i matricës (MF) llogaritet si:

$$MF(\text{standardit}) = \frac{\text{Sipërfaqja e pikut të analitit në MMS}}{\text{Sipërfaqja e pikut të analitit në tretësirën standarde}}$$

$$MF(IS) = \frac{\text{Sipërfaqja e pikut të standardit të brendshëm në MMS}}{\text{Sipërfaqja e pikut të standardit të brendshëm në tretësirën standarde}}$$

$$MF(\text{standardi i normalizuar për IS}) = \frac{MF(\text{standart})}{MF(IS)}$$

IS: standardi i brendshëm;

MMS: standard me matrice (matrix-matched standard).

Koeficienti i variancës nuk duhet të jetë më i madh se vlerat e përshkruara në tabelën 2 të këtij aneksi për “faktorin matricë” (standard i normalizuar për IS).

KAPITULLI 3 KONTROLI I CILËSISË GJATË ANALIZËS RUTINË – VERIFIKIMI I PERFORMANCËS SË METODAVE

Duhet të respektohen kërkesat për sigurimin e cilësisë së rezultateve analitike të kapitullit 7.7 të ISO/IEC 17025:2017²⁰.

Gjatë analizave rutinë, analiza a materialeve të referencës të certifikuara (certified reference materials (CRMs)) është opsioni i preferuar për të demonstruar rendimentin e metodës. Duke qenë se CRMs, që përmbajnë analitet përkatëse në nivelet e përqendrimit të kërkuar, janë radhë herë të disponueshme, mund të përdoren si alternativë edhe materiale të referencës të furnizuara dhe të karakterizuara nga laboratorë të referencës së Bashkimit Evropian ose nga laboratorë, të cilat kanë një akreditim ISO/IEC 17043:2023. Si alternativë të mëtejshme mund të përdoren materiale të referencës të brendshme të kontrolluara periodikisht.

Verifikimi i vazhdueshëm i performancës së metodës gjatë analizës rutinë duhet të kryhet si në analizat screening dhe konfirmatore.

1. Për metodat screening:

Për çdo seri (batch) analizash të kryera, seria e mostrave të mëposhtme të kontrollit të cilësisë duhet të analizohen njëkohësisht:

a) mostra e kontrollit për përshtatshmërinë e instrumentit, në mënyrë ideale të jetë specifik për metodën;

²⁰ ISO/IEC 17025: 2017 Kërkesa të përgjithshme për kompetencën e laboratorëve të testimit dhe kalibrimit (kapitulli 7.7).

b) mostrat e kontrollit të cilësisë të cilat janë të fortifikuara në një përqendrim afër STC dhe në mënyrë ideale në vlerën e CCβ të analizimit për substanca farmakologjike aktive të autorizuar, si dhe për substanca të ndaluara ose të paautorizuara);

c) mostra kontrolli konform (mostrat të bardha), dhe kur është e përshtatshme, reagjenti i bardhë.

2. Për metodat konfirmatore:

Për çdo seri (*batch*) analizash të kryera, seria e mostrave të mëposhtme të kontrollit të cilësisë duhet të analizohen njëkohësisht:

a) mostra e kontrollit për përshtatshmërinë e instrumentit, në mënyrë ideale të jetë specifik për metodën;

b) mostrat e kontrollit të cilësisë të cilat janë të fortifikuara në një përqendrim afër MRL ose ML për substancat farmakologjike aktive të autorizuar ose afër RPA ose LCL për substanca të ndaluara ose të paautorizuara (mostrat kontrolli jokonform);

c) mostra kontrolli konform (mostrat të bardha), dhe kur është e përshtatshme, reagjenti i bardhë.

Për mostrat e kontrollit të cilësisë rekomandohet të aplikohet rendi i mëposhtëm: mostra e kontrollit për përshtatshmërinë e instrumentit, mostra e kontrollit konform, mostra/t që do të konfirmohen, mostra e kontrollit konform përsëri dhe mostra e fortifikuar e kontrollit të cilësisë (mostrat kontrolli jokonform).

Për metodat sasiore për secilën *batch* të mostrave zyrtare, një lakore kalibrimi do të analizohet dhe matet para ose pas mostrave të listuara më sipër.

Aty ku është praktike, duhet të vlerësohet vërtetësia (në bazë të mostrave të fortifikuara) e të gjithë analitëve të kërkuar në mostrat e kontrollit jokonform, me anë të kartava të kontrollit të cilësisë në përputhje me kapitullin 7.7 të ISO/IEC 17025:2017. Nëse kjo kërkon një numër disproporcionalisht të madh për përcaktimin e vërtetësisë, numri i analitëve mund të reduktohet në një numër analitësh përfaqësues.

KAPITULLI 4

ZGJERIM I FUSHËS SË VALIDIMIT TË NJË METODE TË VALIDUAR PARAPRAKISHT

Ndonjëherë është e nevojshme të zgjerohet fusha e një metode të validuar më parë. Në këto raste zgjerimi i fushës së veprimit duhet të realizohet në mënyrë efikase dhe analitike. Kjo mund të arrihet duke kryer një validim në një numër të reduktuar mostrash (p.sh. gjysma e numrit të mostrave) krahasuar me një validim të plotë.

Megjithatë, lloji dhe numri i modifikimeve që do të validohen në një skemë të vetme të validimit të reduktuar bazohet gjithmonë në njohuritë e ekspertëve dhe përvojat e mëparshme, p.sh. një ndryshim në teknikën e dedektimi kërkon një validim të plotë në çdo rast.

Në përgjithësi, për të siguruar vlefshmërinë e vazhdueshme të metodës, performanca e saj duhet të monitorohet vazhdimisht dhe të krahasohet me parametrat e validimit të marrë fillimisht. Në mënyrë ideale, ky kontroll i vazhdueshëm i performancës së metodës është projektuar në një mënyrë që të dhënat që mungojnë për një validim të plotë mund të mblidhen me kalimin e kohës (p.sh. me disa pika të dhënash nga mostrat e QC në secilën seri analitike).

4.1 Zgjerimi i metodave për sa u takon përqendrimeve

Për shkak të ndryshimeve të MRL-ve, ML-ve dhe RPA-ve mund të bëhet e nevojshme të rregullohet diapazoni i përqendrimit për të cilin është validuar një metodë. Për një rast të tillë, aplikimi i një skeme të reduktuar të validimit është i pranueshëm.

Lakoret e kalibrimit për diapazonin e modifikuar duhet të përgatiten sipas procedurës së validimit. Duhet të analizohen *batche* të fortifikuara në nivele të ndryshme përqendrimi (pika. 2.2.1, 2.2.2).

Vërtetësia, përsëritshmëria dhe riprodhueshmëria brenda laboratorit / përpikëria e ndërmjetme duhet të jenë brenda një diapazoni të pranueshëm në krahasim me ato të metodës së validuar

fillimisht. Duhet të kryhet një rillogaritje e CC β (metodat *screening*) dhe CC α (metodat e konfirmatore), sipas rastit.

4.2 Zgjerimi i metodave në lidhje me substancat shtesë

Në përgjithësi, zgjerimi i metodës për sa u takon analitëve është i mundur vetëm për ato të cilët kanë strukturë të ngjashme dhe karakteristika të krahasueshme me ato të përfshira tashmë në metodën analitike. Për një rast të tillë, aplikimi i një skeme të reduktuar të validimit është i pranueshëm. Gjithashtu, nuk lejohet asnjë ndryshim në metodë.

Lakoret e kalibrimit për substancat shtesë duhet të përgatiten sipas procedurës së validuar. Duhet të analizohen lote të ndryshme matricash të fortifikuara në nivele të ndryshme përqendrimi (pika. 2.2.1, 2.2.2). Vërtetësia, përsëritshmëria dhe riprodhueshmëria brenda laboratorit/përpikëria e ndërmjetme duhet të jenë brenda një diapazoni të krahasueshëm me ato të analitëve të tjerë të metodës së validuar fillimisht dhe në përputhje me kërkesat e përcaktuara në pikën 1.2.2. Duhet të bëhet një llogaritje e CC β (metodat *screening*) dhe CC α (metodat konfirmatore) për analitët e rinj.

4.3 Zgjerimi metodave në lidhje me matricat/llojet

Përfshirja e matricave ose specieve të reja në një metodë analitike të validuar tashmë do të jetë gjithmonë një vendim rast pas rasti bazuar në njohuritë dhe përvojat e fituara deri më tani me metodën dhe eksperimentet paraprake që vlerësojnë efektet dhe interferencat e mundshme të matricës. Në përgjithësi, kjo do të jetë e mundur vetëm për matricat që shfaqin veti të ngjashme dhe për analitët joproblematikë (stabiliteti, dedektimi).

Lakoret e kalibrimit (standarde ose matricë) duhet të përgatiten sipas procedurës së validimit. Duhet të analizohen *batche* të ndryshme të matricës së fortifikuar në nivele të ndryshme përqendrimi (pika. 2.2.1, 2.2.2). Vërtetësia, përsëritshmëria dhe riprodhueshmëria brenda laboratorit/përpikëria e ndërmjetme duhet të jenë brenda një diapazoni të pranueshëm me ato të metodës së validuar fillimisht dhe në përputhje me kërkesat e përcaktuara në 1.2.2. Në varësi të qasjes së validimit, mund të jetë i nevojshëm një rillogaritje e CC β (metodat *screening*) ose CC α (metodat konfirmatore).

Nëse rezultatet nuk janë brenda një intervali të pranueshëm në krahasim me vlerat për matricën origjinale, do të jetë i nevojshëm një validim i plotë shtesë, në mënyrë që të përcaktohen parametrat e performancës matricat/speciet specifike.

Në rastet kur MRL-të për një substancë specifike ndryshojnë për matrica të caktuara, ka shumë të ngjarë të jetë e vështirë të përshtatet qëllimi i metodës me matricën/specien shtesë dhe përqendrimin, pasi në këtë rast duhen marrë në konsideratë dy modifikime. Në raste të tilla rekomandohet një validim i plotë.

ANEKSI II

PROCEDURAT E MARRJES SË MOSTRAVE DHE TRAJTIMI I MOSTRAVE ZYRTARE

1. Sasia e mostrës

Sasitë minimale të mostrës do të përcaktohen në programin kombëtar të kontrollit të mbetjeve. Sasitë minimale të mostrës duhet të jenë të mjaftueshme për t'u mundësuar laboratorëve të miratuar të kryejnë procedurat analitike të nevojshme për të përfunduar analizat *screening* dhe konfirmuese. Në mënyrë të veçantë për shpendët, akuakulturën, lepujt, kafshët e kultivuara, zverranikët dhe insektet, një mostër përbëhet nga një ose më shumë kafshë, në varësi të kërkesave të metodave analitike. Për vezët, madhësia e kampionit është të paktën 12 vezë ose më shumë, sipas metodave analitike të përdorura. Në rast se disa kategori substancash duhet të analizohen në një kampion me metoda të ndryshme analitike, sasia e kampionit do të rritet në përputhje me to.

2. Ndarja në nënmostra

Përveç rasteve kur teknikisht është e pamundur ose nuk kërkohet nga legjislacioni kombëtar, çdo mostër duhet të ndahet në të paktën dy nënmostra ekuivalente, ku secila lejon ndjekjen e procedurës së plotë analitike. Nënndarja mund të bëhet në vendin e marrjes së mostrave ose në laborator.

3. Gjurmueshmëria

Çdo mostër duhet të merret në atë mënyrë që të jetë gjithmonë e mundur të gjurmohet në fermën e origjinës dhe grupin e kafshëve ose kafshën individuale, sipas rastit. Në veçanti, për qumështin, mostrat mund të merren në një nga vendet e mëposhtme:

1. në fermë nga tanket e grumbullimit;
2. në nivel të industrisë së qumështit, para se qumështi të shkarkohet.

4. Kontejnerët e mostrave

Mostrat do të mbliidhen në kontejnerë të përshtatshëm për të ruajtur integritetin dhe gjurmueshmërinë e mostrës. Në veçanti, kontejnerët duhet të parandalojnë zëvendësimin, kros-kontaminimin dhe degradimin. Kontejnerët duhet të vulosen zyrtarisht.

5. Raporti i kampionimit

Një raport kampionimi (fleta e shoqërimit) duhet të përgatitet pas çdo procedure të marrjes së mostrës.

Inspektori mbledh minimalisht të dhënat e mëposhtme në raportin e kampionimit:

- a) adresën e autoriteteve kompetente;
- b) emrin e inspektorit ose kodin e identifikimit;
- c) numri zyrtar i kodit të mostrës;
- d) data e marrjes së mostrës;
- e) emrin dhe adresën e pronarit ose të personit përgjegjës për kafshët ose produktet shtazore;
- f) emrin dhe adresën e fermës së origjinës së kafshës (gjatë marrjes së mostrave në fermë);
- g) numri i regjistrimit të numrit të stabilimentit – thertores;
- h) identifikimin e kafshës ose produktit;
- i) specien e kafshës;
- j) matricën e mostrës;
- k) kur është e nevojshme, mjekimi brenda katër javëve të fundit para marrjes së mostrës (kur marrja e mostrave bëhet në fermë);
- l) Substancën ose grupe substancash për analizim;

13. Shënime të tjera

Kopjet në letër ose elektronike të raportit duhet të sigurohen në varësi të procedurës së marrjes së mostrave. Raporti i kampionimit dhe kopjet e tij duhet të plotësohen në mënyrë që të sigurohet vërtetësia dhe vlefshmëria e tyre ligjore, gjë që mund të kërkojë që këto dokumente të nënshkruhen nga inspektori. Në rast të marrjes së mostrave në fermë, fermeri ose përfaqësuesi i tij mund të nënshkruajë raportin origjinal të kampionimit.

Raporti origjinal i kampionimit mbetet në autoritetin kompetent, i cili duhet të garantojë që personat e paautorizuar nuk mund të kenë akses në këtë raport.

Nëse është e nevojshme, fermeri ose pronari i ndërmarrjes mund të informohet për marrjen e mostrave.

6. Raporti i kampionimit për laboratorin

Raporti i kampionimit të mostrave për laboratorin i hartuara nga autoritetet kompetente duhet të jetë në përputhje me kërkesat e përcaktuara në kapitullin 7 të ISO/IEC 17025:2017⁽¹⁾ dhe duhet të përmbajë të paktën informacionin e mëposhtëm:

1. adresën e autoriteteve kompetente ose organeve të caktuara;
2. emrin e inspektorit ose kodin e identifikimit;
3. numri zyrtar i kodit të mostrës;
4. data e marrjes së mostrës;
5. speciet e kafshëve;
6. matrica e mostrës;
7. substanca ose grupe substancash për analizim;
8. Shënime të tjera.

Raporti i kampionimit për laboratorin duhet të shoqërojë kampionin kur dërgohet në laborator.

7. Transporti dhe magazinimi (ruajtja)

Programet e kontrollit të mbetjeve duhet të specifikojnë kushtet e përshtatshme të ruajtjes dhe transportit për çdo kombinim analiti/matricë për të siguruar stabilitetin e analitit dhe integritetin

e kampionit. Koha e transportit duhet të jetë sa më e shkurtër që të jetë e mundur dhe temperatura gjatë transportit duhet të jetë e përshtatshme për të siguruar stabilitetin e analitit.

Vëmendje e veçantë duhet t'i kushtohet kutive të transportit, temperaturës dhe kohës së dorëzimit në laboratorin përgjegjës.

Në rast mospërputhjeje me kërkesat e programit të kontrollit, laboratori duhet të informojë pa vonesë autoritetin kompetent.