

ALLEGATO I

CAPITOLO 1

CRITERI DI RENDIMENTO E ALTRE PRESCRIZIONI PER I METODI ANALITICI**1.1. Prescrizioni relative ai metodi di screening****1.1.1. *Categorie di metodi di screening adeguati***

I metodi di screening adeguati da utilizzare sono quelli qualitativi, semiquantitativi o quantitativi.

1.1.2. Prescrizioni relative ai metodi di screening biologici, biochimici o fisico-chimici

Per le sostanze vietate o non autorizzate, la CC β deve essere la più bassa ragionevolmente ottenibile e in ogni caso inferiore al valore di riferimento per interventi per le sostanze per le quali sono stati stabiliti valori di riferimento per interventi a norma del regolamento (UE) 2019/1871.

Per le sostanze farmacologicamente attive autorizzate, la CC β deve essere inferiore all'LMR o all'LM.

Sono utilizzati per finalità di screening solo i metodi analitici la cui validazione può essere dimostrata in modo documentato e rintracciabile e che hanno un tasso di falsi conformi inferiore o pari al 5 % (errore β). Nel caso di sospetto risultato non conforme, tale risultato deve essere confermato per mezzo di un metodo di conferma.

I metodi di screening quantitativi, utilizzati sia per lo screening che per la conferma, devono soddisfare le stesse prescrizioni relative ad accuratezza, intervallo e precisione di cui ai punti 1.2.2.1 e 1.2.2.2.

1.2. Prescrizioni relative ai metodi di conferma**1.2.1. *Prescrizioni generali per i metodi di conferma***

Per le sostanze vietate o non autorizzate, il CC α deve essere il più basso ragionevolmente ottenibile. Per le sostanze vietate o non autorizzate per le quali è stato stabilito un valore di riferimento per interventi a norma del regolamento (UE) 2019/1871, il CC α deve essere inferiore o pari al valore di riferimento per interventi.

Per le sostanze autorizzate il CC α deve essere superiore, ma il più vicino possibile, all'LMR o all'LM.

A fini di conferma sono utilizzati solo i metodi analitici per i quali si possa dimostrare, in modo documentato e rintracciabile, che sono validati e hanno un tasso di falsi non conformi (errore α) inferiore o pari all'1 % per le sostanze vietate o non autorizzate oppure inferiore o pari al 5 % per le sostanze autorizzate.

I metodi di conferma devono fornire informazioni sulla composizione chimica e sulla struttura dell'analita. Di conseguenza, i metodi di conferma basati esclusivamente sull'analisi cromatografica senza l'uso della rivelazione tramite spettrometria di massa non sono adeguati all'impiego isolato come metodi di conferma per le sostanze farmacologicamente attive vietate o non autorizzate. Nel caso in cui la spettrometria di massa non sia adeguata per le sostanze autorizzate, possono essere utilizzati altri metodi quali HPLC-DAD e -FLD, o una combinazione di essi.

Se necessario secondo il metodo di conferma, all'inizio della procedura di estrazione si deve aggiungere all'aliquota da analizzare uno standard interno adeguato. A seconda della disponibilità, sono impiegate forme stabili dell'analita marcate con isotopi, che sono particolarmente indicate per la rivelazione con la spettrometria di massa, oppure composti analoghi strettamente correlati in modo strutturale all'analita. Ove non sia possibile impiegare alcuno standard interno adeguato, l'identificazione dell'analita è preferibilmente confermata dalla co-cromatografia ⁽¹⁾. In tal caso si ottiene un solo picco, dato che l'altezza (o l'area) del picco ingrandito è equivalente alla quantità di analita aggiunto. Se ciò non è possibile, si devono utilizzare standard a matrice abbinata o a matrice fortificata.

⁽¹⁾ La co-cromatografia è una procedura nella quale, prima delle fasi cromatografiche, l'estratto del campione viene diviso in due parti. Una parte viene sottoposta a cromatografia tale e quale; l'altra parte è miscelata con l'analita standard che deve essere misurato. La miscela è quindi sottoposta a cromatografia. La quantità di analita standard aggiunto deve essere simile alla quantità stimata dell'analita nell'estratto. La co-cromatografia è utilizzata per migliorare l'identificazione di un analita quando vengono impiegati metodi cromatografici, in particolare quando non si può utilizzare alcuno standard interno adeguato.

1.2.2. Criteri generali di rendimento per i metodi di conferma

1.2.2.1. Esattezza espressa come recupero

Per le analisi ripetute di un materiale di riferimento certificato, la deviazione della frazione di massa media determinata per via sperimentale e corretta per il recupero dal valore certificato deve essere conforme agli intervalli minimi di esattezza elencati nella tabella 1.

Tabella 1

Esattezza minima dei metodi quantitativi

Frazione di massa	Intervallo
$\leq 1 \mu\text{g/kg}$	da -50 % a +20 %
da $> 1 \mu\text{g/kg}$ a $10 \mu\text{g/kg}$	da -30 % a +20 %
$\geq 10 \mu\text{g/kg}$	da -20 % a +20 %

Quando non sono disponibili materiali di riferimento certificati, è accettabile che l'esattezza delle misurazioni sia valutata in altri modi, ad esempio utilizzando materiali con valori assegnati da studi interlaboratorio o attraverso aggiunte di quantità note dell'analita o degli analiti a una matrice bianca.

1.2.2.2. Precisione

Il coefficiente di variazione (CV) per l'analisi ripetuta di un materiale di riferimento o fortificato, in condizioni di riproducibilità intralaboratorio, non deve superare il livello calcolato per mezzo dell'equazione di Horwitz. L'equazione è la seguente:

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

dove C è la frazione di massa espressa come potenza (esponente) di 10 (ad esempio, $1 \text{ mg/g} = 10^{-3}$). Per le frazioni di massa inferiori a $120 \mu\text{g/kg}$, con l'applicazione dell'equazione di Horwitz si ottengono valori inaccettabilmente elevati. Il coefficiente massimo di variazione consentito non deve pertanto essere superiore ai valori presentati nella tabella 2.

Tabella 2

Coefficiente di variazione accettabile

Frazione di massa	CV (%) di riproducibilità
$> 1\,000 \mu\text{g/kg}$	16 (adattato dall'equazione di Horwitz)
$> 120 \mu\text{g/kg} - 1\,000 \mu\text{g/kg}$	22 (adattato dall'equazione di Horwitz)
$10 - 120 \mu\text{g/kg}$	25 *
$< 10 \mu\text{g/kg}$	30 *

* Il CV (%) presentato costituisce un orientamento e dovrebbe essere il più basso ragionevolmente possibile.

Per le analisi effettuate in condizioni di ripetibilità, il coefficiente di variazione in condizioni di ripetibilità deve essere pari o inferiore ai due terzi dei valori elencati nella tabella 2.

1.2.3. Prescrizioni relative alla separazione cromatografica

Per la cromatografia liquida (LC) o la gascromatografia (GC), il tempo di ritenzione minimo accettabile per l'analita o gli analiti sotto esame è pari al doppio del tempo di ritenzione corrispondente al volume vuoto della colonna. Il tempo di ritenzione dell'analita nell'estratto deve corrispondere a quello dello standard di taratura, uno standard a matrice abbinata o uno standard a matrice fortificata con una tolleranza di $\pm 0,1$ minuti. Per la cromatografia rapida, con un tempo di ritenzione inferiore a 2 minuti, è accettabile una deviazione inferiore al 5 % del tempo di ritenzione. Se si usa uno standard interno, il rapporto tra il tempo di ritenzione cromatografica dell'analita e quello

dello standard interno, ossia il tempo di ritenzione relativo dell'analita, deve corrispondere a quello dello standard di taratura, standard a matrice abbinata o standard a matrice fortificata con una deviazione massima dello 0,5 % per la gascromatografia e dell'1 % per la cromatografia liquida per i metodi validati a decorrere dalla data di entrata in vigore del presente regolamento.

1.2.4. Criteri di rendimento specifici per la spettrometria di massa

1.2.4.1. Rivelazione con tecniche di spettrometria di massa

La rivelazione tramite spettrometria di massa deve essere effettuata utilizzando alcune delle seguenti opzioni:

1. registrazione di spettri di massa a scansione completa (FS);
2. monitoraggio di ioni selezionati (SIM);
3. tecniche di spettrometria di massa sequenziale (MS^n), quali il monitoraggio di reazioni selezionate (SRM);
4. combinazione di tecniche di spettrometria di massa (MS) o spettrometria di massa sequenziale (MS^n) con modalità di ionizzazione appropriate.

Sono appropriate sia la spettrometria di massa a bassa risoluzione (LRMS, a risoluzione di massa unitaria) sia la spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), compresi ad esempio i settori a doppia focalizzazione, e gli strumenti TOF (tempo di volo) e Orbitrap.

Per confermare l'identità di un analita nella spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRMS), la deviazione di massa di tutti gli ioni diagnostici deve essere inferiore a 5 ppm (o, nel caso di $m/z < 200$ inferiore a 1 mDa). In base a ciò, si dovrebbe selezionare una risoluzione effettiva adatta allo scopo e di norma superiore a 10 000 per l'intero intervallo di massa al 10 % della valle o a 20 000 alla larghezza a metà altezza (FWHM).

Quando la determinazione con tecniche di spettrometria di massa è effettuata mediante registrazione di spettri a scansione completa (LRMS e HRMS), sono adeguati solo ioni diagnostici con intensità relativa superiore al 10 % nello spettro di riferimento dello standard di taratura, standard a matrice abbinata o standard a matrice fortificata. Gli ioni diagnostici devono comprendere lo ione molecolare (se presente con un'intensità ≥ 10 % del picco di base) e ioni frammentati o ioni prodotto caratteristici.

Selezione degli ioni precursori: quando la determinazione con tecniche di spettrometria di massa è effettuata mediante frammentazione dopo la selezione degli ioni precursori, la selezione degli ioni precursori è effettuata con risoluzione di massa unitaria o migliore. Lo ione precursore selezionato deve essere lo ione molecolare, gli addotti caratteristici dello ione molecolare, gli ioni prodotto caratteristici o uno dei loro ioni isotopici. Nel caso in cui la selezione del precursore abbia una finestra di selezione di massa di più di un Dalton (ad esempio nel caso di acquisizione indipendente dai dati), la tecnica è considerata un'analisi di conferma a scansione completa.

Ioni frammentati e ioni prodotto: gli ioni frammentati o ioni prodotto selezionati devono essere frammenti diagnostici per l'analita/per il prodotto oggetto di misurazione. Le transizioni non selettive (ad esempio il catione tropilio o la perdita d'acqua) devono essere omesse ogniqualvolta possibile. L'abbondanza di ioni diagnostici è determinata in base all'area del picco o all'altezza dei cromatogrammi integrati degli ioni estratti. Ciò vale anche quando per l'identificazione sono utilizzate misurazioni a scansione completa. Il rapporto segnale/rumore (S/R) di tutti gli ioni diagnostici deve essere superiore o pari a tre a uno (3:1).

Intensità relative: le intensità relative degli ioni diagnostici (rapporto di ioni) sono espresse come percentuale dell'intensità dello ione o della transizione più abbondante. Il rapporto ionico deve essere determinato confrontando gli spettri o integrando i segnali delle tracce di massa ionica estratte. Il rapporto di ioni dell'analita da confermare deve corrispondere a quello degli standard a matrice abbinata, degli standard a matrice fortificata o delle soluzioni standard a concentrazioni comparabili, misurati nelle stesse condizioni, con una deviazione relativa di ± 40 %.

Per tutte le analisi con tecniche di spettrometria di massa deve essere determinato almeno un rapporto di ioni, preferibilmente di ioni ottenuti in un'unica scansione; tuttavia gli ioni possono anche provenire da diverse scansioni nella stessa iniezione (ossia scansione completa e scansione a frammentazione).

1.2.4.2. Identificazione

Per selezionare modalità di acquisizione e criteri di valutazione adeguati deve essere utilizzato un sistema di punti di identificazione. Al fine di confermare l'identità delle sostanze in una matrice per le quali è fissato un LMR (impiego autorizzato) sono necessari almeno 4 punti di identificazione. Per le sostanze non autorizzate o vietate sono necessari 5 punti di identificazione. Un punto può provenire dalla separazione cromatografica. Nella tabella 3 è riportato il numero di punti di identificazione che ciascuna tecnica consente di ottenere. Per ottenere i punti di identificazione necessari per la conferma, si possono sommare punti di identificazione ottenuti con tecniche diverse.

1. Tutte le analisi effettuate con spettrometria di massa devono essere combinate con una tecnica di separazione con un potere di separazione e una selettività sufficienti per l'applicazione specifica. Tecniche di separazione adeguate sono, tra le altre, la cromatografia liquida e la gascromatografia, l'elettroforesi capillare (CE) e la cromatografia a fluido supercritico (SFC). Nel caso in cui l'analita presenta composti isomeri o isobari, l'accettabilità del tempo di ritenzione (cioè $\pm 0,5$ % nella gascromatografia (GC) e ± 1 % nella cromatografia liquida (LC) e a fluido supercritico (SFC)] è obbligatoria a fini di conferma della sua identità.
2. È possibile combinare un massimo di tre tecniche separate per conseguire il numero minimo di punti di identificazione.
3. Modalità di ionizzazione differenti [ad esempio a impatto di elettroni (EI) e chimica (CI)] sono considerate tecniche differenti.

Tabella 3

Punti di identificazione per tecnica

Tecnica	Punti di identificazione
Separazione (modalità GC, LC, SFC, CE)	1
ione LR-MS	1
Selezione degli ioni precursori a intervallo di massa $< \pm 0,5$ Da	1 (indiretto)
ione prodotto LR-MS ⁿ	1,5
ione HR-MS	1,5
ione prodotto HR-MS ⁿ	2,5

Tabella 4

Esempi del numero di punti di identificazione per tecniche specifiche e per loro combinazioni (n = un intero)

Tecnica/Tecniche	Separazione	Numero di ioni	Punti di identificazione
GC-MS (EI o CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI e CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI o CI) 2 derivati	GC	2 (Derivato A) + 2 (Derivato B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- o LC-MS/MS	GC o LC	1 precursore + 2 prodotti	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- o LC-MS/MS	GC o LC	2 precursori + 2 prodotti	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- o LC-MS ³	GC o LC	1 precursore + 1 MS ² prodotto + 1 MS ³ prodotto	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- o LC-HRMS	GC o LC	n	1 + n × 1,5

GC- o LC-HRMS/MS	GC o LC	1 precursore (intervallo di massa $< \pm 0,5$ Da) + 1 prodotto	$1 + 1 + 2,5 = 4,5$
GC- o LC-HRMS e HRMS/MS	GC o LC	1 ione scansione completa + 1 ione prodotto ^a HRMS	$1 + 1,5 + 2,5 = 5$
GC- e LC-MS	GC e LC	2 ioni (GCMS) + 1 ione (LCMS)	$1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6$

^a Non si ottiene nessun punto di identificazione aggiuntivo per la selezione dello ione precursore se tale ione è lo stesso (o un addotto o un isotopo) rispetto allo ione HRMS monitorato con scansione completa.

1.2.5. *Criteri di rendimento specifici per la determinazione di un analita mediante cromatografia liquida con tecniche di rivelazione diverse dalla spettrometria di massa*

Solo per le sostanze autorizzate, le seguenti tecniche possono essere utilizzate in alternativa ai metodi basati sulla spettrometria di massa, a condizione che siano soddisfatti i criteri pertinenti per tali tecniche:

1. rivelazione spettrofotometrica a serie di diodi (DAD) a scansione completa se usata con HPLC;
2. rivelazione spettrofotometrica a fluorescenza (FLD) se usata con HPLC.

La cromatografia liquida con rivelazione UV/VIS (lunghezza d'onda singola) non può essere utilizzata da sola come metodo di conferma.

1.2.5.1. Criteri di rendimento per la spettrofotometria a serie di diodi a scansione completa

Devono essere soddisfatti i criteri di rendimento per la separazione cromatografica di cui al capitolo 1.2.3.

I massimi di assorbimento nello spettro UV dell'analita avvengono alle stesse lunghezze d'onda di quelli dello standard di taratura nella matrice entro un margine massimo determinato dalla risoluzione del sistema di rivelazione. Per la rivelazione a serie di diodi il margine massimo è in genere entro ± 2 nm. Al di sopra dei 220 nm lo spettro dell'analita non è visivamente differente dallo spettro dello standard di taratura per le parti dei due spettri aventi un'assorbanza relativa pari o superiore al 10 %. Tale criterio è rispettato, in primo luogo, quando sono presenti gli stessi massimi e, in secondo luogo, quando la differenza osservata tra i due spettri non è superiore, in nessun punto, al 10 % dell'assorbanza dello standard di taratura. Nel caso di ricerche computerizzate all'interno della libreria, il raffronto dei dati provenienti dalla spettrometria sui campioni ufficiali da analizzare con quelli sulla soluzione di taratura deve superare un fattore di corrispondenza critico. Per ogni analita tale fattore deve essere determinato nel corso del processo di validazione sulla base degli spettri per i quali sono rispettati i criteri descritti in precedenza. Deve essere controllata la variabilità negli spettri provocata dalla matrice del campione e dal rendimento dello strumento di rivelazione.

1.2.5.2. Criteri di rendimento per la rivelazione spettrofotometrica a fluorescenza

Devono essere soddisfatti i criteri di rendimento per la separazione cromatografica di cui al capitolo 1.2.3.

La scelta delle lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione combinate alle condizioni cromatografiche deve essere compiuta in modo tale da ridurre al minimo gli effetti di componenti interferenti negli estratti dei campioni bianchi. Dovrebbero esserci almeno 50 nanometri tra la lunghezza d'onda di eccitazione e di emissione.

Il picco massimo più vicino nel cromatogramma è separato dal picco dell'analita designato di almeno una larghezza di picco completa al 10 % dell'altezza massima del picco dell'analita.

Ciò si applica alle molecole che presentano una fluorescenza nativa e alle molecole che presentano fluorescenza dopo trasformazione o derivazione.

CAPITOLO 2

VALIDAZIONE

2.1. Caratteristiche di rendimento da determinare per i metodi analitici

Attraverso la validazione del metodo si deve dimostrare che il metodo analitico è conforme ai criteri applicabili per le caratteristiche di rendimento pertinenti. Finalità di controllo differenti richiedono categorie di metodi differenti. La tabella 5 stabilisce quale caratteristica di rendimento debba essere verificata per quale tipo di metodo; ulteriori spiegazioni di ogni parametro sono fornite nel presente capitolo.

Tabella 5

Classificazione dei metodi analitici in base alle caratteristiche di rendimento che devono essere determinate

Metodo	Conferma		Screening		
	Qualitativa	Quantitativa	Qualitativo	Semiquantitativo	Quantitativo
Sostanze	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identificazione conformemente al punto 1.2	x	x			
CC α	x	x			
CC β	-		x	x	x
Esattezza		x			x
Precisione		x		(x)	x
Effetto matrice relativo/recupero assoluto *		x			x
Selettività/specificità		x	x	x	x
Stabilità #		x	x	x	x
Robustezza		x	x	x	x

x: Deve essere dimostrato, mediante validazione, il rispetto delle prescrizioni relative alle caratteristiche di rendimento.

(x) Non è necessario rispettare i requisiti di precisione di cui al punto 1.2.2.2 per i metodi di screening semiquantitativi. La precisione deve essere tuttavia determinata per dimostrare l'adeguatezza del metodo a evitare risultati analitici falsi conformi.

A: sostanze vietate o non autorizzate

B: sostanze autorizzate

Se i dati sulla stabilità degli analiti in una matrice sono disponibili nella letteratura scientifica o grazie ad un altro laboratorio, non è necessario che tali dati siano nuovamente determinati dal laboratorio interessato. Il riferimento a dati disponibili sulla stabilità degli analiti in soluzione è tuttavia accettabile solo se sono applicate condizioni identiche.

* Per i metodi MS occorre provare mediante validazione il rispetto delle prescrizioni relative alle caratteristiche di rendimento. L'effetto matrice relativo del metodo deve essere determinato se tale effetto non è stato valutato durante la procedura di validazione. Il recupero assoluto del metodo deve essere determinato se non si usa uno standard interno o una taratura della matrice fortificata.

2.2. Esattezza, ripetibilità e riproducibilità intralaboratorio

Nel presente capitolo sono illustrati esempi e riferimenti per le procedure di validazione. Possono essere utilizzati altri approcci per dimostrare che il metodo è conforme ai criteri di rendimento, a condizione che vengano raggiunti lo stesso livello e la stessa qualità delle informazioni.

2.2.1. Validazione convenzionale

Il calcolo dei parametri in base ai metodi convenzionali richiede l'esecuzione di svariati esperimenti singoli. Per ciascuna modifica importante si deve determinare la caratteristica di rendimento (cfr. punto 2.4). Per i metodi ad analita multiplo è possibile analizzare contemporaneamente svariati analiti, a condizione di aver precedentemente escluso possibili interferenze pertinenti. In tal modo è possibile determinare svariate caratteristiche di rendimento. Pertanto, per ridurre il carico di lavoro è consigliabile combinare per quanto possibile gli esperimenti (ad esempio, ripetibilità e riproducibilità intralaboratorio con la specificità, analisi dei campioni bianchi per determinare il limite di decisione di conferma e prova della specificità).

2.2.1.1. Esattezza sulla base di materiale di riferimento certificato

È preferibile determinare l'esattezza di un metodo analitico mediante materiale di riferimento certificato (MRC). La procedura è descritta nella norma ISO 5725-4:1994 ⁽²⁾.

Di seguito ne viene riportato un esempio:

1. analizzare sei replicati dell'MRC in base alle istruzioni di prova per il metodo;
2. determinare la concentrazione dell'analita presente in ciascun campione dei replicati;
3. calcolare la media, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (%) per tali sei replicati;
4. calcolare l'esattezza dividendo la concentrazione media rivelata per il valore certificato (misurato come concentrazione) e moltiplicare per 100, per esprimere il risultato in percentuale:

Esattezza (%) = (concentrazione media rivelata corretta per il recupero) × 100/valore certificato.

2.2.1.2. Esattezza sulla base di campioni fortificati

Se non è disponibile materiale di riferimento certificato, l'esattezza del metodo deve essere determinata mediante esperimenti in cui è utilizzata una matrice bianca fortificata, come minimo secondo il seguente schema:

1. per i metodi validati a decorrere dalla data di entrata in vigore del presente regolamento, selezionare il materiale bianco e fortificare a una concentrazione di:
 - a) 0,5 ⁽³⁾, 1,0 e 1,5 volte il valore di riferimento per interventi; oppure
 - b) 0,1 ⁽⁴⁾, 1,0 e 1,5 volte l'LMR o l'LM per le sostanze autorizzate; oppure
 - c) 1,0, 2,0 e 3,0 volte il livello minimo di taratura per le sostanze non autorizzate (per le quali non è stato stabilito alcun valore di riferimento per interventi);
2. l'analisi deve essere eseguita con sei replicati ad ogni livello;
3. analizzare i campioni;
4. calcolare la concentrazione rivelata in ciascun campione;
5. calcolare l'esattezza per ciascun campione utilizzando l'equazione riportata di seguito e calcolare successivamente l'esattezza media e il coefficiente di variazione per i sei risultati a ciascun livello di concentrazione.

Esattezza (%) = (concentrazione media rivelata corretta per il recupero) × 100/livello di fortificazione.

Nel caso dei metodi per sostanze autorizzate validati prima della data di applicazione del presente regolamento è sufficiente determinare l'esattezza del metodo utilizzando 6 aliquote fortificate a 0,5, 1,0 e 1,5 volte l'LMR o l'LM.

⁽²⁾ ISO 5725-4:2020 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione — parte 4: Metodi di base per determinare l'esattezza di un metodo di misura normalizzato (clausola 3).

⁽³⁾ Se, per una sostanza farmacologicamente attiva non consentita, la validazione di una concentrazione pari a 0,5 volte il valore di riferimento per interventi non è ragionevolmente ottenibile, la concentrazione di 0,5 volte il valore di riferimento per interventi può essere sostituita dalla concentrazione più bassa ragionevolmente ottenibile tra 0,5 e 1,0 volte il valore di riferimento per interventi.

⁽⁴⁾ Se, per una particolare sostanza farmacologicamente attiva, la validazione di una concentrazione pari a 0,1 volte l'LMR non è ragionevolmente ottenibile, la concentrazione di 0,1 volte l'LMR può essere sostituita dalla concentrazione più bassa ragionevolmente ottenibile tra 0,1 e 0,5 volte l'LMR.

2.2.1.3. Ripetibilità

1. Per i metodi validati a decorrere dalla data di entrata in vigore del presente regolamento, deve essere preparata una serie di campioni di matrici bianche identiche della stessa specie, da fortificare con l'analita in modo da ottenere concentrazioni equivalenti a:
 - a) 0,5 ⁽⁵⁾, 1,0 e 1,5 volte il valore di riferimento per interventi, oppure
 - b) 0,1 ⁽⁶⁾, 1,0 e 1,5 volte l'LMR o l'LM per le sostanze autorizzate, oppure
 - c) 1,0, 2,0 e 3,0 volte il livello minimo di taratura per le sostanze non autorizzate o vietate nel caso in cui non sia applicabile nessun valore di riferimento per interventi;
2. l'analisi deve essere eseguita con almeno sei replicati ad ogni livello;
3. analizzare i campioni;
4. calcolare la concentrazione rivelata in ciascun campione;
5. calcolare la concentrazione media, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (%) dei campioni fortificati;
6. ripetere tali passaggi in almeno altre due occasioni;
7. calcolare le concentrazioni medie complessive, le deviazioni standard (calcolando la media della deviazione standard al quadrato delle singole occasioni ed estraendo la radice quadrata di tale valore) e i coefficienti di variazione per i campioni fortificati.

Nel caso dei metodi per sostanze autorizzate validati prima della data di entrata in vigore del presente regolamento è sufficiente determinare la ripetibilità del metodo utilizzando matrici fortificate a concentrazioni pari a 0,5, 1,0 e 1,5 volte l'LMR o l'LM.

In alternativa, il calcolo della ripetibilità può essere effettuato conformemente alla norma ISO 5725-2: 2019 ⁽⁷⁾.

2.2.1.4. Riproducibilità intralaboratorio

1. Per le validazioni effettuate dopo la data di entrata in vigore del presente regolamento, preparare una serie di campioni del materiale di prova specificato (matrici identiche o diverse), fortificati con l'analita o gli analiti per ottenere concentrazioni equivalenti a:
 - a) 0,5 ⁽⁵⁾, 1,0 e 1,5 volte il valore di riferimento per interventi, oppure
 - b) 0,1 ⁽⁶⁾, 1,0 e 1,5 volte l'LMR o l'LM per le sostanze autorizzate, oppure
 - c) 1,0, 2,0 e 3,0 volte il livello minimo di taratura per le sostanze non autorizzate o vietate nel caso in cui non sia applicabile nessun valore di riferimento per interventi.
2. Eseguire l'analisi a ciascun livello di concentrazione con almeno sei replicati di materiale bianco.
3. Analizzare i campioni.
4. Calcolare la concentrazione rivelata in ciascun campione.

⁽⁵⁾ Se, per una sostanza farmacologicamente attiva non consentita, la validazione di una concentrazione pari a 0,5 volte il valore di riferimento per interventi non è ragionevolmente ottenibile, la concentrazione di 0,5 volte il valore di riferimento per interventi può essere sostituita dalla concentrazione più bassa ragionevolmente ottenibile tra 0,5 e 1,0 volte il valore di riferimento per interventi.

⁽⁶⁾ Se, per una particolare sostanza farmacologicamente attiva, la validazione di una concentrazione pari a 0,1 volte l'LMR non è ragionevolmente ottenibile, la concentrazione di 0,1 volte l'LMR può essere sostituita dalla concentrazione più bassa ragionevolmente ottenibile tra 0,1 e 0,5 volte l'LMR.

⁽⁷⁾ ISO 5725-2:2019 Accuratezza (esattezza e precisione) dei risultati e dei metodi di misurazione — parte 2: Metodo base per la determinazione della ripetibilità e riproducibilità di un metodo di misurazione normalizzato (clausola 3).

5. Ripetere tali passaggi in almeno altre due occasioni con lotti differenti di materiale bianco, operatori differenti ed in condizioni ambientali il più possibile differenti, ad esempio, lotti di reagenti o di solventi differenti ecc., temperature ambientali differenti, strumenti differenti, oppure una variazione di altri parametri ecc.
6. Determinare la concentrazione media, la deviazione standard ed il coefficiente di variazione (%) dei campioni fortificati.

Nel caso dei metodi per sostanze autorizzate validati prima della data di entrata in vigore del presente regolamento è sufficiente determinare la riproducibilità intralaboratorio utilizzando matrici fortificate a concentrazioni pari a 0,5, 1,0 e 1,5 volte l'LMR o l'LM.

In alternativa, il calcolo della riproducibilità intralaboratorio/precisione intermedia può essere effettuato anche secondo le norme ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 ⁽⁸⁾, Codex CAC/GL 59-2006 ⁽⁹⁾.

2.2.2. Validazione in base a modelli alternativi

Il calcolo dei parametri in base a modelli alternativi richiede l'esecuzione di un piano sperimentale. Il piano sperimentale deve essere progettato in base al numero delle varie specie e dei differenti fattori oggetto di studio. La prima fase dell'intera procedura di validazione consiste pertanto nel prendere in considerazione le popolazioni campionarie che saranno analizzate in laboratorio in futuro, al fine di determinare le specie più importanti e i fattori che possono influenzare i risultati delle misurazioni. L'approccio fattoriale consente di valutare l'incertezza di misura dei risultati delle prove, ottenuti in una varietà di condizioni di prova in un determinato laboratorio, quali analisti differenti, strumenti differenti, lotti di reagenti differenti, matrici differenti, tempi di prova e temperature di prova differenti. Successivamente, l'intervallo di concentrazione deve essere scelto in modo adeguato allo scopo in base all'LMR o all'LM per le sostanze autorizzate o al valore di riferimento per interventi o livello minimo di taratura per le sostanze vietate o non autorizzate.

L'approccio fattoriale mira a stabilire dati di precisione e dati di misurazione affidabili mediante variazione simultanea controllata dei fattori selezionati. Consente di valutare l'impatto combinato degli effetti fattoriali e degli effetti casuali. Il progetto sperimentale consente anche di esaminare la robustezza ⁽¹⁰⁾ del metodo analitico e di determinare la deviazione standard della riproducibilità interna tra le matrici.

Qui di seguito viene presentato un esempio di un approccio alternativo che prevede l'utilizzo di un progetto sperimentale ortogonale.

Possono essere esaminati fino a sette fattori (fattori di rumore). Lo studio è concepito in modo tale che la precisione, l'esattezza (basata su campioni fortificati), la sensibilità, l'incertezza di misura e le concentrazioni critiche possano essere determinate simultaneamente mediante l'attuazione del piano sperimentale.

Tabella 6

Esempio di progetto sperimentale ortogonale con 7 fattori (I — VII) variati a due livelli (A/B) in uno studio di validazione con otto cicli (combinazione di livelli di fattori)

Fattore	I	II	III	IV	V	VI	VII
Ciclo 01	A	A	A	A	A	A	A
Ciclo 02	A	A	B	A	B	B	B
Ciclo 03	A	B	A	B	A	B	B
Ciclo 04	A	B	B	B	B	A	A

⁽⁸⁾ ISO 11843-1:1997 Capacità di rivelazione — parte 1: Termini e definizioni.

⁽⁹⁾ Codex Alimentarius Commission, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Guidelines on estimation of uncertainty of results (CAC/GL 59-2006).

⁽¹⁰⁾ Le modifiche delle condizioni sperimentali ivi menzionate possono riguardare i materiali del campione, gli analiti, le condizioni di conservazione e le condizioni ambientali e/o di preparazione del campione. Per tutte le condizioni sperimentali che possono essere soggette nella pratica ad oscillazione (ad esempio, stabilità dei reagenti, composizione del campione, pH, temperatura) deve essere indicata qualsiasi variazione che possa influenzare il risultato dell'analisi.

Ciclo 05	B	A	A	B	B	A	B
Ciclo 06	B	A	B	B	A	B	A
Ciclo 07	B	B	A	A	B	B	A
Ciclo 08	B	B	B	A	A	A	B

Il calcolo delle caratteristiche del metodo deve essere effettuato come descritto da Jülicher *et al.* ⁽¹¹⁾.

2.2.3. Altri approcci di validazione

Possono essere utilizzati altri approcci per dimostrare che il metodo è conforme ai criteri di rendimento per le caratteristiche pertinenti, a condizione che vengano ottenute informazioni di pari livello e identica qualità. La validazione può inoltre essere eseguita attraverso uno studio interlaboratorio, quali quelli istituiti dal *Codex Alimentarius*, dall'ISO o dall'IUPAC ⁽¹²⁾, oppure in base a metodi alternativi, quali studi di laboratorio singolo o validazione interna ⁽¹³⁾. Ove si applichino procedure di validazione alternative, sono definiti nel protocollo di validazione il modello e la strategia di base con i rispettivi requisiti, ipotesi, e formule o si riportano almeno riferimenti circa la loro disponibilità.

2.3. Selettività/specificità

La capacità di discriminazione tra l'analita e sostanze strettamente collegate deve essere determinata nella massima misura possibile. Occorre determinare l'interferenza di omologhi, isomeri, prodotti di degradazione, sostanze endogene, analoghi, prodotti metabolici del residuo di interesse, dei composti della matrice o di qualsiasi altra sostanza potenzialmente interferente e, se necessario, modificare il metodo per evitare le interferenze identificate. Per determinare la specificità del metodo si utilizza l'approccio seguente:

1. selezionare una gamma di composti chimicamente affini o di altre sostanze che possono essere presenti nei campioni con il composto di interesse e verificare se possano interferire con l'analisi dell'analita o degli analiti bersaglio;
2. analizzare un numero adeguato di campioni bianchi rappresentativi, ad esempio lotti differenti o lotti di specie animali differenti ($n \geq 20$) e verificare la presenza di eventuali interferenze di segnali, picchi o tracce di ioni nella regione di interesse nella quale l'analita bersaglio deve eluire;
3. fortificare campioni bianchi rappresentativi a una concentrazione pertinente con sostanze che potrebbero interferire con l'identificazione e/o la quantificazione dell'analita ed esaminare se la sostanza aggiunta:
 - a) possa indurre una falsa identificazione;
 - b) ostacoli l'identificazione dell'analita bersaglio;
 - c) influenzi considerevolmente la quantificazione.

2.4. Robustezza

Il metodo analitico deve essere testato per verificare il suo rendimento continuo in differenti condizioni sperimentali tra cui, ad esempio, differenti condizioni di campionamento e modifiche marginali che possono verificarsi nelle prove di routine. Per testare la robustezza del metodo, le modifiche introdotte nelle condizioni sperimentali devono essere di scarsa entità. L'importanza di tali modifiche deve essere valutata. Per tutte le modifiche minori che hanno dimostrato di avere un effetto significativo sul rendimento dell'analisi deve essere determinata ogni caratteristica di rendimento.

⁽¹¹⁾ 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*, 120, 173.

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

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

2.5. Stabilità

Occorre determinare la stabilità dello standard di taratura, standard a matrice abbinata e/o standard a matrice fortificata e dei componenti dell'analita o della matrice contenuti nel campione durante la conservazione o l'analisi, in quanto le instabilità possono influenzare i risultati della prova.

La stabilità dell'analita è in genere ben caratterizzata in svariate condizioni di conservazione. Gli esperimenti effettuati per monitorare le condizioni di conservazione degli standard e dei campioni, effettuati nell'ambito del normale sistema di accreditamento del laboratorio e di controllo della qualità, possono fornire le informazioni richieste. Se sono disponibili dati sulla stabilità degli analiti nella matrice (ad esempio sulla base delle informazioni fornite dai laboratori di riferimento dell'UE, dei dati pubblicati ecc.), non è necessario che tali dati siano determinati da ciascun laboratorio. Il riferimento a dati disponibili sulla stabilità degli analiti in soluzione e nella matrice è tuttavia accettabile solo se sono applicate condizioni identiche.

Qualora non siano disponibili i dati sulla stabilità richiesti, devono essere utilizzati gli approcci seguenti.

2.5.1. Determinazione della stabilità dell'analita in soluzione

1. Preparare soluzioni di base fresche dell'analita/degli analiti e diluire secondo quanto specificato nelle istruzioni di prova per ottenere un numero di aliquote sufficiente (ad esempio, 40) di ciascuna concentrazione selezionata. I campioni devono essere costituiti da:
 - a) soluzioni dell'analita utilizzate per la fortificazione;
 - b) soluzioni di analita utilizzate per l'analisi finale;
 - c) qualsiasi altra soluzione che possa interessare (ad esempio standard derivatizzati).
2. Misurare il contenuto di analita nella soluzione appena preparata attenendosi alle istruzioni di prova.
3. Distribuire volumi appropriati in contenitori adeguati, etichettare e conservare in base alle condizioni di luce e temperatura dello schema di cui alla tabella 7. Il tempo di conservazione deve essere scelto tenendo conto della pratica analitica applicata, idealmente fino a quando i primi fenomeni di degradazione non siano osservabili durante l'identificazione e/o la quantificazione. Se durante lo studio di stabilità non si osserva alcuna degradazione, la durata di conservazione dello studio di stabilità deve essere uguale alla durata del periodo massimo di conservazione della soluzione.
4. Calcolare la concentrazione dell'analita o degli analiti in ciascuna aliquota rispetto alla concentrazione dell'analita nella soluzione appena preparata, seguendo la formula seguente:

$$\text{Analita restante (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fresca}}$$

C_i = concentrazione al momento i

C_{fresca} = concentrazione della soluzione fresca

Il valore medio di cinque soluzioni replicate conservate non deve differire di oltre il 15 % dal valore medio di cinque soluzioni replicate appena preparate. Il valore medio delle cinque soluzioni appena preparate è utilizzato come base per calcolare la differenza percentuale.

Tabella 7

Schema per la determinazione della stabilità dell'analita in soluzione

	-20 °C	+4 °C	+20 °C
Buio	10 aliquote	10 aliquote	10 aliquote
Luce			10 aliquote

2.5.2. Determinazione della stabilità dell'analita/degli analiti nella matrice

1. Quando possibile, utilizzare campioni «incurred». Ove non sia disponibile alcuna matrice «incurred», deve essere utilizzata una matrice bianca fortificata con l'analita.

2. Ove sia disponibile una matrice «incurred», determinare la concentrazione nella matrice finché è ancora fresca. Conservare ulteriori aliquote della matrice «incurred» omogeneizzata alla temperatura di -20°C o inferiore, se necessario, e determinare le concentrazioni dell'analita finché il campione è conservato in laboratorio.
3. Se non è disponibile alcuna matrice «incurred», prendere della matrice bianca e omogeneizzarla. Dividere la matrice in cinque aliquote. Fortificare ciascuna aliquota con l'analita, che deve preferibilmente essere preparato in una piccola quantità di soluzione acquosa. Analizzare un'aliquota immediatamente. Conservare le aliquote rimanenti a una temperatura di almeno -20°C o inferiore, se necessario, e analizzarle dopo la conservazione a breve, medio e lungo termine, tenendo conto dei metodi analitici applicati.
4. Registrare il tempo massimo di conservazione accettabile e le condizioni ottimali di conservazione.

Il valore medio di cinque soluzioni replicate conservate non deve differire di più della riproducibilità intralaboratorio del metodo dal valore medio di cinque soluzioni replicate appena preparate. Il valore medio delle cinque soluzioni appena preparate è utilizzato come base per calcolare la differenza percentuale.

2.6. Limite di decisione di conferma (CCa)

Per i metodi di conferma deve essere determinato il CCa. Il CCa deve essere stabilito in condizioni conformi alle prescrizioni relative all'identificazione o identificazione più quantificazione secondo le definizioni di cui al capitolo 1 «Criteri di rendimento e altre prescrizioni per i metodi analitici».

Per il controllo della conformità dei campioni, l'incertezza di misura standard combinata è già stata presa in considerazione nel valore CCa (limite di decisione di conferma).

1. Per le sostanze farmacologicamente attive non autorizzate o vietate il CCa deve essere calcolato nel modo seguente:
 - a) metodo 1: per mezzo della procedura della curva di taratura in base alla ISO 11843-1:1997 ⁽¹⁴⁾ (qui: valore critico della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco che viene fortificato al e oltre il valore di riferimento per interventi o livello minimo di taratura, ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni. Dopo l'identificazione, tracciare un grafico del segnale, se possibile, o della concentrazione ricalcolata rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente al punto di intercettazione dell'asse y più 2,33 volte la deviazione standard della riproducibilità intralaboratorio al punto di intercettazione equivale al limite di decisione. Questo metodo si applica solo alle analisi quantitative. I limiti di decisione ottenuti con questo approccio devono essere verificati analizzando la matrice bianca fortificata al limite di decisione calcolato;
 - b) metodo 2: analizzando almeno 20 materiali bianchi rappresentativi per matrice per essere in grado di calcolare il rapporto segnale-rumore nell'intervallo di tempo nel quale è previsto l'analita. Come limite di decisione può essere utilizzato il triplo del rapporto segnale-rumore. Questo metodo si può applicare alle analisi quantitative e qualitative. I limiti di decisione ottenuti con questo approccio devono essere verificati analizzando la matrice bianca fortificata al limite di decisione calcolato;
 - c) metodo 3: $\text{CCa} = \text{LCL} + k(\text{unilaterale}, 99\%) \times \text{incertezza di misura standard (combinata) al livello minimo di taratura}$

Per le sostanze farmacologicamente attive non autorizzate o vietate, a seconda dell'esperimento di validazione (e dei rispettivi gradi di libertà), la distribuzione t potrebbe essere ragionevolmente applicata o — se si prende come base la distribuzione gaussiana (unilaterale, $n = \infty$) — si deve utilizzare un fattore k di 2,33.

La riproducibilità intralaboratorio e l'esattezza sono idonee a definire l'incertezza di misura standard (combinata), se determinate tenendo conto di tutti i fattori d'influenza pertinenti.

Il metodo 2 per il calcolo del CCa può essere utilizzato solo fino al 1° gennaio 2026 nel caso di metodi validati prima della data di entrata in vigore del presente regolamento. Per i metodi validati dopo l'entrata in vigore del presente regolamento, si utilizzano solo i metodi 1 o 3.

⁽¹⁴⁾ ISO 11843-1:1997 Capacità di rivelazione — parte 1: Termini e definizioni.

2. Per le sostanze autorizzate il CC α deve essere calcolato nel modo seguente:

- a) per le sostanze autorizzate in combinazioni di matrici/specie per le quali è stato fissato un LMR o un LM:
 - i) metodo 1: per mezzo della procedura della curva di taratura in base alla ISO 11843-1:1997 (qui: valore critico della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco che viene fortificato al e oltre l'LMR o l'LM, ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni. Dopo l'identificazione, tracciare un grafico del segnale, se possibile, o della concentrazione ricalcolata rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente all'LMR o all'LM più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intralaboratorio al limite consentito equivale al limite di decisione ($\alpha = 5\%$);
 - ii) metodo 2: $CC\alpha = \text{LMR (o LM)} + k(\text{unilaterale, } 95\%) \times \text{incertezza di misura standard (combinata) all'LMR o all'LM.}$

Per le sostanze autorizzate, a seconda dell'esperimento di validazione (e dei rispettivi gradi di libertà), la distribuzione t potrebbe essere ragionevolmente applicata o — se si prende come base la distribuzione gaussiana (unilaterale, $n = \infty$) — si deve utilizzare un fattore k di 1,64.

La riproducibilità intralaboratorio e l'esattezza sono idonee a definire l'incertezza di misura standard (combinata), se determinate tenendo conto di tutti i fattori d'influenza pertinenti.

Per le sostanze farmacologicamente attive per le quali l'LMR è stabilito per la somma di sostanze diverse, il CC α della sostanza con la concentrazione più elevata nel campione deve essere utilizzato come CC α per valutare la somma delle sostanze nel campione misurato;

- b) per le sostanze autorizzate in combinazioni di matrici/specie per le quali non sono stati fissati LMR non devono essere presenti residui, a meno che non sia stato effettuato un trattamento autorizzato a norma dell'articolo 11 della direttiva 2001/82/CE. Per le sostanze autorizzate per le quali non è stato fissato alcun LMR, per il calcolo del CC α è utilizzato l'LMR «a cascata» stabilito a norma del regolamento di esecuzione (UE) 2018/470 della Commissione ⁽¹⁵⁾. Si applica il metodo 1 o 2 del paragrafo precedente, ma «LMR» si riferisce all'«LMR 0,5 volte a cascata, con l'obiettivo dell'LMR 0,1 volte a cascata, ove ragionevolmente fattibile».

2.7. Capacità di rivelazione di screening (CC β)

Per i metodi di screening deve essere determinata la CC β . La CC β è stabilita come definito al capitolo 1 «Criteri di rendimento e altre prescrizioni per i metodi analitici» del presente allegato e conformemente alle prescrizioni di cui alla tabella 5. Tuttavia, per i metodi di screening non è necessario applicare le prescrizioni complete per l'identificazione (cfr. punti 1.2.3, 1.2.4, 1.2.5).

1. Per le sostanze farmacologicamente attive non autorizzate o vietate, deve essere garantito un errore massimo β del 5 %. La CC β è calcolata come segue:

- a) metodo 1: procedura della curva di taratura in base alla ISO 11843-1:1997 (qui: valore minimo rivelabile della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco rappresentativo, che viene fortificato al valore di riferimento per interventi e al di sotto di tale valore oppure, se non è stato stabilito alcun valore di riferimento per interventi, intorno alla concentrazione bersaglio per lo screening, ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni. Tracciare il grafico del segnale rispetto alla concentrazione aggiunta. La concentrazione corrispondente alla concentrazione bersaglio per lo screening più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intralaboratorio del contenuto medio misurato alla concentrazione bersaglio per lo screening equivale alla capacità di rivelazione. Un'estrapolazione molto inferiore al livello di fortificazione più basso ($< 50\%$ del livello di fortificazione più basso) deve essere confermata da dati sperimentali nella fase di convalida;
- b) metodo 2: studio del materiale bianco fortificato a livelli di concentrazione uguali o superiori alla concentrazione bersaglio per lo screening. Per ciascun livello di concentrazione devono essere analizzati 20 bianchi fortificati al fine di garantire una base affidabile per tale determinazione. Il livello di concentrazione al quale rimane solo $\leq 5\%$ di risultati falsi conformi equivale alla capacità di rivelazione del metodo;
- c) metodo 3: $CC\beta = \text{concentrazione bersaglio per lo screening} + k(\text{unilaterale, } 95\%) \times \text{incertezza di misura standard (combinata) alla, o superiore alla, concentrazione bersaglio per lo screening.}$

⁽¹⁵⁾ Regolamento di esecuzione (UE) 2018/470 della Commissione, del 21 marzo 2018, recante norme dettagliate relative al limite massimo di residui da prendere in considerazione a scopo di controllo per i prodotti alimentari derivati da animali che sono stati trattati nell'UE a norma dell'articolo 11 della direttiva 2001/82/CE (GU L 79 del 22.3.2018, pag. 16).

Per le sostanze farmacologicamente attive non autorizzate o vietate, a seconda dell'esperimento di validazione (e dei rispettivi gradi di libertà), la distribuzione t potrebbe essere ragionevolmente applicata o — se si prende come base la distribuzione gaussiana (unilaterale, $n = \infty$) — si deve utilizzare un fattore k di 1,64.

La riproducibilità intralaboratorio e l'esattezza sono idonee a definire l'incertezza di misura standard (combinata), se determinate tenendo conto di tutti i fattori d'influenza pertinenti.

2. Per le sostanze autorizzate deve essere garantito un errore massimo β del 5 %. La $CC\beta$ è calcolata come segue:

- a) metodo 1: per mezzo della procedura della curva di taratura in base alla ISO 11843-1:1997 (qui: valore minimo rivelabile della variabile netta di stato). In questo caso è impiegato materiale bianco rappresentativo, che viene fortificato al livello consentito e al di sotto di tale livello, a partire dalla concentrazione bersaglio per lo screening, ad intervalli equidistanti. Analizzare i campioni ed identificare l'analita/gli analiti. Calcolare la deviazione standard del contenuto medio misurato alla concentrazione bersaglio per lo screening.

La concentrazione corrispondente alla concentrazione bersaglio per lo screening più 1,64 volte la deviazione standard della riproducibilità intralaboratorio del contenuto medio misurato alla concentrazione bersaglio per lo screening equivale alla capacità di rivelazione;

- b) metodo 2: per mezzo dello studio del materiale bianco fortificato a livelli di concentrazione inferiori al limite consentito. Per ciascun livello di concentrazione devono essere analizzati 20 bianchi fortificati al fine di garantire una base affidabile per tale determinazione. Il livello di concentrazione al quale rimane solo ≤ 5 % di risultati falsi conformi equivale alla capacità di rivelazione del metodo;
- c) metodo 3: $CC\beta$ = concentrazione bersaglio per lo screening + $k(\text{unilaterale, } 95 \%) \times \text{incertezza di misura standard (combinata)}$ alla o superiore alla concentrazione bersaglio per lo screening.

Per le sostanze autorizzate, a seconda dell'esperimento di validazione (e dei rispettivi gradi di libertà), la distribuzione t potrebbe essere ragionevolmente applicata o — se si prende come base la distribuzione gaussiana (unilaterale, $n = \infty$) — si deve utilizzare un fattore k di 1,64 (sia con l'uso «a cascata», sia con l'uso regolare dell'LMR).

La riproducibilità intralaboratorio e l'esattezza sono idonee a definire l'incertezza di misura standard (combinata), se determinate tenendo conto di tutti i fattori d'influenza pertinenti.

Per le sostanze farmacologicamente attive per le quali l'LMR è stabilito per la somma di sostanze diverse, la $CC\beta$ della sostanza con la concentrazione più elevata nel campione deve essere utilizzata come $CC\beta$ per valutare la somma delle sostanze nel campione misurato.

2.8. Curve di taratura

Quando per la quantificazione vengono impiegate curve di taratura:

- 1) nella costruzione della curva devono essere utilizzati almeno cinque livelli preferibilmente equidistanti (compreso lo zero);
- 2) si deve descrivere l'intervallo operativo della curva;
- 3) si deve descrivere la formula matematica della curva e la bontà dell'adattamento dei dati (coefficiente di determinazione R^2) sulla curva;
- 4) si devono descrivere gli intervalli di accettabilità per i parametri della curva.

Per le curve di taratura basate su una soluzione standard, su standard a matrice abbinata o su standard a matrice fortificata, devono essere indicati intervalli accettabili per i parametri della curva di taratura, che possono variare da serie a serie.

2.9. Recupero assoluto

Il recupero assoluto del metodo deve essere determinato se non si usa uno standard interno o una taratura della matrice fortificata.

Quando sono soddisfatti i requisiti di esattezza di cui alla tabella 1, può essere utilizzato un fattore di correzione fisso. In caso contrario deve essere utilizzato il fattore di recupero ottenuto per quel lotto specifico. In alternativa, anziché un fattore di correzione del recupero, deve essere utilizzata la procedura di addizione standard ⁽¹⁶⁾ o uno standard interno.

Il recupero assoluto è calcolato per almeno sei lotti rappresentativi di matrice.

Un'aliquota di matrice bianca deve essere fortificata con l'analita prima dell'estrazione e una seconda aliquota di matrice bianca deve essere fortificata dopo la preparazione del campione a un livello di concentrazione pertinente e deve essere determinata la concentrazione dell'analita.

Il recupero è calcolato come segue:

$$\text{Rec (analita)} = (\text{standard a matrice fortificata})/(\text{standard a matrice abbinata}) \times 100$$

2.10. Effetti matrice relativi

L'effetto matrice relativo deve essere determinato in tutti i casi. Lo si può fare nell'ambito della validazione o in esperimenti separati. Il calcolo dell'effetto matrice relativo deve essere effettuato per almeno 20 diversi lotti bianchi (matrici/specie), a seconda dell'ambito di applicazione del metodo, ad esempio diverse specie da coprire.

La matrice bianca deve essere fortificata dopo l'estrazione con l'analita al valore di riferimento per interventi, all'LMR o all'LM e deve essere analizzata insieme a una soluzione pura dell'analita.

L'effetto matrice relativo o il fattore matrice è calcolato come segue:

$$\text{MF (standard)} = \text{MF (standard)} = \frac{\text{area del picco dello standard MMS}}{\text{area del picco della soluzione standard}}$$

$$\text{MF (IS)} = \frac{\text{area del picco MMS IS}}{\text{area del picco della soluzione IS}}$$

$$\text{MF (standard normalizzato per IS)} = \frac{\text{MF (standard)}}{\text{MF (IS)}}$$

IS: standard interno (internal standard)

MMS: standard a matrice abbinata (matrix-matched standard)

Il coefficiente di variazione non deve essere superiore al 20 % per il fattore matrice (standard normalizzato per IS).

CAPITOLO 3

CONTROLLO DELLA QUALITÀ DURANTE LE ANALISI DI ROUTINE — VERIFICA DEL RENDIMENTO DEL METODO IN CORSO

Devono essere rispettate le prescrizioni relative alla qualità dei risultati analitici di cui al capitolo 7.7 della norma ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁷⁾.

Durante le analisi di routine, l'analisi dei materiali di riferimento certificati (MRC) è l'opzione preferibile per dimostrare il rendimento del metodo. Poiché raramente sono disponibili MRC che contengono gli analiti pertinenti ai livelli di concentrazione richiesti, possono essere utilizzati come alternativa anche materiali di riferimento forniti e caratterizzati dai laboratori di riferimento dell'Unione europea o dai laboratori che possiedono un accreditamento ISO/IEC 17043:2010 ⁽¹⁸⁾. Come ulteriore alternativa possono essere utilizzati materiali di riferimento interni, controllati periodicamente.

La verifica del rendimento del metodo in corso durante l'analisi di routine va effettuata nella fase di screening e nella fase di conferma.

⁽¹⁶⁾ La quantità dell'analita standard aggiunta può essere compresa, ad esempio, tra due e cinque volte la quantità stimata dell'analita nel campione. Tale procedura è studiata per determinare il contenuto di un analita in un campione, prendendo in considerazione il recupero della procedura analitica.

⁽¹⁷⁾ ISO/IEC 17025:2017 Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura (capitolo 7.7).

⁽¹⁸⁾ ISO/IEC 17043:2010 Valutazione della conformità — Requisiti generali per prove valutative interlaboratorio.

1. Per la fase di screening:

per ogni serie (lotto) di analisi eseguita deve essere analizzata contemporaneamente una serie dei seguenti campioni di controllo della qualità:

- a) campione di controllo per l'idoneità sistemica dello strumento, idealmente specifico per il metodo;
- b) campioni di controllo della qualità, fortificati a una concentrazione prossima alla concentrazione bersaglio per lo screening e idealmente alla CC β dello screening per le sostanze farmacologicamente attive autorizzate nonché per le sostanze vietate o non autorizzate;
- c) campione di controllo conforme (campioni bianchi) e, se pertinenti, reagenti bianchi.

2. Per la fase di conferma:

per ogni serie (lotto) di analisi eseguita deve essere analizzata contemporaneamente una serie dei seguenti campioni di controllo della qualità:

- a) campione di controllo per l'idoneità sistemica dello strumento, idealmente specifico per il metodo;
- b) campioni di controllo della qualità, fortificati a una concentrazione prossima all'LMR o all'LM per le sostanze farmacologicamente attive autorizzate o in prossimità del valore di riferimento per interventi o del livello minimo di taratura per le sostanze vietate o non autorizzate (campioni di controllo non conformi);
- c) campione di controllo conforme (campioni bianchi) e, se pertinenti, reagenti bianchi.

Per i campioni di controllo della qualità si raccomanda il seguente ordine: campione di controllo per l'idoneità sistemica dello strumento, campione di controllo conforme, campione/i da confermare, nuovo campione di controllo conforme e campione di controllo di qualità fortificato (campioni di controllo non conformi).

Per i metodi quantitativi con ciascun lotto di campioni ufficiali occorre analizzare e misurare una curva di taratura prima o dopo i campioni appena elencati.

Ove possibile deve essere valutata l'esattezza (sulla base di campioni fortificati) di tutti gli analiti bersaglio nei campioni di controllo non conformi, mediante diagrammi di controllo della qualità conformemente al capitolo 7.7 della norma ISO/IEC 17025:2017. Se ciò richiede un numero sproporzionatamente elevato di determinazioni di esattezza, il numero di analiti può essere ridotto limitandosi a una serie di analiti rappresentativi.

CAPITOLO 4

AMPLIAMENTO DELL'AMBITO DI APPLICAZIONE VALIDATO DI UN METODO GIÀ VALIDATO

Talvolta è necessario ampliare l'ambito di applicazione di un metodo già interamente validato. In questi casi l'ampliamento del campo di applicazione dovrebbe essere effettuato in modo efficiente e analiticamente valido. Può essere effettuato convalidando un numero ridotto di campioni (ad esempio la metà) rispetto ad una validazione completa.

Il tipo e il numero di modifiche da validare in un unico sistema di validazione ridotta devono tuttavia essere sempre fondati su conoscenze specialistiche ed esperienze precedenti, ad esempio un cambiamento nella tecnica di rivelazione richiederebbe in ogni caso una validazione completa.

In generale, per garantire il mantenimento della validità del metodo, il suo rendimento deve essere monitorato in modo continuo e confrontato con i parametri di validazione ottenuti inizialmente. Questo controllo continuo del rendimento del metodo è idealmente concepito in modo tale che i dati mancanti per una validazione completa possano essere raccolti nel tempo (ad esempio con alcuni punti di dati provenienti da campioni di controllo della qualità in ciascuna serie analitica).

4.1. Ampliamenti dei metodi per quanto riguarda l'intervallo di concentrazioni

A causa di modifiche degli LMR, degli LM e dei valori di riferimento per interventi può risultare necessario adeguare l'intervallo di concentrazione per il quale un metodo è validato. In tal caso è accettabile l'applicazione di un sistema di validazione ridotta.

Le curve di taratura per l'intervallo modificato devono essere preparate secondo la procedura validata. Occorre analizzare diversi lotti fortificati a diversi livelli di concentrazione (cfr. punti 2.2.1 e 2.2.2). L'esattezza, la ripetibilità e la riproducibilità intralaboratorio/precisione intermedia devono rientrare in un intervallo accettabile rispetto al metodo originariamente validato. Se del caso, occorre ricalcolare la CC β (metodi di screening) e il CC α (metodi di conferma).

4.2. Ampliamenti dei metodi a sostanze aggiuntive

In generale ampliare l'applicazione del metodo a composti aggiuntivi è possibile solo per gli analiti simili dal punto di vista strutturale e delle caratteristiche a quelli già inclusi nel metodo analitico. In tal caso è accettabile l'applicazione di un sistema di validazione ridotta. Non sono però ammesse divergenze dalla descrizione del metodo.

Le curve di taratura per le sostanze aggiuntive devono essere preparate secondo la procedura validata. Occorre analizzare diversi lotti di materiali matrice fortificati a diversi livelli di concentrazione (cfr. punti 2.2.1 e 2.2.2). L'esattezza, la ripetibilità e la riproducibilità intralaboratorio/precisione intermedia devono rientrare in un intervallo comparabile a quelli degli altri analiti del metodo originariamente validato e in linea con le prescrizioni di cui al punto 1.2.2. Per i nuovi analiti occorre calcolare la CC β (metodi di screening) e il CC α (metodi di conferma).

4.3. Ampliamenti dei metodi per quanto riguarda le matrici/specie

L'inclusione di nuove matrici o specie in un metodo analitico già validato deve sempre essere decisa caso per caso sulla base delle conoscenze e delle esperienze acquisite con il metodo e degli esperimenti preliminari che valutano i potenziali effetti matrice e le interferenze. In generale ciò sarà possibile solo per le matrici che presentano proprietà simili e per gli analiti non critici (stabilità, rivelabilità).

Le curve di taratura (standard o matrice) devono essere preparate secondo la procedura validata. Occorre analizzare diversi lotti di materiale matrice fortificato a diversi livelli di concentrazione (cfr. punti 2.2.1 e 2.2.2). L'esattezza, la ripetibilità e la riproducibilità intralaboratorio/precisione intermedia devono rientrare in un intervallo accettabile rispetto al metodo originariamente validato e in linea con le prescrizioni di cui al punto 1.2.2. A seconda dell'approccio di validazione potrebbe essere necessario ricalcolare la CC β (metodi di screening) o il CC α (metodi di conferma).

Se i risultati non rientrano in un intervallo accettabile rispetto ai valori della matrice originale, sarà necessaria un'ulteriore validazione completa per determinare i parametri di rendimento specifici della matrice/specie.

Nei casi in cui gli LMR per una specifica sostanza differiscono per determinate matrici, sarà molto probabilmente difficile adattare l'ambito di applicazione del metodo alla matrice/alla specie e alla concentrazione aggiuntive, poiché in tal caso devono essere prese in considerazione due modifiche. In questi casi si raccomanda una validazione completa.
