

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΧΗΜΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΩΣ ΕΠΙΤΥΓΧΑΝΕΤΑΙ ΚΑΙ ΠΟΥ ΣΤΟΧΕΥΕΙ

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΒΟΥΛΓΑΡΟΠΟΥΛΟΣ
ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
54124 ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ
e-mail: youlgaro@chem.auth.gr

1. Εισαγωγή

Η επιλογή και η ανάπτυξη μεθόδων χημικής ανάλυσης αποτελούν παραδοσιακά τον επιθυμητό στόχο για τα εργαστήρια χημικής ανάλυσης, συχνά μέχρι τέτοιο βαθμό που η πρακτική εφαρμογή της μεθόδου να παραμελείται. Ενδεχομένως αυτό συμβαίνει, επειδή μετά την ανάπτυξη των χημικών μεθόδων ανάλυσης, οι μέθοδοι αυτές υιοθετούνται από τους Οργανισμούς Τυποποίησης αλλά στη συνέχεια δεν υπάρχει δυνατότητα να ελεγχθεί αποτελεσματικά κατά πόσο πιστά και σωστά εφαρμόζονται.

Παρόλα αυτά, η παραδοσιακή αυτή προσέγγιση υποσκελίζεται πλέον σήμερα από την ανάγκη της πιστής και σωστής εφαρμογής της μεθόδου χημικής ανάλυσης, ώστε τα αποτελέσματα να είναι αξιόπιστα.

Η μέθοδος που θα επιλεγεί για τη χημική ανάλυση συγκεκριμένου δείγματος πρέπει να είναι η πιο κατάλληλη για τον προσδιορισμό συγκεκριμένου ή συγκεκριμένων συστατικών στο συγκεκριμένο υλικό του δείγματος και στη συγκεκριμένη περιοχή συγκεντρώσεων του συστατικού ή των συστατικών.

Η μέθοδος της χημικής ανάλυσης πρέπει συνεπώς να είναι κατάλληλη για τη λύση του εκάστοτε αναλυτικού προβλήματος, ώστε να "εκπληρώνονται οι απαιτήσεις" του χρήστη των αποτελεσμάτων που θα προκύψουν από τη συγκεκριμένη χημική ανάλυση.

Το πρώτο βήμα σε μία "διαδικασία πλήρους επικύρωσης" θα πρέπει επομένως να είναι η ταυτοποίηση και καταγραφή "των απαιτήσεων του χρήστη" και του αναλυτικού προβλήματος; να διαπιστωθεί το τι είναι από αναλυτική και οικονομική άποψη εφικτό καθώς και να προσδιοριστούν και άλλες ιδιαίτερες απαιτήσεις σχετικά με τη δειγματοληψία, το εργαστηριακό περιβάλλον, το εξωτερικό περιβάλλον κ.λ.π.

Λέξεις Κλειδιά: *Επικύρωση, νομοθεσία, αναλυτική μέθοδος, δοκιμή συνεργασίας.*

2. Επιλογή μεθόδων ανάλυσης, κατηγορίες επικύρωσης και τα κριτήρια προσέγγισης μεθόδων ανάλυσης.

Οι αναλυτικές μέθοδοι πρέπει να επιλέγονται με βάση τις απαιτήσεις του πελάτη. Σε πολλές περιπτώσεις αυτό είναι δυνατό μόνο αν το αναλυτικό εργαστήριο βοηθάει τον πελάτη να επιλέξει τη μέθοδο, αφού συχνά οι πελάτες δεν έχουν εξειδικευμένη γνώση αναλυτικής χημείας. Προϋπόθεση για επιτυχή επιλογή είναι να τεκμηριώνεται ο σκοπός της ανάλυσης ή της εξέτασης μαζί με άλλες ιδιαίτερες απαιτήσεις, σε μια αναλυτική παραγγελία /απαίτηση ή σ' ένα σχέδιο προγράμματος ή μελέτης (1).

Εργαστήρια που επιτελούν αναλύσεις για επίσημο έλεγχο δεν έχουν πάντα την ελευθερία επιλογής της μεθόδου. Σε πολλές περιπτώσεις οι μέθοδοι υπαγορεύονται από τη νομοθεσία, π.χ. τόσο η εθνική νομοθεσία όσο και η νομοθεσία της Ε.Ε. συχνά εξειδικεύουν τις μεθόδους αναφοράς που πρέπει να χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις αντιδικίας.

Σε μερικές περιπτώσεις τα εργαστήρια χρησιμοποιούν μεθόδους που έχουν αναπτύξει ενδοεργαστηριακά ή πρότυπες μεθόδους τις οποίες έχουν τροποποιήσει

σημαντικά. Αυτές οι μέθοδοι πρέπει να επικυρώνονται στις σχετικές περιοχές συγκέντρωσης, πριν χρησιμοποιηθούν σε καθημερινή βάση.

Αν η μέθοδος που θα επιλεγεί είναι μια καθιερωμένη πρότυπη μέθοδος αναφοράς το μόνο που συνήθως χρειάζεται το εργαστήριο είναι να επιτύχει τα χαρακτηριστικά της ανάλυσης που δίνονται στη μέθοδο, ιδιαίτερα την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα, ενώ παράλληλα να δείξει ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για την προτιθέμενη χρήση (πίνακας1)

Πίνακας 1

Υπάρχουσα Επικύρωση	Απαιτήσεις Εργαστηρίου
Πλήρως επικυρωμένη μέθοδος (η οποία έχει μελετηθεί πλήρως μέσω μιας δοκιμής συνεργασίας)	Επιβεβαίωση ότι το εργαστήριο είναι ικανό να επιτύχει τα χαρακτηριστικά της απόδοσης της μεθόδου (ή ότι είναι ικανό να πληροί τις απαιτήσεις του αναλυτικού στόχου)
Πλήρως επικυρωμένη μέθοδος, αλλά έχουν χρησιμοποιηθεί νέα μητρικά υλικά ή νέα όργανα	Επιβεβαίωση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας, πιθανόν και του ορίου ανίχνευσης
Καλά καθιερωμένη μέθοδος αλλά που δεν έχει μελετηθεί μέσω δοκιμής συνεργασίας	Επιβεβαίωση, συνοδευόμενη από περιορισμένη επικύρωση, (π.χ. σε σχέση με την επαναληψτικότητα και την αναπαραγωγιμότητα)
Δημοσιευμένη μέθοδος στην επιστημονική βιβλιογραφία: δίνονται τα χαρακτηριστικά	Επιβεβαίωση συνοδευόμενη από περιορισμένη επικύρωση, (π.χ. λαμβάνοντας υπόψη την επαναληψιμότητα)
Δημοσιευμένη μέθοδος στην επιστημονική βιβλιογραφία: δεν δίνονται τα χαρακτηριστικά	Πλήρης επικύρωση και επιβεβαίωση
Μέθοδος που αναπτύσσεται ενδοεργαστηριακά	Πλήρης επικύρωση και επιβεβαίωση

Η ένταση και η φύση τέτοιας εργασίας επιβεβαίωσης εξαρτώνται από τις απαιτήσεις του πελάτη. Αν, για παράδειγμα, η μέθοδος μπορεί να δώσει επαναληψιμότητα 1%, ενώ απαιτείται μόνο 5%, είναι συνήθως επαρκές, αν το εργαστήριο είναι σε θέση να καταδείξει ότι επιτυγχάνεται επαναληψιμότητα 5%.

Πρέπει να σημειωθεί και να εκτιμηθεί, ότι όλες οι μέθοδοι που έχουν υιοθετηθεί και δημοσιευτεί από τους διεθνείς οργανισμούς τυποποίησης έχουν επικυρωθεί με δοκιμές συνεργασίας πλήρους εκτέλεσης της μεθόδου διεργαστηριακά.

2.1 Η εισαγωγή στο εργαστήριο μιας νέας ή μη εξοικειωμένης μεθόδου.

2.1.1. Ευθύνη για τη διεξαγωγή επικύρωσης επιβεβαίωσης.

Όταν ένα εργαστήριο προτίθεται να χρησιμοποιήσει μια μέθοδο με την οποία δεν είναι εξοικειωμένο, είναι δική του ευθύνη να επιβεβαιώσει ότι είναι ικανό να χρησιμοποιήσει τη μέθοδο. Συνήθως εθνικοί ή διεθνείς οργανισμοί, όπως AOAC

INTERNATIONAL, International Organization for Standardization (ISO) κ.λ.π. έχουν αναλάβει τη διεργαστηριακή επικύρωση της μεθόδου. Η έκταση της εσωτερικής επικύρωσης και επιβεβαίωσης του εργαστηρίου εξαρτάται από το γενικό πλαίσιο στο οποίο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος. Μερικές προτάσεις ως προς την έκταση των μέτρων επικύρωσης και επιβεβαίωσης δίνονται στον πίνακα 1.

2.1.2. Απαιτήσεις Επάρκειας

Η εισαγωγή νέων αναλυτικών μεθόδων απαιτεί πως, τόσο τα μέρη που αναπτύσσουν και επικυρώνουν τις μεθόδους όσο και το εργαστήριο που στη συνέχεια θα επιβεβαιώσει τη δυνατότητά του να τις χρησιμοποιήσει σε καθημερινή βάση, είναι επαρκή, δηλαδή διαθέτουν την απαραίτητη γνώση, εμπειρία και επαγγελματικότητα. Όταν πρόκειται να εφαρμοστούν νέες αναλυτικές τεχνικές που βασίζονται για παράδειγμα, σε ιδιότητες του DNA, τότε το εργαστήριο θα πρέπει να προσλάβει νέο εξειδικευμένο προσωπικό.

Δεν είναι ασυνήθιστο νέες συλλογές ταχέων δοκιμών (kit tests) να κυκλοφορούν στο εμπόριο με το σχόλιο πως είναι ‘‘τόσο απλές ώστε ο καθένας να μπορεί να τις χρησιμοποιήσει’’. Συχνά αυτό δεν είναι σωστό και είναι αναγκαίο για το εργαστήριο να αποκτήσει νέα τεχνογνωσία ή να διευρύνει την εμπειρία του, πριν αρχίσει να χρησιμοποιεί τη νέα συλλογή.

Οι κατασκευαστές συλλογών ταχείας ανάλυσης κάνουν μερικές φορές μικρές αλλαγές στην τεκμηρίωση αλλά και στη σύσταση της συλλογής· έτσι είναι απαραίτητο για το χρήστη να είναι καλά πληροφορημένος και παρατηρητικός αλλά επίσης να διαβάξει προσεκτικά κάθε οδηγία που συνοδεύει τις συλλογές.

Η γνώση των συστατικών που περιέχονται μπορεί να είναι κρίσιμη, για παράδειγμα, όταν χρησιμοποιούνται πολύπλοκα αντισώματα στις αναλύσεις ELISA, ή ρυθμιστικά Tris σε αναλύσεις PCR.

2.1.3. Αξιολόγηση δημοσιευμένων δεδομένων επικύρωσης και επιβεβαίωσης

Αποτελέσματα επικύρωσης, δηλαδή τα χαρακτηριστικά απόδοσης αναλυτικών μεθόδων, δίνονται συχνά ως δεδομένα επαναληπτικότητας και αναπαραγωγιμότητας κανονικά ως τυπικές αποκλίσεις ή σχετικές τυπικές αποκλίσεις.

Η αξία των δημοσιευμένων δεδομένων ποικίλλει εξαρτώμενη από την έκταση της επικύρωσης ή της επιβεβαίωσης. Σε μερικές περιπτώσεις τα αποτελέσματα βασίζονται σε πειράματα που εκτελέστηκαν χρησιμοποιώντας συνθετικά υδατικά πρότυπα διαλύματα. Τα αποτελέσματα σε τέτοιες περιπτώσεις φυσικά δεν είναι εφαρμόσιμα στην ίδια προσδιοριζόμενη ουσία σε ένα πολύπλοκο μητρικό υλικό. Σε άλλες περιπτώσεις, μελέτες μιας μεθόδου έχουν γίνει κατάλληλα σε συμφωνία με διεθνώς καθιερωμένα πρωτόκολλα. Για να δοθεί στο χρήστη η δυνατότητα να αξιολογήσει και να χρησιμοποιήσει δημοσιευμένα αποτελέσματα, πρέπει να περιγράφεται ξεκάθαρα, πως εκτιμήθηκαν ή προσδιορίστηκαν τα χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου.

Μέθοδοι που δημοσιεύονται σε επιστημονικά περιοδικά συχνά δε συνοδεύονται από επαρκή πληροφόρηση σχετικά με τη φύση και την έκταση των μέτρων διασφάλισης ποιότητας που εφαρμόστηκαν κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου, όπως περιγραφή για το πώς ελέγχθηκαν σημαντικές αναλυτικές παράμετροι (θερμοκρασία και pH).

Είναι επίσης σημαντικό να είναι γνωστό, αν το εργαστήριο στο οποίο πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις έχει συμμετάσχει σε σχήματα δοκιμής απόδοσης (proficiency testing) ή αν έχει χρησιμοποιήσει υλικά αναφοράς για να στηρίξει την όλη

εργασία, και βέβαια αν έχει υποβληθεί σε κάποια εξωτερική αξιολόγηση π.χ. μέσα από επίσημη διαπίστευση.

Η απουσία χαρακτηριστικών απόδοσης ή η έλλειψη πληροφόρησης σχετικά με τη γενική επάρκεια του εργαστηρίου καθιστά δύσκολη την εκτίμηση της αξιοπιστίας δεδομένων που επικυρώθηκαν ελλιπώς σε δημοσιευμένες μεθόδους.

2.1.4 Χρήση νέας ή μη εξοικειωμένης μεθόδου

Πριν χρησιμοποιήσουμε νέες ή μη εξοικειωμένες μεθόδους σε βάση ρουτίνας, το αρμόδιο προσωπικό πρέπει να αποφασίσει, αν ικανοποιούνται οι απαιτήσεις του πελάτη και του αναλυτικού προβλήματος. Η κρίση πρέπει να βασίζεται τόσο σε δημοσιευμένα δεδομένα επικύρωσης όσο και σε πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από την εργασία εσωτερικής επιβεβαίωσης του ίδιου του εργαστηρίου. Οι μέθοδοι πρέπει να γράφονται αναλυτικά και τα πεδία της εφαρμογής τους πρέπει να περιγράφονται ξεκάθαρα.

Οι παρακάτω πλευρές του ζητήματος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη:

- Η πρότυπη λειτουργική διαδικασία και η διαθεσιμότητά της,
- Τι πληροφόρηση έχει το εργαστήριο σχετικά με τη μέθοδο: βασίζεται σε πρότυπη μέθοδο ή μέθοδο αναφοράς, ή έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο;
- Αν οποιαδήποτε απόκλιση σε μια μέθοδο σε σύγκριση με τη μέθοδο αναφοράς περιγράφεται πλήρως και έχουν διερευνηθεί τα αποτελέσματα της απόκλισης,
- Αν η μέθοδος έχει επιβεβαιωθεί, για παράδειγμα με ανάλυση δειγμάτων αναλόγων μητρικών υλικών στα οποία έχουν προστεθεί γνωστές ποσότητες της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- Αν η μέθοδος χρησιμοποιούνταν στο εργαστήριο για χρονικό διάστημα τουλάχιστον, ας πούμε, τριών μηνών, κατά το οποίο ένας σημαντικός αριθμός πραγματικών δειγμάτων αναλόγου τύπου είχαν αναλυθεί,
- Αν ακολουθούνται διαδικασίες ελέγχου ποιότητας, για παράδειγμα ανάλυση υλικών αναφοράς ή ελέγχου
- Αν το εργαστήριο συμμετέχει σε σχήματα δοκιμής απόδοσης και αξιολογεί, σε συνεχή βάση, τα αποτελέσματα,
- Αν έχει εκτιμηθεί η αβεβαιότητα των μετρήσεων, και τέλος
- Αν πρόκειται για ελεγκτικό εργαστήριο, αν ελέγχει την απόδοση των ελεγκτών και των ελεγκτικών σωμάτων

2.2. Απαιτήσεις της νομοθεσίας και διεθνείς φορείς τυποποίησης για μεθόδους ανάλυσης

Η ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης για να συμπεριληφθούν στα διεθνή πρότυπα ή στη νομοθεσία που αφορά τα τρόφιμα δεν ήταν, μέχρι πρόσφατα, συστηματική. Ως συνέπεια δεν έχουν επικυρωθεί σε σχήματα συνεργασίας όλες οι υπάρχουσες πρότυπες μέθοδοι, και αν ακόμη έχουν επικυρωθεί σε σχήματα συνεργασίας, τα χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου δεν δημοσιεύονται πάντα ως μέρος της μεθόδου, καθιστώντας δύσκολο για τον αναλυτή να επιβεβαιώσει την ικανότητά του για να χρησιμοποιήσει τη μέθοδο κατά ένα κατάλληλο τρόπο.

Γενικά, είναι πιο συνηθισμένο να είναι χημικές πρότυπες μέθοδοι “ πλήρως επικυρωμένες” και να συνοδεύονται με πληροφόρηση, για παράδειγμα, σχετικά με την επαναληψιμότητα (αναπαραγωγιμότητα και την επαναληπτικότητα) παρά μικροβιολογικές μέθοδοι. Ένας λόγος είναι ότι δεν υπάρχουν οδηγίες για την επικύρωση

μικροβιολογικών μεθόδων. Στην πράξη υιοθετούνται από τα μικροβιολογικά εργαστήρια τα χημικά πρωτόκολλα, χωρίς όμως αυτό να ακολουθείται με συστηματικό τρόπο.

Οι περισσότεροι διεθνείς οργανισμοί τώρα αναπτύσσουν τις δικές τους μεθόδους με καθορισμένο τρόπο ή ορίζουν τις συνθήκες με τις οποίες οφείλουν να συμμορφώνονται οι μέθοδοί τους. Στον τομέα των τροφίμων οι πιο σημαντικοί από τους οργανισμούς αυτούς, όπως η Επιτροπή του Κώδικα Τροφίμων του FAO (Codex Alimentarius Commission), η Ευρωπαϊκή Ένωση, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (CEN) και η Διεθνής Ένωση των Επίσημων Αναλυτικών Χημικών AOAC INTERNATIONAL (AOACI) έχουν πολλές ομοιότητες. Αν και οι οργανισμοί αυτοί στοχεύουν στον τομέα των τροφίμων, μπορεί να ληφθούν ως ενδεικτικοί της κατεύθυνσης προς την οποία κινούνται όλοι οι άλλοι τομείς.

Η ουσιαστική απαίτηση, όλων αυτών των οργανισμών, είναι ότι η μέθοδος πρέπει να έχει υποβληθεί σε δοκιμή συνεργασίας πριν υιοθετηθεί ή συστηθεί από τον οργανισμό αυτό. Υπάρχουν άλλες δυνατότητες για την τυποποίηση μιας μεθόδου, όπως μέσα από τα αποτελέσματα σχημάτων δοκιμής απόδοσης (Proficiency Testing) ή μέσα από ενδοεργαστηριακή επικύρωση, αλλά η πρώτη και η "πιο εύκολη" διαδικασία, για ένα εργαστήριο που ψάχνει μια μέθοδο για οποιοδήποτε ιδιαίτερο συνδυασμό προσδιοριζόμενης ουσίας και μητρικού υλικού, είναι να χρησιμοποιήσει μια μέθοδο που έχει δημοσιευθεί από έναν από τους διεθνείς οργανισμούς τυποποίησης.

Οι απαιτήσεις για τους τέσσερις κύριους οργανισμούς τυποποίησης στον τομέα των τροφίμων είναι πολύ όμοιες, για το λόγο αυτό θα περιγραφούν παρακάτω μόνο οι απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

2.2.1 Απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Η Ευρωπαϊκή Ένωση προσπαθεί να εναρμονίσει δειγματοληψία και διαδικασίες ανάλυσης, ώστε να ικανοποιήσει τις σύγχρονες απαιτήσεις των εθνικών και διεθνών εκτελεστικών φορέων καθώς και τα συναφή αυξανόμενα προβλήματα που εισάγει η παγκοσμιοποιημένη αγορά. Για να βοηθήσει στο σκοπό αυτό η Ε.Ε. εξέδωσε οδηγία για τη Δειγματοληψία και τις Μεθόδους Ανάλυσης (2). Η Οδηγία περιέχει ένα τεχνικό παράρτημα, στο οποίο δίνεται έμφαση στην ανάγκη να πραγματοποιηθεί μια δοκιμή συνεργασίας για τη μέθοδο πριν να μπορέσει να υιοθετηθεί από την Ε.Ε.

Τα κριτήρια σύμφωνα με τα οποία πρέπει να συμμορφώνονται οι μέθοδοι ανάλυσης της Ε.Ε. είναι τόσο αυστηρά όσο και εκείνα που συνιστώνται από κάθε Διεθνή Οργανισμό που υιοθετεί την Οδηγία. Αυτά τα κριτήρια είναι:

1. Μέθοδοι ανάλυσης οι οποίες πρόκειται να υιοθετηθούν σύμφωνα με τις προβλέψεις της Οδηγίας θα εξετάζονται σε σχέση με τα ακόλουθα κριτήρια:

- Εξειδίκευση
- Ακρίβεια
- Επαναληψιμότητα: Επαναληπτικότητα (ενδοεργαστηριακή) και αναπαραγωγιμότητα (ενδο-και δι-εργαστηριακή)
- Όριο ανίχνευσης
- Ευαισθησία
- Δυνατότητα πραγματοποίησης και εφαρμογής κάτω από κανονικές συνθήκες λειτουργίας του εργαστηρίου.
- Άλλα κριτήρια τα οποία μπορεί να έχουν επιλεχτεί όπως απαιτείται στην κάθε μέθοδο.
- Οι τιμές επαναληψιμότητας που αναφέρθηκαν προηγουμένως πρέπει να προκύπτουν από δοκιμή συνεργασίας η οποία έχει πραγματοποιηθεί σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένο πρωτόκολλο για δοκιμές

συνεργασίας (π.χ. Διεθνής Οργανισμός Τυποποίησης Επαναληψιμότητας για Μεθόδους Δοκιμών ISO 5725/7981) (2). Οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας πρέπει να εκφράζονται σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένη μορφή (π.χ. σε διαστήματα εμπιστοσύνης 95%, όπως ορίζεται από το ISO 5725/1981). Τα αποτελέσματα από τη δοκιμή συνεργασίας πρέπει να δημοσιεύονται ή να διατίθενται ελεύθερα.

- Μέθοδοι ανάλυσης οι οποίες είναι εφαρμόσιμες ομοιόμορφα σε διάφορες κατηγορίες αγαθών πρέπει να προτιμώνται σε σχέση με μεθόδους οι οποίες εφαρμόζονται σε ιδιαίτερες κατηγορίες αγαθών.
- Οι μέθοδοι ανάλυσης οι οποίες έχουν υιοθετηθεί από αυτήν την Οδηγία πρέπει να εκδίδονται στην πρότυπη προκαταρκτική έκδοση για μεθόδους οι οποίες συνιστώνται από τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης.

2.2.2. Απαιτήσεις επισήμων φορέων- η επικυρωμένη αναλυτική μέθοδος

Αποδοχή των παραπάνω απαιτήσεων σημαίνει ότι όλες οι νομοθετικές μέθοδοι από την Ευρωπαϊκή Ένωση πρέπει να είναι “πλήρως επικυρωμένες”, δηλαδή να έχουν υποβληθεί σε δοκιμή συνεργασίας η οποία να συμμορφώνεται προς ένα διεθνώς, αναγνωρισμένο πρωτόκολλο. Στον τομέα των τροφίμων αυτό επίσης ακολουθείται από την Επιτροπή του Κώδικα Τροφίμων (the Codex Alimentarius Commission) καθώς και από μεθόδους ανάλυσης οι οποίες εκπηγάζουν απ τα κύρια ISO. Πράγματι, αυτές οι απαιτήσεις τώρα πλέον υιοθετούνται από τους περισσότερους διεθνείς φορείς. Έτσι είναι ουσιαστικό για τα εργαστήρια να χρησιμοποιούν μεθόδους οι οποίες συμμορφώνονται προς αυτές τις απαιτήσεις για να εξασφαλίζουν αποδοχή της αναλυτικής τους μεθοδολογίας από τους πελάτες τους.

Η έννοια της επικυρωμένης αναλυτικής μεθόδου είναι τέτοια ώστε η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου να καθορίζονται.

2.3. Μελλοντικές απαιτήσεις μεθόδων ανάλυσης-κριτήρια μεθόδων ανάλυσης

Σήμερα υπάρχει μια αυξανόμενη τάση για να επιτραπεί στα εργαστήρια ελευθερία στην επιλογή της αναλυτικής μεθόδου. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχει γίνει αντιληπτό, πως για να δώσει το εργαστήριο ικανοποιητικά αναλυτικά αποτελέσματα πρέπει να πάρει κάποια μέτρα, μόνο ένα από τα οποία είναι η επιλογή και χρήση μιας κατάλληλης μεθόδου ανάλυσης. Αυτό γίνεται καλύτερα αντιληπτό λαμβάνοντας υπόψη δράσεις στην:

1. GATT, όπου η συμφωνία για την Εφαρμογή Μέτρων Υγιεινής και Φυτοϋγιεινής συνιστά αμοιβαία αναγνώριση μεταξύ κυβερνήσεων. Για την Επιτροπή Κώδικα Τροφίμων αυτό σημαίνει ότι πρέπει να υιοθετηθεί η έννοια της Ισοδυναμίας.
2. Επιτροπή Κώδικα Τροφίμων, η οποία έχει συνυπογράψει το Πρωτόκολλο Εναρμόνισης για τη Δοκιμή Απόδοσης (PT) των Χημικών Αναλυτικών Εργαστηρίων (4) των IUPAC/ISO/AO AC, και την CCMAS που συνιστά συνυπογραφή από την Επιτροπή Κώδικα Τροφίμων των Οδηγιών Εναρμόνισης των IUPAC/ISO/AO AC για Εσωτερικό Έλεγχο Ποιότητας σε Αναλυτικά Εργαστήρια (5) και η οποία, στην 21^η Συνεδρίαση, συνέστησε πρότυπα ποιότητας εργαστηρίου για εργαστήρια που εμπλέκονται σε πιστοποίηση εργασιών εξαγωγής /εισαγωγής (6).
3. ΕΕ, όπου ως αποτέλεσμα της υιοθέτησης της Οδηγίας Πρόσθετων Μέτρων Ελέγχου Τροφίμων (7) τα αναλυτικά εργαστήρια ελέγχου τροφίμων θα απαιτηθεί να διαπιστευτούν (στην Ευρωπαϊκή Οδηγία ισοδύναμη της Οδηγίας ISO 25), να

συμμετάσχουν σε σχήματα δοκιμής απόδοσης (PT) και να χρησιμοποιούν πλήρως “επικυρωμένες μεθόδους”, όταν υπάρχουν διαθέσιμες τέτοιες μέθοδοι. Τέτοια επικύρωση μεθόδων ισοδυναμεί με τις απαιτήσεις μεθόδων ανάλυσης οι οποίες δίνονται στο Εγχειρίδιο Μεθοδολογίας της Επιτροπής Κώδικα Τροφίμων.

Ως αποτέλεσμα τέτοιων δράσεων η προσοχή στρέφεται στο πόσο καλά ο αναλυτής (το εργαστήριο) εκτελεί τις αναλυτικές του διαδικασίες και όχι απλά στο να διασφαλίσει, ότι χρησιμοποιεί μια προδιαγραμμένη αναλυτική μέθοδο.

3. Οι απαιτήσεις και οι διαδικασίες που απαιτούνται για να ληφθούν μέθοδοι πλήρως επικυρωμένες μέσα από δοκιμές συνεργασίας.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω, όλες οι “επίσημες” μέθοδοι ανάλυσης χρειάζεται να περιλαμβάνουν στοιχεία επαναληψιμότητας· τα στοιχεία αυτά μπορούν να ληφθούν μόνο μέσα από δοκιμή συνεργασίας και στο λόγο αυτό οφείλεται η έμφαση που δίνεται στον τομέα τροφίμων για μεθόδους επικυρωμένες και δοκιμασμένες σε σχήματα συνεργασίας.

3.1. Τί είναι δοκιμή συνεργασίας

Δοκιμή συνεργασίας είναι μια διαδικασία κατά την οποία η επαναληψιμότητα μιας αναλυτικής μεθόδου μπορεί να εκτιμηθεί και να ποσοτικοποιηθεί. Η επαναληψιμότητα μιας μεθόδου συνήθως εκφράζεται με όρους τιμών επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας. Η ακρίβεια δεν είναι ο αντικειμενικός σκοπός. Εξαιτίας της σπουδαιότητας των δοκιμών συνεργασίας, οι δοκιμές αυτές περιγράφονται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια παρακάτω, χρησιμοποιώντας την Ανάλυση και τις Συστάσεις από τα Πρωτόκολλα Εναρμόνισης των IUPAC/ISO/AOAC.

3.2. Πρωτόκολλο Εναρμόνισης των IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει σημαντικά βήματα προς μια παγκόσμια αποδοχή των μεθόδων που έχουν δοκιμαστεί σε σχήματα συνεργασίας, αδιάφορα από το ποιος έχει οργανώσει αυτές τις δοκιμές. Αυτό έχει υποβοηθηθεί με τη δημοσίευση από τους IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL των Πρωτοκόλλων Εναρμόνισης σχετικά με Μελέτες Συνεργασίας (9,10). Αυτά τα Πρωτόκολλα αναπτύχθηκαν υπό την αιγίδα της IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemists) και τη βοήθεια αντιπροσώπων από τους κύριους οργανισμούς που ενδιαφέρονται για την καθοδήγηση μελετών συνεργασίας. Ιδιαίτερα, από τον τομέα τροφίμων συμμετείχαν οι:

AOAC INTERNATIONAL, International Organization for Standardization (ISO), International Dairy Federation (IDF), Collaborative International Analytical Council for Pesticides (CIPAC), Nordic Analytical Committee (NMKL), Codex Committee on Methods Analysis and Sampling and International Office of Cocoa and Chocolate.

Τα πρωτόκολλα δίνουν μια σειρά από συστάσεις.

Απευθύνονται στα εξής θέματα:

- Τα στοιχεία που συνθέτουν μια δοκιμή συνεργασίας
- Συμμετέχοντες
- Κατηγορία δείγματος
- Ομοιογένεια δείγματος
- Σχεδιασμός δειγματοληψίας –αριθμός υλικών (υλικό-προσδιοριζόμενη ουσία/ επίπεδο συγκέντρωσης/ μητρικό υλικό)

- Αριθμός επαναλήψεων
- Επαναλήψεις τυφλών δειγμάτων
- Επαναλήψεις γνωστών δειγμάτων
- Ανεξάρτητες επαναλαμβανόμενες αναλύσεις
- Οι μέθοδοι που πρέπει να εξεταστούν
- Οδηγός δοκιμής/ προδιαδικαστικών δοκιμής
- Στατιστική ανάλυση
- Αξιόπιστα δεδομένα
- Αναλύσεις διακύμανσης
- Αρχική εκτίμηση
- Εύρεση τιμών που πρέπει να απορριφθούν
- Παράμετροι επαναληψιμότητας
- Τελική έκθεση

3.3. Άλλες διαδικασίες για την επικύρωση μιας μεθόδου ανάλυσης

Διεθνείς οργανισμοί εξετάζουν τώρα και άλλες διαδικασίες για την επικύρωση των μεθόδων ανάλυσης, εκτός από αυτή της “πλήρους δοκιμής συνεργασίας”. Οδηγίες για τη χρήση αποτελεσμάτων από σχήματα δοκιμής απόδοσης έχουν αναπτυχθεί από το Υπουργείο Γεωργίας, Αλιείας και Τροφίμων, της Μεγάλης Βρετανίας (11) και τώρα υπάρχει μια διαδικασία, που αναπτύχθηκε μέσα από το πρόγραμμα “MicroVal”, για την επικύρωση μεθόδων ταχείας δοκιμής με συλλογή (test kit).

3.4 Αποδοχή της επαναληψιμότητας μιας μεθόδου ανάλυσης χρησιμοποιώντας στατιστικές παραμέτρους-Υπολογισμός των τιμών HORRAT

Δεν υπάρχει επίσημη απαίτηση στην Ευρωπαϊκή Ένωση ή στον Κώδικα ως προς την αποδοχή των χαρακτηριστικών επαναληψιμότητας οποιαδήποτε συγκεκριμένης μεθόδου. Παρόλα αυτά, οι υπολογιζόμενες τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας μπορούν να συγκριθούν με τις αντίστοιχες τιμές υπαρχουσών μεθόδων. Αν είναι ικανοποιητικές, τότε η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επικυρωμένη μέθοδος. Αν δεν υπάρχει μέθοδος με την οποία να γίνει σύγκριση των παραμέτρων επαναληψιμότητας, τότε μπορούν να υπολογιστούν θεωρητικά οι τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας από την εξίσωση του Horwitz (12). Αυτό επιτυγχάνεται καλύτερα με τη χρήση των τιμών HORRAT για να δοθεί ένα μέτρο της αποδοχής χαρακτηριστικών επαναληψιμότητας μιας μεθόδου.

Η τιμή HORRAT είναι: $(RSD_R \text{ που προκύπτει από τη δοκιμή συνεργασίας}) / RSD_R \text{ προβλεπόμενη από την εξίσωση του Horwitz}$.

Έτσι, HO_R η τιμή HORRAT για την αναπαραγωγιμότητα, είναι η παρατηρούμενη RSD_R διαιρούμενη με την RSD_R που υπολογίζεται από την εξίσωση Horwitz στη συγκέντρωση που μας ενδιαφέρει.

3.5 Ερμηνεία

Αν οι τιμές HORRAT είναι ίσες ή μικρότερες από 2, τότε μπορεί να θεωρηθεί ότι η μέθοδος έχει ικανοποιητικές τιμές αναπαραγωγιμότητας. Τα εργαστήρια οφείλουν να διασφαλίζουν, ότι οι μέθοδοι τις οποίες εφαρμόζουν εκπληρώνουν αυτό το κριτήριο.

3.6 Υπολογισμός της τιμής Horwitz.

Η τιμή Horwitz προκύπτει από την εξίσωση του Horwitz, η οποία δηλώνει πως για κάθε μέθοδο:

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

Και ότι η τιμή αυτή είναι ανεξάρτητη από το συνδυασμό μητρικού υλικού-προσδιοριζόμενης ουσίας.

Οι κύριες τιμές είναι:

Λόγος Συγκέντρωσης	RSD _R
1 (100%)	2
10 ⁻¹	2,8
10 ⁻²	4
10 ⁻³	5,6
10 ⁻⁴	8
10 ⁻⁵	11
10 ⁻⁶	16
10 ⁻⁷	23
10 ⁻⁸	32
10 ⁻⁹	45

Ο Horwitz κατέληξε στην εξίσωση μετά από αξιολόγηση των αποτελεσμάτων πολλών δοκιμών συνεργασίας (≤ 3000).

Αν και αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή των RSD_R και είναι μια προσέγγιση της πιθανής επαναληψιμότητας που μπορεί να επιτευχθεί, τα δεδομένα από "αποδεκτές" δοκιμές συνεργασίας είναι μικρότερα από το διπλάσιο των προβλεπόμενων τιμών RSD_R στις συγκεντρώσεις που ενδιαφέρουν. Αυτή η ιδανικά ομαλοποιημένη καμπύλη είναι ανεξάρτητη από τη φύση της προσδιοριζόμενης ουσίας ή της αναλυτικής τεχνικής που χρησιμοποιείται για τη λήψη της μέτρησης. Γενικά οι τιμές που λαμβάνονται από αυτή την καμπύλη είναι ενδεικτικές της επαναληψιμότητας η οποία είναι δυνατό να επιτευχθεί για μια αναλυτική μέθοδο από διαφορετικά εργαστήρια. Η χρήση της παρέχει ένα απλό και ικανοποιητικό μέσο για την εκτίμηση της αποδοχής της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

Η διαδικασία αυτή χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο από οργανισμούς για την εκτίμηση της αποδοχής των χαρακτηριστικών της επαναληψιμότητας των μεθόδων τους.

4. Οι απαιτήσεις και οι διαδικασίες για την απόκτηση μεθόδων οι οποίες έχουν επικυρωθεί στο εργαστήριο

Είναι απαραίτητη σε πολλούς τομείς χημικής ανάλυσης, οι μέθοδοι ανάλυσης, όπου είναι δυνατό, να "επικυρώνονται πλήρως", δηλαδή να έχουν υποβληθεί σε δοκιμή συνεργασίας. Υπάρχουν, όμως πολλές περιπτώσεις όπου αυτό δεν είναι δυνατό ή τέτοιες μέθοδοι δεν είναι διαθέσιμες, και για το λόγο αυτό πολλοί τομείς δεν ακολουθούν αυτή την προσέγγιση. Ως αποτέλεσμα η ανάγκη για τα εργαστήρια να αναπτύξουν και να χρησιμοποιήσουν τις δικές τους ενδοεργαστηριακές μεθόδους ανάλυσης αναγνωρίζεται μέσα στην αναλυτική κοινότητα. Μέχρι πρόσφατα τέτοια ενδοεργαστηριακή μέθοδος επικύρωσης λαμβάνονταν ως δεδομένη. Έχει αναγνωριστεί, πως τέτοια επικύρωση οφείλει να γίνεται σε περισσότερο επίσημη βάση και αρκετοί οργανισμοί έχουν αναπτύξει διαδικασίες και πρωτόκολλα τα οποία εκπληρώνουν αυτές τις ανάγκες. Η επιτροπή του Κώδικα Τροφίμων έχει συμφωνήσει πως το θέμα πρέπει να συμπεριλαμβάνεται στο

επίσημο πρόγραμμα εργασίας της (13). Ιδιαίτερα, αναγνωρίζεται μέσα στο σύστημα του Κώδικα ότι υπάρχουν μερικοί τομείς ανάλυσης τροφίμων, π.χ. κτηνιατρικά κατάλοιπα στον τομέα των τροφίμων, όπου είναι πολύ απίθανο να είναι, ή πιθανώς να γίνουν, διαθέσιμες.

Επικύρωση μπορεί να οριστεί ως η διαδικασία προσδιορισμού της καταλληλότητας ενός συστήματος μέτρησης για την εξαγωγή χρήσιμων αναλυτικών δεδομένων. Ο όρος διεργαστηριακή σύγκριση (δηλ. δοκιμή συνεργασίας) συχνά λαμβάνεται ως συνώνυμος με τη μέθοδο επικύρωσης στον τομέα των τροφίμων. Σύμφωνα με την Οδηγία 25 του ISO/IEC αυτός είναι μόνον ένας από τους πολλούς τρόπους επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων. Οι άλλοι τρόποι περιλαμβάνουν μια ή περισσότερες από τις ακόλουθες διαδικασίες:

- διακρίβωση χρησιμοποιώντας πιστοποιημένα υλικά ή υλικά αναφοράς
- σύγκριση αποτελεσμάτων που έχουν ληφθεί με άλλες μεθόδους
- εκτίμηση των παραγόντων που επηρεάζουν το αποτέλεσμα
- εκτίμηση της αβεβαιότητας των αποτελεσμάτων βασισμένης σε επιστημονική γνώση και πρακτική εμπειρία

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένα οι ISO, IUPAC και AOAC INTERNATIONAL έχουν συνεργαστεί για την παραγωγή πρωτοκόλλων από κοινού συμφωνημένα ή οδηγιών σχετικών με το "σχεδιασμό, την Εισαγωγή και την Ερμηνεία Μελετών Εκτέλεσης Μεθόδου" (9,10), τη "Δοκιμή Απόδοσης των Εργαστηρίων Χημικής Ανάλυσης" (4), τον "Εσωτερικό Έλεγχο Ποιότητας σε εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας" (5) και τη χρήση της πληροφόρησης της ανάκτησης στην αναλυτική μέτρηση (14). Η ομάδα εργασίας η οποία παρήγαγε αυτά τα πρωτόκολλα και τις οδηγίες έχει εξουσιοδοτηθεί από την IUPAC να ετοιμάζει οδηγίες σχετικά με την επικύρωση ενδοεργαστηριακών μεθόδων ανάλυσης. Αυτές οι οδηγίες θα περιγράφουν τις ελάχιστες συστάσεις που πρέπει να δοθούν σε εργαστήρια τα οποία παράγουν αναλυτικά δεδομένα μέσα από διαδικασίες οι οποίες πρέπει να εφαρμόζονται για να διασφαλίσουν επαρκή επικύρωση των μεθόδων τους, πριν αναλάβουν παραπέρα επικύρωση η οποία να συμπεριλαμβάνει άλλα αναγνωρισμένα για την αξιοπιστία τους εργαστήρια.

4.1. Πρωτόκολλα για την ενδοεργαστηριακή επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων

Υπάρχει ένας ικανός αριθμός δημοσιεύσεων οι οποίες έχουν αναπτυχθεί για την ενδοεργαστηριακή επικύρωση αναλυτικών μεθόδων και συγκεκριμένα:

Πρωτόκολλο για την Επικύρωση Μεθόδων Χημικής Ανάλυσης το οποίο αναπτύχθηκε από τη Σκανδιναβική Επιτροπή για Ανάλυση Τροφίμων (14).

Γενικός εργαστηριακός οδηγός ο οποίος αναπτύχθηκε από την EURACHEM, και ο οποίος παράχθηκε από το Κρατικό Χημείο του Ηνωμένου Βασιλείου με την υποστήριξη της Πρωτοβουλίας για επικυρωμένες Αναλυτικές Μετρήσεις του Υπουργείου Εμπορίου και Βιομηχανίας (16).

Σύντομο Μάθημα σχετικά με Ενδοεργαστηριακή Επικύρωση Αναλυτικής Μεθόδου το οποίο αναπτύχθηκε από την AOAC INTERNATIONAL (17).

Οδηγός για την Επικύρωση Μεθόδων ο οποίος αναπτύχθηκε από την Ολλανδική Επιθεώρηση για την Προστασία της Υγείας (18).

Οδηγός για τη Διασφάλιση Ποιότητας Χημικής Ανάλυσης σε Δημόσια Αναλυτικά Εργαστήρια, ο οποίος δημιουργήθηκε από την Εταιρεία Δημοσίων Αναλυτών του Ηνωμένου Βασιλείου (19).

5. Συμπεράσματα

Τώρα πια έχει αναγνωριστεί ότι οι μέθοδοι Χημικής Ανάλυσης πρέπει να επικυρώνονται πριν τη χρήση τους. Ιδανικά, οι μέθοδοι πρέπει να είναι ‘‘πλήρως επικυρωμένες’’, δηλ. πρέπει να έχουν υποβληθεί σε δοκιμή συνεργασίας η οποία διεξάγεται σύμφωνα με διεθνώς αποδεκτά πρωτόκολλα. Παρ’ όλ’ αυτά, με τις υφιστάμενες απαιτήσεις για τα εργαστήρια ώστε να συμμορφώνονται με καθορισμένα πρότυπα ποιότητας και επειδή υπάρχει δυσκολία στην ανεύρεση επαρκούς αριθμού συμμετοχών για να καταστεί δυνατή η διεξαγωγή δοκιμών συνεργασίας σε κάθε περίπτωση (δηλ. για κάθε συνδυασμό προσδιοριζόμενης ουσίας /μητρικού υλικού) υπάρχει τώρα απαίτηση για διεθνώς αποδεκτές οδηγίες σχετικά με ενδοεργαστηριακές μεθόδους που πρόκειται να αναπτυχθούν.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- (1) R. Wood, How to validate analytical methods, TRAC, 18 (1999) 624.
- (2) Council Directive 85/591/EEC Concerning the Introduction of Community Methods of Sampling and Analysis for the Monitoring of Foodstuffs Intended for Human Consumption, O. J. L372 of 31.12.1985.
- (3) Precision of Test Methods, Geneva, 1994, ISO 5725 (previous editions were issued in 1981 and 1986).
- (4) M. Thompson, R. Wood (Editors), The International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories, Pure Appl. Chem. 65 (1993) 2123 (also published in J. AOAC Int. 76 (1993) 926).
- (5) M. Thompson, R. Wood (Editors), Guidelines on internal quality control in analytical chemistry laboratories, Pure Appl. Chem. 67 (1995) 649.
- (6) Report of the 21st Session of the Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, FAO, Rome, 1997, ALINORM 97/23 A.
- (7) Council Directive 93/99EEC in the Subject of Additional Measures Concerning the Official Control of Foodstuffs, O. J. L290 of 24.11.1993.
- (8) Procedural Manual of the Codex Alimentarius Commission, 10th Edition, FAO, Rome, 1997.
- (9) W. Horwitz (Editor), Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 855.
- (10) W. Horwitz (Editor) Protocol for the design, conduct and interpretation of method performance studies, Pure Appl. Chem. 67 (1995) 331.
- (11) MAFF Validated Methods for the Analysis of Foodstuffs: VOA- Introduction, General Consideration and Analytical Quality Control, J. Assoc. Publ. Anal. (in preparation).
- (12) W. Horwitz, Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, Anal. Chem. 54 (1982) 67 A.
- (13) Report of the 22nd Session of the Codex Alimentarius Commission, FAO, Rome, 1997, ALINORM 97/37.
- (14) S. Ellison, M. Thompson, P. Willetts, R. Wood (Editors), Harmonised Guidelines for the Use of Recovery Information in Analytical measurement, Pure Appl. Chem. (in press).
- (15) Validation of Chemical Analytical Methods, NMKL Secretariat, Helsinki, 1996, NMKL Procedure No.4.
- (16) Method Validation- A Laboratory Guide, EURACHEM Secretariat, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, 1996.
- (17) An Interlaboratory Analytical Method Validation Short Course developed by the AOAC INTERNATIONAL, AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, 1996.
- (18) Validation of Methods, Inspectorate for Health Protection, Rijswijk, Report 95-001.
- (19) A Protocol for Analytical Quality Assurance in Public Analysts’ Laboratories, Assoc. Publ. Anal., Sheffield, 1986.

