Naif Arab University for Security Sciences
Arab Journal of Forensic Sciences & Forensic Medicine
المجلة العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي
https://journals.nauss.edu.sa/index.php/AJFSFM

جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية
Naif Arab University for Security Sciences

الجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي
Arab Society for Forensic Sciences and Forensic Medicine

Forensic Toxicology Laboratory Guidelines: Analytical Method Validation (Version 2.0)

CrossMark

المبادئ التوجيهية في مختبرات السموم الجنائية : التحقق من صلاحية الطرق التحليلية (الإصدار الثاني)

مجموعة العمل العلمية العربية لعلم السموم الجنائي
الجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي، جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، المملكة العربية السعودية
عبدالسلام بكداش [١،*]، جهاد القدسي [١،*]، هدى حسن [٢]، فاروق الزهراني [٣]، سلاف عاصي [٤].

[١،*] علوم الأدلة الجنائية، كلية العدالة الجنائية، جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، الرياض، المملكة العربية السعودية.
[٢] قسم علم الأمراض والطب المخبري في مستشفى ومركز أبحاث الملك فيصل التخصصي (سابقاً)
[٣] كلية نايف للأمن الوطني.
[٤] قسم العلوم الجنائية، جامعة ليفربول جون مورس، ليفربول، المملكة المتحدة.

Arab Scientific Working Group for Forensic Toxicology

Arab Society for Forensic Sciences and Forensic Medicine, Naif Arab University for Security Sciences, Riyadh, Saudi Arabia.
Abdulsallam Bakdash[1], Jihad Al-Qudsi[1*], Huda M. Hassan[2], Farouq Alzahrani[3], Sulaf Assi[4].*

[1] *Forensic Sciences Department, College of Criminal Justice , Naif Arab University for Security Sciences, Riyadh, KSA.*
[2] *(Formerly) Pathology and Laboratory Medicine Department, King Faisal Specialist Hospital amd Research Center, Riyadh, KSA.*
[3] *Naif College for National Security.*
[4] *Department of Forensic Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, UK.*

Received 10 Feb. 2020; Accepted 05 May, 2019; Available Online 04 Jun., 2020

المستخلص

لما كانت مهام علم السموم الجنائي تتضمن تحليل سوائل وبعض أعضاء الجسم في حالات الوفاة وتفسير تلك المعلومات، وكذلك دراسة حالات الوفاة المفاجئة غير المتوقعة و/أو غير المبررة والتعامل معها كحالات قضائية جنائية تقع ضمن اختصاص الفاحص الطبي. فإن النتائج التحليلية الموثوقة تعد شرطًا سابقًا للتفسير الصحيح في علم السموم الجنائي عند تقييم الدراسات العلمية، وفي العمل

Abstract

Since postmortem forensic toxicology involves analyzing body fluids and organs from death cases, interpreting that information and studying the sudden unexpected and/or unexplained deaths as coroner's cases or fall under the jurisdiction of the medical examiner. Reliable results and valid analytical data are an essential

الكلمات المفتاحية: علوم الأدلة الجنائية، علم السموم الجنائي، التحقق من الطريقة التحليلية، مبادئ توجيهية.

Keywords: *Forensic Sciences, Forensic Toxicology, Method Validation, Guidelines*

* Corresponding Author: *Abdulsallam Bakdash, Jihad Al-Qudsi*
Email: abakdash@nauss.edu.sa , jalqudsi@nauss.edu.sa

doi: 10.26735/LQFP2592

Production and hosting by NAUSS

1658-6794© 2020. AJFSFM. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons, Attribution-NonCommercial License.

الروتيني اليومي، وكذلك عند تقديم أية نتائج تحاليل سمية كدليل جنائي.

وبالمقابل فإن نتائج التحاليل غير الموثوقة لا يمكن الاعتراض عليها في المحكمة فحسب، بل يمكن أن تؤدي أيضاً إلى صدور أحكام قانونية غير عادلة تجاه المدعى عليه، أو يترتب عليها علاج خاطئ في الحالات الإسعافية أوالمرضية. ولذلك تتطلب الطرق التحليلية الجديدة والمستخدمة في علم السموم الجنائي أو في تشخيص أسباب الوفاة أو التشخيص السريري الحذر والعناية التامة أثناء تطوير الطريقة التحليلية وأثناء تطبيقها عملياً، كما تتطلب الحرص الشديد في التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية النهائية. وتعد موثوقية الطرق التحليلية شرطاً مطلوباً وأساسيّاً بشكل خاص في سياق إدارة الجودة والاعتماد، لاسيّما أن تلك المسائل أصبحت ذات أهمية متزايدة في علم تحليل السموم الجنائي في السنوات الأخيرة.

وتقدم الجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي ومقرها جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية بالرياض الإصدار الثاني من الإرشادات التوجيهية للتحقق من صلاحية طرق التحليل في علم السموم الجنائي المُعد من قبل المجموعة العلمية العربية لعلم السموم الجنائي في الجمعية، والذي تطمح أن يكون إصدارًا علميًّا مميزاً باللغة العربية، وتحرص بنفس الوقت على تقديم المصطلحات العلمية كما هي باللغة العلمية ليكون سهل الفهم والتطبيق لدى جميع الاختصاصيين في مجال علم السموم الجنائي. ولقد وقع اختيار المجموعة العلمية العربية لعلم السموم الجنائي على أن يكون إصدارها الأول لكتيب إرشادات توجيهية للتحقق من صلاحية طرق التحليل في علم السموم الجنائي أسوة بالمنظمات العالمية الناشطة في هذا المجال، فملف الإرشادات التوجيهية يحمل في طياته رسالة علمية منهجية يمكن تعميمها على المختبرات العربية العاملة والناشطة في علم السموم الجنائي من جهة، ويمثل من جهة أخرى تشجيعاً للمجموعات العلمية العربية الأخرى العاملة في مجالات العلوم الجنائية لإصدار منشورات مماثلة، فهناك حاجة ملحة تطلبها المكتبة العربية والمؤسسات العربية العاملة في مجالات علوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي، وخصوصاً بعد أن تطورت وسائل الجريمة والإرهاب على الصعيد العالمي والدولي.

requirement for proper interpretation of forensic toxicology cases, especially when evaluating scientific studies and daily routine work, and when presenting any toxicological findings as criminal evidence.

In contrast, the results of unreliable analyses can be disputed in court and can also lead to unfair legal judgments against the defendant, or can result in wrong treatment in cases of rehabilitation of patients. In order to establish strong evidence and make a correct decision, the lab is asked to give high quality data that are based on reliable analytical methods. For that reason, all new analytical methods used in forensic toxicology including the clinical diagnosis of causes of death require careful care during the development of the analytical method and during its application. This is also an urgent need in the context of quality management and accreditation, especially as those issues have become increasingly important in the science of poisons and drug analysis in recent years.

The Arab Scientific Working Group of Forensic Toxicology (ASWGFT) of the Arab Society for forensic sciences and forensic medicine (ASFSFM(aims to publish the second version of Guidelines for Method Validation in Forensic Toxicology. These guidelines version are written in Arabic to facilitate the understanding of analytical methods validation in the field of forensic toxicology for Arab specialists. The Arab Scientific Working Group of Forensic Toxicology has chosen the first issue to be a manual of guidelines for method validation in forensic toxicology, similar to international organizations who are actively publishing in this field. The guidelines contain a systematic scientific message that can be published and circulated among Arab laboratories.

1. مقدمة

يستند دليل الإرشادات التوجيهية للتحقق من صلاحية طرق التحليل في علم السموم الجنائي إلى منشورات علمية عالمية مستقاة من خلاصة المؤسسات والخبراء في علم السموم الجنائي على المستوى العالمي [1,2]. ويعد دليلاً عمليًّا للمختبرات العربية العاملة في مجال علم السموم الجنائي التي توظف طرقاً تحليلية آلية متطورة في التعامل مع العينات السريرية والجنائية سواء أكانت عينات حيوية، أم غير حيوية، أم مواد مضبوطة. ويستعرض هذا الدليل في مقدمته المصطلحات العلمية الواردة في هذا التخصص، ثم ينتقل لشرح أهمية تقديم الدليل العلمي الموثق حول صلاحية طرق التحليل المستخدمة في مختبرات السموم الجنائية، ويشرح متى يكون من الواجب تقديم هذا الدليل، ومتى يحبذ تقديمه من قبل المختبر العامل في مجال السموم الجنائي، كما يتناول بشيء من التفصيل طرق التحليل المستخدمة بشكل عام في علم السموم الجنائي مع كافة أشكال العينات المقدمة لمختبر تحليل السموم الجنائي، ويناقش أهم المعايير المتعلقة بطرق التحليل، وقيمها الحدية (مثل: الدقة، والصحة، ونمط المعايرة، والأثر المرحل، والتشويش الناجم عن مواد غير مطلوب تحليلها،...إلخ) والتي يجب أن يتضمنها ملف التحقق من صلاحية الطرق التحليلية، ويشرح إجراءات الطرق والمواد الواجب استخدامها لتقديم دليل عملي وموضوعي يثبت صحة وموثوقية الطريقة التحليلية، ويتطرق لشرح بعض المعادلات الرياضية المستخدمة في حساب المعايير ذات الصلة في إثبات صلاحية الطرق التحليلية. وسيتم إرفاق الملحقات الوصفية المتمثلة بأمثلة تجريبية وحسابية بكتيب الإرشادات التوجيهية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي، التي تهدف إلى تعريف الإجراءات القياسية اللازمة للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية في تطبيقات علم السموم الجنائي.

ويعرف التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية بأنه العملية التي يتم من خلالها إجراء مجموعة من التجارب المخبرية بغرض تقييم كفاءة وموثوقية طريقة تحليلية معينة يتم تطويرها، أو طريقة تم تطويرها أو تعديلها من طريقة صحيحة سابقة [3,4]. وإن الهدف من التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية هو تأسيس دليل موضوعي قوي يثبت أن طريقة التحليل ناجحة على مستوى استخدامها وفق حدود معينة ووفق ظروف طبيعة العمل.

وتهدف خطوات وإجراءات عملية التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية في هذا المستند إلى تحقيق ما يلي:

(1) ضمان وضع الحد الأدنى من معايير الممارسة التي يتم القيام بها من أجل التحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي.

(2) ضمان أنّ الحد الأدنى من الإجراءات القياسية في المختبر واللازمة من أجل التحقق من صلاحية الطرق التحليلية الجنائية تم العمل به بالفعل [4].

مع العلم أن كفاءة وأداء هذه الطرق قد تختلف إلى حد ما خلال تحليل العينات من يوم إلى آخر عن الحالة الفعلية للعينات، ويجب أن يكون هذا الاختلاف ضمن المعايير المقبولة. وبالتالي فإنّ العوامل التي يتم التحقق من صلاحيتها وتقييمها مع هذه الإجراءات هي بمثابة تقديرات لصحة ودقة وموثوقية الطريقة التحليلية [3].

2. مصطلحات وتعاريف علمية

2.1 المواد المرجعية Reference Materials

هي مواد متجانسة بشكل كافٍ وثابتة من حيث المواصفات النوعية، وتستخدم عادة في عملية التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية كمادة عيارية قياسية (Reference Standards) أو كمادة عيارية داخلية (IS)، ويجب أن تكون المواد المرجعية ذات درجة نقاوة عالية؛ حيث إن النقاوة تؤثر في نتائج الدراسة التحليلية. وينبغي قدر الإمكان أن تكون المادة المرجعية العيارية القياسية (Reference Standards) مماثلة للمادة المراد تحليلها (Analyte)، أما إذا لم يتحقق ذلك فمن الممكن استبدال المادة العيارية المرجعية بملح حامضي أو قاعدي أو سيترات، بشرط أن تكون المادة عالية النقاوة. وعادة تستخدم ثلاثة أنواع من المواد المرجعية العيارية:

(1) مواد مرجعية معتمدة (مثل: مواد دستور الأدوية الأمريكي).

(2) مواد مرجعية تجارية يتم الحصول عليها من مصدر تجاري موثوق وذي سمعة طيبة.

(3) مواد أخرى ذات نقاوة موثّقة، يتم تشييدها بواسطة مختبر تحليلي أو مؤسسة أخرى غير تجارية.

وينبغي توثيق شهادة المصدر الخاصة بهذه المواد، وبيان رقم التشغيلة (رقم تحضير المنتج) وتاريخ انتهاء الصلاحية وشهادات التحاليل عند توافرها، و/أو شهادات التعريف الداخلية أو الخارجية، ونسبة النقاوة لكل مادة مرجعية، وفي حالة انتهاء صلاحية المادة المرجعية، يجب عدم استخدام محاليل هذه المواد المرجعية المخزنة ما لم تتم إعادة تحديد النقاوة في المحاليل [2, 5].

2.2 المحلول العياري Calibrator

هو محلول يحتوي على المادة المدروسة معلومة التركيز، أُعدت إما من المواد المرجعية أو تم شراؤها محضرة وجاهزة، وتستخدم لمعايرة العينة والاختبار، وينبغي عند الإمكان إعداد المحاليل العيارية ضمن مزيج مكوناته مماثلة للعينات الحيوية المراد تحليلها[5].

3.2 محاليل مراقبة الجودة Quality Control Solutions

هي محاليل تحتوي على المواد المدروسة، يتم تحضيرها إما من المواد المرجعية (بشكل منفصل عن المحاليل العيارية؛ والتي يتم وزنها عادة وقياسها بشكل منفصل)، أو تم شراؤها، أو حتى يتم الحصول عليها من مجموعة من العينات التي تم تحليلها سابقًا، وتخضع لموافقة أخلاقية Ethical Approval طبقا لقانون الأنسجة البشرية. وتستخدم محاليل المراقبة من المصادر آنفة الذكر لتحديد صحة المعايرة، والتي تتلخص بثباتية التقدير الكمي مع مرور الوقت. وكلما أمكن، ينبغي أن تكون محاليل المراقبة QC solutions المستخدمة متوافقة مع النسيج المستخدم، والمحاليل العيارية المذكورة أعلاه [5].

4.2 الأنسجة الحيوية Tissues

هي أية أنسجة حيوية صلبة القوام والتي عادة ما توزن من أجل التحليل السمي، مثل: الدماغ، الكبد، العضلات، الكلى، الشعر، العظم، أو العقي (أول براز للمولود الجديد بعد ولادته Meconium) [4].

5.2 السوائل الحيوية Fluids

هي أي عينة حيوية سائلة، والتي يمكن أن تقاس بالحجم في طريقة التحليل، مثل: الدم، البول، العصارات، المصل، سائل الخلط الزجاجي للعين، والسوائل الفموية [6, 4].

6.2 العينات غير الحيوية Non-Biological Samples

هي أية عينة غير حيوية، سواء أكانت صلبة أم سائلة ذات صلة بالسمية المحتملة في مسرح الحادث أو الجريمة، أو كمواد مضبوطة (Seized Material)، يمكن أن تقاس حجماً أو وزناً بحسب طبيعة العينة.

7.2 العينة العيارية Reference Sample

هي عينات تحتوي على المادة المراد تحليلها معلومة التركيز، أُعدت إما من المواد المرجعية القياسية (من المحاليل العيارية) أو كعينات يتم شراؤها محضرة وجاهزة، وتستخدم لمعايرة الطريقة التحليلية. وينبغي عند الإمكان تحضيرها من المحاليل العيارية ضمن مزيج من المكون الحيوي (Matrix) مكوناته مماثلة للعينات المدروسة [5].

8.2 عينة مراقبة الجودة Quality Control Sample

هي عينة فارغة تحتوي على المواد المراد تحليلها بتراكيز مختلفة، يتم تحضيرها إما من المواد المرجعية القياسية (من محاليل مراقبة الجودة التي تحضر بشكل منفصل عن المحاليل العيارية)، أو يتم شراؤها. وتستخدم لمراقبة سير عمليات التحليل ومدى مطابقة الإجراءات التحليلية الروتينية لمعايير التحقق من صلاحية الطرق التحليلية، ويجب أن تطبق خلال إجراءات أي سلسلة تحليلية روتينية وتعامل نفس معاملة العينات المدروسة [5].

9.2 سلامة التخفيف (التمديد) Dilution Integrity

هي ضمان التخفيف المناسب للعينات بحيث لا تتأثر دقة النتائج وصحتها عند تخفيف العينة بالوسط المناسب [3,4].

10.2 منحنى المعايرة/ Calibration Curve/ Standard Curve

هو تمثيل بياني لاستجابة كاشف جهاز التحليل لتراكيز مختلفة من محلول عياري للمادة المرجعية، ومن خلال منحنى المعايرة يمكن معرفة تحديد كمية المواد المدروسة في عينات مجهولة مادامت أن تراكيز هذه العينات تتراوح بين أعلى وأدنى تركيز من مدى منحنى المعايرة [4,7-9].

11.2 مخطط التشتت المعياري (القياسي) Standardized Residual Plot

وهو تمثيل بياني لتشتت القيم التجريبية لاستجابة الجهاز عند كل تركيز عن القيم الحسابية لنفس التركيز وفق منحنى المعايرة، ومن خلال تشتت قيم النتائج حول قيمة الصفر يمكن تقييم ما إذا

كان منحنى المعايرة يتبع الدرجة الأولى أو الثانية أي خطي أو غير خطي، ويمكن استبعاد القيم الشاذة من النتائج لجعل منحنى المعايرة يصف النتائج بدقة، وذلك يسهل عملية تحديد كمية (تراكيز) المواد المدروسة بدقة على منحنى المعايرة [3, 4].

12.2 نمط المعايرة Calibration Model

هو النموذج الحسابي الذي يشرح العلاقة بين تركيز المادة المراد تحليلها في العينات المدروسة واستجابة الجهاز المستخدم في طريقة التحليل، ويتم ذلك من خلال دراسة العلاقة بين تغيرات استجابة جهاز القياس والتراكيز من خلال رسم التمثيل البياني لهذه المتغيرات، والحصول على منحنى المعايرة ومعرفة ما إذا كانت العلاقة خطية تمثل بمعادلة من الدرجة الأولى، أو غير خطية تمثل بمعادلة من الدرجة الثانية أو الثالثة [3, 4, 7, 10, 11].

13.2 مجال العمل Working Range

هو مجال التراكيز التي يمكن كشفها من خلال جهاز التحليل بشكل ملائم، بحيث إن جهاز القياس يتأثر ويتحسس بالمادة، ويصدر إشارة واستجابة معينة وفق منحنى المعايرة المعتمد والتي تعزى لوجود المادة المرجعية أو المادة المراد تحليلها [3, 4].

14.2 التشويش الناتج عن المواد غير المطلوب تحليلها Interferences of Non-targeted analytes

هي اضطرابات في إشارة جهاز التحليل تعزى إلى تحسس جهاز التحليل لمواد غير المادة المراد تحليلها والناتجة عن العينات الحيوية وغير الحيوية، مثل نواتج الأيض (الاستقلاب)، أو شوائب، أو عن مواد عيارية داخلية. والتي يمكن أن تؤثّر وتشوّش على دقة الكشف النوعي والكمي للمادة المراد تحليلها [4, 7].

15.2 الأثر المُرحّل من المادة Carryover

هو ظهور استجابة لجهاز التحليل وإعطاؤه إشارة استجابة للمادة المراد تحليلها عند قياس عينات لاحقة بشكل مباشر بعد قياس عينات تحوي المادة المراد تحليلها، وتكون هذه الاستجابة ناتجة عن أثر متبقٍ للمادة المراد تحليلها من القياس السابق في إحدى الأدوات المستخدمة أو أجزاء جهاز التحليل يُرحّل إلى العينة اللاحقة، ما يؤثر على النتيجة الحقيقية للعينات اللاحقة [2-4].

16.2 حد الكشف النوعي Limit of Detection LOD

هو أقل تركيز من المادة المراد تحليلها في العينة، والذي نستطيع معه التفريق بين العينة الفارغة والعينة الحاوية على المادة المستهدفة [2-4, 9]، وبعبارة أخرى التفريق بين العينة السلبية والإيجابية.

17.2 حد التقدير الكمي Limit of Quantitation LOQ

هو أقل تركيز من المادة المراد تحليلها في العينة يمكن قياسه بدقة عالية بقيم تحيز ودقة مقبولة [3, 4, 9, 11, 12].

18.2 نسبة استرداد المادة المراد تحليلها في الفحص Recovery of analyte in Assay

هي نسبة استجابة جهاز التحليل الناتجة عن كمية (تراكيز) محددة من المادة المراد تحليلها بعد إضافتها للعينة المدروسة أو استخلاصها من العينة المدروسة إلى استجابة جهاز التحليل الناتجة عن نفس الكمية من المادة المراد تحليلها بمحلولها المائي أو المذيب العضوي المناسب، وبعبارة أخرى هي الكمية المستحصل عليها من المادة المراد تحليلها بعد إجراءات تحضير العينة مثل: الاستخلاص [3, 4, 9-11, 13].

19.2 تعزيز/تثبيط عملية التأين (التشرد) Ionization Suppression/ Enhacement

هو تداخل مباشر أو غير مباشر للمكونات البيولوجية للعينات الحيوية أو المواد غير المادة المراد تحليلها في العينات غير الحيوية في استجابة جهاز التحليل، ما يؤثر على عملية تأيّن المادة المراد تحليلها أثناء تحليلها في الجهاز، والذي قد يمثل بتعزيز التأيّن أو تثبيطه [7, 14].

20.2 الانتقائية Selectivity

هي قدرة الطريقة التحليلية على التمييز بين المركبات المختلفة دون أي تداخل بينها [3, 4, 9, 10, 13].

21.2 الخصوصية Specificity

هي قدرة طريقة التحليل على تمييز المادة المرد تحليلها ضمن العينة بوجود مواد أخرى من مكونات العينة (دون تأثير بيولوجي) أو مواد مضافة وفقاً لظروف الطريقة التحليلية. وتتعلق خصوصية وانتقائية الطريقة التحليلية بتركيز المادة المراد تحليلها، ويجب أن تحدد عند أخفض منطقة من التراكيز في مجال المعايرة، بحيث تضمن أن آثار الشوائب والمواد المتداخلة أو المشوشة، وما إلى ذلك والتي قد تكون موجودة في العينة غير ذات تأثير على نتائج المادة المراد تحليلها [13, 10, 9, 4, 3].

22.2 الثباتية Stability

هي مقاومة المادة المراد تحليلها والمدروسة للتغيرات الكيميائية والفيزيائية ضمن العينة المدروسة تحت شروط محددة، وخلال فترات زمنية محددة، تبدأ من جمع العينة وتعبئتها ونقلها، ومن ثم حفظها وتحضيرها وتحليلها وانتهاءً بتخزينها [13, 10, 4-2].

23.2 معامل التباين (Coefficient of Variation (CV

هو معامل إحصائي يصف الضبط في صحة ودقة النتائج، ويعرف أيضاً بأنه قيمة الانحراف المعياري النسبي (RSD)، وهو مقياس معياري لقياس تبعثر النتائج في التوزع الاحتمالي والتوزع التكراري. وعادة ما يعبر عنه بنسبة مئوية، ويحسب من خلال علاقة رياضية تمثل حاصل قسمة الانحراف المعياري للنتائج SD على القيمة المطلقة للمتوسط الحسابي للنتائج μ [13, 4, 2].

24.2 الصحة Accuracy

هي التقارب والمطابقة بين القيمة الوسطية لقياسات متغير ما، والقيمة الحقيقية المقبولة لهذا المتغير، وعادة ما يشار إليها بفرق النسبة المئوية، وإنّ مصطلح الصحة(Accuracy) غالبًا ما يستعاض عنه بمصطلح التحيز [10, 4-2](Bias).

25.2 الضبط Trueness

هو التقارب والمطابقة عند قياس عدد كبير من العينات بين القيمة الوسطية لقياسات متغير ما، والقيمة المرجعية المقبولة لهذا المتغير.

26.2 الدقة Precision

هي قياس مدى التقارب بين سلسلة من نتائج القياسات تم الحصول عليها من تكرارات متعددة (Repeatibility) لنفس العينة المتجانسة تحت نفس الظروف، وتقيس الدقة الخطأ العشوائي لطريقة تحليلية ما، ويعبر عنها بمعامل الانحراف النسبي (RSD) فيما بين العينات في ذات الوقت أو اليوم (Intra-assay) أو بين أوقات أو أيام متباينة (Inter-assay) [15, 10, 4-2].

27.2 دقة التكرار Repeatability

هي دقة الطريقة التحليلية تحت ظروف تحليلية موحدة لنفس المادة المراد تحليلها، ونفس الجهاز، والمختبر، والشخص المحلل [15, 10, 4-2].

28.2 دقة المقارنة Reproduciability

هي دقة الطريقة التحليلية تحت ظروف تحليلية مختلفة تشمل نفس المادة المراد تحليلها، في مختبرات وأجهزة تحليلية مختلفة، وأشخاص محللين مختلفين [15, 10, 4-2].

29.2 قوة الطريقة التحليلية Robustness

هي مقاومة الطريقة التحليلية للمتغيرات والعوامل ذات التأثير (مثل: تغير درجات حرارة الغرفة) ضمن ظروف العمل [15, 10, 4-2].

30.2 الحد القطعي (Decision Point) Cutoff

هو قيمة تركيز حدية تستخدم لتوزيع النتائج إلى فئات معينة، ويتم تحديده إداريّاً أو قانونيّاً بناء على دراسات معتمدة، ويتم الاعتماد عليه غالباً في فحوصات المسح الشامل أو الاختبارات التشخيصية، ووفقاً لقيمته تقسم النتائج إلى سلبية أو إيجابية بشكل مبدئي، ومثال ذلك قيمة الحد القطعي للهيروين في البول ng/mL 2000 وتجاوز هذه القيمة يعني أن النتيجة إيجابية مبدئيًّا، وقد تختلف قيم الحد القطعي بين الدول والمؤسسات.

3. مجال التطبيق العملي Scope

يعمل خبير علم السموم الجنائي مع خبراء الطب الشرعي

ورجال الأمن، وذلك من أجل معرفة دور السموم، أوالكحول، أوالمخدرات في الوفاة أو في قضية جنائية ما. حيث يطلب من خبير السموم الجنائي تحديد وجود المخدرات أو المواد السامة في سوائل الجسم والأنسجة الحيوية قبل أو بعد الوفاة، وكذلك في إثبات أو نفي بعض الحالات قضائيًا، وذلك باستخدام أحدث الطرق والأجهزة القادرة على تحديد أقل كميات من المواد ذات السمية والتأثير السلبي على الجسم. وبالتالي لا بد لخبير علم السموم الجنائي أن يتحقق من صحة ودقة وصلاحية الطريقة المستخدمة، وذلك لتأسيس أدلة قوية لا تحتمل الشك في القضية الجنائية.كما أن تحديد اتجاه أية قضية جنائية تخص علم السموم بدقة وموثوقية عالية له أثر كبير على الأمن العام والسلامة، كما أن تحري الوفاة بسبب نوع من أنواع السموم ممكن إجراؤه في مختبرات متخصصة من القطاع العام أو الخاص.

وتختص هذه الإرشادات التوجيهية بوصف المنهجية المتبعة عالمياً في التحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي، حيث تتنوع طرق تحليل العينات في علم السموم الجنائي بحسب طبيعة العينات والمواد المراد تحليلها، وبحسب الهدف المرجو من طريقة التحليل، فهناك طرق تحليل طيفية لونية (Spectro-photometry methods)، وهناك طرق تحليل كروماتوغرافي (Chromatographic methods)، وهناك طرق تحليل مناعي (Immunoassay)، وهناك طرق تحليل ذات طابع حيوي جزيئي(Molecular-biological methods)، وجميع الطرق آنفة الذكر يتم تطويرها لتكون مناسبة لتحليل عينات السوائل أو الأنسجة الحيوية والعينات غير الحيوية، وذلك بعد معالجتها خلال عمليات تحضير ملائمة للعينات، لجعل المواد المراد تحليلها سهلة الكشف نوعياً وسهلة التقدير كمياً، ويتم ذلك من خلال تطوير وتحسين طريقة التحليل، ومن ثم الشروع بالتحقق من صلاحيتها.

4. تطوير وتحسين طريقة التحليل Method Development

يتم تطوير الطرق التحليلية وفق هذه الإرشادات التوجيهية عبر مرحلتين:

المرحلة الأولى: تطوير عملية تحضير وإعداد العينات (مثل الاستخلاص).

المرحلة الثانية: تطوير طريقة التحليل الآلي (القياس بالأجهزة) وأخذ القياسات وجمع ومعالجة النتائج والبيانات [7].

ومن الضروري الأخذ بعين الاعتبار عند التحقق من صلاحية طريقة تحليلية قياس القيم النوعية والكمية بنفس الطريقة والظروف التحليلية وبنفس التقنيات المستخدمة لطريقة التحليل النهائية التي تم اعتمادها، كما ينبغي أن يتم تطبيق مبادئ الممارسة المخبرية الجيدة (Good Laboratory Practice; GLP) وحفظ السجلات وفق مفاهيم هذه الوثيقة، وهذا يشمل أيضًا توثيق جميع القرائن والمتغيرات التي يتم قياسها وتقييمها عند تطوير الطريقة وابتكارها، حتى ولو لم تكن النتائج مقبولة [4, 3] في ضوء ما يلي

1.4 تطوير وتحسين تقنيات تحضير وإعداد العينة Optimizing Sample Preparation

يجب تقييم وتحسين التقنيات المستخدمة في عملية تحضير العينة باستخدام المواد المرجعية للمادة المراد تحليلها. فالهدف الأوّلي هو أن نثبت أنّ خطوات تحضير وإعداد العينات تؤدي إلى استخلاص مناسب، وكشف مناسب، وتفسير مناسب، وتحديد نوعي وكمي مناسبين للمادة المراد تحليلها والكشف عنها، ويجب تقييم عملية تحضير العينة باستخدام العينات الممزوجة بالمادة العيارية (أي المضاف إليها مواد عيارية قياسية أو مواد عيارية داخلية)[7, 4].

2.4 تطوير وتحسين العوامل المتعلقة بالأجهزة ومعالجة البيانات Optimizing the instruments and data manipulation

تم تحديد وتحسين العوامل المتعلقة بالأجهزة التحليلية ومعالجة البيانات من خلال إجراء التحليل باستخدام المواد المرجعية للمواد المراد تحليلها، وذلك من أجل تحقيق الكفاءة المثلى للجهاز [4, 7, 11].

5. الحالات التي تتطلب التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية

يجب التحقق من صلاحية الطرق التحليلية عندما يكون هناك ضرورة لإثبات كفاءة وأداء الطريقة التحليلية والمعايير التي يتم قياسها، وإثبات أن الطريقة التحليلية مناسبة للاستخدام في إجراء تحليل معين، ومثال ذلك:

- عند استخدام طريقة تحليلية جديدة.
- عند تعديل طريقة تحليلية سابقة، من أجل تحسين كفاءتها بتعديل أو تغيير أحد أو بعض الإجراءات التحليلية المتبعة، أو من أجل إضافة أو تعديل مواد مراد تحليلها غير تلك التي

استخدمت عند التحقق السابق من صلاحيتها.

- عند إثبات التكافؤ بين طريقة تحليلية معتمدة وطريقة جديدة، أو بين جهاز معتمد وجهاز جديد [11].
- عند اتباع طرق تحليلية غير مطابقة لمواصفات هذه الإرشادات [7, 4].

وإن المعايير أو القيم التي يراد التحقق من صلاحيتها تعتمد بشكل كبير على الظروف المحيطة بالطريقة التحليلية المستخدمة، وبشكل مشابه؛ فإنه بعد التحقق من صلاحية الطريقة يجب تنقيح الطريقة، ويعتمد مدى ووتيرة إعادة التحقق من صلاحية الطرق التحليلية التي تم التحقق من صلاحيتها سلفًا على طبيعة التغييرات المحددة لذلك، أو على سياسة المختبر.

6. إنشاء خطة التحقق من صلاحية الطرق التحليلية

لا شك في أن المختبر مسؤول عن التأكد بدقة من صلاحية الطرق التحليلية المستخدمة فيه؛ ولذلك فإنّ إنشاء وتأسيس خطة لعملية التحقق من الصلاحية له أولوية مُقدَّمة على الشروع بتنفيذ تجارب اختبارت الصلاحية للطرق التحليلية. كما أنّ خطة التحقق من الصلاحية مستقلة عن بقية الإجراءات القياسية المتبعة للتحقق من صلاحية الطريقة التحليلية [16].

ويجب أن تتضمن خطة التحقق من الصلاحية وصف الطرق الآلية المراد استخدامها، وتقنيات تحضير العينات المراد استخدامها، والمواد المراد استخدامها لكل طريقة نوعية وكمية. ويجب أن توثّق الخطة متطلبات التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية، وأن توثّق حدود كشف الطريقة المراد اتباعها، وأن توثّق قدرة الطريقة على النجاح. كما يجب أن تنص الخطة على توجيه التجارب في الاتجاه الذي سيتم العمل به وتحديد معايير القبول لكل متغير (ستعرض أمثلة في الإصدار القادم).

7. المعايير المتطلبة للتحقق من صلاحية طريقة تحليلية اعتماداً على هدف الطريقة

لقد قامت كل من مجموعة العمل العلمية لتحليل المؤثرات العقلية المضبوطة (SWGDRUG)، والمجموعة العلمية لعلم السموم الجنائي (SWGTOX) التابعة لمكتب التحريات الفيدرالي، والشبكة الأوروبية لمؤسسات العلوم الجنائية (ENFSI)، والاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC) وجمعية التعاون الدولي للتتبع والكيمياء التحليلية (CITAC)، وشبكة المنظمات الأوروبية للكيمياء التحليلية (Eurachem)، بنشر سلسلة مفصلة من التوصيات والإرشادات التوجيهية. ويمكن أن تصنف طرق التحليل وفقاً لأساليب متعددة، ولكن في الحالة الراهنة ينبغي دائماً أن يكون هناك فارق مهم بين الطرق الكمية والنوعية؛ حيث تتنوع طرق التحليل في علم السموم الجنائي حسب الأهداف المطلوب إنجازها. فمن طرق التحليل ما يهدف إلى تحري مواد بشكل نوعي من خلال طرق المسح الشامل (Screening methods)، وطرق الكشف النوعي (Qualitative methods)، وطرق التعرف أو الإثبات (Identification/confirmation methods)، وطرق التحديد الكمي(Quantitative methods)، ولذلك فإنّ معايير كل طريقة رئيسية تختلف باختلاف الهدف من التحليل، وعليه فإنه يجب تقييم معايير الصلاحية وفقاً للغرض المطلوب من التحليل، ويوضح الجدول رقم (1) أهم المعايير القياسية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية المطلوب تقييمها وفقًا للمبادئ التوجيهية:

8. المتطلبات الواجبة لإجراء تجارب التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية

يجب أن يتم إجراء جميع تجارب التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية باستخدام عينات ممزوجة بالمادة العيارية (Spiked samples)، ما لم يُذكر خلاف ذلك. وفي بعض الحالات الخاصّة (مثل: طرق المسح الشامل باستخدام المقايسات المناعية) يكون من الأنسب تحليل عينات آدمية (بشريّة) تم تشخيصها سلفًا بدلاً من استخدام عيّنات ممزوجة بالمادة العيارية، وذلك من أجل دراسات محددة للتحقق من الصلاحية [12].

وتُجرى اختبارات التحقق من الصلاحية بإجراءات مماثلة لإجراءات طريقة تحليل العينات المدروسة؛ أي بإجراء دراسات التحقق من الصلاحية في أيام مختلفة، أو من قبل عدد من محللين أو غير ذلك، ما يضمن أن الأجهزة التحليلية تلبي نفس متطلبات الأداء اليومية لطرق القياس التحليلية [12, 4, 3].

وينبغي قدر الإمكان، أن يتم تحضير العينات الممزوجة بالمادة العيارية (Spiked samples) بإضافة مواد مرجعية نقية من مصادر مختلفة (شركة مزودة أخرى، أومنتج برقم تعريف آخر (التشغيلة)

جدول ١- أهم المعايير القياسية اللازمة للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية النوعية والكمية، والمسح، وطرق المقايسات المناعية [4, 12]

معيار التحقق من الصلاحية Validation parameter	طرق التحليل النوعي Qualitative methods	طرق التحليل الكمي Quantitative methods	طرق المسح والمقايسات المناعية Immunoassay-based Screening	طرق المسح الأخرى Other screening methods
الانتقائية والخصوصية Selectivity and Specificity	✓	✓	✓	✓
المنحنى العياري Calibration curve		✓		
حد الكشف النوعي LOD	✓	✓	✓	✓
حد التقدير الكمي LOQ	✓	✓		
الصحة Accuracy		✓		
الدقة Precision		✓	✓	✓
سلامة التخفيف Dilution Integrity		✓	✓	✓
الأثر المرحل Carryover	✓	✓		
دراسات التداخل Interference studies	✓	✓	✓	✓
تعزيز/تثبيط التأين Ionization enhancement/suppression	✓	✓		
الثباتية Stability		✓	✓	✓

تختلف عن مصادر تلك المستخدمة في تحضير عينات المعايرة، أما في الحالات التي يجب فيها استخدام نفس المصدر، فيجب تحضير تلك العينات من محاليل وتراكيز مختلفة [4, 7] .

وإن المتطلبات التالية تمثل الحد الأدنى المطلوب لتقييم معايير التحقق من صلاحية الطرق التحليلية المدرجة في علم السموم الجنائي، وقد تم سردها هنا عشوائيًا، وليس بالضرورة بالترتيب اللازم فعله بالإجراءات المخبرية العملية، ومن الممكن الاطلاع على بعض تجارب التحقق من الصلاحية في الملاحق التي ستصدر لاحقاً، ويشمل القسم 11 إرشادات بشأن كيفية تنفيذ تجارب التحقق من الصلاحية بكفاءة عالية.

1.8 الانتقائية، والخصوصية Selectivity and Specificity

تعبر انتقائية الطريقة التحليلية عن قدرتها على التمييز بين

المركبات المختلفة دون أي تداخل بينها. وتعبر الخصو صية عن قدرة الطريقة التحليلية على التمييز النوعي والتحديد الكمي للمادة المراد تحليلها، وكذلك المادة العيارية الداخلية بوجود مكونات أخرى في العينة، وتتعلق بتركيز المادة المراد تحليلها، ويجب أن تحدد عند أخفض مدى (منطقة) من التراكيز في مجال المعايرة. ومن خلال انتقائية وخصوصية طريقة التحليل يجب أن تضمن صلاحية الطريقة أن آثار الشوائب والمواد المشوشة وما إلى ذلك من المواد التي قد تكون موجودة في العينة أنها ليست ذات تأثير على نتائج المادة (المواد) المراد تحليلها. وتشمل المواد المسببة للتداخل في السوائل البيولوجية مكونات السوائل نفسها، ونواتج الأيض (الاستقلاب)، ومنتجات التحلل [2-4, 10, 12].

ويتم تقييم الخصوصية من خلال الحصول على نتائج قياس عينات فارغة (البلازما والبول، أو عينات أخرى) من عشرة مصادر مختلفة على الأقل، وينبغي اختبار كل عينة فارغة لاحتمالية وجود تداخل أو تشويش (Interference)، ويتم تقييم الانتقائية عند قياس أكثر من مادة مراد تحليلها، حيث ينبغي اختبار كل مادة مراد تحليلها للتأكد من عدم وجود تداخل، وكذلك يجب أن تشمل دراسات التقييم الفعلية الأدوية المصاحبة وغيرها من المواد السمية الممكن وجودها في العينات.

وينبغي ضمان الانتقائية والخصوصية عند حد التقدير الكمي (LOQ)، وتكون النتائج مقبولة في حال كانت إشارة التشويش أقل بنسبة 20% من الإ شارة الخاصة بحد التقدير الكمي بالنسبة للمادة المراد تحليلها، و5% بالنسبة للمادة العيارية الداخلية (IS).

كما ينبغي تقييم إمكانية تشكل المادة المراد تحليلها من نواتج الأيض بعملية معكوسة (راجعة) سواء أثناء إجراءات تحضير العينات أو أثناء قياسها في أجهزة التحليل، ويتم ذلك من خلال تحليل نواتج الأيض المحتمل تحولها بشكل عكسي إلى المادة الأم المراد تحليلها، وذلك بمزجها في عينات فارغة [2-4, 10, 12].

2.8 منحنى ونمط المعايرة Calibration Curve and Model

يتم تحديد منحنى ونمط المعايرة أثناء التحقق من صحة الطريقة التحليلية الكمية باستخدام تراكيز مختلفة لمحاليل المواد العيارية القياسية المرجعية (Reference Standards)، والتي تقاس بالطريقة التحليلية المتبعة باستخدام الجهاز التحليلي المعتمد لمعرفة تغيرات استجابة الجهاز بدلالة التراكيز، ويتم ر سم المخطط البياني الممثل لتغيرات الاستجابة بدلالة التراكيز، والذي يعرف باسم منحنى المعايرة.

وعند إنشاء منحنى المعايرة، يجب تحديد نمط المعايرة لجميع طرق التحليل الكمي، ويجب أن يقترن ذلك أولاً مع تحديد مجال تراكيز المادة المراد تحليلها وفق الطريقة المستخدمة، والذي يعرف بأنه مجال العمل (working range)حيث إنه ضمن هذا المجال توجد علاقة محددة بين استجابة الجهاز (الممثلة بنسبة مساحة القمة الكروماتوغرافية للمادة العيارية القياسية(RS) إلى مساحة القمة الكروماتوغرافية للمادة العيارية الداخلية(IS) وتركيز المادة المراد تحليلها في العينة. وإنّ معرفة نمط المعايرة المناسب (سواء أكان خطياً أم تربيعياً) يعد ضروريًّا جدًّا للحصول على تحديد كمي موثوق ودقيق للمادة المدروسة، ويستحسن استخدام عينات معايرة مع المكونات النسيجية للعينة الحيوية (Matrix) لكن ذلك ليس شرطًا أساسيًا [2-4, 7, 10, 13].

وبغض النظر عن مكونات المادة الفارغة المستخدمة في تحضير المحاليل العيارية فإنه يجب على المختبر أن يثبت أنّ صحة ودقة النتائج مقبولتان من خلال تحضير عينات مرجعية في سوائل حيوية أو غير حيوية ينوى تحليلها وفق طريقة التحليل.

وعلى سبيل المثال، يمكن أن تعطي طرق تحديد الكحول في الدم قيم صحة ودقة مقبولة في جميع اختبارات الدم باستخدام محاليل عيارية تم تحضيرها بالماء، وليس بمصل الدم. وبشكل مشابه فإنه يمكن إثبات قيم الصحة والدقة المقبولة لتحليل مواد عيارية في سائل الدم، إلا أنها حضرت ضمن محاليل حيوية أخرى مختلفة (عينات نسيجية بعد الوفاة، المصل، البول)[17].

ومن الضروري عند إنشاء منحنى المعايرة استخدام محاليل معايرة تغطّي تراكيزها المجال من التراكيز والذي يتوقع كشف المادة خلاله. وإضافة إلى العينة السالبة الفارغة يجب تحضير ستة تراكيز مختلفة على الأقل قابلة للكشف النوعي والتقدير الكمي ضمن مجال المعايرة. ويجب أن يكون الاختلاف بين كل تركيزين متتاليين كبيرًا بشكل مناسب، وذلك لمعرفة سلوك المعايرة على مجال كبير، ويتطلب كحد أدنى إجراء خمسة تكرارات لقياس كل تركيز. ويجب أن يتم إجراء تكرار القياسات اللازمة لإنشاء منحنى المعايرة على شكل مجموعات في أزمنة منفصلة. وتوضع جميع نقاط البيانات الناتجة عن تكرارات القياس الخمسة (الحد الأدنى للتكرارات)

في مخطط بياني واحد باستخدم برنامج أو تطبيق إحصائي مثل (Microsoft Excel) وذلك لإنشاء منحنى المعايرة ومعرفة سلوك الاستجابة بدلالة التراكيز، وبالتالي نمط المعايرة، والأصل أنه ليس من الضروري أن يمر منحنى المعايرة في جميع نقاط العلاقة بين الاستجابة والتركيز المتحصلة من التجربة [4].

وإن نمط المعايرة الأبسط والشائع والمستخدم هو نمط المعايرة الخطي، وينتج عندما يكون هناك تغير طردي ثابت لاستجابة جهاز التحليل عند قياس التراكيز خلال مجال المعايرة، أما عندما يكون هناك تغير غير ثابت في مجال المعايرة فإنّ سلوك المعايرة يكون غير خطي (non-linear)، ما يعني أن تغير استجابة القياس بدلالة التراكيز يتمثل بمعادلة ليست من الدرجة الأولى (frist order equation). وفي نهاية المطاف، فإن أفضل طريقة هي استخدام أبسط نموذج للمعايرة يتلاءم مع علاقة التركيز باستجابة القياس [12, 7, 4].

وعلى الرغم من أن إنشاء منحنى المعايرة أصبح ممارسة واسعة الانتشار، إلا أنه لا يمكن تقييم نمط المعايرة ببساطة عن طريق معامل الارتباط(correlation coefficient (r فقط، وبدلاً من ذلك فإن تقييم نمط المعايرة يجب أن يتم بصريًّا بحيث يتم تضمين أكبر عدد من النقاط التجريبية في المنحنى، وذلك باستخدام مخطط التشتت المعياري (Standardized residual plots). وتتيح هذه الطريقة فحص القيم المتطرفة فيما إن كان يجب التخلص منها أو إلغاؤها إن وجدت لتكون ذات دلالة إحصائية (على سبيل المثال، خارج مجال الانحراف المعياري 3±SD).

وإضافة إلى ذلك، فإن مخطط التشتت المعياري (Standardized residual plots) يسمح بإمكانية معرفة ما إذا كانت تباينات النتائج متساوية ضمن مجال المعايرة وبدرجة تشتت متساوية من أجل كل تركيز. كما أنه يعطي مؤشرًا إذا كان منحنى المعايرة بنمطه المختار يمر بشكل عام بكافة النقاط على المخطط البياني. وعلى سبيل المثال فهو يعطي مؤشرًا فيما إذا كان نمط المعايرة المختار يلائم النتائج العملية للقياس، فمثلاً تشتت النتائج عشوائيًّا حول الخط الصفري (تباين متماثل) يدل على أن النمط الخطي للمعايرة هو الأنسب. وتوجد بدائل أخرى مناسبة لتقييم أنماط المعايرة، فمن الممكن أن تخضع العلاقة التي تصف تغيرات الاستجابة بدلالة التراكيز إلى معادلة من الدرجة الثانية، وهنا يختلف هذا النمط عن النمط الخطي [4, 3].

وإذا تم إنشاء نمط معايرة خطي، فإنه يمكن استخدام عدد تراكيز أقل للمحاليل العيارية، وكذلك تكررات قياس أقل من أجل إجراء المعايرات في التحليل الروتيني. ومع ذلك وفي حال تم اختيار عدد أقل من تراكيز المحاليل العيارية في التحليل الروتيني أثناء إجراء المعايرة فإنه يجب استخدام نفس المحاليل العيارية الخاصة بمراقبة الجودة (Calibrators) (نفس العدد، والتكرارات، والتراكيز) التي نفذت خلال دراسات التحقق من الصلاحية من أجل تقييم الصحة والدقة أثناء العمل الروتيني. كما ينبغي أن تتضمن المحاليل العيارية المستخدمة أدنى وأعلى تراكيز ضمن مجال المعايرة، وينبغي أن تحتوي على ما لا يقل عن أربع نقاط معايرة غير صفرية (عينات ممزوجة بالمادة العيارية المرجعية)[4].

وبالإضافة إلى ذلك، فإنّه عند إنشاء نمط المعايرة من أجل طريقة تم التحقق من صحتها، فإنّه لا يجوز تغيير نمط المعايرة عشوائيًّا ليوافق نتائج مقبولة أثناء التحليل، وعلى سبيل المثال لا يجوز الانتقال من نمط خطي لم يتم التأكد منه تماماً إلى نمط خطي معتمد من أجل ضبط قيم الجهاز وأدائه أثناء التحليل[4].

3.8 حد الكشف النوعي Limit of Detection

لا بد من إجراء دراسة تعيين حد الكشف النوعي (LOD) لجميع الطرق التحليلية، ويوجد عدد من الطرق المختلفة لتعيين حد الكشف النوعي. وينبغي في بداية الأمر اختيار الطريقة التحليلية متضمنةً تحضير العينات وإجراءات التحليل وفق الأجهزة التحليلية المتاحة بما يضمن تقييماً منطقيًّا ومقبولاً لحد الكشف النوعي، حيث تتضمن دراسة حد الكشف النوعي لطريقة تحليلية ما مراعاة كفاءة أجهزة التحليل وآلية عملها ونوع مكونات مزيج العينة (Matrix) وسلامة العينة وإجراءات تحضيرها؛ ولذلك يجب تقييم حد الكشف النوعي عبر عدة قياسات أو عدة تجارب باستخدام عينات ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) من ثلاثة مصادر مختلفة على الأقل من العينات الفارغة (Blank Matrices) مالم يتم ذكر خلاف ذلك، وإضافة إلى ذلك فإنه من الضروري التأكد من أنّ حد الكشف النوعي يناسب جميع المعطيات الخاصة بطريقة التحليل، ومثال ذلك أنه يجب مطابقة طيف الكتلة الناتج عن قياس عينة ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) مع طيف كتلة مادة قياسية مرجعية ضمن عامل تطابق مقبول من خلال تحديد تجريبي لحد الكشف النوعي، وليس عن طريق حسابات نظرية.

ويجب تعيين حد الكشف النوعي وفق إحدى الطرق التالية:

1.3.8 تقييم حد الكشف النوعي للطرق التحليلية غير الآلية Estimating LOD for a Non-Instrumental Method

إن هذه الطريقة هي الأكثر شيوعاً عند العمل على إجراء تحليل مسحي للعينات (Screening) بهدف كشف وجود أو غياب مادة ما أو مجموعة من المواد (مثل؛ الاختبارات اللونية). ومن أجل تقييم حد الكشف النوعي بطريقة بصرية غير آلية يجب أن يتم مزج العينات (Spiking) بتراكيز متناقصة من المادة المراد تحليلها وتكرار القياس ثلاث مرات على الأقل، ولا بد عند الضرورة أن يشارك عدد من المحللين في تقييم حد الكشف النوعي في هذه الطريقة التحليلية، ويعد التركيز الأخفض من المادة المراد تحليلها والذي ينتج عنه نتيجة إيجابية هو الحد الأدنى الكافي للكشف النوعي [13, 12, 4, 3].

2.3.8 استخدام التركيز الأقل من المحلول العياري (غير الصفري) كحد للكشف النوعي Using the Lowest Non-Zero Calibrator as the LOD

هذا الأسلوب مفيد لطرق التحليل النوعي، في بعض الأمثلة قد يكتفى بتعريف حد الكشف النوعي كقيمة لأقل تركيز للمحلول العياري ذي التركيز الأدنى غير الصفري (عينة محتوية على تركيز من المادة العيارية القياسية المراد تحليلها)، وتستخدم كحد أدنى ثلاث عينات في كل قياس من المحلول العياري ذي التركيز الأدنى غير الصفري والتي يجب أن تحلل كلاً على حدة ثلاث مرات على الأقل لإثبات أن جميع معايير الكشف والتشخيص محققة، وعند الضرورة، فإنه من المقبول استخدام نفس تكرار قياسات المادة القياسية المرجعية والمستخدمة لإنشاء منحنى المعايرة (الفقرة ٨,٢) من أجل بعض العينات المُقاسة بهذه الطريقة، ولكن قد يضطر إلى استخدام عينات أو قياسات إضافية لتحقيق تسعة تكرارات للقياسات [13, 12, 10, 4, 3].

3.3.8 استخدام الحد القطعي كحد للكشف النوعي Using the Cutoff Concentration as the LOD

هذا الأسلوب مفيد لكل من طرق التحليل النوعي والكمي، ففي بعض الحالات قد يُكتفى بتعريف حد الكشف النوعي كقيمة لنقطة الحسم (الحد القطعي) التي يتم تحديدها إداريًّا في المختبر. فعلى سبيل المثال يستطيع المختبر تسمية تراكيز محددة للإيثانول 0.02 g/dL كنقطة حدية معرفة يتم اختيارها كحد كشف نوعي في الدم اعتماداً على نقطة الحسم التي يتم إقرارها إدارياً حتى لو كان من الممكن الكشف تحليلياً عن الكحول بتراكيز أقل من ذلك [3].

وبشكل مماثل بالنسبة لاختبارات المقايسات المناعية (Immune Assay) المعتمدة على استخدام الأجسام المضادة، فللمختبر الحق في استخدام تركيز الحد القطعي كقيمة لحد الكشف النوعي لهذه المقايسات. ويجب تحليل ثلاثة عينات كحد أدنى من عينات ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) عند التركيز الموافق للنقطة الحدية، وأن يتم تكرار ذلك ثلاث مرات من أجل إثبات أن جميع معايير الكشف والتشخيص متطابقة (على الأقل تسعة قياسات في المجمل)، ومن المقبول استخدام نفس تكرار قياسات المادة القياسية المرجعية والمستخدمة لإنشاء منحنى المعايرة (الفقرة ٨,٢) من أجل بعض العينات المقاسة بهذه الطريقة، ولكن قد يضطر إلى استخدام عينات أو قياسات إضافية لتحقيق تسعة تكرارات للقياسات [4, 3].

4.3.8 تقييم حد الكشف النوعي باستخدام إشارة التشويش (الضجيج) في الخلفية Estimating LOD Using Background Noise

تفيد هذه الطريقة في تعيين حد الكشف النوعي فقط في طرق التحليل الآلي والتي ينتج عنها إشارات تشويش (ضجيج، Noise) في الخلفية. وفي هذه الحالة يجب استخدام ما لا يقل عن ثلاثة مصادر مختلفة للعينة الفارغة (Blank Matrix). فعلى سبيل المثال، إذا كان الاختبار يستخدم عينات الدم ما بعد الوفاة Postmortem blood، فلابد من استخدام ثلاثة مصادر مستقلة للدم ما بعد الوفاة postmortem blood من ثلاثة أشخاص متوفين مختلفين، ويمكن حساب حد الكشف النوعي في هذه الحالة بطريقتين [18, 9, 4]:

1.4.3.8 تقييم حد الكشف النوعي باستخدام مواد قياسية مرجعية Estimating LOD Using Reference Materials

يتم تحليل ثلاثة مصادر (أو أكثر) من عينات فارغة

ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) بتراكيز متناقصة، ويجرى التحليل مرتين وبشكل منفصل وتعاد القياسات ثلاث مرات لكل عينة. إن الحد الأدنى للكشف النوعي يمكن اعتباره أقل تركيز يتصف بما يلي:

١) ينتج استجابة متكررة وثابتة على جهاز القياس أكبر أو تساوي ثلاثة أضعاف مستوى التشويش (ضجيج، Noise) الناتج في خلفية الكروماتوغرام مقارنة بالعينات السلبية.

٢) يحقق معايير كشف وتحديد مقبولة بالمقارنة مع عينات محللة مسبقاً (على سبيل المثال، زمن الاستبقاء أو زمن الاحتفاظ (Retention Time; RT)، شكل القمة الكروماتوغرافية peak shape، ونسبة m/z لأيونات طيف الكتلة) [18, 4].

وفيما إذا كان الممكن تقييم نسبة الإشارة إلى التشويش (Signal to Noise; S/N) بالنظر، فإن ذلك يبقى موضوعيًا، لذلك فإنه يجب استخدام برنامج مخصص من أجل تحديد هذه النسبة. وإذا تم حسابها يدوياً، فإن الإشارة (Signal) تُعرّف على أنها ارتفاع إشارة الاستجابة (القمة) للمادة المراد تحليلها، والتشويش (Noise) يُعرّف على أنه الامتداد بين أعلى قمة وأخفض مستوى من الخط القاعدي للكروماتوغرام في المنطقة المحيطة بالقمة الناجمة عن المادة المراد تحليلها، وبالتالي يتم تقييم كل قياس بشكل مفرد.

$$Signal\ to\ noise\ (\frac{S}{N}) = \frac{hight\ of\ analyte's\ Peak}{amplitude\ of\ noise}$$

2.4.3.8 تقييم حد الكشف النوعي باستخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام Estimating LOD Using Statistical Analysis of Background

ولتعيين حد الكشف النوعي باستخدام هذه الطريقة، يجب تحليل ثلاثة مصادر مختلفة لعينات مزيج فارغة (Blank Matrices) ويجرى التحليل مرتين منفصلتين بتكرارية ثلاث مرات على الأقل. ويتم حساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لإشارة التشويش (مساحة القمة عند زمن الاستبقاء RT للمادة المراد تحليلها) من العينات الفارغة. وبشكل مماثل، يتم تحليل ثلاثة مصادر (أو أكثر) من عينات فارغة ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) بتراكيز متناقصة، ويجرى التحليل مرتين وبشكل منفصل، وتعاد القياسات ثلاث مرات لكل عينة. إن أقل تركيز للعينة الممزوجة بالمادة العيارية القياسية الذي يعطي بشكل مستمر إشارة استجابة أكبر من معدل إشارة التشويش في العينات الفارغة (X) مضافاً إليه مقدار ثلاثة أضعاف وثلث الضعف من الانحراف المعياري (SD) يمثل حد الكشف النوعي LOD، وفق العلاقة التالية:

$$LOD = X + 3.3\ SD$$

3.4.3.8 تقييم حد الكشف النوعي باستخدام منحنى المعايرة الخطي LOD Using a Linear Calibration Curve

هذه التقنية مفيدة لأي طريقة تحليل كمي تخضع لنموذج المعايرة الخطي. يتم تكرار قياس عينات منحنى المعايرة عبر مجال عمل الطريقة التحليلية (Working range) ثلاث مرات على الأقل. ويتم تحديد حد الكشف النوعي من خلال الانحراف المعياري (SD) للمقطع على المحور العمودي (الصادي) (y-intercept) والمتوسط الحسابي لميل خط منحنى المعايرة المستقيم (Avgm) لمنحنيات المعايرة الخطية الناتجة عن القياسات، وفق العلاقة التالية: [18]

$$LOD = 3.3 \times \frac{SD}{Avgm}$$

4.8 حد التقدير الكمي Limit of Quantitation

في جميع طرق التحليل الكمي لابد أن تتم إجراءات تعيين حد التقدير الكمي (LOQ)، وهناك عدة طرق مختلفة لتعيين قيمة (LOQ) للطرق التحليلية، وينبغي اختيار الطريقة التحليلية التي توفر أفضل قيمة لحد التقدير الكمي بالنظر إلى الأدوات والأجهزة التحليلية المستخدمة.

وتراعي دراسة تعيين حد التقدير الكمي لطريقة ما سلامة كفاءة أجهزة التحليل وسلامة العينة و القيود العملية الملازمة. ويجب أن يقدر حد التقدير الكمي (LOQ) من خلال قياسات متعددة باستخدام عينات فارغة وعينات ممزوجة بالمادة العيارية القياسية من ثلاثة مصادر مختلفة على الأقل من مزيج العينة الفارغة (Matrix)، ما لم يطلب خلاف ذلك كما هو مبين أدناه:

1.4.8 استخدام التركيز الأقل من المحلول العياري (غير

الصفري) كحد للتقدير الكمي Using the Lowest Non-Zero Calibrator as the LOQ

في بعض الحالات ربما يكفي اعتماد قيمة حد التقدير الكمي كقيمة لأقل تركيز لمحلول عياري غير صفري من محاليل المعايرة. ويجب أن يتم تحليل ما لا يقل عن ثلاث عينات من التركيز الأقل للمحلول العياري بثلاثة تكرارات لإثبات استيفاء وتحقيق معايير الكشف والتحديد والصحة والدقة. ومن المقبول استخدام نفس تكرار قياسات المادة القياسية المرجعية والمستخدمة لإنشاء منحنى المعايرة (الفقرة ٨,٢) من أجل بعض العينات المقاسة بهذه الطريقة، ولكن قد يضطر إلى استخدام عينات أو قياسات إضافية لتحقيق تسعة تكرارات للقياسات [18, 4].

2.4.8 استخدام تركيز الحد القطعي كحد للتقدير الكمي Using Cutoff Concentration as the LOQ

يمكن للمختبر أن يسمي تركيز الحد القطعي لطريقة تحليلية معينة كحد تقدير كمي حتى لو أمكن الوصول تحليليًّا لقيمة أقل من قيمة حد التقدير الكمي المقررة.

ويجب أن تكون التراكيز المستخدمة في هذه الطريقة ضمن مجال منحنى المعايرة المنشأ مسبقاً، كما يجب تحليل ثلاث عينات على الأقل من العينات الممزوجة بالمادة القياسية المرجعية بتركيز موافق لقيمة حد التقدير الكمي بتكرارية ثلاث مرات لإثبات استيفاء وتحقيق معايير الكشف والتحديد والصحة والدقة.

3.4.8 تقييم حد التقدير الكمي باستخدام إشارة التشويش (الضجيج) في الخلفية Estimating LOQ Using Background Noise

تفيد هذه الطريقة في تعيين حد التقدير الكمي فقط عند الاعتماد على طرق التحليل الآلي والتي ينتج عنها إشارات تشويش ضجيج (Noise) في الخلفية. وفي هذه الحالة يجب استخدام ما لا يقل عن ثلاثة مصادر مختلفة للعينة الفارغة (Blank matrices). فعلى سبيل المثال، إذا كان الاختبار يستخدم عينات الدم ما بعد الوفاة، فلابد من استخدام ثلاثة مصادر مستقلة للدم ما بعد الوفاة (postmortem blood) من ثلاثة أشخاص متوفين مختلفين، ويمكن حساب حد التقدير الكمي في هذه الحالة بطريقتين:.

1.3.4.8 تقييم حد التقدير الكمي باستخدام مواد قياسية مرجعية Estimating LOQ Using Reference Materials

يتم تحليل ثلاثة مصادر (أو أكثر) من عينات فارغة ممزوجة بالمادة العيارية القياسية Spiked samples (بتراكيز متناقصة) ويجرى التحليل مرتين وبشكل منفصل وتعاد القياسات ثلاث مرات لكل عينة.

إن الحد الأدنى للتقدير الكمي يمكن اعتباره أقل تركيز يتصف بما يلي:

١) ينتج استجابة متكررة وثابتة على جهاز القياس أكبر أو تساوي عشرة أضعاف مستوى التشويش (ضجيج، Noise) الناتج في خلفية الكروماتوغرام مقارنة بالعينات السلبية.

٢) يحقق معايير كشف وتحديد مقبولة بالمقارنة مع عينات محللة مسبقاً (على سبيل المثال، زمن الاستبقاء أو زمن الاحتفاظ (Retention Time; RT)، شكل القمة الكروماتوغرافية (peak shape)، ونسبة m/z لأيونات طيف الكتلة.

فيما إذا كان من الممكن تقييم نسبة الإشارة إلى التشويش (Signal to Noise; S/N) بالنظر، فإن ذلك يبقى موضوعيًّا، لذلك فإنه يجب استخدام برنامج مخصص من أجل تحديد هذه النسبة. ويمكن حسابها يدويًا.

2.3.4.8 تقييم حد التقدير الكمي باستخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام Estimating LOQ Using a Statistical Analysis of Background

لتعيين حد التقدير الكمي باستخدام هذه الطريقة، يجب تحليل ثلاثة مصادر مختلفة لعينات مزيج فارغة (Blank Matrix) ويجرى التحليل مرتين منفصلتين بتكرارية ثلاث مرات على الأقل. ويتم حساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لإشارة التشويش (مساحة القمة عند زمن الاستبقاء RT للمادة المراد تحليلها من العينات الفارغة. وبشكل مماثل، يتم تحليل ثلاثة مصادر (أو أكثر) من عينات فارغة ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) بتراكيز متناقصة ويجرى التحليل مرتين وبشكل منفصل وتعاد القياسات ثلاث مرات لكل عينة، كما أن أقل تركيز للعينة الممزوجة بالمادة العيارية القياسية يعطي بشكل

مستمر إشارة استجابة أكبر من معدل إشارة التشويش في العينات الفارغة (X) مضافاً إليه مقدار عشرة أضعاف من الانحراف المعياري (SD)، حيث يمثل حد التقدير الكمي LOQ وفق العلاقة التالية:

$$LOQ = X + 10\,SD$$

3.3.4.8 حد التقدير الكمي باستخدام منحنى المعايرة الخطي Estimating LOQ Using a Linear Calibration Curve

هذه التقنية مفيدة لأي طريقة تحليل كمي تخضع لنموذج المعايرة الخطي. يتم تكرار قياس عينات منحنى المعايرة عبر مجال عمل الطريقة التحليلية (Working range) ثلاث مرات على الأقل. ويتم تحديد حد التقدير الكمي من خلال الانحراف المعياري (SD) للمقطع على المحور العمودي (الصادي) (y-in-tercept) والمتوسط الحسابي لميل خط منحنى المعايرة المستقيم (Avgm) لمنحنيات المعايرة الخطية الناتجة عن القياسات، وفق العلاقة التالية [18, 4]:

$$LOQ = 10 \times \frac{SD}{Avgm}$$

5.8 نسبة استرداد المادة المراد تحليلها Recovery of analyte

هي نسبة استجابة جهاز التحليل الناتجة عن كمية محددة من المادة المراد تحليلها بعد الإضافة لمزيج العينة المدروسة(Matrix) أو الاستخلاص من مزيج العينة المدروسة إلى استجابة جهاز التحليل الناتجة عن نفس الكمية للمادة المراد تحليلها بمحلولها المائي أو المذيب العضوي المناسب. وبعبارة أخرى هي الكمية المستحصل عليها من المادة المراد تحليلها بعد إجراءات تحضير العينة، مثل الاستخلاص، ويمكن أيضاً أن يفهم من مصطلح نسبة الاسترداد بأنها النسبة المئوية من المادة المراد تحليلها والمتبقية في العينة بعد الانتهاء من معالجتها وإعدادها لتكون جاهزة للقياس [19, 4, 3].

وفي حالة العينات البيولوجية، من الممكن إضافة كمية محددة من المادة العيارية القياسية إلى مزيج العينة الفارغة (Blank Ma-trix)، ويجب أن يتم تنفيذ تجارب نسبة الاسترداد من خلال دراسة نتائج التحليل للعينات بعد تحضيرها أو استخلاصها باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة (عادة نفس التراكيز المستخدمة لتقييم صحة ودقة الطريقة)، ويتم استخلاص وتحليل خمسة تكرارات لكل تركيز، وتضاف كمية معروفة من المادة العيارية الداخلية (IS) إلى كل عينة بعد عملية الاستخلاص، وفي نفس الوقت يتم تحليل محاليل عيارية مائية أو ضمن مذيبات عضوية للمادة المراد تحليلها والتي تحتوي على نفس الكمية من المادة المراد تحليلها، وبعد إجراء القياسات وتدوين البيانات في جدول يتم حساب نسبة الاسترداد بمقارنة نسب مساحات قمم المادة المراد تحليلها إلى مساحات قمم المادة العيارية الداخلية، وذلك في كل من العينات الفارغة (Matrix) الممزوجة بالمادة المراد تحليلها المستخلصة والعينات غير المستخلصة (عينات المحاليل المائية أو المحاليل العضوية)، وينبغي ألا تتجاوز دقة النتائج ± 15، وفق المعادلة التالية:

$$Recovery = \frac{[A1/A2]}{[A3/A4]} \times 100$$

القيم الخاصة بالعينات الفارغة (Matrix) الممزوجة بالمادة المراد تحليلها المستخلصة:

A1 مساحة قمة المادة المراد تحليلها المستخلصة

A2 مساحة قمة المادة العيارية الداخلية

القيم الخاصة بالعينات غير المستخلصة (عينات المحاليل المائية أو المحاليل العضوية)

A3 مساحة قمة المادة المراد تحليلها ضمن المحلول المائي أو المذيب العضوي

A4 مساحة قمة المادة العيارية الداخلية

وليس من الضروري أن تكون نسبة استرداد المادة المراد تحليلها ١٠٠٪، ولكن ينبغي أن تكون قيم نسبة الاسترداد متسقة (بما في ذلك المادة المراد تحليلها والمادة العيارية الداخلية) عند كل التراكيز التي تم قياسها، وبحيث تحقق معايير الكشف النوعي والتحديد الكمي والصحة والدقة، وأن تكون موثوقة، وينصح بألا تقل نسبة الاستخلاص ما أمكن عن ٥٠٪.

6.8 الأثرالمرحّل للمادة Carryover

إنّ ظهور أثر المادة المدروسة أثناء تحليل عينات لاحقة لعملية تحليل العينة المدروسة قد يؤدي إلى نتائج غير دقيقة في التحليل النوعي والكمي باستخدام طرق التحليل الآلي. لذلك يجب أن يُقيَّم

الأثر المرحّل للمادة المراد تحليلها خلال عملية التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية، سواء أكانت الطريقة للكشف النوعي أو التقدير الكمي ما لم يكن للمختبر إجراءات دائمة وثابتة وممارسات في رقابة الجودة لتتبع الأثر المرحّل من المادة المراد تحليلها [4, 2].

ولتقييم الأثر المرحّل للمادة المراد تحليلها كجزء من التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية، لابد من تحليل فوري لعينات فارغة (Blank Matrix) بعد كل عملية تحليل للعينات الحاوية على المادة المراد تحليلها، ويتم تحديد التركيز المثالي الذي لايمكن مشاهدة أثر مرحّل له في تحاليل لاحقة على أنه أعلى تركيز للمادة المراد تحليلها (أعلى من حد الكشف النوعي LOD) الذي لا يمكن بعد استخدامه في تحضير وتحليل عينة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها مشاهدة أية أثر مرحّل في عينة فارغة لاحقة. وينبغي تحديد هذا التركيز بإجراء ثلاثة تكرارات للقياس.

ومن المقبول حصر دراسة الأثر المرحّل على أعلى تركيز في منحنى المعايرة، ويفضل العمل بتراكيز أعلى، وعند الضرورة فإنه يجب إجراء تغييرات على طريقة التحليل للتخلص من أية أثر مرحّل يمكن أن يلاحظ [4].

وفي بعض الحالات حيث يكون من المستحيل التخلص من ظاهرة الأثر المرحّل، لابد أن تتم إدارة مسألة الأثر المرحّل وفق إجراءات العمل القياسية (SOP)، فمثلاً يجب أن تكون الاستجابة الناتجة عن المادة المراد تحليلها في العينات المدروسة أكبر بـ١٠ مرات من الاستجابة الناتجة عن الأثر المرحّل في العينات الفارغة اللاحقة مباشرة لقياس العينات المدروسة، أو أنّ يتم إعادة استخلاص العينات المدروسة وإعادة تحليلها، أو يجب أن يتم قياس (حقن) عينة مائية أو عينة مذيب عضوي مناسب (الطور المتحرك) بين كل عينتين مدروستين بما يضمن انتقال الأثر المرحل إلى العينة البينية.

7.8 دراسات التداخل والتشويش Interference Studies

يجب معرفة وتعيين المواد المتداخلة أو المشوِّشة من مختلف المصادر في جميع الطرق التحليلية وبالأخص في فحوصات التحليل النوعي وطرق التحليل الكمي، وطرق المسح الشامل (ما عدا حالات الاختبارات المناعية المعتمدة على الأجسام المضادة)[21, 20, 4] في ضوء ما يلي:

1.7.8 تقييم التداخل الناتج عن مكونات مزيج العينة Evaluating Matrix Interferences

يجب قدر الإمكان تحليل عينات فارغة (Blank Matrix) من العينات المدروسة، وذلك من عشرة مصادر مختلفة كحد أدنى، ويتم ذلك بدون إضافة مادة عيارية داخلية (IS)، بهدف إثبات عدم وجود تداخلات أو تشويش لمزيج العينة الفارغة (Blank Matrix) (وذلك من خلال مراقبة إشارة التشويش تحديدًا ضمن مجال زمن استبقاء المادة المراد تحليلها). وفي حين أن هذه الطريقة قد تكشف عن التداخلات الأكثر شيوعاً الناجمة عن العينات الحيوية، إلا أنه من المعلوم أنه لايمكن الكشف عن التداخلات الأقل شيوعًا [23, 22, 19, 4, 3].

2.7.8 تقييم التداخلات الناجمة عن المواد التحليلية الشائعة التي يمكن مصادفتها Evaluating Interferences from Other Commonly Encountered Analytes

من الضروري تقييم المواد الأخرى غير المواد المراد تحليلها، والتي يتوقع أن تكون موجودة في العينات المدروسة، ويمكن أن تسبب تداخلاً وتشويشاً على طريقة التحليل، ويتم ذلك من أجل جميع الطرق التحليلية (باستثناء الاختبارات المناعية). ومثال ذلك عند تطوير طريقة لتحليل الأمفيتامين في الدم، يجب أن يتم معرفة ما إذا كانت عقاقير أو نواتج أيض (استقلاب) عقاقير أخرى، ومركبات مشابهة بالبنية قد تتداخل أو تشوش على تحليل العينة. وبشكل مشابه عند تطوير طريقة كروماتوغرافية غازية باستخدام كاشف التأين باللهب (GC-FID) للكشف عن الإيثانول، فإنه يجب معرفة ما إذا كانت هناك مركبات عضوية طيّارة تتداخل مع الكشف [24].

ويتم إنجاز هذا التقييم من خلال تحليل العينات الفارغة الممزوجة بالمواد المرجعية العيارية (Spiked matrix samples) المحتمل مصادفتها في العينات الحقيقية لمعرفة أي تشويش أو تداخل محتمل في التراكيز العلاجية أو التراكيز القاتلة العالية. أو من خلال تحليل عينات لحالات حقيقية وردت إلى المختبر وسبق تحليلها، ويتوقف ذلك على المواد المراد تحليلها وطبيعة مكونات العينة (Matrix) وهدف المختبر، ويجب أن تدرج في عملية التقييم جميع المواد/أو نواتج أيضها التي تم تحليلها في المختبر، جنباً إلى جنب مع العقاقير الشائعة الأخرى ضمن تصنيف محدد، حسب مقتضى الحال [20].

3.7.8 تقييم تداخلات وتشويش النظائر المشعة الثابتة المستخدمة كمادة عيارية داخلية Evaluating Interferences from Stable-Isotope IS

قد تحوي المركبات الموسومة بنظائر مشعة (أهمها المواد الموسومة) باستخدام نظير الهيدروجين (الديوتيريوم) مثل (Amphetamine-D5) والتي تستخدم عادة في الطرق التحليلية كمواد عيارية داخلية (IS)، مركبات أخرى غير موسومة (كشوائب)، وإضافة إلى ذلك، فإن أطياف الكتلة للجزيئات الأخرى ضمن المركب وغير الموسومة بالنظائر المشعة قد تحتوي على شظايا أيونية (Fragments) مشحونة بشحنة موجبة أو سالبة مماثلة لنفس الكتلة الجزيئية ولنفس النسبة (الكتلة/الشحنة m/z) للمادة المراد تحليلها، وفي كلا المثالين فإن كشف المادة المراد تحليلها وتحديد كميتها ممكن أن يتأثر [25]؛ ولذلك يجب أن يتم تقييم التداخلات الناجمة عن استخدام مادة عيارية داخلية موسومة بنظائر مشعة ثابتة بتحليل عينات المزيج الفارغة (Blank matrix) ممزوجة بالمادة المراد تحليلها وبإضافة مادة عيارية داخلية موسومة بنظائر مشعة ثابتة (IS)، ثم مراقبة تأثر إشارة استجابة جهاز التحليل للمادة المراد تحليلها. وتعد التداخلات والتشويش الناجمة تحت حد الكشف النوعي (LOD) للطريقة التحليلية غير ذات أهمية، وذلك وفق غرض المختبر من التحليل [25].

وبشكل مشابه، يجب تحليل عينة المزيج الفارغة (Blank matrix) ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بأعلى تركيز من مجال المعايرة وبدون إضافة مادة عيارية داخلية موسومة بنظائر مشعة ثابتة، وذلك من أجل تقييم ما إذا كانت أيونات شظايا المادة المراد تحليلها (Fragments) وغير الموسومة بنظائر مشعة ثابتة مماثلة لشظايا المادة العيارية الداخلية الموسومة بنظائر مشعة ثابتة ما يؤثر بالنهاية على التحليل الكمي [21].

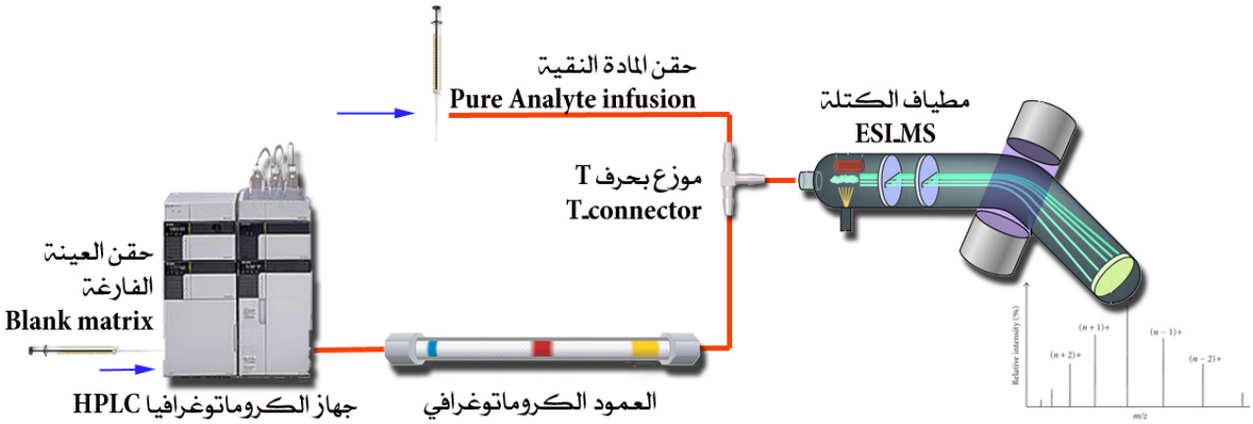
8.8 التقدير الكمي لتأثير مزيج العينة في عملية تعزيز/ تثبيط التأين Quantitative estimation of matrix impact on ionization suppression/ enhancement

تتأثر عملية تأين المادة المراد تحليلها ضمن مصدر التأين وخاصة عند اعتماد تقنية التأين بالرذاذ الإلكتروني (Electrospray Ionization; ESI) في طرق التحليل التي تستخدم الكروماتوغرافيا السائلة المقترنة بمطياف الكتلة (LC-MS) وذلك بوجود مركبات أخرى مرافقة للمادة المراد تحليلها ضمن مزيج العينة ما ينتج عنه تعزيز أو تثبيط عملية التأين، وهذه ظاهرة مألوفة ويمكن مصادفتها بشكل كبير [14, 21, 26].

وعندما يتجاوز معدل تعزيز أو تثبيط عملية تأين المادة المراد تحليلها مقدار 25%± أو عندما يتجاوز معامل التباين (Coefficient of variation; CV) للتعزيز أو التثبيط مقدار ١٥٪ فإنه يجب على المختبر أن يثبت أنه لا يوجد تأثير على المعايير الأخرى الخاصة بالتحقق من صلاحية الطريقة التحليلية أو يجب تعديل معايير الفصل الكروماتوغرافي أو تعديل طريقة تحضير العينة المدروسة من أجل ضمان تقليل تأثير تعزيز أو تثبيط التأين. فعلى سبيل المثال، إن تعزيز/ تثبيط التأين قد يكون له تأثير كبير على حد الكشف النوعي (LOD) لطرق التحليل النوعي، وبشكل مشابه قد يؤثر على حد الكشف النوعي (LOD) وحد التقدير الكمي(LOQ) وصحة الطريقة التحليلية (Accuracy) في طرق التحليل الكمي. إن التأثير على العوامل آنفة الذكر، يجب أن يُقيَّم عن طريق زيادة عدد المصادر المختلفة للعينات الفارغة (Blank Matrices) والمستخدمة في تقييم المادة المراد تحليلها. وينبغي على المختبر تقييم تأثير تعزيز/تثبيط التأين للمادة العيارية الداخلية (IS) المستخدمة في طريقة التحليل طالما أنه تم رصد أية تغير في استجابة المادة العيارية الداخلية من خلال ممارسات مراقبة الجودة (QC/QA) اليومية في المختبر[4]. وعادة ما يتم تقييم تعزيز/ تثبيط التأيّن باستخدام إحدى الطريقتين التاليتين:

1.8.8 حقن المادة بعد العمود الكروماتوغرافي لتقييم مدى تعزيز/تثبيط التأيّن Post-column Infusion to Assess Ionization Suppression/ Enhancement

تسهم هذه الطريقة في الحصول على معلومات عن أزمنة الاستبقاء (RT) التي تحدث عندها عملية تعزيز أو تثبيط التأين، وهي طريقة مجدية لتطوير الطريقة التحليلية. ولتقييم تعزيز/ تثبيط التأين للطرق التحليلية التي تعتمد تقنية (LC-MS) يتم حقن محلولين بشكل مستمر بتركيز عالٍ وتركيز منخفض على التوالي من المادة المراد تحليلها وبشكل منفصل عن حقن العينة الفارغة (Blank matrix) في جهاز الكرمواتوغرافيا السائلة بواسطة موزع يأخذ شكل T ويكون بعد



شكل ١ - آلية تقييم تعزيز/ تثبيط التأين للمادة المراد تحليلها وذلك بالحقن المستمر لمحلولها النقي بعد العمود الكروماتوغرافي *post-column injection*

العمود الكروماتوغرافي مباشرة، ما يسمح بانتقال المادة المراد تحليلها مع الطور المتحرك ودخولها إلى مطياف الكتلة، وتتم مراقبة ثباتية الخط الأساسي (Base line) للاستجابة الناجمة عن مرور المادة المراد تحليلها في مطياف الكتلة. و عادة ـ كلما أمكن ـ يتم حقن ما لايقل عن عشر عينات فارغة (Blank matrix) تمت معالجتها أو استخلاصها (من الدم بعد الوفاة مثلا) وفق الطريقة المعتمدة لتحضير العينات المدروسة، وبالتزامن مع الحقن المستمر لمحلولي المادة العيارية الداخلية للمادة المراد تحليلها عبر الموزع T (وفقاً للشكل ١)[14, 7, 4].

2.8.8 طريقة الإضافة بعد الاستخلاص لتقييم مدى تعزيز / تثبيط التأين Post-extraction addition to Assess Ionization Suppression/ Enhancement

تسهم هذه الطريقة في التقييم الكمي لتعزيز /تثبيط التأين للمادة المراد تحليلها وفق طرق التحليل الكمي بأجهزة الكروماتوغرافيا السائلة المقترنة بمطياف الكتلة (LC-MS)، حيث يتم تحضير مجموعتين من العينات، تتألف المجموعة الأولى من محاليل مائية للمادة العيارية القياسية للمادة المراد تحليلها (أو ضمن مذيب عضوي مناسب) محضرة بتركيزين، الأول منخفض والثاني مرتفع، ويتم حقن المحاليل بالتراكيز المنخفضة والمرتفعة للمادة العيارية القياسية ست مرات على الأقل من أجل تحديد قيمة وسطية لمساحة القمة الموافقة لكل تركيز. فيما تتألف المجموعة الثانية من عينات فارغة (Blank matrix) مأخوذة من عشرة مصادر مختلفة للعينة المدروسة على الأقل إن أمكن ذلك، ويتم أخذ عينتين من كل مصدر، وبعد إتمام التحضير أو الاستخلاص وفق الطريقة المعتمدة لتحضير العينات المدروسة يتم مزج الخلاصات التي تم الحصول عليها بالتركيز المنخفض أو بالتركيز المرتفع من المادة العيارية القياسية للمادة المراد تحليلها. وتتم مقارنة مساحة القمة الكروماتوغرافية للمادة المراد تحليلها في محاليلها المائية (أو ضمن المذيب العضوي) (Set 1) مع مساحة القمة الكروماتوغرافية للمادة المراد تحليلها التي تم إضافتها إلى العينات الفارغة بعد استخلاصها أو تحضيرها (Set 2). وبالتالي سيكون هناك نسبتان مئويتان للتعزيز/ للتثبيط، إحداهما للتركيز المنخفض، والأخرى للتركيز المرتفع [23, 19, 4].

ويستخدم المعدل الوسطي لمساحة القمة لكل مجموعة (X) في تقييم تأثير التعزيز أو الكبح من أجل كل تركيز، كما يلي:

$$Ionization\ suppression\ /\ enhancement\ \% = \left(\frac{X\ area\ of\ Set\ 2}{X\ area\ of\ Set\ 1} - 1\right) \times 100$$

9.8 صحة ودقّة النتائج Accuracy and Precision

1.9.8 الصحة Accuracy

يجب إجراء دراسات الصحة لجميع الطرق التحليلية

الكميّة، ويمكن أن تتم هذه الدراسة بالتزامن مع دراسات الدقّة، ويتم تقييم الصحة في عينات ممزوجة بالمادة المراد تحليلها باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة على الأقل تغطي مجال المعايرة، بحيث يمثل التركيز المنخفض ثلاثة أضعاف حد التقدير الكمي (LOQ)، والتركيز المتوسط ما قيمته ٣٠-٥٠٪ من متوسط تراكيز مجال المعايرة، والتركيز المرتفع ما قيمته على الأقل ٧٥٪ من الحد القطعي الأعلى لمجال المعايرة، وبخمسة تكرارات لكل تركيز على الأقل، ويجب أن تكون هذه التراكيز مختلفة عن التراكيز المعتمدة في إجراء المعايرة ومحضرة من محاليل أساسية مختلفة عن محاليل المعايرة، ويتم تقييم الصحة كنسبة مئوية لقيم التراكيز التي تم الحصول عليها إلى القيمة الحقيقية لتراكيز المادة المراد تحليلها التي تم مزجها مع العينة.

ويتم تقييم الصحة خلال يوم واحد (سلسلة حقن واحدة within run accuracy)، وفق العينات والتكرارات المحددة أعلاه من خلال حقنها كسلسلة عين حقن واحدة في يوم واحد، ومن ثم تقييم الصحة.

وكذلك يتم تقييم الصحة بين أيام مختلفة (عدة سلاسل حقن between run accuracy) وفق العينات والتكرارات المحددة أعلاه من خلال حقن ثلاث سلاسل حقن على الأقل وفي ثلاثة أيام مختلفة، ومن ثم يتم تقييم الصحة [4].

و تحسب الصحة لكل تركيز باستخدام المعادلة الرياضية التالية:

$$Accuracy(\%) at\ Cx = \left[\frac{Mean\ of\ calculated\ C\ x - Nominal\ concentration\ x}{Nominal\ Concentration\ x}\right] \times 100$$

ويعد الحد الأقصى المقبول للصحة بقيمة ±15% عند كل تركيز، باستثناء قيمة الصحة عند حد التقدير الكمي والتي يمكن تقبل حتى ±20%. ومن أجل بعض التحاليل التي تتطلب قيمة صحة أقل على سبيل المثال (تحديد الإيثانول في الدم) فمن المتوقع أن تكون قيمة الصحة المقبولة ±10%. ومن المستحسن أن تستخدم نفس البيانات المستخدمة في تقييم الصحة أيضاً لإجراء تقييم الدقة (Precision).

2.9.8 الدقة Precision

يجب إجراء دراسات تقييم الدقة لجميع طرق التحليل الكمي، وكذلك عند النقاط الحدية للاختبارات المعتمدة على الأجسام المناعية، ويمكن إجراء دراسات تقييم الدقة بنفس الوقت مع دراسات تقييم الصحة. ويعبر عن الدقة بمعامل التّباين (Coefficient of varation; CV)، ويحسب لكل تركيز من خلال علاقة رياضية تمثل حاصل قسمة الانحراف المعياري للنتائج SD على القيمة المطلقة للمتوسط الحسابي للنتائج μ:

$$CV = RSD = \frac{SD}{\mu}(\%)$$

ويتم تقييم الدقة في عينات ممزوجة بالمادة المراد تحليلها باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة على الأقل تغطي مجال المعايرة، بحيث يمثل التركيز المنخفض ثلاثة أضعاف حد التقدير الكمي (LOQ)، والتركيز المتوسط ما قيمته ٣٠-٥٠ ٪ من متوسط تراكيز مجال المعايرة، والتركيز المرتفع ما قيمته على الأقل ٧٥٪ من الحد القطعي الأعلى لمجال المعايرة، وبخمسة تكرارات لكل تركيز على الأقل، ويجب أن تكون هذه التراكيز مختلفة عن التراكيز المعتمدة في إجراء المعايرة ومحضرة من محاليل أساسية مختلفة عن محاليل المعايرة [4].

ويتم تقييم الدقة خلال يوم واحد (سلسلة حقن واحدة within run Precision)، وفق العينات والتكرارات المحددة أعلاه من خلال حقنها كسلسلة عين حقن واحدة في يوم واحد، ومن ثم تقييم الدقة [2] .

وكذلك يتم تقييم الدقة بين أيام مختلفة (عدة سلاسل حقن between run Precision) وفق العينات والتكرارات المحددة أعلاه من خلال حقن ثلاث سلاسل حقن على الأقل وفي ثلاثة أيام مختلفة، ومن ثم يتم تقييم الدقة [2].

ويعد الحد الأقصى المقبول للدقة بقيمة ±15% عند كل تركيز، باستثناء قيمة الصحة عند حد التقدير الكمي والتي يمكن تقبل حتى ±20%. ومن أجل بعض التحاليل التي تتطلب قيمة دقة أقل على سبيل المثال (تحديد الإيثانول في الدم) فمن المتوقع أن تكون قيمة الدقة المقبولة ±10% [2-4].

ويوضح الجدول (٢) المعايير القياسية اللازمة للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية وطرق إجرائها وتقييمها وشروط القبول:

جدول 2- المعايير القياسية اللازمة للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية وطرق إجرائها وتقييمها وشروط القبول.

Table 2- Method validation parameters, procedures, assessment and acceptance criteria.

المعيار Validation Parameter	طريقة العمل Procedures	طريقة الحساب Assessment	شرط القبول Acceptance Criteria
الانتقائية (Selctivity) **دراسات التداخل والتشويش (Interference Studies)**	إضافة المواد المراد تحليلها والمواد التي يمكن أن تصادف في العينة إلى عينات فارغة من عشرة مصادر مختلفة على الأقل.	تقييم كل مادة مدروسة على حدة، مقارنة زمن الاستبقاء، وشكل القمم الكروماتوغرافية وطيف الكتلة للمواد المستهدفة مع المواد المضافة	عدم وجود تداخل بين المواد المستهدفة والمواد المضافة إلى العينات الفارغة
الخصوصية (Specificity) **دراسات التداخل والتشويش (Interference Studies)**	تحليل عشر عينات فارغة من عشرة مصادر مختلفة على الأقل، وقياس محلول المادة المراد تحليلها ضمن المذيب المناسب (ستة تكرارات)، وتدرس عند حد التقدير الكمي (LOQ).	مقارنة نتائج تحليل العينات الفارغة ونتائج تحليل عينات محلول المادة المراد تحليلها، ودراسة احتمالية وجود تداخل أو تشويش مع المادة المراد تحليلها، أو عند زمن استبقاء المادة المراد تحليلها	يجب أن تكون إشارة التشويش أقل من 20% من الإشارة الخاصة بحد التقدير الكمي (LOQ) بالنسبة للمادة المراد تحليلها، وأن تكون أقل من 5% بالنسبة للمادة العيارية الداخلية
حد الكشف النوعي (LOD)			
الطرق التحليلية غير الآلية	مزج العينات (Spiking) بتراكيز متناقصة من المادة المراد تحليلها وتكرار القياس ثلاث مرات على الأقل.	التركيز الأخفض من المادة المراد تحليلها الذي ينتج عنه نتيجة إيجابية هو الحد الأدنى الكافي للكشف النوعي	جميع معايير الكشف والتأكيد متوافقة مع المادة المراد تحليلها
استخدام التركيز الأقل من المحلول العياري (غير الصفري)	تحليل ثلاث عينات كحد أدنى من المحلول العياري ذي التركيز الأدنى غير الصفري بتكرارية ثلاث مرات على الأقل.	حد الكشف النوعي هو أقل تركيز للمحلول العياري ذي التركيز الأدنى غير الصفري	جميع معايير الكشف والتأكيد متوافقة مع المادة المراد تحليلها
استخدام الحد القطعي كحد للكشف النوعي	تحليل ثلاث عينات كحد أدنى من عينات ممزوجة بالمادة المراد تحليلها عند التركيز الموافق للحد القطعي (النقطة الحدية)، وأن يتم تكرار ذلك ثلاث مرات.	حد الكشف النوعي هو قيمة الحد القطعي (Cuttoff)	جميع معايير الكشف والتأكيد متوافقة مع المادة المراد تحليلها
استخدام إشارة التشويش في الخلفية			
استخدام مواد قياسية مرجعية	تحليل ثلاثة مصادر (أو أكثر) من عينات فارغة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بتراكيز متناقصة ويجرى التحليل مرتين وبشكل منفصل وتعاد القياسات ثلاث مرات لكل عينة.	تقييم إشـــارة المادة المراد تحليلها إلى إشارة التشويش (Signal to Noise; S/N) S/N=height of analyte / amplitude of noise	حد الكشف النوعي ينتج استجابة متكررة وثابتة على جهاز القياس أكبر أو تساوي ثلاثة أضعاف مستوى التشويش (Noise) الناتج في خلفية الكروماتوغرام مقارنة بالعينات الفارغة S/N ≥3
استخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام	تحليل ثلاث عينات فارغة من مصادر مختلفة (Blank Matrix) ويجري التحليل مرتين منفصلتين بتكرارية ثلاث مرات على الأقل، وبشكل مماثل تحليل عينات فارغة ممزوجة بتراكيز متناقصة من المادة المراد تحليلها.	حساب المتوسط الحسابي (X) والانحراف المعياري (SD) لإشارة التشويش من العينات الفارغة، ويحسب حد الكشف النوعي من خلال العلاقة: LOD=X + 3.3 SD	جميع معايير الكشف والتأكيد متوافقة مع المادة المراد تحليلها، وتقارن النتائج مع العينات الفارغة الممزوجة بالمادة المراد تحليلها

ASFSFM 2020; Volume 2 Issue (1)
Naif Arab University for Security Sciences

Table 2- (continued)

تابع جدول 2-

المعيار Validation Parameter	طريقة العمل Procedures	طريقة الحساب Assessment	شرط القبول Acceptance Criteria
تقييم حد الكشف النوعي باستخدام منحنى المعايرة الخطي	تكرار قياس عينات منحنى المعايرة عبر مجال عمل الطريقة التحليلية (Working range) ثلاث مرات على الأقل.	تحديد الانحراف المعياري (SD) للمقطع على المحور العمودي (الصادي) (y-intercept) والمتوسط الحسابي لميل خط منحنى المعايرة المستقيم (Avgm) لمنحنيات المعايرة الخطية الناتجة عن القياسات، ويحسب حد الكشف النوعي من خلال العلاقة: LOD=3.3 ×SD/Avgm	جميع معايير الكشف والتأكيد متوافقة مع المادة المراد تحليلها، وتقارن النتائج مع العينات الفارغة الممزوجة بالمادة المراد تحليلها
حد التقدير الكمي (LOQ)			
استخدام التركيز الأقل من المحلول العياري (غير الصفري)	تحليل ثلاث عينات كحد أدنى من التركيز الأقل للمحلول العياري بثلاثة تكرارات (حد أدنى تسعة تكرارات).	حد التقدير الكمي هو أقل تركيز لمحلول عياري غير صفري من محاليل المعايرة	استيفاء وتحقيق معايير الكشف والتأكيد والصحة والدقة
استخدام تركيز الحد القطعي	تحليل ما لا يقل عن ثلاث عينات عند تركيز الحد القطعي بثلاثة تكرارات (حد أدنى تسعة تكرارات).	حد التقدير الكمي هو قيمة الحد القطعي (Cuttoff)	استيفاء وتحقيق معايير الكشف والتأكيد والصحة والدقة
استخدام إشارة التشويش في الخلفية			
استخدام مواد قياسية مرجعية	تحليل ثلاث عينات فارغة من مصادر مختلفة (أو أكثر) ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بتراكيز متناقصة ويجرى التحليل مرتين وبشكل منفصل، وتعاد القياسات ثلاث مرات لكل عينة.	تقييم إشارة المادة المراد تحليلها إلى إشارة التشويش Signal to Noise; S/N S/N=height of analyte / amplitude of noise	حد التقدير الكمي ينتج استجابة متكررة وثابتة على جهاز القياس أكبر أو تساوي عشرة أضعاف مستوى التشويش (ضجيج، Noise) الناتج في خلفية الكروماتوغرام مقارنة بالعينات الفارغة S/N ≥10
استخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام	تحليل ثلاث عينات فارغة من مصادر مختلفة (Blank Matrix) ويجري التحليل مرتين منفصلتين بتكرارية ثلاث مرات على الأقل، وبشكل مماثل تحلل عينات فارغة ممزوجة بتراكيز متناقصة من المادة المراد تحليلها.	حساب المتوسط الحسابي (X) والانحراف المعياري (SD) لإشارة التشويش من العينات الفارغة، ويحسب حد التقدير الكمي من خلال العلاقة: LOQ=X + 10 SD	استيفاء وتحقيق معايير الكشف والتأكيد والصحة والدقة
استخدام منحنى المعايرة الخطي	تكرار قياس عينات منحنى المعايرة عبر مجال عمل الطريقة التحليلية (Working range) ثلاث مرات على الأقل	تحديد الانحراف المعياري (SD) للمقطع على المحور العمودي (الصادي) (y-intercept) والمتوسط الحسابي لميل خط منحنى المعايرة المستقيم (Avgm) لمنحنيات المعايرة الخطية الناتجة عن القياسات، ويحسب حد التقدير الكمي من خلال العلاقة: LOQ=10 ×SD/Avgm	استيفاء وتحقيق معايير الكشف والتأكيد والصحة والدقة

Table 2- (continued)

تابع جدول 2-

المعيار Validation Parameter	طريقة العمل Procedures	طريقة الحساب Assessment	شرط القبول Acceptance Criteria
نسبة استرداد المادة المراد تحليلها **(Recovery of analyte)**	استخلاص خمسة تكرارات لثلاثة تراكيز مختلفة وتضاف كمية معروفة من المادة العيارية الداخلية (IS) إلى كل عينة بعد عملية الاستخلاص، ومن ثم تحليلها، وفي نفس الوقت يتم تحليل محاليل عيارية مائية أو ضمن مذيبات عضوية للمادة المراد تحليلها والتي تحتوي على نفس الكمية من المادة المراد تحليلها،	- القيم الخاصة بالعينات الفارغة (Matrix) الممزوجة بالمادة المراد تحليلها المستخلصة: A1 مساحة قمة المادة المراد تحليلها المستخلصة A2 مساحة قمة المادة العيارية الداخلية - القيم الخاصة بالعينات غير المستخلصة (عينات المحاليل المائية أو المحاليل العضوية) A3 مساحة قمة المادة المراد تحليلها ضمن المحلول المائي أو المذيب العضوي A4 مساحة قمة المادة العيارية الداخلية Recovery= [A1/A2]/[A3/A4] x100	ينصح بألا تقل نسبة استرداد المادة المراد تحليلها (نسبة الاستخلاص) ما أمكن عن 50%، وينبغي ألا تتجاوز دقة النتائج ± 15%
الأثر المرحّل للمادة (Carryover)	تحليل فوري لعينات فارغة (Blank Matrix) بعد كل عملية تحليل لعينات حاوية للمادة المراد تحليلها بتراكيز متزايدة، أو من خلال تحليل عينات لأعلى تركيز في المعايرة متبوعة بتحليل عينة فارغة	تحديد التركيز الأعلى الذي لا يمكن بعد استخدامه في تحضير وتحليل عينة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها مشاهدة أثر مرحّل في عينة فارغة لاحقة، من خلال حساب تركيز الأثر المرحل للمادة المراد تحليلها في العينة الفارغة	يجب ألا يزيد الأثر المرحل على مقدار 20% من قيمة حد التقدير الكمي (LOQ) بالنسبة للمادة المراد تحليلها وألا يزيد على 5% للعياري الداخلي.
التقدير الكمي لتأثير مزيج العينة في عملية تعزيز/ تثبيط التأين			
حقن المادة بعد العمود الكروماتوغرافي لتقييم مدى تعزيز /تثبيط التأين	حقن محلولين بشكل مستمر بتركيز عالٍ وتركيز منخفض على التوالي من المادة المراد تحليلها وبشكلٍ منفصل عن حقن العينة الفارغة (Blank matrix) في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة بواسطة موزع يأخذ شكل T ويوضع بعد العمود الكروماتوغرافي مباشرة، (عشر عينات فارغة إن أمكن)	مراقبة ثباتية الخط الأساسي (Base line) للاستجابة الناجمة عن مرور المادة المراد تحليلها في مطياف الكتلة.	يجب ألا يتجاوز معدل تعزيز أو تثبيط عملية تأين المادة المراد تحليلها مقدار 25%± أو لا يتجاوز معامل التباين (Coefficient of variation; CV) للتعزيز أو التثبيط مقدار 15%
طريقة الإضافة بعد الاستخلاص لتقييم مدى تعزيز / تثبيط التأين	تحقن مجموعتان من العينات، المجموعة الأولى (Set 1) من محاليل مائية للمادة العيارية القياسية للمادة المراد تحليلها (أو ضمن مذيب عضوي مناسب) محضرة بتركيزين، الأول منخفض والثاني مرتفع، ست مرات على الأقل. المجموعة الثانية (Set 2) من عينات فارغة (Blank matrix) مأخوذة من عشرة مصادر مختلفة للعينة المدروسة على الأقل إن أمكن ذلك، ويتم أخذ عينتين من كل مصدر، وبعد إتمام التحضير أو الاستخلاص وفق الطريقة المعتمدة لتحضير العينات المدروسة يتم مزج الخلاصات التي تم الحصول عليها بالتركيز المنخفض أو بالتركيز المرتفع من المادة العيارية القياسية للمادة المراد تحليلها	تتم مقارنة متوسط (X) مساحة القمة الكروماتوغرافية للمادة المراد تحليلها في محاليلها المائية (أو ضمن المذيب العضوي) (Set 1) مع متوسط مساحة القمة الكروماتوغرافية للمادة المراد تحليلها التي تم إضافتها إلى العينات الفارغة بعد استخلاصها (Set 2)، ويقيم معدل التعزيز أو التثبيط وفق العلاقة: Ionization suppression / enhancement %= ((X area of Set 2)/(X area of Set 1)-1)×100	يجب ألا يتجاوز معدل تعزيز أو تثبيط عملية تأين المادة المراد تحليلها مقدار 25%±، أو لا يتجاوز معامل التباين (Coefficient of variation; CV) للتعزيز أو التثبيط مقدار 15%

تابع جدول 2-

Table 2- (continued)

المعيار Validation Parameter	طريقة العمل Procedures	طريقة الحساب Assessment	شرط القبول Acceptance Criteria
الصحة (Accuracy)	تحلل عينات ممزوجة بالمادة المراد تحليلها باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة على الأقل تغطي مجال المعايرة، بحيث يمثل التركيز المنخفض ثلاثة أضعاف حد التقدير الكمي (LOQ)، والمتوسط ما قيمته 30 – 50 % من متوسط تراكيز مجال المعايرة، والمرتفع ما قيمته على الأقل 75% من الحد القطعي الأعلى لمجال المعايرة، وبخمسة تكرارات لكل تركيز على الأقل، ويجب أن تكون هذه التراكيز مختلفة عن التراكيز المعتمدة في إجراء المعايرة ومحضرة من محاليل أساسية مختلفة عن محاليل المعايرة	تقيَّم الصحة خلال يوم واحد (within run accuracy) من خلال تحليل سلسلة عينات واحدة في يوم واحد. وكذلك تقيَّم الصحة بين أيام مختلفة (between-run accuracy) من خلال تحليل ثلاث سلاسل حقن على الأقل وفي ثلاثة أيام مختلفة، وتقيم الصحة بحساب (Bais%) بالعلاقة التالية: Accuracy(%) at Cx= [(Mean of calculated Cx-Nominal Cx) / (Nominal Cx)] ×100	الحد الأقصى المقبول للصحة بقيمة ± 15% عند كل تركيز، باستثناء قيمة الصحة عند حد التقدير الكمي والتي يمكن تقبل حتى ± 20%.
الدقة (Precision)	تقيَّم الدقة لنفس العينات المستخدمة في تقييم الصحة، ويتم تحديد الدقة في المقايسات المناعية (immunoassays) عند تركيز الحد القطعي (Cuttoff) باستخدام ثلاثة تراكيز مختلفة وبخمسة تكرارات قياس على الأقل، تركيز منخفض ليس أقل من 50% من(Cuttoff)، وتركيز (Cuttoff)، وتركيز مرتفع ليس أكثر من 50% أعلى من تركيز (Cuttoff).	تقيَّم الدقة خلال يوم واحد (within run Precision). بتحليل سلسلة عينات واحدة في يوم واحد. و تقيَّم الدقة بين أيام مختلفة (between-run Precision) بتحليل ثلاث سلاسل حقن على الأقل وفي ثلاثة أيام مختلفة، وتمثل الدقة حاصل قسمة الانحراف المعياري للنتائج SD على القيمة المطلقة للمتوسط الحسابي للنتائج μ: $CV(\%)=RSD= SD/\mu$	الحد الأقصى المقبول للدقة بقيمة 15% عند كل تركيز، باستثناء قيمة الصحة عند حد التقدير الكمي والتي يمكن أن تقبل حتى 20% . ومن أجل بعض التحاليل التي تتطلب قيمة دقة أقل على سبيل المثال (تحديد الإيثانول في الدم) فمن المتوقع أن تكون قيمة الدقة المقبولة 10%.
منحنى- نمط المعايرة Calibration Curve/ Standard (Curve/) Calibration Model	تحضير عينات ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بتراكيز نقاط المعايرة (على الأقل ستة تراكيز تغطي مجال العمل) ضمن مزيج العينة المدروسة مع عينة فارغة، تحلل بتكرارية خمس مرات	تقييم الصحة لجميع القياسات ورسم منحنى المعايرة وتحديد نمطها ومعادلتها وقيمة r^2	عدم تجاوز الصحة نسبة ± 15% لجميع نقاط المعايرة (تقبل الصحة بنسبة ± 20% عند حد التقدير الكمي)، وأن تكون قيمة r^2 أكبر من 0.975
عينات مراقبة الجودة (Quality Control Samples)	تحضر عينات مراقبة الجودة على الأقل بثلاثة تراكيز (مرتفع، متوسط، منخفض)، وتقاس بتكرارية مرتين، ويجب أن يكون عدد عينات مراقبة الجودة على الأقل 5% من عدد العينات الكلي للسلسلة التحليلية	تقييم نتائج القياسات لعينات مراقبة الجودة وفق منحنى المعايرة المعتمد	يجب ألا تزيد التراكيز المحسوبة على أو تنقص عن 15% من التراكيز الأصلية، وأن تكون 66% من القيم ضمن مجال ± 1 من قيمة الانحراف المعياري (SD) و 99% من القيم ضمن مجال SD ±2، وتستبعد القيم أعلى من SD ±3.
سلامة التخفيف (التمديد) (Dilution Integrity)	مزج العينة الفارغة بتراكيز أعلى من التركيز الأعلى لمنحنى المعايرة، ومن ثم تخفيفها بنسب محددة	تقييم الصحة والدقة للنتائج مقارنة مع التراكيز الأولية	عدم تجاوز الصحة والدقة نسبة 15% لجميع التخفيفات

Table 2- (continued)

تابع جدول 2-

المعيار Validation Parameter	طريقة العمل Procedures	طريقة الحساب Assessment	شرط القبول Acceptance Criteria
الثباتية (Stability)	تقيم الثباتية في عينات فارغة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بتحضير ثلاث عينات رئيسية لتركيزين أحدهما مرتفع والآخر منخفض، وتقاس العينات المأخوذة من كل عينة رئيسية بتكرارية ثلاث مرات عند كل نقطة زمنية ابتداءً من الزمن الصفر (وقت تحضير العينات)	مقارنة متوسط استجابة جهاز التحليل عند الزمن صفر لكل مجموعة من العينات بمتوسط الاستجابة للعينات التالية عند الأزمنة التالية من دراسة الثباتية	يجب ألا تتجاوز نسبة الفقد أو عدم الثباتية نسبة 15% من التركيز الأولي
ثباتية التجمد والذوبان (Freeze/Thaw Stability)	يتم تقسيم العينات الفارغة الممزوجة بالمادة المراد تحليلها في الفقرة السابقة إلى ما لا يقل عن ثلاثة أنابيب محكمة الإغلاق منفصلة لكل تركيز ويعتبر تركيز العينات الأولي هو التركيز عند الزمن صفر، ثم تجمد في درجة حرارة التخزين المحددة لمدة 24 ساعة، ويتبع ذلك تذويب العينات المتجمدة في درجة حرارة الغرفة دون مساعدة. وعند ذوبان العينات تماماً، يجب أن يتم التحليل الأول لمجموعة العينات بثلاثة تكرارات، وبعدها يعاد تجميدها مرة أخرى لمدة 12 إلى 24 ساعة في ظل نفس الظروف. ويجب إعادة التحليل بمعاودة عملية دورة التجمد/ الذوبان مرتين أو عدة مرات.	مقارنة متوسط استجابة جهاز التحليل عند الزمن صفر لكل مجموعة من العينات بمتوسط الاستجابة للعينات التالية عند الأزمنة التالية من دراسة الثباتية	يجب ألا تتجاوز نسبة الفقد أو عدم الثباتية بنسبة 15% من التركيز الأولي
ثباتية العينات المحضرة (Stability – Processed Sample)	تحضير عدة سلاسل عينات للتحليل (مثلاً بعد الاستخلاص) كما هو بالنسبة للعينات المحضرة بخصوص منحنى المعايرة بالنسبة للتراكيز المحددة، ويتم توزيعها ضمن قِنِّينَات الحَقْن (injection vial) الخاصة بالحاقن الأوتوماتيكي. ويتم تحليل سلسلة العينات الأولى لكل تركيز على الفور بثلاثة تكرارات لمعرفة الاستجابات عند بدء الدراسة (الزمن الصفر). ويتم تخزين كافة قِنِّينَات الحَقْن الخاصة بسلاسل العينات الأخرى لنفس التراكيز كما في طريقة التخزين خلال التحليل الروتيني (على سبيل المثال، في الثلاجة، أو في درجة حرارة الغرفة على الحاقن الأوتوماتيكى). ثم يتم تحليلها بثلاثة تكرارات في فترات زمنية مختلفة خلال 72 ساعة	مقارنة متوسط استجابات الكاشف في كل فترة زمنية إلى مقابلاتها في الزمن الصفر.	يجب ألا تتجاوز نسبة الفقد أو عدم الثباتية بنسبة 15% من التركيز الأولي

9. المتطلبات الإضافية للتحقق من صلاحية الطريقة التحليلية Additional Validation Parameters

من المهم في بعض الحالات أن يتم تقييم عوامل إضافية للتحقق من صلاحية الطريقة التحليلية في حال تطلبت الخطوات المتبعة في الطريقة إجراءات محددة، ومن هذه العوامل ثباتية المادة المراد تحليلها في مزيج العينة المدروسة (Matrix) وخاصة عند تجميد مزيج العينة وإذابته، وكذلك عند خضوع مزيج العينة لإجراءات تحضير قبل القياس (معالجة بطريقة محددة أو استخلاص)، وتأثير تخفيف العينة بمحل أو مذيب معين على كل من صحة ودقة الطريقة التحليلية، ويجب على المختبر أن يضمن هذه العوامل في خطة التحقق من صلاحية الطريقة، وتحديد ما إذا كانت قابلة للتطبيق في الطريقة التحليلية أو إذا كانت تم تحديدها بوسائل أخرى (أي تم تحديدها من خلال ممارسات ضمان الجودة، او من خلال مراجع منشورة). ويجب أن تتضمن خطة التحقق من صلاحية الطريقة للمختبر وثائق وثبوتيات هذا التقييم

1.9 سلامة التخفيف Dilution Integrity

لا بد من التحقق من تأثير تخفيف العينة أثناء التحقق من صلاحية طرق التحليل الكمية حتى وإن كان ذلك ممارسة روتينية داخل المختبر، وفي بعض الأحيان، يتطلب الحجم الصغير للعينة إجراء تعديلات مناسبة على العينة ليتم فحصها بشكل مناسب، وفي حالات أخرى، ممكن مصادفة عينات ذات تراكيز عالية للغاية فتكون أعلى من مجال المعايرة الذي تم معرفته. لجعل تركيز المادة المحللة ضمن نطاق التراكيز المثبتة صحته، فلابد لإجراءات المختبر أن تسمح بإعادة التحليل بعد التخفيف من العينة.

وإذا كان تخفيف عينة لمادة مدروسة ذات تركيز عالٍ أو حجم ضئيل ممكنًا، فلابد للمختبر أن يقيّم تأثير التخفيف على قيم دقة وتحيز الطريقة التحليلية. ويتم إنجاز ذلك بإعادة دراسات الدقة والصحة باستخدام عوامل تخفيف معقولة (١:٢، ١:١٠، ١:٥٠) ويتم تحديد ما إذا بقيت معايير كفاءة الطريقة ثابتة[2, 4].

2.9 الثباتية Stability

إن ثباتية المادة المدروسة المراد تحليلها قد تتأثر بعدد من المتغيرات، بما في ذلك ظروف التخزين من درجة حرارة ورطوبة نسبية، وكذلك ظروف عملية تحضير العينات ودرجة حموضة الوسط. ويتم تصميم تجارب الثباتية وإجرائها لمعالجة الحالات التي تصادف عادة في عمليات المختبرات، ما لم يتم تحديد ثباتية المادة المدروسة مسبقاً وبالفعل من خلال طرق أخرى (أي خلال ممارسات ضمان الجودة، أو خلال المراجع المنشورة). ويجب أن يستخدم في دراسات الثباتية مجموعة من العينات المحضرة من المواد المرجعية النقية. وتستخدم المواد المرجعية النقية لإعداد عينات معززة من المادة المدروسة بتركيزين منخفض وعالٍ في كل مزيج يراد تحليله بنفس الطريقة.

ومن المهم أن يتم تحضير حجم كبير وكافٍ من كل من هذه العينات المعززة بوجود مادة مرجعية وذلك من أجل استكمال الدراسات في الأقسام التالية أدناه. يجب مبدئيًا أن يتم تحليل هذه العينات المعززة في ثلاثة تحضيرات لتأسيس الاستجابة عند الزمن صفر. وتتم مقارنة متوسط الاستجابة للزمن صفر لكل مجموعة من العينات بمتوسط الاستجابة للعينات التالية عند الزمن التالي t1 من دراسة الثباتية. كما أن الانحدار الخطي لمتوسط الاستجابتين المقاستين (مثلاً: المحسوبة من مساحة القمة[1]، أو من نسب مساحات القمة للمادة المدروسة إلى المادة المرجعية النقية الداخلية) بدلالة الزمن سوف يعطي تقييمًا لمنحى الثباتية [2,3].

1.2.9 ثباتية المادة المدروسة عند التجمد والذوبان[2] Stability – Freeze/Thaw

عادة يجب على المختبر كجزء من ممارسة المختبر القياسية أن يقوم بتجميد العينات قبل التحليل، كما أنه يجب على المختبر أن يقوم بتحديد ثباتية المادة المدروسة بعد ثلاث دورات التجميد والذوبان للمادة، وذلك في حال عدم وجود بيانات يمكن الاعتماد عليها نشرت في هذا الشأن حول المادة.

ويتم تقسيم العينات المعززة آنفة الذكر في الفقرة (٢,٩) إلى ما لا يقل عن ثلاثة أنابيب منفصلة لكل تركيز، ثم تجمد في درجة حرارة التخزين المقصودة لمدة ٢٤ ساعة، ويتبع ذلك تذويب الجليد دون مساعدة في درجة حرارة الغرفة. عند إذابة

1- عند رصد مساحات القمم الموافقة للمكونات، يجب أن تكون استجابة الجهاز ثابتة باستمرار على مدى عدة أيام من أجل الحصول على تفسير موثوق به للبيانات

2- ومن المسلم به أن دراسات الثباتية من أجل التجميد/ الذوبان والتخزين للعينات الصلبة (على سبيل المثال: الشعر، الأنسجة، والمنتجات الغذائية(قد لا يكون ممكنًا من خلال التحضير، وذلك بسبب طبيعة هذه العينات. وينبغي توخي الحذر في تفسير نتائج العينات الصلبة عندما تكون بيانات الثباتية الخاصة بها غير متوافرة

الجليد تمامًا، يجب أن يتم تحليل أول مجموعة من العينات في ثلاثة تحضيرات، في حين يعاد تجميدها مرة أخرى للعينات الأخرى لمدة ١٢ إلى ٢٤ ساعة في ظل نفس الظروف. ويجب إعادة التحليل بمعاودة عملية دورة التجمد/ الذوبان مرتين أو عدة مرات.

وتعتبر المادة المراد تحليلها ثابتة عند الحصول على قيم تراكيز لعينات ما بعد التجمد والذوبان مقارنة مع تركيز عينات الزمن صفرضمن حدود صحة الطريقة التحليلية المتبعة أي ضمن المجال ±15%.

2.2.9 ثباتية العينات المحضرة Stability – Processed Sample

قد تكون هناك ظروفٌ طارئة تحول دون تحليل العينة المدروسة مباشرة بعد تحضيرها، وذلك ضمن الأجهزة التحليلية، لذلك لا يمكن تحليلها على الفور. وإنما يكون من الضروري تحليلها في اليوم التالي أو في وقت لاحق. في هذه الحالات، يكون من الضروري تقييم المدة اللازمة لتحضير العينة والتي تبقى ضمنها العينة سالمة قبل أن تخضع لتغيرات غير مقبولة، وقبل أن تمنع الكشف الدقيق للمادة أو تحليلها، وتحديد كمياتها.

وعادة يتم تحضير عدةسلاسل عينات للتحليل مثلاً بعد الاستخلاص(كما هو بالنسبة للعينات المحضرة بخصوص منحنى المعايرة بالنسبة للتراكيز المحددة)، ويتم توزيعهاضمن قنّينَات الحَقْن (injection vials) الخاصة بالحاقن الأوتوماتيكي. ويتم تحليل سلسلة العينات الأولى لكل تركيز على الفور بثلاث تكرارات لمعرفة الاستجابات عند بدء الدراسة (الزمن الصفر) ويتم تخزين كافة زجاجات الحَقْن (injection vials) الخاصة بسلاسل العينات الأخرى لنفس التراكيز كما في طريقة التخزين خلال التحليل الروتيني على سبيل المثال، في الثلاجة، أو في درجة حرارة الغرفة على الحاقن الأوتوماتيكي. ثم يتم تحليلها بثلاثة تكرارات في فترات زمنية مختلفة خلال ٧٢ ساعة. وتتم مقارنة متوسط استجابات الكاشف في كل فترة زمنية إلى مقابلاتها في الزمن الصفر [4].

وتعتبر المادة المراد تحليلها ثابتة عند الحصول على قيم تراكيز عينات ما بعد التخزين مقارنة مع تركيز عينات الزمن صفر ضمن حدود صحة الطريقة التحليلية المتبعة أي ضمن المجال ±15% .

10. متطلبات إعادة التحقق من الصلاحية للطرق التحليلية التي تم التحقق من صلاحيتها مسبقاً Required Revalidation of Previously Validated Methods

تتطلب التعديلات التي تطرأ على الطريقة المثبتة صلاحيتها تقييماً للتأكد من أن التعديلات الطارئة ليس لها تأثير سلبي على كفاءة الطريقة التحليلة وأدائها. ويمكن أن تشمل هذه التعديلات على سبيل المثال لا الحصر الظروف التحليلية (Analytical conditions) ونوعية الأجهزة (Instrumentation) وظروف تحضير العينة (Sample processing) وبرامج معالجة البيانات (Data software).

وعلى سبيل المثال، بالنسبة للظروف التحليلية؛ التعديلات في مُذيبات الاستخلاص، أو المحاليل المنظمة (Buffer) ما قد يؤثر على خطية النتائج، أو التشويش، أو على حدود الكشف، أو الدقة، أو الصحة.

كما أن تغيير عمود الفصل الكروماتوغرافي أو مادة الطور الثابت في العمود، أو تغيير أحد مكونات أو نسب محاليل الطور المتحرك في الطرق الكروماتوغرافية يمكن أن يؤثر على خطية النتائج أو يسبب تداخلات.

والهدف في هذه الحالات هو التحقق من تأثير التعديلات على كفاءة الطريقة التي تم التحقق من صلاحيتها مسبقاً.

ويتم تحديد المعايير التي يجب إعادة تقييمها للتحقق من صلاحية الطريقة بعد ضبط المعايير المحتمل تأثرها وفقاً للتعديل الذي تم إجراؤه، ولابد من إجراء تجارب التحقق من الصلاحية من خلال تقييم المعايير المستهدفة لعينات يتم تحليلها وفقًا للطريقة قبل التعديل وعينات يتم تحليلها وفق الطريقة بعد التعديل، ما يسمح بإجراء مقارنة وإطلاق حكم بوجود تأثير للتعديلات من عدمه [4].

11. متطلبات التوثيق من أجل التحقق من صلاحية الطرق التحليلية Documentation Requirements for Method Validation

يعد حفظ السجلات جزءًا أساسيًّا من إجراءات العمل في المختبرات، وهو عنصر رئيسي من عناصر عملية التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية. ويجب الحفاظ على البيانات التي تم إنشاؤها خلال دراسات التحقق من صحة التحليل، ويجب أن تكون تلك البيانات متاحة للتدقيق والمراجعة، أو التفتيش. بحيث يجب

ترتيب وتصنيف هذه السجلات ليسهل استرجاعها واستعراضها.

ويجب أن تتضمن سجلات التحقق من صلاحية طريقة ملخصًا للدراسات التي أجريت للتحقق من الصلاحية ونتائجها. قد يكون هذا الملخص بشكل تقرير في نقاط، أو ملخص بشكل جدول، وذلك بشكل مختصر لتسهيل مراجعة سريعة لدراسات التحقق من الصلاحية للطريقة التحليلية. ويجب أن يشتمل هذا الملخص كحد أدنى على ما يلي:

- الهدف والنطاق (Scope)
- مخطط التحقق من الصلاحية (Validation plan)
- وصف جميع المعايير والمقاييس المقيمة، وفي حالة لم يتم تقييم أحد هذه العوامل يجب تعليل ذلك.
- خطوات تحضير العينات لتتضمن التراكيز، والمزائج.
- البيانات الأولية والنتائج المباشرة أو المراجع التي تشير أين تم حفظ البيانات الأولية.
- النتائج والحسابات (Results and calculations)
- الاستنتاجات (Conclusions)
- المراجع (References)
- توثيق المراجعات الإدارية والموافقات
- من المهم لسجلات التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية أن تحتوي على تفاصيل محددة بشأن الدراسات التي أجريت، بما في ذلك:
- الأشخاص المعنيون بعملية التحقق من صلاحية الطريقة (Individuals involved in the method validation).
- الأجهزة المستخدمة والنوعية (Specific instrumentation)
- التواريخ (Dates)

ويجب أن تتضمن وثائق التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية أيضًا نسخة من الطريقة التحليلية التي وضعت حديثًا أو إشارة إلى مكان حفظها.. إضافة إلى ذلك، من المستحسن أن يتم الاحتفاظ بوثائق التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية مدة لا تقل عن ١٠ سنوات بعد إجراء صلاحية الطريقة.

12. المراجعة العلمية

تمت مراجعة وتدقيق ملف المبادئ التوجيهية للتحقق من صلاحية طرق تحليل السموم الجنائية من قبل أعضاء مجموعة العمل العلمية العربية لعلم السموم الجنائية بالجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي، والمؤلفة من كل من:

١) د. هدى مصطفى حسن/ رئيس قسم التطوير وأخصائية علم السموم الجنائي بمستشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث، المملكة العربية السعودية.

٢) أ.د. رجاء محمد عبد المعبود/ أستاذ دكتور، قسم الطب الشرعي والسموم الإكلينيكية، كلية الطب، جامعة أسيوط، جمهورية مصر العربية.

٣) د. عبدالسلام أحمد بكداش/ أستاذ مساعد، قسم الكيمياء الجنائية بجامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، المملكة العربية السعودية.

٤) د. أحمد إبراهيم الأسمري/ رئيس مركز السموم والكيمياء الشرعية بجدة، وزارة الصحة المملكة العربية السعودية.

٥) د. جهاد القدسي/ أستاذ مساعد في جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، رئيس قسم المجموعات العربية العلمية في الجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي، المملكة العربية السعودية.

٦) د. سلاف عاصي/ أستاذ مساعد، قسم السموم والتحاليل السريرية والجنائية، جامعة ليفربول، المملكة المتحدة.

٧) د. شذى ديب/ مدير مختبرات راندوكس، مانشيستر، المملكة المتحدة.

٨) د. فاروق الزهراني/ مختبرات السموم في إدارة أمن الدولة، الرياض، المملكة العربية السعودية.

٩) د. مها المزروع/ رئيس مركز مراقبة السموم الإقليمي في الدمام، المملكة العربية السعودية.

١٠) د. طارق الأحمدي/ قسم علوم الأدلة الجنائية، كلية الملك فهد الأمنية، الرياض، المملكة العربية السعودية.

١١) أ. علي حكمي/ قسم علوم الأدلة الجنائية، كلية الملك فهد الأمنية، الرياض، المملكة العربية السعودية.

13. الصلاحية

تسري هذه المبادئ التوجيهية للتحقق من صلاحية طرق تحليل السموم الجنائية لمدة عامين من تاريخ الإصدار.

14. المراجع

1. Andri, B., Lebrun, P., Dispas, A., Klinkenberg, R. g., Streel, B., Ziemons, E., Marini, R., & Hubert, P. (2017). Optimization and validation of a fast super-critical fluid chromatography method for the quan-

ceutical industry perspective. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 21(6), 1249-1273.

11. Kintz, P., Salomone, A., & Vincenti, M. (2015). Hair analysis in clinical and forensic toxicology: Academic Press.

12. Klimenko, L. Y., Trut, S., Petyunin, G., & Ivanchuk, I. (2013). Validation of UV-spectrophotometric methods of quantitative determination in forensic and toxicological analysis: recovery

13. Kruve, A., R. Rebane, et al. (2015). "Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I." Analytica chimica acta 870: 29-44.

14) Kruve, A., R. Rebane, et al. (2015). "Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II." Analytica chimica acta 870: 8-28.

15) Lynch, K. L. (2016). CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry. Clinical chemistry, 62(1), 24-29.

16) Matuszewski, B., Constanzer, M., & Chavez-Eng, C. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLCâˆ' MS/MS. Analytical chemistry, 75(13), 3019-3030.

17) Moffat, A. C., Osselton, M. D., Widdop, B., & Watts, J. (2011). Clarke's analysis of drugs and poisons: Pharmaceutical Press,.

18) Papoutsis, I. I., Athanaselis, S. A., Nikolaou, P. D., Pistos, C. M., Spiliopoulou, C. A., & Maravelias, C. P. (2010). Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine

titative determination of vitamin D3 and its related impurities. Journal of Chromatography A, 1491, 171-181.

2. Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. Journal of chromatography B, 877(23), 2224-2234.

3. Bressolle, F., Bromet-Petit, M., & Audran, M. (1996). Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods Applications to pharmacokinetics. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 686(1), 3-10.

4. Bruce, P., Minkkinen, P., & Riekkola, M.-L. (1998). Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. Microchimica Acta, 128(1), 93-106.

5. Chesher, D. (2008). Evaluating assay precision. Clin Biochem Rev, 29(Suppl 1), S23-S26.

6. CHMP. (2015). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) -Guideline on bioanalytical method validation (0277-6715).

7. Cooper, G. A., Paterson, S., & Osselton, M. D. (2010). The United Kingdom and Ireland association of forensic toxicologists: forensic toxicology laboratory guidelines (2010). Science & Justice, 50(4), 166-176.

8. De Bievre, P., & Günzler, H. (2005). Validation in chemical measurement: Springer.

9. Drummer, O. H. (2007). Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. Analytical and bioanalytical chemistry, 388(7), 1495-1503.

10. Findlay, J., Smith, W., Lee, J., Nordblom, G., Das, I., DeSilva, B., Khan, M., & Bowsher, R. (2000). Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharma-

drugs and their metabolites in blood: Applications in clinical and forensic toxicology. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 52(4), 609-614.

19) Penders, J., & Verstraete, A. (2006). Laboratory guidelines and standards in clinical and forensic toxicology. Accreditation and quality assurance, 11(6), 284-290.

20) Peters, F. T., & Maurer, H. H. (2002). Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology: a review, Validation in chemical measurement (pp. 1-9): Springer.

21) Peters, F. T., Drummer, O. H., & Musshoff, F. (2007). Validation of new methods. Forensic science international, 165(2), 216-224.

22) Remane, D., Meyer, M. R., Wissenbach, D. K., & Maurer, H. H. (2010). Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization or electrospray ionization. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24(21), 3103-3108.

23) SWOGTOX. (2013). Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, Scientific Working Group for Forensic Toxicology.

24) Tiscione, N. B., & Wegner, K. (2017). Validation of the Neogen® Fentanyl ELISA Kit for Blood and Urine. Journal of analytical toxicology, 41(4), 313-317.

25) U.S. Department of Health and Human Services. (2013). Bioanalytical Method Validation. Food and Drug Administration, Guidance for Industry,.

26) UNODC. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens, A commitment to quality and continuous improvement. UNITED NATIONS.

27) UNODC. (2009). Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens.

28) Viswanathan, C., Bansal, S., Booth, B., DeStefano, A. J., Rose, M. J., Sailstad, J., Shah, V. P., Skelly, J. P., Swann, P. G., & Weiner, R. (2007). Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays. Pharmaceutical research, 24(10), 1962-1973.