جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية
المجلة العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي
www.nauss.edu.sa
http://ajfsfm.nauss.edu.sa

مبادئ توجيهية

مجموعة العمل العلمية العربية لعلم السموم الجنائي (ASWGFT): المبادئ التوجيهية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي

عبدالسلام بكداش[1,2*]، جهاد القدسي[2]، هدى الشيخ حسن[3]

[1] كلية علوم الأدلة الجنائية، جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، المملكة العربية السعودية
[2] الجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي، جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، المملكة العربية السعودية
[3] قسم الأمراض والمختبرات الطبية، مشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث، الرياض، المملكة العربية السعودية

الملخص:

تعتبر البيانات التحليلية الموثوقة شرطاً مسبقاً للتفسير الصحيح في علم السموم الجنائي عند تقييم الدراسات العلمية، وفي العمل 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 المدعّى عليه، أو يترتب عنها 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، سيّما أن تلك المسائل أصبحت ذات أهمية متزايدة في علم تحليل السموم الجنائي في السنوات الأخيرة.

تقدم الجمعية العربية لعلوم الأدلة الجنائية والطب الشرعي ومقرها جامعة نايف العربية للعلوم الأمنية بالرياض الإصدار الأول من المبادئ التوجيهية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي المقدمة من قبل مجموعة العمل العلمية العربية لعلم السموم الجنائي في الجمعية، والذي تطمح أن يكون إصدارًا علميًّا مميزاً باللغة العربية، ويحرص 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 مجموعة العمل العلمية العربية لعلم السموم الجنائي على أن يكون إصدارها الأول لدليل المبادئ التوجيهية للتحقق من صلاحية طرق التحليل في علم السموم الجنائي أسوة بالمنظمات العالمية الناشطة في هذا المجال، فملف المبادئ 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.

* Corresponding author: Abdulsallam Bakdash
Email: a.bakdash@nauss.edu.sa

1658-6794© 2017 Naif Arab University for Security Sciences. Peer Review under the responsibility of NAUSS
doi: 10.26735/16586794.2017.013
الوصول الحر
Production and hosting by NAUSS

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 first 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.

ا. مقدمة

يستند دليل المبادئ 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 عمليّاً للمختبرات العربية العاملة في مجال علم السموم الجنائي والتي توظف طرقاً تحليلية آلية متطورة في التعامل مع العينات السريرية والجنائية. 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

Arab Scientific Working Group for Forensic Toxicology (ASWGFT): Guidelines for Analytical Method Validation in Forensic Toxicology

Abdulsallam A. Bakdash [1, 2, *], Jihad Al-Qudsi [2], Huda M. Hassan [3]

[1,*] Department of Forensic Chemistry, College of Forensic Sciences, Naif Arab University for Security Sciences, Riyadh, Saudi Arabia

[2] Arab Society for Forensic Sciences and Forensic Medicine, Naif Arab University for Security Sciences, Riyadh, Saudi Arabia

[3] Department of Pathology & Laboratory Medicine, King Faisal Specialist Hospital and Research Center, Riyadh, Saudi Arabia

Abstract

Reliable results and valid analytical data are an essential 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

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 الملف لشرح بعض المعادلات الرياضية المستخدمة في حساب المعايير ذات الصلة في إثبات صلاحية الطرق التحليلية. وسيتم إرفاق الملحقات الوصفية المتمثلة بأمثلة تجريبية وحسابية بدليل المبادئ التوجيهية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي في عدد لاحق. وتهدف هذه المبادئ التوجيهية 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 عمل 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].

وتتأثر كفاءة وأداء هذه الطرق التحليلية بالعديد من العوامل المتعلقة بظروف العمل التقنية و الفنية ووقت إجراء التجارب وتكرارها ما يؤدي لاختلاف في النتائج ويجب أن يكون هذا الاختلاف ضمن المعايير المقبولة، ولتقييم ذلك فإنّه يتم دراسة العديد من العوامل ويتم التحقق من صلاحيتها من خلال هذه الإجراءات، وهي بمثابة تقديرات لصحة ودقة وموثوقية الطريقة التحليلية [3].

٢. مصطلحات وتعاريف علمية

٢,١ 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 Standard) أو كمادة عيارية داخلية (Internal Standard)، ويجب أن تكون المواد المرجعية ذات درجة نقاوة عالية حيث أن النقاوة تؤثر في نتائج الدراسة التحليلية. وينبغي قدر الإمكان أن تكون المادة المرجعية العيارية القياسية (Reference Standard) 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 ومعروفة النقاوة. وعادة ما 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 وذو 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، مثل رقم الوجبة (رقم التعريف) وتاريخ انتهاء الصلاحية وشهادات التحاليل عند توفرها، و/أو شهادات التعريف الداخلية أو الخارجية، ونسبة النقاوة. وفي حالة انتهاء صلاحية المادة المرجعية، يجب عدم استخدام محاليل هذه المواد المرجعية المخزنة ما لم تتم إعادة تحديد النقاوة في المحاليل [2,5].

٢,٢ الأنسجة الحيوية (Biological Tissues)

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

٢,٣ السوائل الحيوية (Biological Fluids)

هي أية عينة حيوية سائلة، والتي يمكن أن تقاس بالحجم في طريقة

التحليل مثل سائل الدم، البول، العصارات، المصل، سائل الخلط الزجاجي للعين، والسوائل الفموية [4,6].

٤,٢ العينات غير الحيوية (Non-Biological Samples)

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

٥,٢ العينة الفارغة (Blank Matrix Sample)

هي عينة لنسيج حيوي أو سائل حيوي أو عينات غير حيوية، أو أية مكونات اصطناعية (مستحضرات) والتي لا تحتوي على المادة المراد تحليلها (Analyte)، وبدون مادة عيارية داخلية (Internal Standard) [4,7].

٦,٢ العينة الممزوجة بالمادة العيارية (Spiked/Fortified Matrix Sample)

هي عينة فارغة، ممزوجة بالمادة العيارية القياسية أو المادة المراد تحليلها، أو أية مادة مرجعية معلومة التركيز [2].

٧,٢ العينات العيارية (Calibrator)

هي عينات فارغة تحتوي على المادة المراد تحليلها معلومة التركيز، أعدت 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 (Matrix) مكوناته مماثلة للعينات المدروسة [5].

٨,٢ عينات مراقبة الجودة (Quality Control Samples)

هي عينات 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 إجراء أي سلسلة تحليلية روتينية، وتعامل نفس معاملة العينات المدروسة [5].

٩,٢ سلامة التخفيف (التمديد) (Dilution Integrity)

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

١٠,٢ منحنى المعايرة Calibration Curve/ Standard) (Curve

هو تمثيل بياني للعلاقة بين استجابة كاشف الجهاز (Detector) وتراكيز المحاليل العيارية للمادة المرجعية، ومن خلال منحنى المعايرة يمكن قياس تركيز المواد المستهدفة في أي عينة طالما تتراوح تراكيز المواد المستهدفة فيها بين أعلى وأدنى تركيز من مدى منحنى المعايرة [4,6-9]. وإذا كان تركيز العينة يزيد على أعلى تركيز نقاط المعايرة فإنها تحتاج إلى تخفيف وفق المعايير المحددة لذلك، ويجب أن تضرب النتيجة بمعامل التخفيف، ويجب أن لا تتجاوز النتيجة مجال العمل.

١١,٢ مخطط التشتت المعياري (القياسي) (Standardized Residual Plot)

هو تمثيل بياني لتشتت القيم التجريبية لاستجابة الجهاز عند كل تركيز عن القيم الحسابية لنفس التركيز وفق منحني المعايرة، ومن خلال تشتت قيم النتائج حول قيمة الصفر يمكن تقييم ما إذا كان منحنى المعايرة يتبع الدرجة الأولى (نمط خطي Linear equation) أو الثانية (نمط غير خطي Quadratic equation)، ويمكن استبعاد القيم الشاذة من النتائج لجعل منحنى المعايرة يصف النتائج بدقة، وذلك يسهل عملية قياس تراكيز المواد المستهدفة بدقة على منحنى المعايرة [3,4]. حيث أن هذه المخططات تشرح ما إذا كانت النتائج متماثلة التفاوت عن القيم النظرية وتحقق النمط الخطي، أو لاتحقق النمط الخطي بتفاوت الخطأ حول القيم النظرية.

١٢,٢ 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 فيما إذا كانت العلاقة خطية تمثل بمعادلة من الدرجة الاولى، أو غير خطية تمثل بمعادلة من الدرجة الثانية أو الثالثة [3,4,7,10,11].

١٣,٢ مجال العمل (Working Range)

هو مجال التراكيز من المادة المراد تحليلها والذي يتم تحديده بناء على هدف التحليل أو التطبيق، وخلال هذا المجال ينبغي للمعايرة أن تكون خطية، وأن تحقق شروط الصحة والدقة المقبولة. وينبغي أن يكون مجال العمل ضمن مقدار 80-120% من كمية المادة المراد تحليلها والمتوقع وجودها في العينات المفحوصة، كما أنه يجب يضمن التعبير عن التجانس في العينات المفحوصة بما مقداره 70-130% من المحتوى في العينات قليلة التجانس مثل محتويات المعدة أو الكبد [3,4].

١٤,٢ 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 وتكون ناتجة عن العينات الحيوية وغير الحيوية، مثل نواتج الأيض (الاستقلاب)، أو شوائب، أو عن مواد عيارية داخلية. والتي ممكن أن تؤثّر وتشوّش على دقة الكشف النوعي والكمي للمادة المراد تحليلها [4,7].

١٥,٢ 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 على المادة المراد تحليلها، وتكون هذه الاستجابة ناتجة عن أثر متبقي للمادة المراد تحليلها من القياس السابق في أجزاء جهاز التحليل يُرحّل إلى العينة اللاحقة ما يؤثر على النتيجة الحقيقية للعينات اللاحقة [2-4].

١٦,٢ 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].

١٧,٢ حد التقدير الكمي (Limit of Quantitation; LOQ)

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

١٨,٢ نسبة استرداد المادة المراد تحليلها في الفحص (Recovery of analyte in Assay)

هي نسبة كمية المادة المتحصل عليها من المادة المدروسة بعد إجراءات تحضير العينة (الاستخلاص مثلاً) إلى كمية المادة في عينة غير مستخلصة ومذابة مباشرة في الماء أو في مذيب عضوي مناسب [3,4,9,10,11,13].

١٩,٢ 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 والذي يؤثر على عملية تأيّن المادة المراد تحليلها أثناء تحليلها في الجهاز، والذي قد يتمثل بتعزيز التأيّن أو تثبيطه [7,14].

٢٠,٢ الانتقائية (Selectivity)

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

٢١,٢ الخصوصية (Specificity)

هي قدرة طريقة التحليل على تمييز المادة المراد تحليلها ضمن العينة بوجود مواد أخرى سواء 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 [3,4,9,10,13].

٢٢,٢ 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 [2-4,10,13].

٢٣,٢ 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 [2,4,13].

٢٤,٢ الصحة (Accuracy)

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

٢٥,٢ الضبط (Trueness)

هي التقارب والمطابقة عند قياس عدد كبير من العينات بين القيمة الوسطية لقياسات متغير ما، والقيمة المرجعية المقبولة لهذا المتغير. [2-4,10].

٢٦,٢ الدقة (Precision)

هي قياس مدى التقارب بين سلسلة من نتائج القياسات تم الحصول عليها من تكرارات متعددة (Repeatability) 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) [2-4,10,15].

٢٧,٢ دقة التكرار (Repeatability)

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

٢٨,٢ دقة المقارنة (Reproducibility)

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

٢٩,٢ قوة الطريقة التحليلية (Robustness)

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

٣٠,٢ الحد القطعي (Cutoff; Decision Point)

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، ومثال ذلك قيمة الحد القطعي للأمفيتامين في البول 1000 ng/mL وتجاوز هذه القيمة يعني أن العينة إيجابية مبدئياً، وقد تختلف قيم الحد القطعي بين الدول والمؤسسات .

٣. نطاق العمل (Scope)

تختص هذه الإرشادات التوجيهية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية في علم السموم الجنائي، وتتنوع طرق تحليل العينات في علم السموم الجنائي بحسب طبيعة العينات والمواد المراد تحليلها، وبحسب الهدف المرجو من طريقة التحليل، فهناك طرق تحليل طيفية لونية (Spectrophotometry methods)، وطرق تحليل كروماتوغرافي (Chromatographic methods)، وطرق تحليل مناعية (Immuno-assay)، طرق تحليل ذات طابع حيوي جزيئي (Molecular-biologi-cal 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 [3,4].

٤. تطـــوير وتحســـين 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 أيضاً توثيق جميع القرائن والمتغيرات التي يتم قياسها وتقييمها عند تطوير الطريقة وابتكارها، حتى ولو لم تكن النتائج مقبولة [3,4].

١,٤ تطوير وتحسين تقنيات تحضير وإعداد العينة

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

٢,٤ تطوير وتحسين العوامل المتعلقة بالأجهزة ومعالجة البيانات

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

٥. 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 على ذلك:

- عند استخدام طريقة تحليلية جديدة.
- عند تعديل طريقة تحليلية مسبقة، 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 [4,7].

إن 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 إعادة التحقق من صلاحية الطريقة في حالة تغير المحاليل أو أحد قيم معايير التحقق من الصلاحية، ويعتمد مدى ووتيرة إعادة التحقق من صلاحية الطرق التحليلية التي تم التحقق من صلاحيتها مسبقاً على طبيعة التغييرات المحددة لذلك، أو على سياسة المختبر.

٦. إنشاء خطة التحقق من صلاحية الطرق التحليلية

لا شك 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].

يجب 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

جدول 1- المعايير القياسية اللازمة للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية النوعية والكمية والمسح الشامل باستخدام المقايسات المناعية أو أساليب أخرى [4,12]

Table 1- Parameters considered during analytical method validation.

معيار التحقق من الصلاحية Validation parameter	طرق التعرف أو الإثبات وطرق الكشف النوعي Qualitative-) Confirmation/ (identification- methods	طرق التحليل الكمي Quantitative) (analysis	طرق المسح الشامل باستخدام المقايسات المناعية Immunoassay-based) (screening	طرق المسح الشامل بأساليب أخرى Screening Methods,) (All others
الانتقائية والخصوصية Selectivity / Specificity	✓	✓	✓	✓
المنحني العياري Calibration curve		✓		
حد الكشف النوعي LOD	✓	✓	✓	✓
حد التقدير الكمي LOQ		✓		
الصحة Accuracy		✓		
الدقة Precision		✓	✓ عند الحد القطعي	✓ عند الحد القطعي
سلامة التخفيف Dilution Integrity	✓	✓	✓	✓
الأثر المرحل Carryover	✓	✓		
دراسات التداخل والتشويش Interference studies	✓	✓	✓	✓
تعزيز/تثبيط التأين Ionization enhancement/ suppression	✓	✓		
الثباتية Stability	✓ إن وجدت	✓	✓ إن وجدت	✓

أن تنص الخطة على توجيه التجارب في الاتجاه الذي سيتم العمل به وتحديد معايير القبول لكل متغير (ستصدر أمثلة في الملاحق).

٧. 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)، والشبكة الأوروبية لمؤسسات العلوم الجنائية (ENF-SI)، والاتحاد الدولي للكيمياء البحتة والتطبيقية (IUPAC) وجمعية التعاون الدولي للتتبع والكيمياء التحليلية (CITAC)، وشبكة المنظمات الأوروبية للكيمياء التحليلية (Eurachem)، بنشر سلسلة مفصلة من التوصيات والإجراءات القياسية والإرشادات. وحيث تصنف طرق التحليل وفقاً لأساليب متعددة ينبغي في الحالة الراهنة أن يكون هناك فارق مهم بين الطرق الكمية والنوعية، حيث تتنوع طرق تحليل علم السموم الجنائي حسب الأهداف المطلوب إنجازها. فمن طرق تحليل السموم الجنائي 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 يتوجب تقييم معايير الصلاحية وفقاً للغرض المطلوب من التحليل، ومن خلال تقسيم طرق التحاليل المتبعة في التحاليل السمية إلى أربعة أصناف رئيسية وهي طرق التعرف أو الإثبات وطرق الكشف النوعي Qualitative- Confirmation/identification- methods، وطرق التحليل الكمي Quantitative analysis، وطرق المسح الشامل باستخدام المقايسات المناعية (Immunoassay-based screening)، وطرق المسح الشامل بأساليب أخرى (Screening Methods; All others) يوضح الجدول رقم 1- المعايير القياسية للتحقق من صلاحية الطرق التحليلية المطلوب تقييمها وفقاً لهذه المبادئ التوجيهية.

٨. 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 مسبقاً بدلاً من استخدام عيّنات ممزوجة بالمادة العيارية، وذلك من أجل دراسات محددة للتحقق من الصلاحية [12]. تُجرى اختبارات التحقق من الصلاحية بإجراءات مماثلة لإجراءات طريقة تحليل العينات المدروسة؛ أي بإجراء دراسات التحقق من الصلاحية في أيام مختلفة، أو من قبل عدة محللين أو غير ذلك، ما يضمن أن الأجهزة التحليلية تلبي نفس متطلبات الأداء اليومية لطرق القياس التحليلية [3,4,12].

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

إن المتطلبات التالية تمثل الحد الأدنى المطلوب لتقييم معايير التحقق من صلاحية الطرق التحليلية المدرجة في علم السموم الجنائي، وقد تم سردها هنا عشوائياً 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 على إرشادات بشأن كيفية تنفيذ تجارب التحقق من الصلاحية بكفاءة عالية.

١,٨ الانتقائية، والخصوصية (Selectivity and Specificity)

تعبر انتقائية الطريقة التحليلية عن قدرتها على التمييز بين المركبات المختلفة دون أي تداخل بينها. وتعبر الخصوصية 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 عشر 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 من خلال شمل دراسات التقييم الفعلية الأدوية المصاحبة وغيرها من المواد السمية الممكن تواجدها في العينات.

وينبغي ضمان الانتقائية والخصوصية عند حد التقدير الكمي (LOQ). وتكون النتائج مقبولة في حال كانت إشارة التشويش أقل بنسبة 20% من الإشارة 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 عكوسة (راجعة) سواء أثناء إجراءات تحضير العينات أو أثناء قياسها في أجهزة التحليل، ويتم ذلك من خلال تحليل نواتج الأيض المحتمل تحولها بشكل عكوس إلى المادة الأم المراد تحليلها، وذلك بمزجها في عينات فارغة.

٢,٨ 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 رسم 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 أنه 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 ضروري جدًا للحصول على تحديد كمي موثوق ودقيق للمادة المدروسة. ويستحسن استخدام عينات معايرة مع مكونات العينة الفارغة (Matrix-matched calibrator) لكن ذلك ليس شرطا أساسياً. وبغض النظر عن مكونات المادة الفارغة المستخدمة في تحضير المحاليل العيارية فإنه يتوجب على المختبر أن يثبت أنّ صحة ودقة النتائج مقبولين من خلال تحضير عينات مرجعية في سوائل حيوية أو غير حيوية والتي ينوى تحليلها وفق طريقة التحليل [2-4,7,10,13].

وعلى سبيل المثال، يمكن أن تعطي طرق تحديد الكحول في الدم الكامل قيم صحة ودقة مقبولة في جميع اختبارات الدم باستخدام محاليل عيارية تم تحضيرها بالماء، وليس بالدم الكامل. وبشكل مشابه فإنه يمكن إثبات قيم الصحة والدقة المقبولة لتحليل مواد عيارية في الدم الكامل، لكنها تستخدم لعينات حيوية أخرى مختلفة (عينات نسيجية بعد الوفاة، السيروم، البول) [17].

ومن الضروري عند إنشاء منحنى المعايرة استخدام محاليل معايرة تغطّي تراكيزها مجال العمل أي 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 بشكل معقول و مناسب وذلك لمعرفة سلوك المعايرة على مجال كبير، ويتطلب كحد أدنى إجراء خمس 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 (Micro-soft 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].

إن 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، ما يعني أن تغير استجابة القياس بدلالة التراكيز يتمثل بمعادلة ليست من الدرجة الأولى. وفي نهاية المطاف، فإن أفضل طريقة هي استخدام أبسط نموذج للمعايرة والذي يتلاءم مع علاقة التركيز باستجابة القياس [4,7,12].

على 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^2) فقط، وبدلاً من ذلك فإن تقييم نمط المعايرة يجب أن يتم بصرياً بحيث يتم تضمين أكبر عدد من النقاط التجريبية في المنحني وذلك باستخدام مخطط التشتت المعياري (Standardized residual plots). تتيح هذه الطريقة فحص القيم المتطرفة فيما إن كان يجب حذفها أو إلغائها إن وجدت بحيث لا تقل عدد نقاط المعايرة عن 5 نقاط لمنحني المعايرة لتكون ذات دلالة إحصائية (على سبيل المثال، خارج مجال الإنحراف المعياري (Standard Deviation; SD)، $SD \pm 3$).

إضافة إلى ذلك، فإن مخطط التشتت المعياري (Standardized residual plots) يسمح بإمكانية معرفة فيما إذا كانت تباينات النتائج متساوية ضمن مجال المعايرة وبدرجة تشتت متساوية من أجل كل تركيز. كما أنها تعطي مؤشرًا إذا كان منحني المعايرة بنمطه المختار يمر بشكل عام في كافة النقاط على المخطط البياني. وعلى سبيل المثال فهي تعطي مؤشراً فيما إذا كان نمط المعايرة المختار يلائم النتائج العملية للقياس، فمثلا تشتت النتائج عشوائياً حول الخط الصفري (تباين متماثل) يدلل على أن النمط الخطي للمعايرة هو الأنسب [3,4].

ويوجد 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.

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 يتوجب 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].

بالإضافة إلى ذلك، فإنّه بعد اعتماد نمط المعايرة من أجل طريقة تم التحقق من صحتها، فإنّه لا يجوز تغيير نمط المعايرة عشوائيّاً ليوافق نتائج مقبولة أثناء التحليل. على 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].

٣,٨ حد الكشف النوعي (Limit of Detection)

لابد 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 المدروسة (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 ثلاث مصادر مختلفة على الأقل من العينات الفارغة (Blank Matrices) مالم يتم ذكر خلاف ذلك. إضافة 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 أحد الطرق التالية:

١,٣,٨ 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 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 [3,4,10,12,13].

٢,٣,٨ 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). ويستخدم كحد أدنى ثلاث عينات في كل قياس من المحلول العياري ذي التركيز الأدنى غير الصفري والتي يجب أن تحلل كل على حدة ثلاث مرات على الأقل لإثبات أن جميع معايير الكشف والتشخيص متطابقة. وعند الضرورة، فإنه من المقبول استخدام نفس تكرار قياسات المادة القياسية المرجعية والمستخدمة لإنشاء منحنى المعايرة (الفقرة 8.2) من أجل بعض العينات المقاسة بهذه الطريقة، ولكن قد يضطر إلى استخدام عينات أو قياسات إضافية لتحقيق تسع تكرارات للقياسات [3,4,10,12,13].

٣,٣,٨ استخدام الحد القطعي كحد للكشف النوعي (Using the Cuttoff Concentration as the LOD)

هذا الأسلوب مفيد لكل من طرق التحليل النوعي والكمي، ففي بعض الحالات قد يكتفى بتعريف حد الكشف النوعي كقيمة الحد القطعي (Cuttoff) المعرفة للاختبار. 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 الحد القطعي حتى لو كان من الممكن الكشف تحليلياً عن الكحول بتراكيز أقل من ذلك [3].

وبشكل مماثل بالنسبة لاختبارات المقايسات المناعية (Immuno-Assay) المعتمدة على استخدام الأجسام المضادة، فللمختبر الحق في استخدام تركيز الحد القطعي كقيمة لحد الكشف النوعي لهذه المقايسات. ويجب تحليل ثلاث عينات كحد أدنى من عينات ممزوجة بالمادة العيارية القياسية (Spiked samples) عند التركيز الموافق للنقطة الحدية (الحد القطعي)، 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 8.2) من أجل بعض العينات المقاسة بهذه الطريقة، ولكن قد يضطر إلى استخدام عينات أو قياسات إضافية لتحقيق تسع تكرارات للقياسات [3,4].

٤,٣,٨ تقييم حد الكشف النوعي باستخدام إشارة التشويش (الضجيج) في الخلفية Estimating LOD) (Using Background Noise

تفيد هذه الطرق في تعيين حد الكشف النوعي 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 (postmor-tem blood) من ثلاثة أشخاص متوفين مختلفين، ويمكن حساب حد الكشف النوعي في هذه الحالة بطريقتين: [4,9,18]

٨.٣.٤.١ 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:

1) ينتج استجابة متكررة وثابتة على جهاز القياس أكبر أو تساوي ثلاثة أضعاف مستوى التشويش (ضجيج، Noise) الناتج في خلفية الكروماتوغرام مقارنة بالعينات الفارغة، نسبة الإشارة إلى التشويش (Signal to Noise; S/N) $S/N \geq 3$.

2) 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) [4,18].

فيما إذا كان الممكن تقييم نسبة الإشارة إلى التشويش بالنظر، فإن ذلك يبقى موضوعياً، 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.

نسبة الإشارة إلى التشويش S/N = ارتفاع إشارة الاستجابة (القمة) للمادة المراد تحليلها / معدل ارتفاع إشارات التشويش

٨.٣.٤.٢ تقييم حد الكشف النوعي باستخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام *(Estimating LOD Using Statistical Analysis of Background)*

لتعيين حد الكشف النوعي باستخدام هذه الطريقة، يجب تحليل ثلاثة عينات مزيج فارغة من مصادر مختلفة (Blank Matrix) ويجري 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 والذي 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 [4,18]:

$$LOD = X + 3.3\ SD$$

٨.٣.٥ تقييم حد الكشف النوعي باستخدام منحني المعايرة الخطي *(Estimating 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 [4,18]:

$$LOD = 3.3 \times SD / Avgm$$

٨.٤ 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.

تراعي 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 و عينات ممزوجة بالمادة العيارية القياسية من ثلاثة مصادر مختلفة على الأقل من مزيج العينة الفارغة (Matrix)، ما لم يطلب خلاف ذلك كما هو مبين أدناه.

٨.٤.١ 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 تسع تكرارات للقياسات [4,18].

٢.٤.٨ 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 تحليلياً لقيمة أقل من قيمة حد التقدير الكمي المقررة.

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

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

تفيد هذه الطرق 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:

١.٣.٤.٨ 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:

1) ينتج استجابة متكررة وثابتة على جهاز القياس أكبر أو تساوي عشرة أضعاف مستوى التشويش (ضجيج، Noise) الناتج في خلفية الكروماتوغرام مقارنة بالعينات السلبية، نسبة الإشارة إلى التشويش (Signal to Noise; S/N) S/N ≥10..

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

فيما إذا كان من الممكن تقييم نسبة الإشارة إلى التشويش بالنظر، فإن ذلك يبقى موضوعياً، لذلك فإنه يجب استخدام برنامج حسابي مخصص من أجل تحديد هذه النسبة. ويمكن حسابها يدوياً.

٢.٤.٣.٨ تقييم حد التقدير الكمي باستخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام *(Estimating LOQ Using 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. إن أقل تركيز للعينة الممزوجة بالمادة العيارية القياسية والذي يعطي بشكل مستمر إشارة استجابة أكبر من معدل إشارة التشويش في العينات الفارغة (X) مضافاً إليه مقدار عشرة أضعاف من الانحراف المعياري (SD) يمثل حد التقدير الكمي (LOQ)، وفق العلاقة التالية:

$$LOQ = X + 10\ SD$$

٤.٤.٨ تقييم حد التقدير الكمي باستخدام منحني 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-intercept) والمتوسط الحسابي لميل خط منحنى المعايرة المستقيم (Avgm) لمنحنيات المعايرة الخطية الناتجة عن القياسات، وفق العلاقة التالية [4,18]:

$$LOQ = 10 \times SD / Avgm$$

٥.٨ 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 المردا تحليلها والمتبقية في العينة بعد الانتهاء من معالجتها وإعدادها لتكون جاهزة للقياس [3,4,19].

وفي حالة العينات البيولوجية، من الممكن إضافة كمية محددة من

المادة العيارية القياسية إلى مزيج العينة الفارغة (Matrix)، ويجب أن يتم تنفيذ تجارب نسبة الاسترداد من خلال دراسة نتائج التحليل للعينات بعد تحضيرها أو استخلاصها باستخدام ثلاث تراكيز مختلفة (عادة نفس التراكيز المستخدمة لتقييم صحة ودقة الطريقة)، ويتم استخلاص خمسة تكرارات لكل تركيز، وتضاف كمية معروفة من المادة العيارية الداخلية (IS) إلى كل عينة بعد عملية الاستخلاص ،من 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، 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%، وتحسب نسبة الاسترداد وفق المعادلة التالية [4]:

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

- 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 100%، ولكن ينبغي أن تكون قيم نسبة الاسترداد متسقة (بما في ذلك المادة المراد تحليلها والمادة العيارية الداخلية) عند كل التراكيز التي تم قياسها، و بحيث تحقق معايير الكشف النوعي والتحديد الكمي والصحة والدقة، وأن تكون موثوقة، وينصح بألا تقل نسبة الاستخلاص ما أمكن عن 50%.

٦.٨ الأثر المرحّل 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 [2,4].

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 بتراكيز متزايدة، ويتم تحديد التركيز المثالي والذي لايمكن مشاهدة أثر مرحّل له في تحاليل لاحقة على أنه أعلى تركيز للمادة المراد تحليلها (أعلى من حد الكشف النوعي LOD) والذي لا يمكن بعد استخدامه في تحضير وتحليل عينة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها مشاهدة أثر مرحّل في عينة فارغة لاحقة يزيد بمقدار 20% من قيمة حد التقدير الكمي (LOQ) بالنسبة للمادة المراد تحليلها وألا يزيد عن 5% للعياري الداخلي. وينبغي تحديد هذا التركيز بإجراء ثلاث 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].

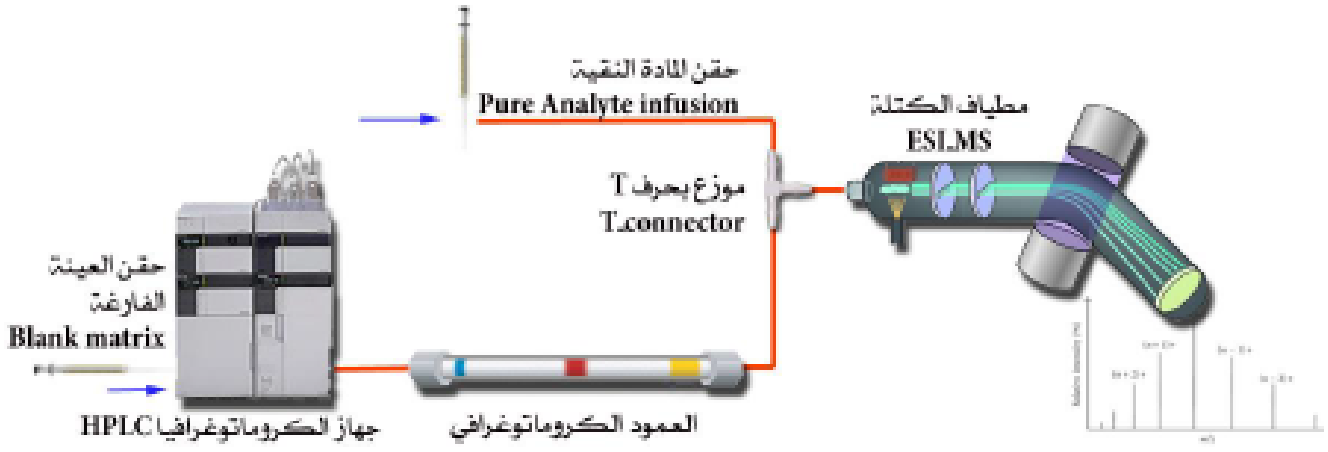
وفي بعض الحالات حيث يكون من المستحيل التخلص من ظاهرة الأثر المرحّل، لابد وأن تتم إدارة مسألة الأثر المرحّل وفق إجراءات العمل القياسية (Standard Operating Procedure; SOP)، فمثلاً يجب أن تكون الاستجابة الناتجة عن المادة المراد تحليلها في العينات المدروسة أكبر بـ 10 مرات من الاستجابة الناتجة عن الأثر المرحّل 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.

٧.٨ 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) [4,20,21].

١.٧.٨ تقييم التداخل الناتج عن مكونات مزيج العينة *(Evaluating Matrix Interferences)*

يجب قدر الإمكان تحليل عينات فارغة (Blank Matrix) من العينات المدروسة وذلك من عشر 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 تحديداً 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 شيوعاً [3,4,19,22,23].



شكل 1 - آلية تقييم تعزيز / تثبيط التأين للمادة المراد تحليلها وذلك بالحقن المستمر لمحلولها النقي بعد العمود الكروماتوغرافي post-column injection

٢.٧.٨ تقييم التداخلات الناجمة عن المواد تحليلية 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 فيما إذا كانت عقاقير أو نواتج أيض (استقلاب) عقاقير أخرى، ومركبات مشابهة بالبنية قد تداخل أو تشوش على تحليل العينة. وبشكل مشابه عند تطوير طريقة كروماتوغرافية غازية باستخدام كاشف التأين باللهب (GC-FID) للكشف عن الإيثانول، فإنه يجب معرفة فيما إذا كانت هناك مركبات عضوية طيارة تتداخل مع الكشف [24].

ويتم إنجاز هذا التقييم من خلال تحليل العينات الفارغة المزوجة بالمواد المرجعية العيارية (Spiked matrices) المحتمل مصادفتها في العينات الحقيقية لمعرفة أية 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/أونواتج أيضها التي تم تحليلها في المختبر، جنباً إلى جنب مع العقاقير الشائعة الأخرى ضمن تصنيف محدد، حسب مقتضى الحال [20].

٣.٧.٨ تقييم تداخلات وتشويش النظائر المشعة الثابتة المستخدمة كمادة عيارية داخلية *(Evaluating Interferences from Stable-Isotope Internal Standards)*

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. ولذلك يجب أن يتم تقييم التداخلات الناجمة عن استخدام مادة عيارية داخلية موسومة بنظائر مشعة ثابتة بتحليل عينات المزيج الفارغة 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 للطريقة التحليلية غير ذات أهمية، وذلك وفق غرض المختبر من التحليل [25].

وبشكل مشابه، يجب تحليل عينة المزيج الفارغة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بأعلى تركيز من مجال المعايرة وبدون إضافة مادة عيارية داخلية موسومة بنظائر مشعة ثابتة وذلك من أجل تقييم فيما 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].

٨.٨ 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 المراد تحليها مقدار

±25% أو عندما يتجاوز معامل التباين (Coefficient of variation; CV) للتعزيز أو التثبيط مقدار 15% فإنه يتوجب على المختبر أن يثبت أنه لايوجد تأثير على المعايير الأخرى الخاصة بالتحقق من صلاحية الطريقة التحليلية أو يتوجب 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 (Bias) في طرق التحليل الكمي. إن التأثير على العوامل آنفة الذكر أعلاه، 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. وعادة ما يتم تقييم تعزيز / تثبيط التأيّن باستخدام إحدى الطريقتين التاليتين [4]:

١.٨.٨ حقن المادة بعد العمود الكروماتوغـرافي 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 ويتموضع بعد 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 (شكل - 1). وعادة إن أمكن يتم حقن ما لايقل عن عشر عينات فارغة (Blank matrix) والتي تمت معالجتها أو استخلاصها وفق الطريقة المعتمدة لتحضير العينات المدروسة، وبالتزامن مع الحقن المستمر لمحلولي المادة العيارية الداخلية للمادة المراد تحليلها عبر الموزع T [4,7,14].

٢.٨.٨ طريقة الإضافة بعد الاسـتخلاص 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 عند استخدام طرق تحليل كمي تعتمد على أجهزة الكروماتوغرافيا السائلة المقترنة بمطياف الكتلة (LC-MS)، حيث يتـم تحضيـر مجمـوعتين من العينات، تتألف المجموعة الأولى (Set 1) 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 ستة مرات على الأقل من أجل تحديد قيمة وسطية لمسـاحة القمة الموافقة لكل تركيز. فيما تتألف 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. 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 نسبتين مئويتين للتعزيز / للتثبيط، إحداهما للتركيز المنخفض، والأخرى للتركيز المرتفع [4,19,23].

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

$$\text{Ionization suppression / enhancement \%} = [(\text{X area of Set 2})/(\text{X area of Set 1})-1]\times 100$$

٩.٨ صحة ودقّة النتائج (Accuracy and Precision)

١.٩.٨ 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 ثلاث تراكيز مختلفة على الأقل تغطي مجال المعايرة، بحيث يمثل التركيز المنخفض ثلاثة أضعاف حد التقدير الكمي (LOQ)، والتركيز المتوسط ما قيمته 30 – 50 % من متوسط تراكيز مجال المعايرة، والتركيز المرتفع ما قيمته على الأقل 75% من التركيز الحدي الأعلى لمجال المعايرة، وبخمس 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 عينات 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].

تحسب الصحة لكل تركيز باستخدام المعادلة الرياضية التالية:

$$\text{Accuracy}(\%) \text{ at Cx} = [(\text{Mean of calculated Cx} - \text{Nominal Cx}) / (\text{Nominal Cx})] \times 100$$

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).

٨.٩.٢ 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 variation; CV)، ويحسب لكل تركيز من خلال علاقة رياضية تمثل حاصل قسمة الانحراف المعياري للنتائج SD على القيمة المطلقة للمتوسط الحسابي للنتائج μ [4].

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

يتم تقييم الدقة في عينات ممزوجة بالمادة المراد تحليلها باستخدام ثلاث تراكيز مختلفة على الأقل تغطي مجال المعايرة، بحيث يمثل التركيز المنخفض ثلاثة أضعاف حد التقدير الكمي (LOQ)، والتركيز المتوسط ما قيمته 30% – 50% من متوسط تراكيز مجال المعايرة، والتركيز المرتفع ما قيمته على الأقل 75% من التركيز الحدي الأعلى لمجال المعايرة، وبخمس 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].

ويتم تحديد الدقة في المقايسات المناعية (Immunoassays) عند تركيز الحد القطعي (Cuttoff) من أجل التفاعلات المناعيَة التي قد يحدث خلال تطبيقها تفاعلات تصالبية (Cross-reactivity) وبخاصة عند المسح الشامل لطيف من المركبات مثل المواد الأفيونية، ويكون هذا الإجراء ضرورياً في حال كان تركيز الحد القطعي للمادة المراد تحليلها (اللورازيبام Lorazepam) أقل من تركيز الحد القطعي للمادة المستهدفة الأساسية (الأوكسازيبام Oxazepam) في المسح الشامل عن البنزوديازبيانت) في المقايسات المناعية. إن هذا التقييم قد يتطلب تغيير أو إعادة تقييم تركيز الحد القطعي أو المادة الهدف المراد تحليلها بالاعتماد على حاجة المختبر. ويجب على أقل تقدير تقييم الدقة عند تركيز الحد القطعي باستخدام ثلاث تراكيز مختلفة تمزج مع ثلاث عينات فارغة مختلفة (Blank matrix) وبخمس تكرارات قياس على الأقل، ويفضل أن تعتمد التراكيز الثلاث المختلفة وفق ما يلي؛ تركيز منخفض ليس أقل من 50% من تركيز الحد القطعي، وتركيز الحد القطعي، وتركيز مرتفع ليس أكثر من 50% أعلى من تركيز الحد القطعي. لا يجوز أن تتجاوز الدقة 20% عند كل تركيز. إضافة إلى ذلك، لا يجب أن يتجاوز قيمة ضعف الانحراف المعياري النسبي لكل تركيز بقيمتيه الإيجابية والسلبية قيمة تركيز الحد القطعي كي تكون التجربة صحيحة.

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

٩. 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 يتضمن 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، أو من خلال مراجع منشورة). ويجب أن تتضمن خطة التحقق من صلاحية الطريقة للمختبر وثائق وثبوتيات هذا التقييم [4].

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 عشر 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 والذي ينتج عنه نتيجة إيجابية هو الحد الأدنى الكافي للكشف النوعي	جميع معايير الكشف والتأكيد متوافقة مع 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 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 المراد تحليلها
استخدام إشارة التشويش في الخلفية	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 إشارة 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 $S/N \geq 3$
استخدام مواد قياسية مرجعية	تحليل ثلاثة 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 المراد تحليلها، وتقارن النتائج مع العينات الفارغة الممزوجة بالمادة المراد تحليلها
استخدام التحليل الإحصائي لخلفية الكروماتوغرام			
تقييم حد الكشف النوعي باستخدام منحني المعيارة 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 المراد تحليلها، وتقارن النتائج مع العينات الفارغة الممزوجة بالمادة المراد تحليلها

يتبع في الصفحة التالية cuntinued on the next page

Table 2- (continued) **تابع جدول 2-**

المعيار Validation Parameter	طريقة العمل Procedures	طريقة الحساب Assessment	شرط القبول Acceptance Criteria
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 ثلاثة 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 ثلاثة 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 منحني 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

cuntinued on the next page يتبع في الصفحة التالية

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) المزوجة 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 المرحَل للمادة (Carryover)	تحليل فوري لعينات فارغة (Blank Matrix) بعد كل عملية تحليل لعينات حاوية على المادة المراد تحليلها بتراكيز متزايدة، أو من خلال تحليل عينات لأعلى تركيز في المعايرة متبوعة بتحليل عينة فارغة	تحديد التركيز الأعلى والذي 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 عن 5% للعياري الداخلي.
التقدير الكمي لتأثير مزيج العينة في عملية تعزيز / تثبيط التأين			
حقن المادة بعد العمود الكروماتوغرافي لتقييم مدى تعزيز / تثبيط التأيّن	حقن محلولين بشكل مستمر بتركيز عالٍ وتركيز منخفض على التوالي من المادة المراد تحليلها وبشكل 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 المراد تحيلها 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 مجموعتين 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، ستة 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 المراد تحيلها مقدار 25%±، أو لا يتجاوز معامل التباين (Coefficient of variation; CV) للتعزيز أو التثبيط مقدار 15%

يتبع في الصفحة التالية cuntinued on the next page

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 ثلاث 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 التركيز الحدي الأعلى لمجال المعايرة، وبخمس 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 (Cutoff) باستخدام ثلاث تراكيز مختلفة وبخمس تكرارات قياس على الأقل، تركيز منخفض ليس أقل من 50% من(Cutoff)، وتركيز (Cutoff)، وتركيز مرتفع ليس أكثر من 50% أعلى من تركيز (Cutoff).	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/μ	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 خمسة مرات	تقييم الصحة لجميع القياسات ورسم منحنى المعأيرة وتحديد نمطها ومعادلتها وقيمة r^2	عدم تجاوز الصحة نسبة ± 15% لجميع نقاط المعأيرة (تقبل الصحة بنسبة ± 20% عند حد التقدير الكمي)، وأن تكون قمية r^2 أكبر من 0.975
عينات مراقبة الجودة (Quality Control Samples)	تحضر عينات مراقبة الجودة على الأقل بثلاث 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 المعأيرة 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 المعأيرة ومن ثم تخفيفها بنسب محددة	تقييم الصحة والدقة للنتائج مقارنة مع التراكيز الأولية	عدم تجاوز الصحة والدقة نسبة 15% لجميع التخفيفات

يتبع في الصفحة التالية cuntinued on the next page

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 بثلاث 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 نسبة 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 بثلاث 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 الاوتوماتيكى). ثم يتم تحليلها بثلاث 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 نسبة 15% من التركيز الأولي

١.٩ سلامة التخفيف (Dilution Integrity)

لا بد من التحقق من تأثير تخفيف العينة أثناء التحقق من صلاحية طرق التحليل الكمية حتى وإن كان ذلك يتم بشكل روتيني داخل المختبر. وقد يتم اللجوء إلى تخفيف العينة بمحلول أو مذيب مناسب في بعض الحالات، من هذه الحالات عندما يكون حجم العينة الواردة قليل بالنسبة لخطوات إجراء التحليل ما يتطلب إجراء تعديلات مناسبة على العينة بتخفيفها لزيادة حجمها ليتم فحصها بشكل مناسب. وفي حالات أخرى، عندما تكون العينات الواردة ذات تراكيز عالية للغاية أعلى من مجال المعايرة الذي تم اعتماده خلال تطوير الطريقة التحليلية والتحقق من صلاحيتها ويتم اللجوء إلى تخفيف العينة في هذه الحالات بهدف جعل تركيز المادة المراد تحليلها في العينة ضمن مجال المعايرة الذي تم التحقق من صلاحيته.

وفي حال إجراء تخفيف العينات المدروسة فلا بد للمختبر أن يقيّم تأثير التخفيف على قيم الدقة والصحة الخاصة بالطريقة التحليلية. ويتم إنجاز ذلك بإعادة تقييم الدقة والصحة باستخدام عوامل تخفيف معقولة (1:2، 1:10، 1:50) والتأكد من كونها ضمن القيم المقبولة [2,4].

٢.٩ الثباتية (Stability)

إن ثباتية المادة المدروسة المراد تحليلها قد تتأثر بعدد من المتغيرات، بما في ذلك ظروف التخزين من درجة حرارة ورطوبة نسبية وإضاءة وغيرها من العوامل، كما تتأثر بظروف تحضير العينات وإجراءاته ودرجة حموضة الوسط أثناء التحضير أو القياس، ويتم العمل على إجراء تجارب الثباتية بهدف معالجة الحالات التي تصادف عادة في المختبر، ويمكن الاعتماد على تحديد ثباتية المادة المراد تحليلها والمدروسة مسبقاً (أي من خلال ممارسات ضمان الجودة، أو خلال المراجع المنشورة).

يجب أن يستخدم في دراسات الثباتية مجموعة من العينات الفارغة (Blank matrix) وذلك بمزجها بالمواد المرجعية النقية، وتحضر عينات بتركيزين منخفض وعالي. و من المهم أن يتم تحضير حجم كبير وكافٍ من كل من هذه العينات وذلك من أجل استكمال الدراسات.

يتم تقييم الثباتية في عينات فارغة ممزوجة بالمادة المراد تحليلها بتحضير ثلاث عينات رئيسية لكل تركيز، وتقاس العينات المأخوذة من كل عينة رئيسية بتكرارية ثلاث مرات عند كل نقطة زمنية ابتداءً من الزمن الصفر (وقت تحضير العينات)، وتتم مقارنة متوسط استجابة جهاز التحليل عند الزمن صفر لكل مجموعة من العينات بمتوسط الاستجابة للعينات التالية عند الأزمنة التالية من دراسة الثباتية، ويجب أن تكون التغيرات في قيم الثباتية ذات دلالة إحصائية لاعتمادها [2,3].

١.٢.٩ ثباتية التجمد والذوبان (Freeze/Thaw Stability)

عادةً ما يتوجب على المختبر كجزء من ممارسة المختبر القياسية أن يقوم بتجميد العينات قبل التحليل، في هذه الحالة يجب على المختبر أن يقوم بتحديد ثباتية المادة المراد تحليلها بعد ثلاث دورات من التجميد والذوبان للعينات المدروسة، وذلك في حال عدم وجود بيانات يمكن الاعتماد عليها نشرت في هذا الشأن حول المادة.

يتم تقسيم العينات الفارغة الممزوجة للمادة المراد تحليلها آنفة الذكر في الفقرة ٢.٩ 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 إذابة العينات تماماً، يجب أن يتم التحليل الأول لمجموعة العينات في ثلاث تحضيرات كما ورد سابقاً، 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.

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

٢.٢.٩ ثباتية العينات المحضرة (ثباتية المستخلص) (Stability – Processed Sample)

قد تكون هناك ظروف طارئة تحول دون تحليل العينة المدروسة مباشرة بعد تجهيزها للتحليل أو استخلاصها، ما يستدعي عدم 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 يتأثر الكشف الدقيق للمادة المراد تحليلها وتحديد كمياتها.

عادة ما يتم 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 أوتوماتيكي. ويتم تحليل سلسلة العينات الأولى لكل تركيز على الفور بثلاث تكرارات لمعرفة الاستجابات عند بدء الدراسة (الزمن الصفر). ويتم تخزين كافة قِنِّينَات الحَقْن (injection vial) 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 الاوتوماتيكي). ثم يتم تحليلها بثلاث تكرارات في فترات زمنية مختلفة خلال ٧٢ ساعة. وتتم مقارنة متوسط استجابات الكاشف في كل فترة زمنية إلى مقابلاتها في الزمن الصفر. [4]

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

١٠. 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 على الظروف التحليلية (Analytical conditions) وظروف 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 التعديل المعايير المحتمل تأثرها وفقاً للتعديل الذي تم إجراؤه، ولا بد من إجراء تجارب التحقق من الصلاحية من خلال تقييم المعايير المستهدفة لعينات يتم تحليلها وفق للطريقة قبل التعديل وعينات يتم تحليلها وفق الطريقة بعد التعديل ما يسمح بإجراء مقارنة وإطلاق حكم بوجود تأثير للتعديلات من عدمه [4].

١١. متطلبات توثيق التحقق من صلاحية الطرق التحليلية Documentation (Requirements for Method Validation

يعد حفظ السجلات جزء أساسي من إجراءات العمل في المختبرات، وهو عنصر رئيسي من 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. ويجب ترتيب وتصنيف هذه السجلات ليسهل استرجاعها واستعراضها.

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

- الهدف والنطاق (Scope)
- مخطط التحقق من الصلاحية (Validation plan)
- وصف جميع المعايير والمقاييس المقيّمة، وفي حالة لم يتم تقييم أحد هذه العوامل يجب تعليل ذلك
- خطوات تحضير العينات لتتضمن التراكيز، والمزائج (Matrices).
- البيانات الأولية والنتائج المباشرة أو المراجع التي تشير أين تم حفظ البيانات الاولية.
- النتائج والحسابات (Results and calculations)
- الاستنتاجات (Conclusions)
- المراجع (References)
- توثيق المراجعات الادارية والموافقات

يجب أن تتم مراجعة النتائج والحسابات ومعايير التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية واعتمادها قبل إجراء أي فحص للعينات الحقيقية.

ومن المهم أن تحتوي سجلات التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية على تفاصيل محددة بشأن الدراسات التي أجريت، بما في ذلك الأشخاص المعنيون في عملية التحقق من صلاحية الطريقة والأجهزة المستخدمة والنوعية والتواريخ.

ويجب أن تتضمن وثائق التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية أيضا نسخة من الطريقة التحليلية التي وضعت حديثا أو إشارة إلى مكان حفظها. إضافة الى ذلك، فمن المستحسن أن يتم الاحتفاظ بوثائق التحقق من صلاحية الطريقة التحليلية مدة لا تقل عن 10 سنوات بعد الاستغناء عن العمل بالطريقة التحليلية.

١٢. 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:

1) د. هدى الشيخ حسن/ رئيس قسم التطوير وأخصائية علم السموم الجنائي بمشفى الملك فيصل التخصصي ومركز الأبحاث، المملكة العربية السعودية.

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

3) د. حاتم عبدالمنعم أحمد / أستاذ مشارك، رئيس قسم الكيمياء الجنائية بجامعة نايف العربية للعلوم الأمنية ، المملكة العربية السعودية.

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

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

6) د. جبر أحمد عبدالله الجبر/ أستاذ مساعد، قسم السموم

السريرية ، كلية الطب، جامعة الكويت، دولة الكويت.

7) د. سمر الزير/ أستاذ مساعد، قسم الصيدلة والسموم، كلية الصيدلة، جامعة دمشق، الجمهورية العربية السورية

مع الشكر للدكتور خالد مسعود محمد الأستاذ المشارك في قسم الكيمياء الجنائية بجامعة نايف العربية للعلوم الأمنية، المملكة العربية السعودية على إسهامه في مراجعة هذه المبادئ.

١٣. الصلاحية:

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

المراجع

1. United Nations Office on Drugs, Crime. Laboratory, Scientific Section. 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 Publications; 2009.
2. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2011.
3. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. Clarke's analysis of drugs and poisons. London: Pharmaceutical press; 2011.
4. Scientific Working Group for Forensic Toxicology, SWGTOX., Standard practices for method validation in forensic toxicology; 2013.
5. Cooper GA, Paterson S, Osselton MD. The United Kingdom and Ireland association of forensic toxicologists: forensic toxicology laboratory guidelines (2010). Sci Justice. 2010;50(4):166-76. https://doi.org/10.1016/j.scijus.2010.09.005, PMid:21075293.
6. Drummer OH. Requirements for bioanalytical procedures in postmortem toxicology. Anal Bioanal Chem. 2007;388(7):1495-503. https://doi.org/10.1007/s00216-007-1238-7, PMid:17377776
7. Araujo P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. J Chromatogr B. 2009;877(23):2224-34. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030, PMid:18929516
8. Andri B, Lebrun P, Dispas A, Klinkenberg R, Streel B, Ziemons E, Marini RD, Hubert P. Optimization and validation of a fast supercritical fluid chromatography method for the quantitative determination of vitamin D3 and its related impurities. J Chromatogr A. 2017;1491:171-81.https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.090, PMid:28242051
9. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. Forensic Sci Int. 2007;165(2-3):216-24. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.05.021, PMid:16781833
10. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology—a review. InValidation in chemical measurement 2002 (pp. 1-9). Springer, Berlin, Heidelberg
11. De Bièvre P. Validation in chemical measurement. Günzler H, editor. Berlin: Springer; 2005. https://doi.org/10.1007/b138530, PMid:15756102
12. Penders J, Verstraete A. Laboratory guidelines and standards in clinical and forensic toxicology. Accred Qual Assur. 2006;11(6):284-90. https://doi.org/10.1007/s00769-006-0131-y
13. US Food and Drug Administration. Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics. Guid Ind. 2015:1-5.
14. Remane D, Meyer MR, Wissenbach DK, Maurer HH. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid

spectrometry. Analytica chimica acta. 2008;627(1):71-81. https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.043, PMid:18790129

21. Van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y. Validation of bioanalytical LC–MS/MS assays: evaluation of matrix effects. J Chromatogr B. 2009;877(23):2198-207. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.003, PMid:19179125
22. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, Ravio P, Leito I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. Analytica chimica acta. 2015;870:8-28. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016, PMid:25819784
23. Kintz P, Salomone A, Vincenti M. Hair analysis in clinical and forensic toxicology. Academic Press; 2015
24. Hensley D, Cody JT. Simultaneous determination of amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA), methylenedioxymethamphetamine (MDMA), and methylenedioxyethylamphetamine (MDEA) enantiomers by GC-MS. J Anal Toxicol. 1999;23(6):518-23. https://doi.org/10.1093/jat/23.6.518, PMid:10517560
25. Kukk S. Kinetic aspects of interaction between dopamine transporter and N-substituted nortropane derivatives (Doctoral dissertation; 2017. https://hdl.handle.net/10062/57121

chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. Rapid Commun Mass Spectrom. 2010;24(21):3103-8. https://doi.org/10.1002/rcm.4736, PMid:20941756
15. Chesher D. Evaluating assay precision. Clin Biochem Rev. 2008;29(Suppl 1):S23. PMid:18852851 PMCid:PMC2556577
16. Patriarca M, Magnusson B, Örnemark U, Eurachem guidance on validating analytical methods. Euroreference 1 - June 2016.
17. Thon N, Weinmann W, Yegles M, Preuss U, Wurst FM. Direct metabolites of ethanol as biological markers of alcohol use: basic aspects and applications. Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie. 2013;81(9):493-502. PMid:23856980
18. Guideline ICH. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). InInternational Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland 2005 Nov (pp. 11-12).
19. Kruve A, Rebane R, Kipper K, Oldekop ML, Evard H, Herodes K, Ravio P, Leito I. Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I. Analytica chimica acta. 2015;870:29-44. https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.017, PMid:25819785
20. Keller BO, Sui J, Young AB, Whittal RM. Interferences and contaminants encountered in modern mass