



rikilt-dlo

RAPPORT 94-36

RAPPORTAGE BEOORDELING CLRVV METHODEN VAN ONDERZOEK
NUMMER 53 DD. 1994-07-19, NUMMER 58 DD. 1994-07-19 EN
NUMMER 73 DD. 1994-07-21

Drs. J.A. van Rhijn
H.J. Keukens



Algemene beoordeling.

De methoden van onderzoek zijn beoordeeld op punten welke van invloed zijn op de bruikbaarheid in de praktijk en op punten met betrekking tot de te verwachten betrouwbaarheid van de resultaten welke met de methode gegenereerd worden.

Over het algemeen kan gesteld worden dat de beschrijving van de methoden overzichtelijk is en in praktische zin goed uitvoerbaar lijkt.

Om de betrouwbaarheid van de resultaten beter te kunnen garanderen moeten de methoden van onderzoek op een aantal hoofdpunten aangepast worden.

Deze punten zijn:

- Aantoonbaarheidsgrens, bepaalbaarheidsgrens en herhaalbaarheid moeten per component in de methoden van onderzoek worden opgenomen. De berekening van deze grootheden moet gebaseerd zijn op internationaal door de statistiek geaccepteerde definities.
- De kwaliteit van standaardoplossingen, welke de basis zijn voor de vaststelling van kwantitatieve gehalten in monsters, moet expliciet gegarandeerd worden door een vorm van batchcontrole.
- In de methoden van onderzoek moeten acceptatiecriteria worden opgenomen voor een set analyses. Het is van evident belang dat de resultaten van de veelheid aan geanalyseerde controlemonsters kunnen worden getoetst aan acceptatiecriteria.
- Op een aantal plaatsen in de methoden van onderzoek worden criteria gesteld aan bepaalde facetten, b.v. aan de lineariteit van de calibratiecurve. Vermeld moet worden welke actie genomen moet worden als niet aan de gestelde criteria voldaan wordt en wie de beslissingsbevoegdheid in deze heeft om door te gaan met de analyses of deze te stoppen.

Een gedetailleerde beschrijving van de bevindingen voor de individuele methoden van onderzoek wordt gegeven in de toegevoegde bijlagen.

Drs. J.A. van Rhijn

H.J. Keukens

1994-11-02

Bijlage 1

Methode van onderzoek nr. 58 dd. 1994-07-19

Varkens-, rund-, kalfs-, en pluimveevlees - Bepaling en bevestiging van sulfonamiden en dapson - HPLC-UV/diode array.

Opmerkingen met betrekking tot de beoordeelde methode:

1.1 Toelichting

De aard van de toelichting is dusdanig algemeen dat met name het stellen van criteria bemoeilijkt wordt. De methode moet voorlopig beperkt worden tot de componenten waarvoor alle benodigde gegevens zijn verzameld.

1.2 Aantoonbaarheidsgrens

De genoemde benadering van 20 tot 30 $\mu\text{g/kg}$ strookt niet met de in de toelichting genoemde grens van 20 $\mu\text{g/kg}$ als ondergrens van de kwantitatieve bepaling.

Als laagste niveau, dat met voldoende statistische zekerheid kwantitatief kan worden bepaald, wordt gewoonlijk de bepaalbaarheidsgrens in een voorschrift opgenomen per component.

3 Beginsel

Tekst als volgt aanpassen: Reserved phase scheiding moet zijn Reversed phase scheiding.

4.1 Herhaalbaarheid

Voor de herhaalbaarheid is geen correcte grootte weergegeven. Herhaalbaarheid is in principe het verschil dat gevonden mag worden bij duplo analyse van het zelfde monster onder herhaalbaarheidscondities. Statistisch gezien is dat bij een bepaald gehalte een vast getal (2,8xs, mg/kg). Aangezien er sprake is van een onbekend gehalte valt te overwegen om de relatieve herhaalbaarheid in de methode op te nemen. Het toegestane verschil bedraagt in dat geval $2,8 \times \text{VC, \%}$.

4.2 Reproduceerbaarheid

Zie opmerking bij herhaalbaarheid (4.1).

Om de binnen-lab reproduceerbaarheid vast te stellen moeten meer variabelen worden gewijzigd dan dat in de tekst is weergegeven. Er kan ook gekozen worden voor een benadering van deze grootte door vermenigvuldiging van de herhaalbaarheid met een factor 1,6.

5 Reagentia en hulpmiddelen

Tekst als volgt aanpassen: (minimaal 10 Mohm.cm) in (minimale weerstand 10 Mohm.cm⁻¹).

5.3.6 Hoofdstandaardoplossing

* Uit praktisch oogpunt is het afwegen van exact 10,0 mg standaardstof vrijwel onmogelijk. Het verdient aanbeveling een toegestane marge aan te geven (b.v. ± 1 mg) en daarmee rekening te houden bij het vaststellen van uiteindelijke concentratie.

* Het handhaven van een bewaartemperatuur van 4 °C is moeilijk te realiseren. Er dient tenminste een marge te worden aangegeven om te kunnen voldoen aan de zelf vastgestelde criteria.

5.3.9/5.3.10 HPLC meetstandaardoplossingen

Met de beschreven procedure worden eindoplossingen verkregen welke in sterke mate verschillen qua waterpercentage. Daardoor ontstaat ook een afwijking ten opzichte van de samenstelling van het eindextract van de monsters. Dit kan met name gevolgen hebben voor de kwantitatieve bepaling van de snelst eluerende component, sulfadiazine. De procedure moet wat dit punt betreft nader bezien worden.

In algemene zin moet vastgesteld worden dat in de beschrijving geen procedures zijn opgenomen voor controle van de standaardoplossingen, nog acceptatiecriteria voor de bereide oplossingen.

5.4.1 Blanco vleesmonsters

Er wordt geen definitie gegeven van het begrip "blanco vleesmonster".

7.1 Algemeen

Uit de tekst valt niet af te leiden of de te analyseren monsters in enkelvoud of in duplo geanalyseerd worden.

7.6.4 Procedure HPLC-DAD meting

* Het begrip tailing dient nader gespecificeerd te worden en voorzien worden van een acceptatie criterium.

* Wat is de te volgen procedure als niet voldaan wordt aan het criterium voor de lineariteit?

* In de tekst is sprake van een vergelijking van de piekhoogten van de standaard van 3 µg/kg met eerdere analyseresultaten. Wat is de toegestane afwijking?

* In de tekst wordt niet aangegeven hoe gehandeld moet worden als de concentratie van een bepaald monsterextract hoger ligt dan de concentratie van de hoogste calibratie oplossing.

7.8 Bevestiging en criteria

De tekst wekt de suggestie dat spectrumregistratie van standaard en monster op verschillende dagen mag plaatsvinden. Dit is niet acceptabel, omdat het spectrum kan afwijken door kleine verschillen in eluenssamenstelling en omgevingstemperatuur.

7.8.2 Confirmatie

Met name het tweede acceptatiecriterium wijkt af van het geaccepteerde EEG criterium in deze. Is het aannemelijk te maken dat het gekozen criterium in ieder geval gelijkwaardig is aan het EEG criterium dat een afwijking per golflengte toestaat van maximaal 10 %?

8 Weergave van de resultaten

* De verklarende tekst bij de berekening maakt niet duidelijk welke standaardoplossing gebruikt wordt voor berekening van het uiteindelijke gehalte.

* Er wordt in de tekst van het deze methode niet ingegaan op criteria waaraan het terugvindingspercentage en het duploverschil tussen de twee recovery experimenten moet voldoen om vast te stellen of de analyseserie geaccepteerd kan worden of voor herhaling in aanmerking komt. Deze kwaliteitscriteria moeten in elke methode van onderzoek opgenomen zijn.

H.J. Keukens

1994-11-01

Bijlage 2.

Methode van onderzoek nr. 73 dd. 1994-07-21

Kalver-urine - Bepaling en bevestiging van hormonen - (C_{13} voorzuivering)/GCMS

Opmerkingen met betrekking tot de beoordeelde methode:

Algemeen:

De criteria genoemd in § 7.6 zijn onvoldoende nauwkeurig geformuleerd. Punt 4 bijvoorbeeld geeft aan dat de ionintensiteiten van monster en standaard moeten worden vergeleken maar er wordt niet bij aangegeven welke grenzen gehanteerd moeten worden. De minimaal acceptabele recovery wordt op 20% gesteld maar blijkens het vervolg van deze alinea kan ook een lagere recovery geaccepteerd worden. Wat is nu de minimale eis?

Er wordt een verlies van 80% van de analyt getolereerd alsmede een injectieverlies van 50% (§7.6). In de 'worst case' zou analyse plaatsvinden aan 10% van het aanwezige analyt. Is in die omstandigheid de bewering betreffende de aantoonbaarheidsgrens nog valide? Dezelfde vraag kan gesteld worden als men overgaat tot verdunning van het extract om interferentie te voorkomen (§7.7).

De methode is kwalitatief van karakter maar de verslaglegging alsmede sommige beslissingen (§7.6.5 en §9.1) zijn kwantitatief van karakter en blijkens de notatie 1,0 ng/ml nog redelijk nauwkeurig ook (bijlage 1).

Naar aanleiding van de tekst:

p.2 Bepaalbaarheidsgrens wordt niet vermeld

p.7 Pipetten niet genoemd in §6. Status m.b.t. kwaliteitscontrole is onduidelijk.

5.3.14 Minimale houdbaarheid gedefinieerd maar wat is de maximale houdbaarheid en wat gebeurt er met de standaarden na verloop van één jaar?

5.3.15 Pipetten niet gespecificeerd. Houdbaar gedurende 6 maanden, daarna verwerpen?

6.21 Voorschrift H74 wordt niet vermeld in MVO 53 maar is wel essentieel.

7.5 Opmerking 1: Voor zover van belang voor de analyse moet aangegeven worden wat bedoeld wordt met 'kwaliteitscontrole'

Opmerking 2: Wat zijn 'grote wijzigingen' en wat zijn dat niet. M.a.w. wie beslist en in welke gevallen?

Opmerking 3: Wordt daarna de performance van het instrument nog gecontroleerd?

7.5.1 De exacte massa is een fysische grootte, die kan berekend worden, de meting is dan tevens een controle van de MS.

7.5.3 Waar wordt gedocumenteerd welke windows worden gebruikt cq welk temperatuurprogramma wordt gebruikt.

7.6

Opmerking 1: Wie autoriseert dat?

Opmerking 2: Wat is goed en wat is slecht?

Opmerking 3: *..(relatieve)..* wat wordt hier bedoeld met het oog op het vervolg van deze alinea waarin sprake is van het berekenen van de relatieve retentietijd t.o.v. E_2D_3 als alternatief voor absolute retentietijden.

Opmerking 4: Hoe wordt die vergelijking gehanteerd; welke criteria worden aangelegd?

Opmerking 5: Zie commentaar bij opmerking 4

Opmerking 7: Een schijnbaar hard criterium; minimaal 20% recovery, wordt in de volgende zin weer ontkracht. Welk criterium wordt nu gehanteerd? Wanneer wordt het resultaat afgekeurd?

7.7 Heeft verdund injecteren gevolgen voor de aantoonbaarheidsgrens en zo ja kan dan nog worden voldaan aan het gestelde in §1.2?

HPLC of 2D-GC, wie beslist en wanneer wordt dat gedaan?

8.2.1 Criteria onder §7.6 zijn niet goed gedefinieerd.

De aanwezigheid van één anabolicum hangt blijkbaar af van de performance voor andere anabolica?

Hoeft de blanco urine niet negatief te zijn?

9.1 Is de methode kwalitatief of kwantitatief?

9.2 Wat wordt met deze info gedaan?

Bijlage 1 bestaat uit een met 'Bijlage 1' gemerkt deel en een ongemerkt deel. Bovendien is met name het tweede deel niet duidelijk m.b.t. wat er in sommige kolommen moet worden ingevuld.

Drs. J.A. van Rhijn

1994-11-01

Bijlage 3

Methode van Onderzoek nr. 53 dd. 1994-07-19

Urine, lever - Bepaling van beta-agonisten - GCMS

Opmerkingen met betrekking tot de beoordeelde methode:

Algemeen:

De omstandigheden waarin tot een tweede analyse met CI-GC-MS wordt overgegaan zijn niet duidelijk. Wanneer moet dat en wie neemt die beslissing. Hoe wordt dan vervolgens omgegaan met de informatie die er al is (EI) en de nog te verkrijgen informatie (CI), zie ook de opmerking betreffende bijlage 2.

Neem ter verduidelijking clenbuterol. In EI zijn al vier ionen gemeten, daarvan zouden er volgens EG criteria tenminste twee bruikbaar moeten zijn voor bevestiging. Vervolgens wordt met CI-GC-MS heranalyse toegepast maar terwijl er slechts twee additionele ionen nodig zijn voor bevestiging, worden er vier gemeten. Ligt nu op voorhand vast welke er gebruikt worden of is er een vrije keuzemogelijkheid van twee uit vier?

Wie is verantwoordelijk voor goedkeuring tijdens en na afloop van de analyse?

Welke minimumeisen worden gesteld aan gevoeligheid van de MS, recovery, blankowaarde enz en wat zijn te nemen acties wanneer die eisen niet gehaald worden.

Naar aanleiding van de tekst:

1.1 De tekst maakt niet duidelijk of de bepaling van andere β -agonisten dan clenbuterol kwantitatief dan wel kwalitatief is.

1.2 Voor welke componenten geldt de aantoonbaarheidsgrens?

1.3 Voor een kwantitatieve methode is de bepaalbaarheidsgrens van groot belang. Deze is niet vermeld.

4 Herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid worden voor urine niet vermeld.

4.2 De term 'herhaalbaarheid' zal waarschijnlijk 'reproduceerbaarheid' moeten zijn (2^e regel)

5.3 Volgorde niet erg logisch: vermelding van standaarden wordt onderbroken door nummers 5.3.28 t/m 5.3.30.

Op p.8 worden bewaarcondities vermeld. Expiratie data ontbreken. Bewaarcondities overige hulpmiddelen ontbreken eveneens.

7.1.1 en 7.1.2 Welk aantal en welke β -agonisten worden bedoeld?

7.3.1 * ...met deze methode negatief is bevonden ...*. Gezien de onder § 1.2 genoemde spreiding (0.1 tot 0.5 $\mu\text{g/l}$) is niet duidelijk wat deze bewering betekent. Beter is het om aan te geven dat het gehalte kleiner is dan $\mu\text{g/l}$.

7.3.2 en 7.3.3 De gebruikte pipetten worden niet vermeld in § 6. Bovendien is niet duidelijk of deze pipetten onder een vorm van kwaliteitscontrole vallen. De juistheid van het toegevoegde volume is echter van groot belang en precieze vaststelling hiervan wordt zinvol geacht. (geldt tevens voor §§ 7.4.2 en 7.4.3)

7.3.4 en 7.4.4 beschrijven in essentie dezelfde handelingen. Toch wordt het stellen van de pH in 7.3.4 niet beschreven en in 7.4.4 wel. §7.5.1 bevat dan de passage over het stellen van de pH van urine extracten. Hierdoor wordt het voorschrift onnodig gecompliceerd. Als § 7.3.4 net als 7.4.4 het stellen van de pH beschrijft, kunnen §§ 7.5.1 en 7.5.2 gecombineerd worden.

7.6.5 Tekent de hoofdassistent ergens af voor deze beslissing?

7.9.2 Welk reactiegas wordt er daadwerkelijk gebruikt? Dat moet eenduidig worden beschreven. Wellicht staat dat in een gebruiksvoorschrift voor de GC-MS. Zoja dan moet daarnaar verwezen worden.

7.10

Wanneer wordt een tweede analyse met CI-GC-MS uitgevoerd? Wat zijn de beslisriteria?

Het is onduidelijk hoe er wordt omgegaan met de meting van het vijfde ion voor bijvoorbeeld MAB en MAP.

Voor broombuterol is opmerking 2 niet duidelijk.

Bij bijlage 2:

De strekking van de tabel met diagnostische ionen in analytische zin is niet duidelijk. Ter illustratie: Worden de ionen in de rechter kolom allen in CI gemeten of is het een combinatie van de diagnostische ionen in EI en CI meting. Als dat laatste het geval is waarom dan slechts 3 ionen voor MAP terwijl de EI meting nog tal van mogelijke diagnostische ionen levert.

Als het eerste het geval is dan moet het volgende worden opgemerkt:

De meting van m/z 86 en 262 voor clenbuterol in CI levert geen extra informatie op als deze ionen al gemeten zijn in EI. Bovendien zijn het ionen die afkomstig zijn van ongewenst optredende EI ionisatie in de CI-GC-MS dus in feite wordt dan twee keer EI uitgevoerd en dat is niet voldoende voor bevestiging. Analoge redenering geldt in meerdere of mindere mate voor andere verbindingen.

8 De berekeningswijze die beschreven wordt, corrigeert automatisch voor recovery verliezen. De aanname die daarbij impliciet gemaakt wordt is dat de recovery van alle componenten in de urine + spike hetzelfde is als in het te analyseren monster. Is dit uitgangspunt onderbouwd met analysegegevens? Desalniettemin wordt hiermee de recovery een factor van belang. Het is daarom verstandig eisen te stellen aan de minimum recovery in zowel de urine + spike als in het onbekende monster waarbij voor de laatste alleen de recovery van de interne standaarden kan worden opgegeven.

Bijlagen 3 en 5: Piekintensiteiten zijn weliswaar belangrijk voor het inschatten van de kwaliteit van de analyse maar zijn ook eenvoudig te beïnvloeden via bijvoorbeeld de multiplierspanning. Wat echter eveneens van belang is, is de signaal/ruis verhouding op de base piek in bijvoorbeeld de urine + 2 $\mu\text{g/l}$ spike. Dat laatste zegt meer over de kwaliteit van de analyse.

Drs. J.A. van Rhijn
1994-11-01