

Πρωτόκολλα επικύρωσης μεθόδων ανάλυσης τροφίμων. Αβεβαιότητα μέτρησης και παράμετροι επικύρωσης.

Θεοφάνια Τσιρώνη, Μαρία Τσεβδού, Βάσω Ωραιοπούλου

Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο (ftsironi@chemeng.ntua.gr)

Περίληψη

Η επικύρωση μεθόδων (method validation) είναι η διαδικασία εκτέλεσης συστηματικών εργαστηριακών μελετών, οι οποίες αποδεικνύουν ότι τα χαρακτηριστικά επίδοσης της μεθόδου έχουν κατανοηθεί και ότι η μέθοδος είναι επιστημονικά ορθή, υπό τις συνθήκες που πρέπει να εφαρμόζεται. Σκοπό έχει να προσδιορίσει τη δυνατότητα εφαρμογής της μεθόδου για μια ορισμένη ανάλυση ενός συγκεκριμένου τύπου δείγματος, να αποδείξει ότι παρέχει ακρίβεια και αξιοπιστία και να αναγνωρίσει τους περιορισμούς στη χρήση της. Κατά την επικύρωση εξετάζονται παράμετροι της μεθόδου όπως η ακρίβεια (επαναληψιμότητα, αναπαραγωγιμότητα), η ορθότητα, η γραμμικότητα (αναλογικότητα) και το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Η παρούσα εργασία έχει σκοπό την συλλογή και παρουσίαση των σχετικών πρωτοκόλλων επικύρωσης των μεθόδων που αφορούν την ανάλυση τροφίμων καθώς και την επισήμανση των αναγκαίων προσθηκών και μετατροπών που προκύπτουν από τη μελέτη.

Από τα διάφορα εργαστήρια που διεξάγουν αναλύσεις τροφίμων χρησιμοποιούνται για την επικύρωση μεθόδων κυρίως οι οδηγίες των ISO, IUPAC και EURACHEM. Ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας η EURACHEM παρέχει αναλυτικούς οδηγούς αναφορικά με τη δειγματοληψία και την μέτρηση. Μεταξύ των παραπάνω κειμένων δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις, και οι κύριες παράμετροι επικύρωσης είναι η ακρίβεια, η ευαισθησία, το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης. Ελλείψεις παρουσιάζονται στην επικύρωση των μεθόδων ποιοτικής ανάλυσης και των μεθόδων προσδιορισμού συστατικών όπως τα αλλεργιογόνα, κυρίως λόγω της απουσίας πιστοποιημένων υλικών αναφοράς, καθώς και στην εκτίμηση της αβεβαιότητας κατά τη δειγματοληψία. Εξειδικευμένα πρωτόκολλα επικύρωσης έχουν διατυπωθεί για τις μικροβιολογικές μετρήσεις, λόγω των ειδικών απαιτήσεων για τον έλεγχο των μεθόδων αυτών. Ωστόσο παρατηρούνται ελλείψεις σχετικά με τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας της μέτρησης και με την εφαρμογή σε ορισμένες μεθόδους (π.χ. PCR για την ανίχνευση του *Campylobacter* spp.).

Abstract

It is internationally recognized that validation of methods is necessary in analytical laboratories. The use of validated methods is important for an analytical laboratory to show its qualification and competency. Validation is the tool used to demonstrate that a specific analytical method actually measures what it is intended to measure and thus that it is suitable for its intended purpose. The objective of the present study was the collection, survey and review of method validation protocols generated by standardization organizations, other nationally and regionally significant bodies, organizations and companies. Criteria for acceptance of method performance characteristics were also collected and surveyed and gaps and needs were addressed. The aim was to bring together the different approaches and to make definite recommendations as to the best practice.

Food analysis laboratories use mainly the validation protocols published by ISO, IUPAC and Eurachem. ISO and Eurachem provide detailed guidelines about measurement and sampling uncertainty. There are not significant deviations between protocols, while the main performance criteria are accuracy - as expressed by precision under repeatability and reproducibility

conditions, trueness and bias, recovery, and robustness - sensitivity, limit of detection, and limit of quantification. The need of estimation of the uncertainty of a measurement is emphasised, including, among other sources, the uncertainty in sampling. Gaps were noticed on validation of qualitative methods and with methods for the determination of food allergens, mainly due to lack of certified reference materials. Additionally, some issues need to be harmonised for intra-laboratory validations (agreement on a common protocol for single laboratory validation, use of the same parameters for method validation, use of the same criteria for acceptance or rejection of validation parameters). Specific guidelines have been published for the validation of microbiological methods. The major gap and research need on the application of these guidelines is that they are not referred to the estimation of measurement uncertainty. Gaps also arise in some applications (e.g. PCR methods for the identification of *Campylobacter* spp.).

1. Επικύρωση και επαλήθευση μεθόδων ανάλυσης τροφίμων- Πρωτόκολλα επικύρωσης

Επικύρωση μεθόδου (method validation) είναι η απόδειξη ότι αυτή ικανοποιεί τα κριτήρια για τη σκοπούμενη χρήση της. Πρόκειται για τη διαδικασία εκτέλεσης συστηματικών εργαστηριακών μελετών, οι οποίες αποδεικνύουν ότι τα χαρακτηριστικά επίδοσης (performance characteristics) της μεθόδου έχουν προσδιορισθεί και ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fit for purpose), και επιστημονικά ορθή, υπό τις συνθήκες που πρέπει να εφαρμόζεται. Η επικύρωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με χρήση υλικών αναφοράς, με διεργαστηριακές δοκιμές, με σύγκριση των αποτελεσμάτων με άλλες μεθόδους, κ.α. Η επαλήθευση μεθόδου (verification) είναι η επιβεβαίωση με εξέταση των αποδεικτικών στοιχείων, ότι μια μέθοδος ικανοποιεί προδιαγεγραμμένες απαιτήσεις. Η επαλήθευση (verification) μεθόδου είναι η διαδικασία κατά την οποία το εργαστήριο αποδεικνύει ότι μπορεί να εφαρμόσει σωστά μία πρότυπη μέθοδο και συγκεντρώνει δεδομένα για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας της μέτρησης. Το εργαστήριο πρέπει να επικυρώνει τις μη πρότυπες μεθόδους, τις μεθόδους που σχεδιάζονται/αναπτύσσονται από αυτό (εσωτερικές μεθόδους), τις πρότυπες μεθόδους που χρησιμοποιούνται εκτός του σκοπούμενου αντικειμένου, καθώς και τις ενισχυμένες και τις τροποποιημένες πρότυπες μεθόδους έτσι, ώστε να επιβεβαιώνει ότι οι μέθοδοι είναι κατάλληλες για τη σκοπούμενη χρήση (Taverniers at al., 2004, Trullols et al., 2004).

Η επικύρωση περιλαμβάνει:

- α) προδιαγραφή των απαιτήσεων (κριτήρια αποδοχής),
- β) μελέτη/προσδιορισμό των αναλυτικών χαρακτηριστικών των μεθόδων,
- γ) έλεγχο ότι οι απαιτήσεις μπορούν να ικανοποιηθούν με τη χρήση της μεθόδου, και
- γ) δήλωση για την εγκυρότητα (καταλληλότητα).

Σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC της Ευρωπαϊκής ένωσης, κατά τη διεξαγωγή μιας ποιοτικής ή/και ποσοτικής δοκιμής για τα τρόφιμα απαιτείται ο προσδιορισμός παραμέτρων όπως η αβεβαιότητα (uncertainty), η ορθότητα (accuracy) και η ακρίβεια (precision). Η επικύρωση μεθόδων συχνά συμπεριλαμβάνεται ωστόσο στη γενικότερη έννοια της διασφάλισης ποιότητας και κρίνεται απαραίτητος ο καθορισμός των παραμέτρων της δοκιμής που απαιτείται να υπολογιστούν και να αξιολογηθούν καθώς και ο τρόπος υπολογισμού τους σύμφωνα με διεθνώς αναγνωρισμένα κριτήρια. Γι' αυτό το λόγο είναι απαραίτητο να καλυφθούν οι ελλείψεις στα πρωτόκολλα και τις παραμέτρους επικύρωσης των μεθόδων που αφορούν τα τρόφιμα. Τα πρωτόκολλα επικύρωσης και οι οδηγίες που έχουν δημοσιευτεί από τους διάφορους διεθνείς και ευρωπαϊκούς οργανισμούς συνοψίζονται στον Πίνακα 1.

Επιπλέον, εθνικοί οργανισμοί (British Standards-BSI, UK, Food Standards Agency-FSA, UK, Deutsches Institut für Normung-DIN, Germany, French Standards Association-AFNOR,

France, Nordic Committee on Food Analysis-NMKL, Nordic countries, National Veterinary Institute-NordVal, Norway, Belgian Federal Agency for the Safety of the Food Chain-FASFC, Belgium, Standards Council of Canada-SCC, Canada, Standardization Administration of the People's Republic of China-SAC, China, Bureau of Standards, Metrology and Inspection-BSMI, Taiwan) καθώς και άλλοι φορείς (International Laboratory Accreditation Cooperation-ILAC, European Cooperation for Accreditation of Laboratories-EAL, Nordic Innovation Centre-NORDEN, International Seed Testing Association-ISTA) έχουν δημοσιεύσει πρωτόκολλα ή κατευθυντήριες οδηγίες για τη διεξαγωγή επικύρωσης μεθόδων καθώς και για τον υπολογισμό της αβεβαιότητας μέτρησης και δειγματοληψίας. Τα διάφορα εργαστήρια που διεξάγουν αναλύσεις τροφίμων χρησιμοποιούν για την επικύρωση μεθόδων κυρίως τις οδηγίες των ISO, IUPAC και EURACHEM. Ιδιαίτερα για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας η EURACHEM παρέχει αναλυτικούς οδηγούς αναφορικά με τη δειγματοληψία και την μέτρηση που στηρίζονται στους ορισμούς και τις οδηγίες του ISO. Μεταξύ των παραπάνω κειμένων δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις, και οι κύριες παράμετροι επικύρωσης παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Πίνακας 1. Πρωτόκολλα επικύρωσης μεθόδων ανάλυσης τροφίμων από διεθνείς φορείς

Διεθνείς ή Ευρωπαϊκοί Οργανισμοί

ISO

ISO 5725-1:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results - Part 1: General principles and definitions

ISO/IEC Guide 98:1995 Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM)

ISO/IEC FDGuide 98-1 Uncertainty of measurement - Part 1: Introduction to the expression of uncertainty in measurement

ISO/IEC NP Guide 98-2 Uncertainty of measurement - Part 2: Concepts and basic principles

ISO/IEC Guide 98-3:1998 Uncertainty of measurement - Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM: 1995)

ISO/IEC NP Guide 98-4 Uncertainty of measurement - Part 4: Role of measurement uncertainty in conformity assessment

ISO/IEC NP Guide 98-5 Uncertainty of measurement - Part 5: Applications of the least-squares method

ISO 11843: 2003, Capability of Detection

ISO 16140:2003 Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods

ISO/TR 13843:2000 Water quality - Guidance on validation of microbiological methods

ISO 8196-3:2009 Milk - Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis - Part 3: Protocol for the evaluation and validation of alternative quantitative methods of milk analysis

IUPAC

Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies (IUPAC, 1995a)

Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC, 2002)

Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (IUPAC,

1996)

The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC, 2006)

Guidelines for calibration in analytical chemistry: part 1. fundamentals and single component calibration (IUPAC, 1998)

Guidelines for calibration in analytical chemistry: part 2. multispecies calibration (IUPAC (2004)

Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories (IUPAC, 1995b)

Eurachem

The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (Eurachem, 1998a)

Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (Eurachem, 2000)

Use of uncertainty information in compliance assessment (Eurachem, 2007a)

Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches (Eurachem, 2007b)

Quality Assurance for Research and Development and Non-routine Analysis (Eurachem, 1998b)

AOAC International

AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis (AOAC, 2002a)

Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis (AOAC, 2002b)

Codex Alimentarius Commission

Guidelines on measurement uncertainty CAC/GL 54-2004

Harmonized iupac guidelines for the use of recovery information in analytical measurement CAC/GL 37-2001

CEN

CEN/TR 15356-1:2006 Validation and interpretation of analytical methods, migration testing and analytical data for materials and articles in contact with food - Part 1: General considerations

00275200 FprEN 15842 Foodstuffs - Detection of food allergens - General considerations and validation of methods (Under Approval 2010-02)

00275215 EN ISO 16140:2003/prA1 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Protocol for the validation of alternative methods - Amendment 1: Interlaboratory study on quantitative methods (ISO 16140:2003/DAM1:2009) (Under Approval 2011-07)

2. Παράμετροι επικύρωσης μεθόδων- Εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων

Οι παράμετροι επικύρωσης περιλαμβάνουν τα στοιχεία που περιγράφονται στον Πίνακα 2 (Eurachem Guide, 1998, Thompson et al., 2002). Ιδιαιτερότητες παρατηρούνται στην περίπτωση των ποιοτικών μεθόδων, συμπεριλαμβανομένων και των μικροβιολογικών δοκιμών,

όπου το αποτέλεσμα είναι παρουσία/ απουσία. Τα χαρακτηριστικά επικύρωσης για την περίπτωση αυτή συνοψίζονται στη συνέχεια:

- Επαναληψιμότητα
- Αναπαραγωγιμότητα
- Ορθότητα
- Όριο ανίχνευσης
- Σταθερότητα
- Εξειδίκευση-Ψευδώς θετικό αποτέλεσμα (False positive)
- Ευαισθησία-Ψευδώς αρνητικό αποτέλεσμα (False negative)

Πίνακας 2. Παράμετροι επικύρωσης μεθόδων ανάλυσης τροφίμων. (Οι ορισμοί είναι σε συμφωνία με τους ISO και IUPAC).

Παράμετρος επικύρωσης	Ορισμός
Ακρίβεια (πιστότητα) μετρήσεων (precision)	Εκφράζει τη διασπορά των τιμών γύρω από μια μέση τιμή. Δηλώνει την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα.
Ορθότητα μετρήσεων (accuracy)	Εκφράζει την εγγύτητα κάποιας μετρούμενης τιμής με την πραγματική τιμή.
Ευαισθησία (sensitivity)	Είναι η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει μικρές μεταβολές στη συγκέντρωση της ουσίας ή στον αριθμό των μικροοργανισμών, μέσα σε δεδομένο υπόστρωμα. Αντιπροσωπεύεται από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης.
Επιλεκτικότητα (selectivity) και εξειδίκευση (specificity)	Είναι η ικανότητα της μεθόδου να προσδιορίζει ουσίες ή μικροοργανισμούς καθαρά χωρίς να επηρεάζεται από άλλες ουσίες, μικροοργανισμούς και παρεμβολές.
Ανθεκτικότητα (robustness)	Εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα κάτω από προσχεδιασμένες μεταβολές των πειραματικών συνθηκών. Αξιολογείται από το εργαστήριο που αναπτύσσει τη μέθοδο, εισάγοντας μικρές διακυμάνσεις στη διαδικασία και εκτιμώντας την επιρροή στην απόδοση της μεθόδου.
Γραμμικότητα ή αναλογικότητα (linearity)	Είναι η ικανότητα της μεθόδου να παρουσιάζει καλή γραμμικότητα (αναλογικότητα) σε όλο το εύρος συγκέντρωσης μιας ουσίας ή κατά τις αραιώσεις στις μικροβιολογικές δοκιμές.
Όριο ανίχνευσης (limit of detection)	Είναι μια εκτίμηση της ελάχιστης τιμής που μπορεί να ανιχνεύσει μία μέθοδος χωρίς ποσοτική ακρίβεια.
Όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification)	Είναι η ελάχιστη τιμή (συγκέντρωση, αριθμός μικροοργανισμών) που μπορεί να προσδιορίσει μία μέθοδος με αποδεκτό επίπεδο αβεβαιότητας.

Το αποτέλεσμα μιας μέτρησης δεν μπορεί να αξιολογηθεί αν δε συνοδεύεται από μια δήλωση της αβεβαιότητάς του. Είναι λοιπόν αναγκαία η γνώση του εύρους διακύμανσης των μετρήσεων. Το πρότυπο ISO 17025:2005 απαιτεί από τα εργαστήρια δοκιμών να εφαρμόζουν διαδικασίες εκτίμησης της αβεβαιότητας των μετρήσεων. Μια λογική εκτίμηση βασίζεται στη γνώση της απόδοσης της μεθόδου και στο σκοπό της μέτρησης και κάνει χρήση δεδομένων από προηγούμενη εμπειρία και επικύρωση.

Αβεβαιότητα μετρήσεων (measurement uncertainty) είναι μία εκτίμηση του εύρους τιμών γύρω από τη μετρούμενη τιμή, εντός του οποίου είναι πιθανό (συνήθως με ένα ορισμένο επίπεδο εμπιστοσύνης π.χ. 95%) να βρίσκεται η αληθινή τιμή του μετρούμενου μεγέθους. Κατά την εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων πρέπει να λαμβάνονται υπόψη όλοι οι σημαντικοί παράγοντες που συνεισφέρουν στην αβεβαιότητα (δειγματοληψία, προετοιμασία δείγματος, περιβαλλοντικές συνθήκες, παρασκευή προτύπων και υλικών αναφοράς, διαδικασία δοκιμής, αναλυτής, επεξεργασία δεδομένων κ.α.).

Τα βήματα υπολογισμού της αβεβαιότητας, σύμφωνα με τον οδηγό GUM (ISO), είναι τα εξής:

- Προσδιορισμός των πηγών αβεβαιότητας
- Υπολογισμός των αβεβαιοτήτων Τύπου Α (τυχαίες αβεβαιότητες)
- Προσδιορισμός των αβεβαιοτήτων Τύπου Β (συστηματικές αβεβαιότητες)
- Υπολογισμός της Συνδυασμένης αβεβαιότητας
- Υπολογισμός της Ολικής αβεβαιότητας

Η εκτίμηση της αβεβαιότητας στην πράξη γίνεται με χρήση πρακτικών κανόνων και μεθοδολογικών εργαλείων εκτίμησης αβεβαιότητας. Σύμφωνα με τον οδηγό της Eurachem για την εκτίμηση της αβεβαιότητας, ο υπολογισμός της τιμής αβεβαιότητας των μετρήσεων πρέπει να περιλαμβάνεται και να προκύπτει από τις υπάρχουσες διαδικασίες διασφάλισης ποιότητας (επικύρωση αναλυτικής μεθόδου, εσωτερικός έλεγχος ποιότητας, διεργαστηριακές δοκιμές ικανότητας, ιχνηλασιμότητα). Ο οδηγός αυτός είναι ιδιαίτερα χρήσιμος σε περιπτώσεις όπου δεν είναι διαθέσιμα προηγούμενα ικανοποιητικά δεδομένα και επομένως πρόκειται να χρησιμοποιηθεί η μαθηματική αναλυτική προσέγγιση σύμφωνα με το GUM (ISO) με όλα τα διαφορετικά στάδια.

3. Προσδιορισμός ελλείψεων και προτάσεις

Ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός των ελλείψεων και αδυναμιών, έτσι ώστε προταθούν βελτιώσεις για εναρμόνιση των υπάρχουσων διαδικασιών επικύρωσης μεθόδων ανάλυσης τροφίμων. Ελλείψεις παρατηρούνται ως προς τους ορισμούς των επιμέρους παραμέτρων που πρέπει να προσδιοριστούν στην περίπτωση των ποιοτικών μεθόδων, ενώ λαμβάνεται υπόψη η πιθανότητα ψευδώς θετικού ή ψευδώς αρνητικού αποτελέσματος. Επιπλέον, κρίνεται σκόπιμη η εναρμόνιση των θεμάτων που αφορούν τη διενέργεια ενδοεργαστηριακών ελέγχων.

Η επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού αλλεργιογόνων παρουσιάζει δυσκολίες εξαιτίας της απουσίας πιστοποιημένων υλικών αναφοράς, επικυρωμένων μεθόδων ανάλυσης για τις περισσότερες αλλεργιογόνες ουσίες καθώς και της ανάγκης για την εναρμόνιση των πρωτοκόλλων επικύρωσης σε διεθνές επίπεδο.

Αναφορικά με την ανάλυση ουσιών όπως οι μυκοτοξίνες διαπιστώνεται ανάγκη για τον προσδιορισμό των αναγκαίων παραμέτρων και κριτηρίων επικύρωσης για τη διεξαγωγή διεργαστηριακών δοκιμών επικύρωσης.

Για τις αναλύσεις προσθέτων, περιβαλλοντικών μολυντών ή μολυντών από τη διεργασία, οι υπάρχουσες οδηγίες κρίνονται επαρκείς για τη διεξαγωγή επικύρωσης των μεθόδων. Ωστόσο κρίνεται αναγκαίος ο προσδιορισμός μιας ενιαίας, επικυρωμένης διαδικασίας για την εκτίμηση της ανάκτησης, κυρίως για πρόσθετα ή μολυντές σε χαμηλές περιεκτικότητες.

Στις κατευθυντήριες οδηγίες που έχουν αναπτυχθεί για τις μικροβιολογικές αναλύσεις, λόγω των ιδιαιτεροτήτων που παρουσιάζουν, απουσιάζουν οδηγίες για την εκτίμηση της αβεβαιότητας στη μέτρηση, τη δειγματοληψία και την ανάκτηση, ενώ ταυτόχρονα παρατηρούνται ελλείψεις αναφορικά με την εφαρμογή σε ορισμένες μεθόδους (π.χ. μέθοδος PCR για την αναγνώριση του *Campylobacter* spp.).

Η επάρκεια χρήσης των υπαρχόντων πρωτοκόλλων επικύρωσης κρίνεται, εξάλλου, σκόπιμο να ελεγχθεί για την περίπτωση του προσδιορισμού της αυθεντικότητας τροφίμων, συμπεριλαμβάνοντας την επιλογή των κατάλληλων στατιστικών εργαλείων για την ανάλυση των δεδομένων.

Acknowledgement: This work was completed in the framework of MoniQA: “Towards harmonisation of analytical methods for monitoring food quality and safety in the food supply chain” project and funded under the EU FP6 Programme, Topic 5.4.5.1 – Quality and safety control strategies for food (Contract No Food-CT-2006-036337).

X. Βιβλιογραφία

AOAC, “AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis”, Journal of AOAC International, 85(5), (2002) 1187-1200

AOAC, 2002b: AOAC Official Methods, Program Manual (OMA Program Manual, Part 6, Appendix D: Guidelines for collaborative study procedures to validate characteristics of a method of analysis, Gaithersburg, MD.

Eurachem Guide, 1998: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. LGC Ltd. Teddington, Middlesex, United Kingdom

Eurachem, 1998a: EURACHEM Guide, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (www.eurachem.org/guides/valid.pdf)

Eurachem, 1998b: EURACHEM / CITAC Guide, Quality Assurance for Research and Development and Non-routine Analysis (www.eurachem.org/guides/rdguide.pdf)

Eurachem, 2000: EURACHEM / CITAC Guide CG 4 (2000) Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (<http://www.eurachem.org/guides/QUAM2000-1.pdf>)

Eurachem, 2007a: EURACHEM / CITAC Guide, Use of uncertainty information in compliance assessment (http://www.eurachem.org/guides/Interpretation_with_expanded%20uncertainty_2007_v1.pdf)

Eurachem, 2007b: EURACHEM / CITAC Guide, Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches (www.eurachem.org/guides/UFS_2007.pdf)

IUPAC, “Guidelines for calibration in analytical chemistry: part 1. Fundamentals and single component calibration”, Pure & Appl. Chem., 70(4), (1998) 993-1014.

IUPAC, “IUPAC Technical Report Guidelines for calibration in analytical chemistry: part 2. multi-species calibration”, Pure Appl. Chem., 76(6), (2004) 1215–1225

IUPAC, "IUPAC Technical Report, Harmonised guidelines for internal quality control in analytical chemistry laboratories", *Pure and Applied Chemistry*, 67(4), (1995b) 649-666.

IUPAC, "IUPAC Technical Report, Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis", *Pure Appl. Chem.*, 74(5), (2002) 835–855

IUPAC, "IUPAC Technical Report, Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", *Pure & Appl. Chem.*, 67(2) (1995a) 331-343.

IUPAC, "IUPAC Technical Report, The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories", *Pure Appl. Chem.*, 78(1), (2006) 145-196.

IUPAC, 1996: EURACHEM/IUPAC/ISO/AOAC INTERNATIONAL, Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement (<http://www.eurachem.org/guides/recovery.pdf>)

Taverniers I., De Loose M. and Van Bockstaele E., "Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance", *Trends in Analytical Chemistry*, 23(7), (2004) 535-552.

Thompson M., Ellison S.L.R. and Wood R., "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis", *Pure Appl. Chem.*, 74(5), (2002) 835 – 855.

Trullols E., Ruisánchez I. and Xavier Rius F., "Validation of qualitative analytical methods", *Trends in Analytical Chemistry* 23(2), (2004) 137-145.