Este documento es un instrumento de documentación y no compromete la responsabilidad de las instituciones

►**B**

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

►C1 de 14 de agosto de 2002 ◄

por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados

[notificada con el número C(2002) 3044]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2002/657/CE)

(DO L 221 de 17.8.2002, p. 8)

Modificada por:

		Diario Oficial		
		nº	página	fecha
►**M1**	Decisión 2003/181/CE de la Comisión de 13 de marzo de 2003	L 71	17	15.3.2003
►**M2**	Decisión 2004/25/CE de la Comisión de 22 de diciembre de 2003	L 6	38	10.1.2004

Rectificada por:

►**C1** Rectificación, DO L 239 de 6.9.2002, p. 66 (2002/657/CE)

▼B

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

►C1 de 14 de agosto de 2002 ◄

por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados

[notificada con el número C(2002) 3044]

(Texto pertinente a efectos del EEE)

(2002/657/CE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Europea,

Vista la Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE [1], y, en particular, el segundo párrafo del apartado 1 de su artículo 15,

Considerando lo siguiente:

(1) La presencia de residuos en productos de origen animal es una cuestión que afecta a la salud pública.

(2) En la Decisión 98/179/CE de la Comisión, de 23 de febrero de 1998, por la que se fijan normas específicas relativas a la toma de muestras oficiales para el control de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos [2], se establece que el análisis de las muestras será efectuado exclusivamente por los laboratorios autorizados por la autoridad competente para el control oficial de residuos.

(3) Es necesario garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios autorizados para el control oficial de residuos. Para ello deben utilizarse sistemas de aseguramiento de la calidad y, específicamente, métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes, y garantizarse la trazabilidad con arreglo a normas comunes o normas consensuadas.

(4) De acuerdo con la Directiva 93/99/CEE del Consejo, de 29 de octubre de 1993, sobre medidas adicionales relativas al control oficial de los productos alimenticios y la Decisión 98/179/CE [3], a partir de enero de 2002, los laboratorios de control oficiales deben estar autorizados con arreglo a la norma ISO 17025 (1). De conformidad con la Decisión 98/179/CE, se exigirá a los laboratorios autorizados su participación en un programa externo, internacionalmente reconocido, de evaluación y acreditación del control de calidad. Dichos laboratorios deberán asimismo demostrar su competencia participando de manera regular y satisfactoria en programas adecuados de ensayo de aptitud reconocidos u organizados por laboratorios de referencia nacionales o comunitarios.

(5) De acuerdo con la Directiva 96/23/CE, una red de laboratorios comunitarios de referencia, laboratorios nacionales de referencia y laboratorios nacionales de control facilita las tareas de coordinación.

(6) Los avances realizados en química analítica desde la adopción de la Directiva 96/23/CE han dejado obsoleto el concepto de métodos de rutina y métodos de referencia y lo han reemplazado por un planteamiento en el que se establecen criterios de funcio-

(1) DO L 125 de 23.5.1996, p. 10.
(2) DO L 65 de 5.3.1998, p. 31.
(3) DO L 290 de 24.11.1993, p. 14.

▼B

namiento y procedimientos de validación de los métodos de cribado y confirmación.

(7) Es necesario acordar criterios comunes de interpretación de los resultados de los laboratorios oficiales de control para garantizar una aplicación armonizada de la Directiva 96/23/CE.

(8) Deben establecerse progresivamente límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) de los métodos analíticos aplicables a sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido y, en particular, a sustancias cuya utilización no ha sido autorizada ni prohibida específicamente en la Comunidad, con objeto de garantizar una aplicación armonizada de la Directiva 96/23/CE.

(9) La Decisión 90/515/CEE de la Comisión, de 26 de septiembre de 1990, por la que se establecen los métodos de referencia para la investigación de residuos de metales pesados y de arsénico ([1]), la Decisión 93/256/CEE de la Comisión, de 14 de abril de 1993, por la que se establecen los métodos que deberán utilizarse para la detección de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático ([2]), y la Decisión 93/257/CEE de la Comisión, de 15 de abril de 1993, por la que se establecen los métodos de referencia y la lista de laboratorios nacionales de referencia para la detección de residuos ([3]), cuya última modificación la constituye la Decisión 98/536/CE ([4]), revisadas anteriormente para tener en cuenta los avances de los conocimientos científicos y técnicos, se consideran obsoletas en cuanto a su ámbito de aplicación y sus disposiciones y, en consecuencia, deben ser derogadas por la presente Decisión.

(10) Debe fijarse un período transitorio que permita adaptar los métodos de análisis de las muestras oficiales a las disposiciones de la presente Decisión.

(11) Las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité permanente de la cadena alimentaria y de sanidad animal.

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Contenido y ámbito de aplicación

La presente Decisión establece normas relativas a los métodos analíticos de muestras oficiales tomadas de conformidad con la segunda frase del apartado 1 del artículo 15 de la Directiva 96/23/CE y fija criterios comunes de interpretación de los resultados analíticos de dichas muestras por parte de los laboratorios oficiales de control.

La presente Decisión no será aplicable a determinadas sustancias sujetas a normas más específicas de la legislación comunitaria.

Artículo 2

Definiciones

A efectos de la presente Decisión, se aplicarán las definiciones de la Directiva 96/23/CE y del ►**M1** anexo I ◄ de la presente Decisión.

([1]) DO L 286 de 18.10.1990, p. 33.
([2]) DO L 118 de 14.5.1993, p. 64.
([3]) DO L 118 de 14.5.1993, p. 75.
([4]) DO L 251 de 11.9.1998, p. 39.

▼B

Artículo 3

Métodos analíticos

Los Estados miembros garantizarán que las muestras oficiales tomadas de acuerdo con la Directiva 96/23/CE se analizan según métodos que:

a) están documentados en las instrucciones de ensayo, preferiblemente de acuerdo con la norma ISO 78-2 (6);

b) cumplen las disposiciones del punto 2 del ►M1 anexo I ◄ de la presente Decisión;

c) han sido validados de acuerdo con los procedimientos descritos en el punto 3 del ►M1 anexo I ◄;

d) cumplen los límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) que se establecerán de acuerdo con el artículo 4.

▼M2

Artículo 4

Los Estados miembros velarán por que los métodos analíticos utilizados para detectar las siguientes sustancias cumplan los límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) que figuran en el anexo II, con respecto a las matrices a las que se hace referencia en dicho anexo:

a) el cloranfenicol;

b) los metabolitos de nitrofuranos;

c) la medroxiprogesterona;

d) el verde de malaquita.

▼B

Artículo 5

Control de calidad

Los Estados miembros asegurarán la calidad de los resultados de los análisis de las muestras tomadas de acuerdo con la Directiva 96/23/CE, en particular comprobando los ensayos y/o las calibraciones de acuerdo con el punto 9 del capítulo 5 de la norma ISO 17025 (1).

Artículo 6

Interpretación de los resultados

1. El resultado de un análisis se considerará no conforme si se supera el límite de decisión del método de confirmación para el analito.

2. Si se ha establecido un límite permitido para una sustancia, el límite de decisión es la concentración por encima de la cual puede decidirse con una certeza estadística de 1 - α que se ha superado efectivamente el límite permitido.

3. Si no se ha establecido un límite permitido para una sustancia, el límite de decisión es la concentración más baja a partir de la cual un método puede detectar la presencia del analito en cuestión con una certeza estadística de 1 - α.

4. Para las sustancias del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE, el error α será equivalente o inferior a 1 %. Para todas las demás sustancias, el error α será equivalente o inferior a 5 %.

Artículo 7

Derogación

Quedan derogadas las Decisiones 90/515/CEE, 93/256/CEE y 93/257/CEE.

▼B

Artículo 8

Disposiciones transitorias

Los métodos de análisis de muestras oficiales de sustancias del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE que cumplen los criterios establecidos en las Decisiones 90/515/CEE, 93/256/CEE y 93/257/CEE podrán seguir utilizándose hasta transcurridos dos años desde la entrada en vigor de la presente Decisión. Los métodos aplicados actualmente a las sustancias del grupo B del anexo I de la Directiva 96/23/CE deberán cumplir las disposiciones de la presente Decisión a más tardar cinco años después de la fecha de aplicación de la misma.

Artículo 9

Fecha de aplicación

La presente Decisión se aplicará a partir del 1 de septiembre de 2002.

Artículo 10

Destinatarios

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

▼B

ANEXOI

CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO Y OTROS REQUISITOS Y PROCEDIMIENTOS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

1. DEFINICIONES

1.1. «Exactitud»: grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado (2). Se obtiene determinando la veracidad y la precisión.

1.2. «Error alfa (α)»: probabilidad de que la muestra analizada sea realmente conforme, aunque se haya obtenido una medición no conforme («decisión de falso no conforme»).

1.3. «Analito»: sustancia que debe ser detectada, identificada y/o cuantificada y los derivados de la misma que se formen durante el análisis.

1.4. «Error beta (β)»: probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme («decisión de falso conforme»).

1.5. «Sesgo»: diferencia entre el resultado del ensayo esperado y un valor de referencia aceptado (2).

1.6. «Patrón de calibración»: mecanismo de medición que representa la cantidad total de sustancia de interés de modo que su valor esté vinculado a una base de referencia.

1.7. «Material certificado de referencia (CRM)»: material al que se ha asignado un contenido de analito especificado.

1.8. «Cocromatografía»: procedimiento en el que se divide el extracto en dos partes antes de la cromatografía. Una parte se cromatografía tal cual. La otra se mezcla con el analito patrón que debe medirse y se cromatografía también. La cantidad de analito patrón añadido debe ser similar a la cantidad de analito estimada en el extracto. Este método está diseñado para mejorar la identificación de un analito por métodos cromatográficos, especialmente cuando no puede utilizarse un patrón interno adecuado.

1.9. «Estudio colaborativo»: análisis de una misma muestra con un mismo método para determinar las características de funcionamiento del método. El estudio cubre el error aleatorio de medición y el sesgo de laboratorio.

1.10. «Método de confirmación»: método que proporciona información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.

1.11. «Límite de decisión (CCα)»: límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α que una muestra no es conforme.

1.12. «Capacidad de detección (CCβ)»: contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error β. En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de 1 - β. En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de 1 - β.

1.13. «Material de muestra enriquecido»: muestra enriquecida con una cantidad conocida del analito que debe detectarse.

1.14. «Estudio interlaboratorios (comparación)»: organización, realización y evaluación de ensayos de una misma muestra por dos o más laboratorios según condiciones predefinidas para determinar el funcionamiento de los ensayos. En función del objetivo del estudio puede catalogarse de estudio colaborativo o de estudio de aptitud.

1.15. «Patrón interno (IS)»: sustancia no contenida en la muestra, de propiedades físicoquímicas lo más próximas posible a las del analito que ha de identificarse, que se añade a cada muestra y patrón de calibración.

1.16. «Muestra de laboratorio»: muestra que se prepara y se envía a un laboratorio para una inspección o un ensayo.

▼B

1.17. «Nivel de interés»: concentración de una sustancia o un analito en una muestra que es significativa para determinar su conformidad con la legislación.

1.18. «Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL)»: contenido mínimo de un analito en una muestra que debe ser detectado y confirmado. Sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido.

1.19. «Característica de funcionamiento»: calidad funcional que puede atribuirse a un método analítico. Puede tratarse, por ejemplo, de la especificidad, la exactitud, la veracidad, la precisión, la repetibilidad, la reproducibilidad, la recuperación, la capacidad de detección y la robustez.

1.20. «Criterios de funcionamiento»: exigencias de una característica de funcionamiento en función de las cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados fiables.

1.21. «Límite permitido»: límite máximo de residuo, nivel máximo u otra tolerancia máxima de sustancias establecidos en otro ámbito de la legislación comunitaria.

1.22. «Precisión»: grado de concordancia entre resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones estipuladas (predeterminadas). La precisión suele expresarse como imprecisión y calcularse como desviación estándar de los resultados de los ensayos. Cuanto mayor es la desviación estándar menor es la precisión (2).

1.23. «Estudio de aptitud»: procedimiento por el que varios laboratorios analizan una misma muestra con sus propios métodos, siempre que los utilicen en condiciones de rutina. El estudio debe realizarse de acuerdo con las Guías ISO 43-1 (3) y 43-2 (4) y puede utilizarse para evaluar la reproducibilidad de los métodos.

1.24. «Método cualitativo»: método analítico que identifica una sustancia basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas.

1.25. «Método cuantitativo»: método analítico que determina la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico de unidades apropiadas.

1.26. «Determinación del blanco de reactivo»: procedimiento analítico completo aplicado sin la porción de ensayo o utilizando una cantidad equivalente de disolvente adecuado en lugar de la porción de ensayo.

1.27. «Recuperación»: porcentaje de la concentración real de una sustancia recuperado durante el procedimiento analítico. Este factor se determina durante la validación si no se dispone de material de referencia certificado.

1.28. «Material de referencia»: material del que se haya confirmado una o varias propiedades, por medio de un método validado, de manera que pueda utilizarse para calibrar un aparato o comprobar un método de medición.

1.29. «Repetibilidad»: precisión en condiciones de repetibilidad (2).

1.30. «Condiciones de repetibilidad»: condiciones en las que un mismo operador obtiene resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de análisis, en el mismo laboratorio y con el mismo equipo (2).

1.31. «Reproducibilidad»: precisión en condiciones de reproducibilidad (2) (4).

1.32. «Condiciones de reproducibilidad»: condiciones en las que operadores diferentes obtienen resultados de ensayos independientes con el mismo método e idénticas muestras de ensayo, en laboratorios diferentes y con equipos diferentes (2) (4).

1.33. «Robustez»: susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación de la muestra en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores. Deberá indicarse cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica (por ejemplo, estabilidad de los reactivos, composición de la muestra, pH o temperatura) que puedan afectar a los resultados analíticos.

▼B

1.34. «Determinación del blanco de la muestra»: procedimiento analítico completo aplicado a una porción de ensayo de una muestra que no contiene el analito.

1.35. «Métodos de cribado»: métodos utilizados para detectar la presencia de una sustancia, o tipo de sustancias, al nivel de interés. Estos métodos permiten tratar un elevado número de muestras y se utilizan para cribar grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no conformes. Están diseñados específicamente para evitar resultados de falso conforme.

1.36. «Estudio intralaboratorio (validación interna)»: estudio analítico por un solo laboratorio que utiliza el mismo método para proceder a análisis, separados por largos intervalos de tiempo justificados, de idénticos o diferentes materiales de ensayo en condiciones distintas.

1.37. «Especificidad»: capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias. Esta característica es ante todo una función de la técnica de medición descrita, pero puede variar en función del tipo de compuesto o de la matriz.

1.38. «Adición de patrón»: procedimiento en el que la muestra de ensayo se divide en dos (o más) porciones de ensayo. Una de las porciones se analiza tal cual y en la otra (o las otras) se añaden cantidades conocidas del analito patrón antes de proceder al análisis. La cantidad de analito patrón añadida debe ser entre dos y cinco veces superior al contenido estimado de analito en la muestra. Este procedimiento está diseñado para determinar el contenido de un analito en una muestra, teniendo en cuenta la recuperación del procedimiento analítico.

1.39. «Analito patrón»: analito de contenido y pureza conocidos y certificados que se utiliza como referencia en el ensayo.

1.40. «Sustancia»: materia de constitución química particular o confirmada y sus metabolitos.

1.41. «Porción de ensayo»: cantidad de material extraído de la muestra de ensayo en la que se realiza el análisis o la observación.

1.42. «Muestra de ensayo»: muestra preparada a partir de una muestra de laboratorio y de la que se tomarán porciones de ensayo.

1.43. «Veracidad»: grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad se expresa normalmente como sesgo (2).

1.44. Las unidades son las descritas en la guía ISO 31 (20) y la Directiva 71/354/CE (19).

1.45. «Validación»: confirmación mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto (1).

1.46. «Reproducibilidad intralaboratorio»: precisión obtenida en un mismo laboratorio y en condiciones estipuladas (predeterminadas) —relativas, por ejemplo, al método, los materiales de ensayo, los operadores y el entorno— separados por largos intervalos de tiempo justificados.

2. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO Y OTROS REQUISITOS Y PROCEDIMIENTOS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Los métodos o combinaciones de métodos analíticos diferentes de los descritos a continuación sólo pueden utilizarse con fines de criba o confirmación si se puede demostrar que cumplen los requisitos pertinentes establecidos en la presente Decisión.

2.1. REQUISITOS GENERALES

2.1.1. **Manipulación de las muestras**

Las muestras se recogerán, manipularán y procesarán de manera que se obtenga la máxima probabilidad de detectar la sustancia. En los procedimientos de manipulación de las muestras se evitará la posibilidad de contaminación accidental o de pérdida de analitos.

2.1.2. **Funcionamiento de los ensayos**

2.1.2.1. *La recuperación*

En el análisis de muestras se determinará la recuperación en cada lote de muestras si se utiliza un factor corrector de la recuperación fijo. Si la recuperación se encuentra dentro de los límites, puede emplearse el factor corrector fijo. En caso contrario, se aplicará el factor de recupe-

▼B

ración de ese lote específico, a no ser que deba aplicarse el factor específico de recuperación del analito de la muestra, en cuyo caso se utilizará el procedimiento de adición de patrón (véase el punto 3.5) o de un patrón interno para la determinación cuantitativa de un analito en una muestra.

2.1.2.2. *Especificidad*

Un método deberá ser capaz de distinguir entre el analito y otras sustancia en las condiciones experimentales. Se hará una estimación de esa capacidad de distinción. Deberán aplicarse estrategias para superar cualquier interferencia previsible con las sustancias cuando se aplica la técnica de medición descrita, como la utilización de productos homólogos, análogos o metabólicos del residuo de interés. Es especialmente importante estudiar cualquier interferencia que pudiera resultar de los componentes de la matriz.

2.2. MÉTODOS DE CRIBA

De acuerdo con la Directiva 96/23/CE, para el cribado se utilizarán sólo técnicas analíticas respecto de las cuales pueda demostrarse de modo documental que están validadas y tienen un porcentaje de falsos conformes < 5 % (error β) al nivel de interés. Si se sospecha que un resultado no es conforme, se confirmará mediante un método de confirmación.

2.3. MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN PARA RESIDUOS ORGÁNICOS Y CONTAMINANTES

Los métodos de confirmación para residuos orgánicos o contaminantes incluirán información sobre la estructura química del analito. En consecuencia, los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos que prescinden de la detección espectrométrica no convienen por sí solos como métodos de confirmación. No obstante, si una técnica por sí sola carece de la especificidad necesaria, dicha especificidad se obtendrá por medio de procedimientos analíticos consistentes en combinaciones adecuadas de limpieza, separación cromatográfica y detección espectrométrica.

Los métodos o combinaciones de métodos siguientes se consideran adecuados para la identificación de residuos orgánicos o contaminantes en el caso de los grupos de sustancias indicados:

Cuadro 1

Métodos de confirmación adecuados para residuos orgánicos o contaminantes

Técnica de medición	Sustancias del anexo 1 de la Directiva 96/23/CE	Limitaciones
CL o CG con detección por espectrometría de masas	Grupos A y B	Sólo si sucede a una separación por cromatografía en línea y fuera de línea Sólo si se utilizan técnicas de barrido completo o técnicas que no registran los espectros de masa completos pero incluyen al menos 3 (grupo B) o 4 (grupo A) puntos de identificación
CL o CG con detección espectrométrica de IR	Grupos A y B	Deben cumplirse requisitos específicos de absorción en la espectrometría de IR
CL-DAD barrido completo	Grupo B	Deben cumplirse requisitos específicos de absorción en la espectrometría de UV
CL-fluorescencia	Grupo B	Sólo se aplica a las moléculas que presentan fluorescencia natural y a las que la presentan después de transformación o derivatización
2-D TLC-UV/VIS por barrido completo	Grupo B	Se requieren la HPTLC bidimensional y la cocromatografía
CG-Detección de la captación electrónica	Grupo B	Sólo si se utilizan dos columnas de polaridad diferente
CL-inmunograma	Grupo B	Sólo si se utilizan al menos dos sistemas cromatográficos diferentes o un segundo método de detección independiente
CL-UV/VIS (longitud de onda única)	Grupo B	Sólo si se utilizan al menos dos sistemas cromatográficos diferentes o un segundo método de detección independiente

▼B

2.3.1. **Criterios y requisitos de funcionamiento comunes**

Los métodos de confirmación proporcionarán información sobre la estructura química del analito. Si se obtiene la misma respuesta con más de un compuesto, el método no es capaz de distinguir esos compuestos. Los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos sin recurrir al empleo de la detección espectrométrica no convienen por sí solos como métodos de confirmación.

Si se utilizan estos métodos, al comenzar el procedimiento de extracción se añadirá un patrón interno adecuado a la porción de ensayo. Se emplearán, según su disponibilidad, formas marcadas por isótopos estables del analito, especialmente adecuadas para la detección por espectrometría de masas, o compuestos relacionados estructuralmente con el analito.

Cuando no pueda utilizarse un patrón interno adecuado, la identificación del analito se confirmará mediante cocromatografía. En este caso, sólo se obtendrá un pico, en el cual la altura (o superficie) máxima será equivalente a la cantidad de analito añadida. En el caso de la cromatografía de gases (CG) o la cromatografía líquida (CL), la anchura del pico medida a la mitad de la altura máxima oscilará entre un 90 % y un 110 % de la anchura original, y los tiempos de retención serán idénticos, con una tolerancia del 5 %. Para los métodos de cromatografía en capa fina (TLC), se intensificará únicamente la mancha que supuestamente se debe al analito; no deberá aparecer ninguna mancha nueva ni se modificará el aspecto.

Los materiales de referencia o enriquecidos que contengan cantidades conocidas de analito, en el límite o a proximidad del límite permitido o de decisión (muestra de control no conforme), así como los materiales de control conformes y los blancos de reactivo, deberán utilizarse preferentemente durante todo el proceso simultáneamente con cada lote de muestras de ensayo analizado. El orden para inyectar las soluciones en el instrumento de análisis es el siguiente: blanco de reactivo, muestra de control conforme, muestra o muestras por confirmar, muestra de control conforme de nuevo y, por último, muestra de control no conforme. Se justificará toda variación de esta secuencia.

2.3.2. **Criterios de funcionamiento adicionales y otros requisitos que deben cumplir los métodos cuantitativos de análisis**

2.3.2.1. *Veracidad de los métodos cuantitativos*

En el caso de análisis repetidos de un material de referencia certificado, los intervalos de referencia de la desviación entre la fracción de la masa media determinada experimentalmente, con corrector de recuperación, y el valor auténtico estarán dentro de los siguientes límites:

Cuadro 2

Veracidad mínima de los métodos cuantitativos

Fracción de masa	Intervalo
≤ 1 µg/kg	– 50 % a + 20 %
> 1 µg/kg a 10 µg/kg	– 30 % a + 10 %
≥ 10 µg/kg	– 20 % a + 10 %

Cuando no se dispone de tales CRM, se acepta una valoración de la veracidad de las mediciones mediante recuperación de adiciones de cantidades conocidas de uno o varios analitos a una matriz en blanco. Los datos corregidos mediante la recuperación media sólo son aceptables si entran dentro de los intervalos expuestos en el cuadro 2.

2.3.2.2. *Precisión de los métodos cuantitativos*

El coeficiente de variación (CV) interlaboratorios para el análisis repetido de un material de referencia o enriquecido, en condiciones de reproducibilidad, no superará el nivel calculado mediante la ecuación de Horwitz, a saber:

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

donde C es la fracción de masa expresada como potencia (exponente) de 10 (por ejemplo, 1 mg/g = 10^{-3}). El cuadro 3 recoge varios ejemplos.

▼B

Cuadro 3

Ejemplos de CV de reproducibilidad de los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa de analito

Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
1 µg/kg	(*)
10 µg/kg	(*)
100 µg/kg	23
1 000 µg/kg (1 mg/kg)	16

(*) Con fracciones de masa inferiores a 100 µg/kg, la aplicación de la ecuación de Horwitz conduce a valores inaceptablemente elevados. Por ello, los CV de las concentraciones inferiores a 100 µg/kg serán lo más bajos posible.

En análisis realizados en condiciones de repetibilidad, los CV intralaboratorio suelen arrojar valores situados entre la mitad y los dos tercios de los mencionados. En análisis realizados en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, los CV intralaboratorio no serán superiores a los CV de reproducibilidad.

En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, el método alcanzará una reproducibilidad intralaboratorio no superior al CV de reproducibilidad correspondiente en una concentración de 0,5 × el límite permitido.

2.3.3. **Criterios de funcionamiento y otros requisitos de la espectrometría de masas**

Los métodos de espectrometría de masas pueden servir de métodos de confirmación sólo después de una separación cromatográfica en línea y fuera de línea.

2.3.3.1. *Separación cromatográfica*

En todos los procesos de CG-MS, la separación por cromatografía de gases se realizará mediante columnas capilares. En todos los procesos de CL-MS, la separación cromatográfica se realizará mediante columnas adecuadas de CL. En cualquier caso, el tiempo de retención mínimo aceptable para el analito es el doble del tiempo de retención correspondiente al volumen vacío de la columna. El tiempo de retención (o el tiempo relativo de retención) del analito en la porción de ensayo corresponderá al del patrón de calibración, dentro de una banda especificada de tiempo de retención. Esta banda de tiempo de retención será acorde con el poder de resolución del sistema cromatográfico. La relación entre el tiempo de retención cromatográfica del analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, corresponderá al de la solución de calibración, con un margen de tolerancia de ± 0,5 % para la CG y ± 2,5 % para la CL.

2.3.3.2. *Detección por espectrometría de masas*

La detección por espectrometría de masas se llevará a cabo mediante técnicas de MS, como el registro de espectros de masa completos (barridos completos) o el control de iones específicos (SIM), así como de técnicas de MS-MS^n, como el control de la reacción seleccionada (SRM), u otras técnicas apropiadas de MS o MS-MS^n, combinadas con los modos de ionización adecuados. En espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), la resolución será generalmente superior a 10 000 para todo el intervalo de masas, con una definición del valle del 10 %.

Barrido completo: Cuando la determinación con técnicas de espectrometría de masas se lleva a cabo registrando espectros completos, es obligatoria la presencia de todos los iones de diagnóstico medidos (el ion molecular, los aductos característicos del ion molecular, los iones fragmentados característicos y los iones isotópicos) con una intensidad relativa superior al 10 % en el espectro de referencia del patrón de calibración.

SIM: Cuando la determinación con técnicas de espectrometría de masas se lleva a cabo por fragmentografía, el ion molecular será preferiblemente uno de los iones de diagnóstico seleccionados (el ion molecular, los aductos característicos del ion molecular, los iones fragmentados característicos y todos sus iones isotópicos). Los iones de diagnóstico seleccionados no deberán proceder exclusivamente de la misma parte de la molécula. La relación señal-ruido para cada ion de diagnóstico será ≥ 3:1.

▼B

Barrido completo y SIM: Las intensidades relativas de los iones detectados, expresadas como porcentaje de la intensidad del ion más intenso o de la transición, corresponderá a las del patrón de calibración, bien de soluciones del patrón de calibración, bien de muestras enriquecidas, en concentraciones comparables, medidas en las mismas condiciones, con los siguientes márgenes de tolerancia indicados en el cuadro 4.

Cuadro 4

Tolerancias máximas permitidas de intensidades relativas de iones en diversas técnicas de espectrometría de masas

Intensidad relativa (% del pico de base)	EI-CG-MS (relativos)	CI-CG-MS, CG-MS^n CL-MS, CL-MS^n (relativos)
> 50 %	± 10 %	± 20 %
> 20 % – 50 %	± 15 %	± 25 %
> 10 % – 20 %	± 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %	± 50 %

Interpretación de los datos del espectro de masas: Deben identificarse las intensidades relativas de los iones de diagnóstico, o de los pares de iones de precursor/producto, comparando sus espectros o integrando las señales de cada traza de masa. Cuando se procede a la corrección del fondo, se hará uniformemente en todo el lote (véase el apartado 4 del punto 2.3.1) y se indicará claramente.

Barrido completo: Si se registran espectros de barrido completo en una única espectrometría de masas, debe haber un mínimo de cuatro iones con una intensidad relativa ≥ 10 % del pico de base. Se incluirá el ion molecular si se encuentra en el espectro de referencia con una intensidad relativa ≥ 10 %. Deberá encontrarse un mínimo de cuatro iones dentro de los límites máximos de tolerancia permitidos para las intensidades relativas de los iones (cuadro 5). Puede recurrirse a la búsqueda bibliográfica asistida por ordenador. En este caso, la comparación de los datos del espectro de masas en las muestras de ensayo con la solución de calibración superará un factor crítico de correspondencia. Este factor se determinará para cada analito durante el proceso de validación, sobre la base de espectros para los que se cumplen los criterios que vamos a describir. Se controlará la variabilidad debida a la matriz de la muestra y el funcionamiento del detector.

SIM: Cuando se miden fracciones de la masa con técnicas distintas de las de barrido completo, ha de utilizarse un sistema de puntos de identificación para interpretar los datos. La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE requiere un mínimo de 4 puntos de identificación. La confirmación de las sustancias clasificadas en el grupo B del anexo I de la Directiva 96/23/CE requiere un mínimo de 3 puntos de identificación. El siguiente cuadro presenta el número de puntos de identificación que puede obtener cada una de las técnicas básicas de espectrometría de masas. No obstante, para obtener los puntos de identificación que requiere la confirmación y el total de puntos de identificación que han de calcularse:

a) se medirá como mínimo un ratio de un ion;

b) todos los ratios de iones pertinentes medidos cumplirán los criterios descritos, y

c) se combinará un máximo de tres técnicas distintas para alcanzar el número mínimo de puntos de identificación.

Cuadro 5

Relación entre diversos tipos de fracciones de masa y puntos de identificación obtenidos

Técnica de MS	Puntos de identificación obtenidos por ion
Espectrometría de masas de baja resolución (LR)	1,0
Ion precursor LR-MS^n	1,0
Productos de transición LR-MS^n	1,5
HRMS	2,0

▼B

Técnica de MS	Puntos de identificación obtenidos por ion
Ion precursor HR- MS^n	2,0
Productos de transición HR-MS^n	2,5

Notas:
(1) Cada ion se contará una sola vez.
(2) La CG-MS mediante ionización por impacto de electrones se considera una técnica distinta de la CG-MS mediante ionización química.
(3) Sólo podrán utilizarse distintos analitos para aumentar el número de puntos de identificación si en los derivados intervienen tipos distintos de reacción química.
(4) Para las sustancias del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE, si se emplea una de las técnicas HPLC combinada con detección espectrofotométrica por red de diodos mediante barrido completo (DAD), HPLC combinada con detección por fluorescencia, HPLC combinada con un inmunograma, una TLC bidimensional combinada con detección espectrométrica; puede aportarse un máximo de un punto de identificación, siempre que se cumplan los criterios exigidos para dichas técnicas.
(5) Los productos de transición abarcan productos de segunda y de tercera generación.

Cuadro 6

Ejemplos de número de puntos de identificación obtenidos mediante diversas técnicas y combinaciones de técnicas (n = un número entero)

Técnica o técnicas	Número de iones	Puntos de identificación
CG-MS (EI o CI)	N	n
CG-MS (EI + CI)	2 (EI) + 2 (CI)	4
CG-MS (EI o CI) 2 derivados	2 (derivado A) + 2 (derivado B)	4
CL-MS	N	n
CG-MS-MS	1 ion precursor y 2 de segunda generación	4
CL-MS-MS	1 ion precursor y 2 de segunda generación	4
CG-MS-MS	2 iones precursores, cada uno con 1 de segunda generación	5
CL-MS-MS	2 iones precursores, cada uno con 1 de segunda generación	5
CL-MS-MS-MS	1 ion precursor, 1 de segunda generación y 2 de tercera generación	5,5
HRMS	N	2 n
CG-MS + LC-MS	2 + 2	4
CG-MS + HRMS	2 + 1	4

2.3.4. **Criterios de funcionamiento y otros requisitos de la cromatografía con detección por infrarrojos**

Picos adecuados: se entiende por picos adecuados los máximos de absorción en el espectro de infrarrojos de un patrón de calibración que cumpla los requisitos siguientes:

2.3.4.1. *Detección por infrarrojos*

Máximo de absorción: se producirá en un intervalo de número de onda de 4 000-500 cm^{-1}.

Intensidad de absorción: no será inferior a

a) una absorbancia molar específica de 40 con respecto al valor de base del pico, o

b) una absorbancia relativa del 12,5 % de la absorbancia del pico más intenso en el intervalo 4 000-500 cm^{-1}

si ambas se miden con respecto a una absorbancia cero, y del 5 % de la absorbancia del pico más intenso en el intervalo 4 000-500 cm^{-1} cuando ambas se miden con respecto al valor de base del pico.

▼B

Nota: Aun cuando desde el punto de vista teórico puedan preferirse picos adecuados según a), en la práctica los picos según b) son más fáciles de determinar.

Se determinará el número de picos en el espectro de infrarrojos del analito cuyas frecuencias se correspondan con un pico adecuado en el espectro del patrón de calibración, con un margen de ± 1 cm^{-1}.

2.3.4.2. *Interpretación de los datos del espectro de infrarrojos*

La absorción estará presente en todas las regiones del espectro del analito que correspondan a un pico adecuado en el espectro de referencia del patrón de calibración. Es necesario un mínimo de seis picos adecuados en el espectro de infrarrojos del patrón de calibración. Si el número de picos adecuados es inferior a seis (7), el espectro en cuestión no podrá utilizarse como espectro de referencia. La «puntuación», es decir, el porcentaje de picos adecuados observados en el espectro de infrarrojos del analito deberá ser al menos de 50. En caso de que no exista una correspondencia exacta para un pico adecuado, la región pertinente del espectro del analito habrá de ser compatible con la presencia de un pico concordante. El procedimiento se aplicará únicamente a los picos de absorción del espectro de la muestra cuya intensidad sea al menos tres veces superior al ruido entre un pico y otro.

2.3.5. **Criterios de funcionamiento y otros requisitos de la determinación de un analito mediante CL combinada con otras técnicas de detección**

2.3.5.1. *Separación cromatográfica*

Si se dispone de material adecuado, se empleará un patrón interno. Se tratará de un patrón afín, con un tiempo de retención cercano al del analito. El analito deberá eluir en el tiempo de retención típico del patrón de calibración correspondiente, en las mismas condiciones experimentales. El tiempo mínimo aceptable de retención de un analito será el doble del tiempo de retención del volumen en vacío de la columna. La relación entre el tiempo de retención del analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, corresponderá a la del patrón de calibración en la matriz apropiada, con un margen de ± 2,5 %.

2.3.5.2. *Detección UV/VIS por barrido completo*

Deben cumplirse los criterios de funcionamiento de los métodos de CL.

Los máximos de absorción en el espectro del analito presentarán las mismas longitudes de onda que los del patrón de calibración, dentro de un margen determinado por la resolución del sistema de detección. Para la detección por red de diodos, suele ser de ± 2 nm. El espectro del analito por encima de los 220 nm, para aquellas partes de ambos espectros con una absorbancia relativa ≥ 10 %, no deberán diferir visualmente del espectro del patrón de calibración. Este criterio se satisface, en primer lugar, cuando se presentan máximos iguales y, en segundo lugar, cuando en ninguno de los puntos observados la diferencia entre ambos espectros es superior a 10 % de la absorbancia del patrón de calibración. Si se recurre a la búsqueda en bibliotecas y concordancia asistidas por ordenador y a la concordancia, la comparación de los datos del espectro en las muestras de ensayo con los del patrón de calibración deberá superar un factor crítico de correspondencia. Este factor se determinará durante el proceso de validación para cada analito, sobre la base de espectros para los que se cumplen los criterios descritos anteriormente. Se controlará la variabilidad debida a la matriz de la muestra y el funcionamiento del detector.

2.3.5.3. *Criterios de funcionamiento de la detección fluorimétrica*

Deben cumplirse los criterios de funcionamiento de los métodos de CL.

Ello se aplica a las moléculas que presentan fluorescencia natural y a las que la presentan después de transformación o derivatización. La selección de las longitudes de onda de excitación y de emisión en combinación con las condiciones cromatográficas se harán de tal manera que se minimice la aparición de componentes de interferencia en extractos de muestras en blanco.

El máximo del pico más próximo en el cromatograma estará separado del pico del analito designado por al menos una anchura del pico, medida al 10 % de la altura máxima del pico del analito.

▼B

2.3.5.4. *Criterios de funcionamiento para la identificación de un analito mediante CL-inmunograma*

Por sí sola, la CL-inmunograma no es apropiada como método de confirmación.

Deben cumplirse los criterios aplicables a los métodos de CL.

Los parámetros de control de la calidad predefinidos, por ejemplo, la fijación inespecífica, la fijación relativa de las muestras de control o el valor de la absorbancia del blanco, deberán situarse dentro de los límites obtenidos durante la validación del análisis.

El inmunograma constará de al menos cinco fracciones.

Cada fracción será inferior a la mitad de la anchura del pico.

La fracción con el máximo contenido de analito debe ser la misma para la muestra problema, la muestra de control no conforme y el patrón.

2.3.5.5. *Determinación de un analito mediante CL combinada con detección de UV/VIS (longitud de onda única)*

Por sí sola, la CL con detección de UV/VIS (longitud de onda única) no es apropiada como método de confirmación.

El máximo del pico más próximo en el cromatograma estará separado del pico del analito designado por al menos una anchura del pico, medida al 10 % de la altura máxima del pico del analito.

2.3.6. **Criterios de funcionamiento y otros requisitos de la determinación de un analito mediante 2D TLC combinada con detección espectrométrica UV/VIS por barrido completo**

Se requieren la HPTLC bidimensional y la cocromatografía.

Los valores RF del analito deben coincidir con los valores RF de los patrones, con un margen de ± 5 %.

El aspecto visual del analito no se distinguirá del aspecto visual del patrón.

En manchas del mismo color, el centro de la mancha más cercana estará separado del centro de la mancha del analito por una distancia de al menos la mitad de la suma de los diámetros de ambas manchas.

El aspecto visual del espectro del analito no se distinguirá del aspecto visual del patrón, como se explica en el caso de la detección UV/VIS por barrido completo.

Si se recurre a la búsqueda bibliográfica asistida por ordenador y a la concordancia, la comparación de los datos del espectro en las muestras de ensayo con los del patrón de calibración debe superar un factor crítico de correspondencia. Este factor se determinará durante el proceso de validación para cada analito, sobre la base de espectros para los que se cumplen los criterios descritos anteriormente. Se controlará la variabilidad debida a la matriz de la muestra y el funcionamiento del detector.

2.3.7. **Criterios de funcionamiento y otros requisitos de la determinación de un analito mediante CG combinada con detección de la captación electrónica (ECD)**

Si se dispone de material adecuado, se empleará un patrón interno. De preferencia, se tratará de una sustancia afín, con un tiempo de retención cercano al del analito. El analito deberá eluir en el tiempo de retención típico del patrón de calibración correspondiente en las mismas condiciones experimentales. El tiempo mínimo aceptable de retención de un analito será el doble del tiempo de retención del volumen en vacío de la columna. La relación entre el tiempo de retención del analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, corresponderá a la del patrón de calibración en la matriz apropiada, con un margen de ± 0,5 %. El máximo del pico más próximo en el cromatograma estará separado del pico del analito designado por al menos una anchura del pico, medida al 10 % de la altura máxima del pico del analito. Para obtener información adicional puede recurrirse a la cocromatografía.

2.4. MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN DE LOS ELEMENTOS QUÍMICOS

Los análisis de confirmación de los elementos químicos se basarán en el concepto de identificación inequívoca y de cuantificación exacta y precisa a partir de las propiedades fisicoquímicas específicas del elemento químico en

▼B

cuestión (por ejemplo, la longitud de onda característica del elemento de la radiación emitida o absorbida, o la masa atómica) al nivel de interés.

Los métodos o combinaciones de métodos siguientes se consideran convenientes para la identificación de elementos químicos:

Cuadro 7

Métodos adecuados de confirmación de los elementos químicos

Técnica	Parámetro medido
Voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución anódica	Señal eléctrica
Espectrometría de absorción atómica	
Llama	Longitud de onda de absorción
Generación de hidruros	Longitud de onda de absorción
Vapor frío	Longitud de onda de absorción
Atomización electrotérmica (cámara de grafito)	Longitud de onda de absorción
Espectrometría de emisión atómica	
Plasma acoplado inductivamente	Longitud de onda de emisión
Espectrometría de masas	
Plasma acoplado inductivamente	Relación masa/carga

2.4.1. **Criterios de funcionamiento comunes y otros requisitos de los métodos de confirmación**

Los materiales de referencia o enriquecidos que contengan cantidades conocidas de analito, en el límite o a proximidad del límite máximo permitido o de decisión (muestra de control no conforme), así como los materiales de control conformes y los blancos de reactivo, deberán utilizarse preferentemente durante todo el proceso simultáneamente con cada lote de muestras de ensayo analizado. El orden recomendado para inyectar las soluciones en el instrumento de análisis es el siguiente: blanco de reactivo, muestra de control conforme, muestra por confirmar, muestra de control conforme y, por último, muestra de control no conforme. Se justificará toda variación de esta secuencia.

En general, la mayoría de las técnicas analíticas requieren la digestión completa de la matriz orgánica para obtener soluciones antes de proceder a la determinación del analito, lo cual puede realizarse mediante procedimientos de mineralización asistida por microondas, que minimizan el riesgo de pérdida o contaminación de los analitos. Se utilizarán tubos de teflón descontaminados de buena calidad. Si se recurre a otros métodos de digestión, húmeda o seca, se dispondrá de pruebas documentales que excluyan posibles fenómenos de pérdida o contaminación. En determinadas circunstancias puede optarse por procedimientos de separación (por ejemplo, la extracción), como alternativa a la digestión, para separar los analitos de los componentes de la matriz y/o concentrarlos, e introducirlos en el equipo de análisis.

En cuanto a la calibración, ya sea externa o basada en el método de adición de patrón, se tendrá cuidado de no superar el intervalo de trabajo establecido para el análisis. En el caso de una calibración externa, los patrones de calibración deben prepararse en una solución cuya composición sea lo más análoga posible a la de la muestra. Asimismo, se procederá a la corrección del fondo según exijan las circunstancias específicas del análisis.

2.4.2. **Criterios de funcionamiento adicionales y otros requisitos que deben cumplir los métodos cuantitativos de análisis**

2.4.2.1. *Veracidad de los métodos cuantitativos*

En el caso de análisis repetidos de los elementos de un material de referencia certificado, la desviación entre el contenido medio determinado experimentalmente y el valor auténtico no superará el límite de ± 10 %. Cuando no se dispone de tales CRM, se acepta una valoración de la veracidad de las mediciones mediante recuperación de adiciones de cantidades conocidas del elemento a las muestras desconocidas. Obsérvese que el elemento añadido no está químicamente ligado a la matriz real como lo está el analito, por lo que los resultados obtenidos por este

▼B

procedimiento tienen menos validez que los obtenidos por CRM. Los datos de recuperación sólo son aceptables si entran en un margen de ± 10 % del valor perseguido.

2.4.2.2. *Precisión de los métodos cuantitativos*

En caso de análisis repetidos de una muestra en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, el coeficiente de variación (CV) intralaboratorio de la media no superará los siguientes valores:

Cuadro 8

CV de los métodos cuantitativos en un intervalo de fracciones de masa del elemento

Fracción de masa	CV (%)
≥ 10 µg/kg a 100 µg/kg	20
> 100 µg/kg a 1 000 µg/kg	15
≥ 1 000 µg/kg	10

2.4.3. **Requisitos específicos de la voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución anódica (DPASV)**

Es de capital importancia la destrucción completa de la materia orgánica de las muestras antes de proceder a determinaciones por DPASV. En los voltamogramas no deberán verse señales anchas que resulten de la presencia de materia orgánica. En la DPASV, los constituyentes inorgánicos de la matriz pueden influir en la altura de los picos. Por ello, la cuantificación ha realizarse por el método de adiciones de patrón. Con este método se suministrarán muestras de voltamogramas típicos de una solución de muestra.

2.4.4. **Requisitos específicos de la espectrometría de absorción atómica (AAS)**

Esta técnica se emplea básicamente para estudiar un único elemento, lo que exige la optimación de los parámetros experimentales en función del elemento que deba cuantificarse. Siempre que sea posible, se verificarán los resultados cualitativa y cuantitativamente recurriendo a líneas de absorción alternativas (lo ideal es utilizar dos líneas diferentes). Los patrones de calibración se prepararán en una solución matriz cuya composición sea lo más análoga posible a la de la muestra que debe medirse (por ejemplo, concentración de ácidos o composición de los agentes modificantes). Para minimizar los valores en blanco, todos los reactivos serán de la mayor pureza disponible. Según el modo que se elija para vaporizar o atomizar la muestra, puede distinguirse entre varios tipos de AAS.

2.4.4.1. *Criterios específicos de la AAS de llama*

Se optimará el reglaje de los instrumentos para cada elemento. En particular, ha comprobarse la composición de los gases y el flujo. Para evitar las interferencias por la absorción del fondo, se utilizará un corrector de fuente de radiación continua. Si no se conocen las matrices, se comprobará si es preciso corregir el fondo.

2.4.4.2. *Requisitos específicos de la AAS con cámara de grafito*

En el laboratorio, la contaminación afecta frecuentemente a la exactitud cuando se trabaja con ultratrazas en la cámara de grafito. Por ello, deben utilizarse reactivos muy puros, agua desionizada y materiales de plástico inerte para la manipulación de la muestra y del patrón. Se optimará el reglaje de los instrumentos para cada elemento. En particular, han de comprobarse las condiciones de pretratamiento y atomización (temperatura y tiempo) y la modificación de la matriz.

Trabajar en condiciones isotermas de atomización [por ejemplo, tubo transversal de grafito calentado con plataforma L' vov integrada (8)] reduce la influencia de la matriz en la atomización del analito. En combinación con la modificación de la matriz y con la corrección Zeeman del fondo (9) puede procederse a la cuantificación mediante una curva de calibración basada en la medición de soluciones patrón acuosas.

2.4.5. **Requisitos específicos de la espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros**

Los compuestos orgánicos que contienen elementos como arsénico, bismuto, germanio, plomo, antimonio, selenio, estaño y telurio pueden

▼B

ser muy estables y exigir una descomposición oxidativa para obtener resultados correctos de contenido total del elemento. En consecuencia, se recomienda la digestión por microondas o la incineración de alta presión en condiciones fuertemente oxidantes. Se prestará la máxima atención a la conversión completa y reproducible de los elementos en sus hidruros correspondientes.

La formación de hidruro de arsénico en una solución de ácido clorhídrico con $NaBH_4$ depende del estado de oxidación del arsénico (As III: formación rápida, As V: período de formación más largo). Para evitar una pérdida de sensibilidad en la determinación del As V con la técnica de inyección de flujo, causada por el breve tiempo de reacción de este sistema, después de la descomposición oxidativa As V debe reducirse a As III. Para ello, son adecuados el yoduro de potasio/ácido ascórbico o la cisteína. Se procederá de la misma manera con los blancos, las soluciones de calibración y las de muestra. La utilización de un sistema de lotes permite determinar ambas especies de arsénico sin que la exactitud se vea afectada. Dado el período de formación más largo del hidruro de As V, la calibración se realizará por integración del área del pico. Se optimará el reglaje de los instrumentos. En particular, el flujo de gas que transfiere el hidruro al atomizador es especialmente importante y ha de comprobarse.

2.4.6. **Requisitos específicos de la espectrometría de absorción atómica por vapor frío**

El vapor frío se usa sólo en el caso del mercurio. Dadas las pérdidas de mercurio elemental por volatilización y adsorción, ha de prestarse una atención especial durante todo el análisis. Debe tenerse el máximo cuidado en evitar la contaminación debida a los reactivos o al entorno.

Para obtener resultados correctos en el contenido total del mercurio, es preciso proceder a la descomposición oxidativa de los compuestos orgánicos que contienen mercurio. Para la descomposición deben utilizarse sistemas sellados con digestión asistida por microondas o incinerador de alta presión. Debe observarse un cuidado especial al limpiar el equipo que ha estado en contacto con el mercurio.

Conviene trabajar con la técnica de inyección de flujo. Para límites de decisión más bajos, se recomienda la adsorción de mercurio elemental en un adsorbente de oro/platino, seguida de desorción térmica. La humedad en torno al absorbente o la celda falsea la medición, por lo que debe evitarse.

2.4.7. **Requisitos específicos de la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES)**

La espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (10) es un método que permite la medición simultánea de diversos elementos. Para emplear la ICP-AES, primero ha de procederse a la digestión de las muestras para descomponer las matrices orgánicas. Se utilizarán sistemas sellados con digestión asistida por microondas o incinerador de alta presión. La calibración de los instrumentos y la selección de la longitud de onda desempeñan un papel esencial para un análisis ICP-AES correcto. Para la calibración de los instrumentos, en el caso de curvas de calibración lineales, suele ser necesaria la medición de sólo cuatro concentraciones de las soluciones de calibración, ya que las curvas de calibración ICP-AES suelen ser lineales para cuatro a seis órdenes de magnitud de concentración. Generalmente, ha de procederse a la calibración del sistema ICP-AES con un patrón válido para múltiples elementos, que se preparará en una solución que contenga la misma concentración de ácidos que la solución de medición. Se comprobarán las concentraciones de elemento en la curva lineal.

La selección de longitudes de onda para la medición de la emisión de los analitos debe adecuarse a las concentraciones de los elementos que han de determinarse. Si la concentración del analito se encuentra fuera del intervalo de trabajo de una línea de emisión, se utilizará otra línea de emisión. Al principio, se elegirá la línea de emisión más sensible (sin interferencias) y, después, otra menos sensible. Si se trabaja en el límite de detección o cerca de él, lo mejor suele ser optar por la línea más sensible para el analito correspondiente. Las interferencias espectrales y de fondo originan las principales dificultades en ICP-AES. Pueden producirse interferencias el desplazamiento simple del fondo, como el desplazamiento oblicuo del fondo, la superposición espectral directa y el desplazamiento complejo del fondo. Cada una de estas interferencias tiene sus propias causas y remedios. Según las matrices se aplicarán correcciones de interferencias y se optimarán los parámetros operativos. Algunas interferencias pueden evitarse mediante

▼B

dilución o adaptación de las matrices. En cada lote de muestras de análisis, tanto el material de referencia y enriquecido que contiene cantidades conocidas del analito como el material blanco se tratarán del mismo modo que las muestras de análisis. Para controlar posibles desviaciones, se comprobará el patrón después de unas 10 muestras. Todos los reactivos y el gas plasma será la mayor pureza disponible.

2.4.8. **Requisitos específicos de la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (11)**

La determinación de indicios de elementos de masa atómica media, como el cromo, el cobre y el níquel, puede sufrir fuertes interferencias de otros iones isobáricos y poliatómicos. Ello sólo puede evitarse si se dispone de un poder de resolución mínimo de 7 000-8 000. Entre las dificultades de las técnicas MS figuran la desviación instrumental, los efectos de matriz y la interferencia de iones moleculares ($m/z < 80$). Es precisa una estandarización interna múltiple que cubra el mismo ámbito de masa que los elementos por determinar para corregir la desviación instrumental y los efectos de matriz.

Debe descomponerse completamente la materia orgánica de las muestras antes de proceder a mediciones por ICP-MS. Como para la AAS, tras su digestión en sistemas sellados, los elementos volátiles, como el yodo, deben transferirse a un estado de oxidación estable. Las mayores interferencias proceden de combinaciones de iones moleculares de argón (gas plasma), hidrógeno, carbono, nitrógeno y oxígeno (ácidos empleados para la disolución, impurezas del gas plasma y gases atmosféricos incorporados) y la matriz de la muestra. Para evitar interferencias es preciso proceder a la digestión completa, las mediciones del fondo, la correcta elección de las masas analíticas que a veces se asocian con una menor abundancia (límite de detección más pobre) y la disolución de los ácidos empleados para la disolución, por ejemplo el ácido nítrico.

Para determinar los elementos deben excluirse las interferencias mediante la correcta elección de las masas analíticas específicas, lo que incluye la confirmación de las relaciones de isótopos. Se comprobará la respuesta instrumental para cada medición, teniendo en cuenta los factores de Fano, por medio de patrones internos.

3. VALIDACIÓN

La validación demostrará que el método analítico cumple los criterios relativos a las características de funcionamiento aplicables.

Controles con objetivos diferentes requieren distintas categorías de métodos. El cuadro siguiente determina qué características de funcionamiento han de comprobarse para cada tipo de método.

Cuadro 9

Clasificación de los métodos analíticos en función de las características de funcionamiento que deben determinarse

		Límite de detección CCβ	Límite de decisión CCα	Veracidad/ la recuperación	Precisión	Selectividad/especificidad	Aplicabilidad/ robustez/ estabilidad
Métodos cualitativos	S	+	–	–	–	+	+
	C	+	+	–	–	+	+
Métodos cuantitativos	S	+	–	–	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+

S = métodos de criba; C = métodos de confirmación; + = determinación obligatoria.

3.1. PROCEDIMIENTOS DE VALIDACIÓN

En este capítulo se ofrecen ejemplos o referencias de procedimientos de validación de los métodos analíticos. Pueden utilizarse otros enfoques para demostrar que el método analítico cumple los criterios de funcionamiento, a condición de que alcancen la misma cantidad y calidad de información.

▼B

La validación también puede realizarse a través de un estudio interlaboratorios, como se establecen en el Codex *Alimentarius*, las normas ISO o la IUPAC (12), o de acuerdo con métodos alternativos como estudios en un solo laboratorio, o la validación interna (13) (14). Esta parte se centra en los estudios en un solo laboratorio (o validación interna) a través de un enfoque modular. Este enfoque consiste en:

1) un conjunto de características comunes de funcionamiento, independiente del modelo de validación empleado, y

2) procedimientos más específicos que dependen del modelo, tal como se presenta en el cuadro 10 a continuación.

Cuadro 10

Parámetros de funcionamiento independientes y dependientes del modelo

Validación		
Parámetros de funcionamiento independientes del modelo	Parámetros de funcionamiento dependientes del modelo	
Características comunes de funcionamiento (3.1.1)	Enfoque convencional de la validación (3.1.2)	Enfoque de la validación interna (3.1.3)
Especificidad	La recuperación	La recuperación
Veracidad	Repetibilidad	Repetibilidad
Robustez: cambios menores	Reproducibilidad intralaboratorio	Reproducibilidad intralaboratorio
Estabilidad	Reproducibilidad	Reproducibilidad
	El límite de decisión (CCα)	El límite de decisión (CCα)
	Capacidad de detección (CCβ)	Capacidad de detección (CCβ)
	Curvas de calibración	Curvas de calibración
	Robustez: cambios importantes	Robustez

3.1.1. **Características de funcionamiento independientes del modelo**

Al margen del enfoque de validación que se adopte, deben determinarse las siguientes características de funcionamiento. Para minimizar la carga de trabajo, puede emplearse un planteamiento cuidadosamente diseñado y estadísticamente sólido para combinar experimentos realizados con el fin de determinar diferentes parámetros.

3.1.1.1. *Especificidad*

En los métodos analíticos es importante el poder de distinción entre el analito y sustancias afines (isómeros, metabolitos, productos de degradación, sustancias endógenas, constituyentes de la matriz, etc.). Son necesarios dos enfoques para comprobar si existen interferencias.

Por ello, se elegirán sustancias que potencialmente interfieran y se analizarán muestras en blanco pertinentes para detectar posibles interferencias y valorar sus efectos:

— seleccione una gama de compuestos químicamente relacionados (metabolitos, derivados, etc.) u otras sustancias que puedan encontrarse en las muestras con el compuesto de interés,

— analice un número apropiado de muestras en blanco representativas ($n \geq 20$) y verifique posibles interferencias (señales, picos, indicios de iones) en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito,

— asimismo, se enriquecerán muestras en blanco representativas hasta una concentración adecuada con sustancias que pueden interferir con la identificación o la cuantificación del analito,

— después del análisis estudie si:

  — dicha presencia puede conducir a una falsa identificación,

  — la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de una o más interferencias, o

  — la cuantificación sufre una influencia apreciable.

▼B

3.1.1.2. *Veracidad*

En este apartado se describe la determinación de la veracidad (un componente de la exactitud). La veracidad sólo puede establecerse mediante material de referencia certificado (CRM). Se utilizará CRM siempre que se pueda. El procedimiento se describe detalladamente en la norma ISO 5725-4 (5). Presentamos un ejemplo a continuación:

— analice 6 muestras idénticas del CRM siguiendo las instrucciones de ensayo del método,
— determine la concentración del analito en cada una de dichas muestras,
— calcule la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) para estas concentraciones,
— calcule la veracidad dividiendo la concentración media detectada por el valor certificado (medido como concentración) y multiplíquelo por 100, para expresar el resultado en porcentaje:

Veracidad (%) = concentración media detectada (tras introducción del factor corrector de recuperación) × 100/valor certificado.

Si no se dispone de CRM, en lugar de la veracidad puede determinarse la recuperación, tal como se describe en el punto 4.1.2.1.

3.1.1.3. *Aplicabilidad/robustez (cambios menores)*

En estos estudios se utiliza la introducción deliberada por el laboratorio de variaciones menores razonables y la observación de sus consecuencias.

Deben realizarse estudios previos a la investigación seleccionando factores del pretratamiento, limpieza y análisis de la muestra que pueden influir en los resultados de la medición. Entre estos factores se cuentan el operador, la procedencia y la edad de los reactivos, disolventes, patrones y extractos de la muestra, la velocidad de calentamiento, la temperatura, el pH y muchos otros factores que pueden darse en el laboratorio. Conviene modificar dichos factores en un orden de magnitud acorde con las desviaciones habituales entre laboratorios.

— identifique posibles factores que pudieran influir en los resultados,
— varíe ligeramente cada factor,
— realice una prueba de robustez según el método de Youden (15)(16) (a este nivel pueden emplearse otros métodos homologados, pero el método de Youden reduce al mínimo el tiempo y el esfuerzo requeridos). El método de Youden es un diseño factorial fraccional. No permite detectar interacciones entre los diversos factores,
— si se observa que un factor influye significativamente en los resultados de la medición, proceda a otros experimentos para determinar los límites de aceptabilidad de dicho factor,
— los factores que influyen significativamente en los resultados deben quedar claramente identificados en el protocolo del método.

La idea de base no es estudiar una alteración a la vez, sino introducir diversas variaciones simultáneamente. Por ejemplo, imaginemos que A, B, C, D, E, F, G son los valores nominales de siete factores distintos que podrían influir en los resultados si sus valores nominales se cambian ligeramente. Demos a sus valores alternativos las minúsculas correspondientes a, b, c, d, e, f, g. Esto nos da 2^7 o 128 combinaciones diferentes.

Puede tomarse un subconjunto de ocho de dichas combinaciones, con una mezcla equilibrada de mayúsculas y de minúsculas (cuadro 11). Debe procederse a ocho determinaciones, utilizando una combinación de los factores elegidos (A-G). En el cuadro 11 se presentan los resultados de las determinaciones (S-Z).

Cuadro 11

Configuración del experimento para estudios de robustez (cambios menores)

Valor del factor F	Combinación de determinaciones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c

▼B

Valor del factor F	Combinación de determinaciones							
	1	2	3	4	5	6	7	8
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Resultado observado R	S	T	U	V	W	X	Y	Z

Para los cálculos, véanse los ejemplos de ensayos de robustez en el punto 3.3.

3.1.1.4. *Estabilidad*

Se ha observado que la insuficiente estabilidad del analito o de los constituyentes de la matriz en la muestra durante el almacenamiento o el análisis puede dar origen a desviaciones significativas del resultado del análisis. Además, debe comprobarse la estabilidad del patrón de calibración en la solución. Normalmente, la estabilidad del analito está debidamente caracterizada para diversas condiciones de almacenamiento. El control de las condiciones de almacenamiento debe formar parte del sistema habitual de acreditación del laboratorio. Si no se conoce este particular, a continuación se ofrecen ejemplos de cómo determinar la estabilidad.

Estabilidad del analito en la solución

— Prepare nuevas soluciones madre del analito y dilúyalas, siguiendo las instrucciones de ensayo, para obtener el número suficiente de alícuotas (por ejemplo, 40) de cada concentración seleccionada (en torno al límite de funcionamiento mínimo exigido en el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, o en torno al límite permitido para las demás sustancias). Prepare soluciones de los analitos empleados en el enriquecimiento y en la solución del análisis final, y de cualquier otra solución de interés (por ejemplo, patrones derivados).
— Mida el contenido de analito en la solución recién preparada, siguiendo las instrucciones de ensayo.
— Vierta los volúmenes adecuados en recipientes apropiados, etiquételos y almacénelos de acuerdo con el procedimiento descrito en el cuadro 12.

Cuadro 12

Procedimiento para la determinación de la estabilidad del analito en la solución

	– 20 ºC	+ 4 ºC	+ 20 ºC
A oscuras	10 alícuotas	10 alícuotas	10 alícuotas
A la luz			10 alícuotas

— El tiempo de almacenamiento puede ser de 1, 2, 3 y 4 semanas o más si es necesario, es decir, hasta que se observen los primeros fenómenos de degradación durante la identificación o la cuantificación. Debe registrarse el tiempo máximo y las condiciones óptimas de almacenamiento.
— Debe calcularse la concentración del analito (o los analitos) en cada alícuota tomando como valor 100 % la solución del analito recién preparado en el momento del análisis.

Resto del analito (%) = $Ci \times 100/C_{fresco}$

C_i = concentración en el momento i

C_{fresco} = concentración de la solución recién preparada.

Estabilidad del analito (o los analitos) en la matriz

— Utilice muestras reales siempre que sea posible. Cuando no disponga de ellas, utilice matriz enriquecida con el analito.
— Si dispone de ellas, determine la concentración en el material mientras está aún fresco. Tome otras alícuotas del material después de 1,

▼B

2, 4 y 20 semanas, y determine las concentraciones. El tejido debe almacenarse como mínimo a - 20 ºC, o menos si es necesario.

— Si no dispone de material real, tome material en blanco y homogenéicelo. Divida el material en 5 alícuotas. Enriquezca cada alícuota con el analito, preparado de preferencia en una pequeña cantidad de solución acuosa. Analice una alícuota inmediatamente. Almacene las alícuotas restantes como mínimo a - 20 ºC, o menos si es necesario, y analícelas tras 1, 2, 4 y 20 semanas.

3.1.1.5. *Curvas de calibración*

Cuando se utilizan curvas de calibración para la cuantificación es preciso:

— emplear al menos cinco niveles (incluyendo el cero) en la construcción de la curva,

— describir el intervalo de trabajo de la curva,

— describir la fórmula matemática de la curva y la bondad del ajuste de los datos a la curva,

— describir los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva.

Si es necesaria una calibración en serie de una solución patrón, se indicarán ámbitos aceptables para los parámetros de la curva de calibración, que pueden variar de una serie a otra.

3.1.2. **Procedimientos convencionales de validación**

El cálculo de los parámetros por métodos convencionales exige la realización de diversos experimentos aislados. Debe determinarse cada característica de funcionamiento para cada cambio importante (véase el apartado sobre aplicabilidad/robustez). Con los métodos multianalitos pueden analizarse varios analitos simultáneamente, siempre que previamente se hayan descartado posibles interferencias de importancia. De modo similar pueden determinarse varias características de funcionamiento. Así pues, para minimizar la carga de trabajo es conveniente combinar los experimentos cuando sea posible (por ejemplo, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio con la especificidad, el análisis de muestras en blanco para determinar el límite decisión y las pruebas de especificidad).

3.1.2.1. *La recuperación*

cuando no se dispone de CRM, debe determinarse la recuperación mediante experimentos con matriz en blanco enriquecida, por ejemplo mediante el procedimiento siguiente:

— seleccione 18 alícuotas de un material en blanco y enriquezca cada 6 de ellas con 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permitido,

— analice las muestras y calcule la concentración en cada muestra,

— mediante la siguiente ecuación, calcule la recuperación para cada muestra,

— calcule la recuperación media y el CV de los 6 resultados a cada nivel,

— % de recuperación = 100 × contenido medido/nivel de enriquecimiento.

El método convencional de determinación de la recuperación es una variante del método de adición de patrón descrito en el punto 3.5, si:

— la muestra se considera en blanco, en vez de una muestra para analizar,

— se considera que el componente final ([1]) y la recuperación ([2]) son similares para ambas porciones de ensayo,

— las muestras de ensayo tienen la misma masa, y los extractos de las fracciones de ensayo el mismo volumen,

— la cantidad de patrón de calibración añadida a la segunda porción de ensayo (enriquecida) se expresa x_{ADD}. ($x_{ADD} = \rho_A.V_A$),

— x_1 es el valor medido del blanco y x_2 el valor medido de la segunda porción de ensayo (enriquecida);

([1]) Componente final: fracción de la masa del analito contenida en la muestra y presente en el extracto final.

([2]) Recuperación (aquí): fracción de la masa del analito añadida a la muestra que está presente en el extracto final. En el resto del documento se supone que el componente final y la recuperación son iguales, por lo que sólo se utilizará el término «recuperación».

▼B

— entonces, el % de recuperación = 100 $(x_2 - x_1)/x_{ADD}$.

Si cualquiera de las condiciones mencionadas no se cumple (o se supone que no se cumple), se llevará a cabo el procedimiento completo de determinación de la recuperación por el método de la adición de patrón que se describe en el punto 3.5.

3.1.2.2. *Repetibilidad*

— Prepare un conjunto de muestras de matrices idénticas, enriquecidas con el analito para dar concentraciones equivalentes a 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permitido.

— En cada nivel debe procederse al análisis con un mínimo de 6 muestras idénticas.

— Analice las muestras.

— Calcule la concentración detectada en cada muestra.

— Determine la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.

— Repita estos pasos al menos otras dos veces.

— Calcule las concentraciones medias generales y los CV de las muestras enriquecidas.

3.1.2.3. *Reproducibilidad intralaboratorio*

— Prepare un conjunto de muestras de materiales de ensayo especificados (de matrices idénticas o diferentes), enriquecidas con el analito para dar concentraciones equivalentes a 1, 1,5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo exigido o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite permitido.

— En cada nivel debe procederse al análisis con un mínimo de 6 muestras idénticas.

— Repita estos pasos al menos otras dos veces con operadores diferentes y distintas condiciones ambientales (por ejemplo, diferentes lotes de reactivos, disolventes, temperaturas ambientales, instrumentos, etc.).

— Analice las muestras.

— Calcule la concentración detectada en cada muestra.

— Determine la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.

3.1.2.4. *Reproducibilidad*

De acuerdo con la norma ISO 5725-2 (5), para verificar la reproducibilidad los laboratorios deben participar en estudios colaborativos.

3.1.2.5. *Límite de decisión (CCα)*

El límite de decisión debe establecerse según los requisitos de identificación, o de identificación más cuantificación, definidos en la parte 2, «Criterios de funcionamiento y otros requisitos y procedimientos de los métodos analíticos».

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CCα:

— bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor crítico de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco, enriquecido hasta el límite de funcionamiento mínimo exigido, y por encima del mismo, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal frente a la concentración añadida. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente a la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio de la ordenada en origen. Esto sólo se aplica a análisis cuantitativos (α = 1 %),

— bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, para poder calcular la relación señal-ruido en la banda en la que se espera encontrar el analito. Puede usarse como límite de decisión un valor triple al de la relación señal-ruido. Esto es aplicable a análisis cuantitativos y cualitativos.

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CCα:

— bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor crítico de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco,

▼B

enriquecido en torno al límite permitido en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal frente a la concentración añadida. El límite de decisión (α = 5 %) equivale a la concentración correspondiente al límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio,

— bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito hasta el límite permitido. El límite de decisión (α = 5 %) es igual a la concentración en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar correspondiente.

Véase también el artículo 5 y el punto 3.2.

3.1.2.6. *La capacidad de detección (CCβ)*

La capacidad de detección debe establecerse según los requisitos definidos de cribado, de identificación o de identificación más cuantificación (véase la parte 2).

En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CCβ:

— bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor mínimo detectable de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco representativo, enriquecido hasta el límite de funcionamiento mínimo exigido, y por debajo del mismo, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal frente a la concentración añadida. La capacidad de detección (β = 5 %) es igual a la concentración correspondiente al límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio medido en el límite decisión,

— bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito en cantidades hasta el límite de decisión. Analice las muestras e identifique los analitos. La capacidad de detección (β = 5 %) es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido,

— si no se dispone de resultados cuantitativos, la capacidad de detección puede determinarse investigando el material blanco enriquecido hasta el límite de decisión y por encima del mismo. En este caso, la capacidad de detección del método es igual al nivel de concentración, en el que sólo queda $\leq$ 5 % de resultados de falso conforme. Por ello, debe procederse a un mínimo de 20 análisis para al menos un nivel de concentración a fin de garantizar la fiabilidad de esta determinación.

En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, se puede establecer el CCβ:

— bien mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843 (17) (denominado valor mínimo detectable de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material blanco representativo, enriquecido en torno al límite permitido en incrementos equidistantes. Analice las muestras e identifique los analitos. Calcule la desviación estándar del contenido medio en el límite de decisión. La capacidad de detección (ß = 5 %) es igual a la concentración correspondiente al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio.

— bien analizando un mínimo de 20 materiales blancos por matriz, enriquecidos con analito hasta el límite de decisión. La capacidad de detección (β = 5 %) es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar correspondiente.

Véase también el punto 3.2.

3.1.2.7. *Robustez (cambios importantes)*

El método de análisis debe probarse en diversas condiciones experimentales, por ejemplo ante diferentes especies, matrices o condiciones de muestreo. Los cambios introducidos deben ser importantes. La importancia de esos cambios puede evaluarse utilizando, por ejemplo, el enfoque Youden (15) (16). Para todo cambio importante debe determinarse cada característica de funcionamiento que haya tenido un efecto significativo en el funcionamiento del análisis.

▼B

3.1.3. **Validación mediante métodos alternativos**

Si se aplican procedimientos alternativos de validación, se indicará en el protocolo de validación el modelo y la estrategia, con sus respectivos requisitos previos, hipótesis y fórmulas, o, cuando menos, sus referencias. Se presenta a continuación un ejemplo de planteamiento alternativo. Si se aplica, por ejemplo, el modelo de validación interna, las características de funcionamiento se determinan de una manera que permita una validación para los cambios importantes en el mismo procedimiento de validación. Ello exige definir un plan experimental de validación

3.1.3.1. *Plan experimental*

Debe elaborarse un plan experimental, en función del número de especies y de factores diferentes que se pretenda estudiar. Por ello, en el primer paso de todo el proceso de validación se estudiarán las poblaciones de muestras que se analizarán en el futuro en el laboratorio para seleccionar las especies más importantes y aquellos factores que pueden influir en los resultados de las mediciones. Posteriormente, se elegirá el intervalo de concentración adaptado a la finalidad de acuerdo con el nivel de interés.

Ejemplo:

— Pueden estudiarse simultáneamente varios analitos mediante el método de análisis que se está validando.
— Se han identificado dos variantes del factor dominante (A y B). Los factores dominantes forman la base sobre la cual se combinan los niveles del factor. Entre estos factores dominantes pueden figurar la especie o la matriz. En el presente ejemplo, el factor dominante se varió en dos niveles, es decir, se consideraron dos especies distintas (A y B). De manera general, se pueden variar los factores dominantes en más de dos niveles, lo cual sólo aumenta el número de análisis que deben realizarse.
— Los factores seleccionados se variarán en dos niveles (que se indican como + o -).

Cuadro 13

Factores considerados importantes en el procedimiento de validación

Sexo del animal	(factor 1)
Raza	(factor 2)
Condiciones de transporte	(factor 3)
Condiciones de almacenamiento	(factor 4)
Frescura de la muestra	(factor 5)
Condiciones de engorde	(factor 6)
Distintos operadores con diferentes grados de experiencia	(factor 7)

Cuadro 14

Posible plan experimental para el ejemplo propuesto

Especie	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Muestra nº
A	+	+	+	+	–	+	–	1
A	+	+	–	–	+	–	–	2
A	+	–	+	–	–	–	+	3
A	+	–	–	+	+	+	+	4
A	–	+	+	–	+	+	+	5
A	–	+	–	+	–	–	+	6
A	–	–	+	+	+	–	–	7
A	–	–	–	–	–	+	–	8
B	+	+	+	+	+	–	+	9
B	+	+	–	–	–	+	+	10
B	+	–	+	–	+	+	–	11

▼B

Especie	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4	Factor 5	Factor 6	Factor 7	Muestra nº
B	+	–	–	+	–	–	–	12
B	–	+	+	–	–	–	–	13
B	–	+	–	+	+	+	–	14
B	–	–	+	+	–	+	+	15
B	–	–	–	–	+	–	+	16

Como cada muestra (cada combinación de nivel de factores) tiene que enriquecerse con 4 concentraciones distintas en torno al nivel de interés, y como debe analizarse una muestra en blanco por nivel, se realizarán 5 × 16 = 80 análisis para todo el experimento de validación.

De los resultados de estos 80 resultados medidos es posible calcular (13) (14):

Recuperación

— la repetibilidad por nivel de concentración (s_{ir}),

— la reproducibilidad intralaboratorio por nivel de concentración (s_{iR}),

— el límite de decisión (CCα),

— la capacidad de detección (CCβ),

— la curva de potencias (índice de error β frente a concentración; véase el punto 3.1.3.2),

— la robustez frente a los cambios importantes; la robustez frente a los cambios menores puede determinarse de acuerdo con lo expuesto en el punto 3.1.1.3,

— 16 curvas de calibración dependientes de la muestra,

— 1 curva de calibración global,

— el intervalo de predicción de la curva de calibración global,

— las desviaciones inducidas por la matriz (S_{mat}),

— las desviaciones inducidas por el proceso de análisis (S_{run}),

— el efecto de cada factor en los resultados de la medición.

Estas características de funcionamiento permiten la evaluación global del funcionamiento del método, pues no sólo se estudia la influencia de cada factor, sino también las combinaciones pertinentes de estos factores. Con ayuda de esta configuración experimental puede decidirse si se excluye de la curva de calibración global alguno de los factores, por apartarse significativamente de las desviaciones estándar de los demás factores.

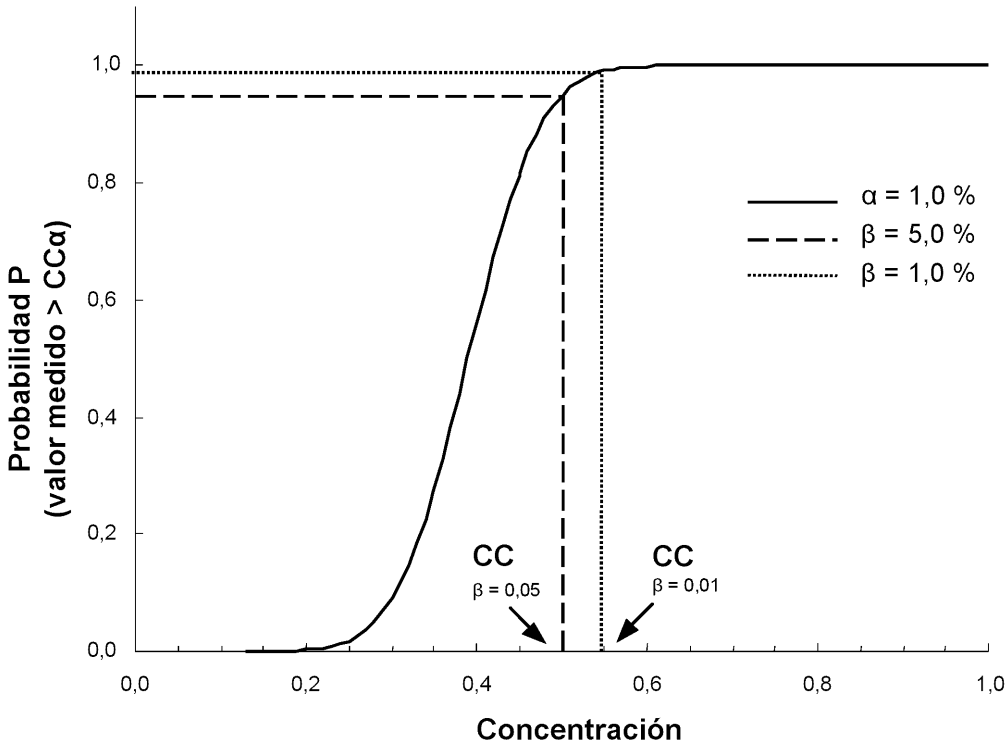
3.1.3.2. *Curva de potencias*

La curva de potencias da información sobre la capacidad de detección del método en el intervalo de concentración elegido. Hace referencia al error β en la aplicación del método estudiado. La curva de potencias permite calcular la capacidad de detección de cada categoría de métodos (cribado, confirmación) o tipo (cualitativo o cuantitativo) para un error β determinado (por ejemplo, 5 %).

▼B

Figura 1

Curva de potencias



En la figura 1 se presenta un ejemplo del establecimiento gráfico de la capacidad de detección (CCβ) de un método analítico. Este método concreto presenta un riesgo remanente del 5 % de llegar a una decisión de falso conforme en una concentración de 0,50 µg/kg. En una concentración de 0,55 µg/kg el riesgo de llegar a una decisión de falso conforme disminuye hasta el 1 %.

3.1.3.3. *Reproducibilidad*

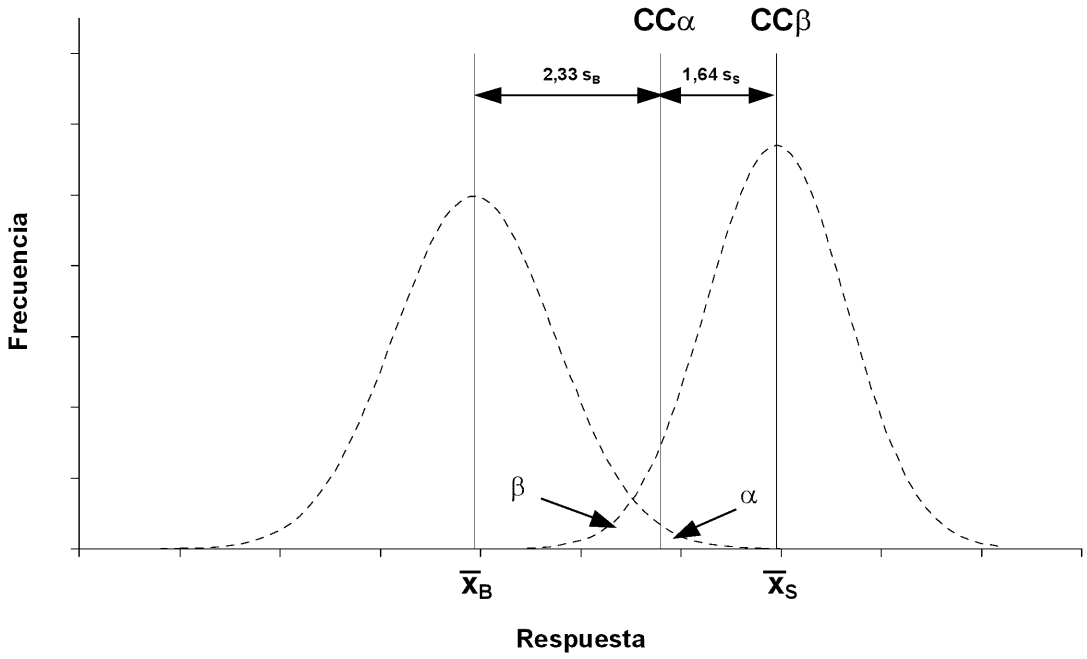
La determinación de la reproducibilidad de un método mediante el concepto de estudio intralaboratorio (validación interna) exige la participación repetida en estudios de aptitud, de conformidad con las guías ISO 43-1 (3) y 43-2 (4). Los laboratorios pueden elegir sus propios métodos, siempre que se utilicen en condiciones de rutina. La desviación estándar del laboratorio puede utilizarse para evaluar la reproducibilidad del método.

▼B

3.2. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS DIVERSOS LÍMITES ANALÍTICOS

Figura 2

Sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido

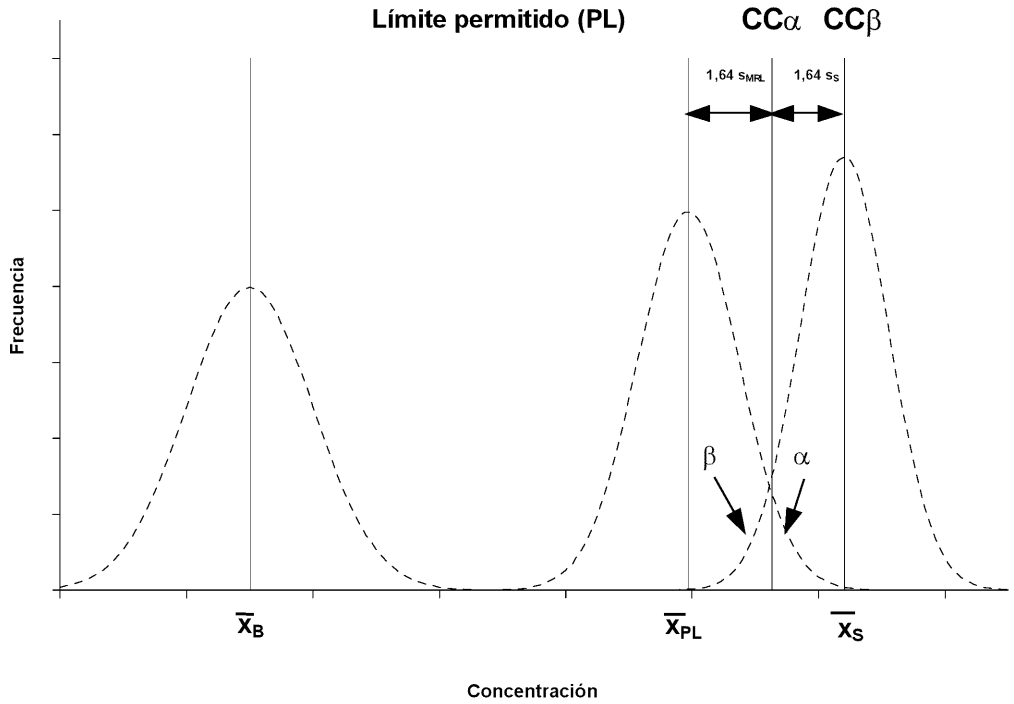


$\overline{X}_S$	Valor medio de la respuesta de la muestra contaminada
S_B	Desviación estándar de la muestra en blanco (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
S_S	Desviación estándar de la muestra contaminada (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
α	Tasa de resultados falsos no conforme
β	Tasa de resultados falsos conforme
CCα	Respuesta con un error α dado y un 50 % de error β
CCβ	Respuesta con un error α muy pequeño y un error β dado

▼B

Figura 3

Sustancias para las que se ha establecido un límite permitido



$\bar{x}_B$	«Concentración» media de la muestra en blanco
$\bar{x}_{PL}$	Concentración media de la muestra que contiene el analito en el límite permitido
$\bar{x}_S$	Concentración media de la muestra contaminada
s_{PL}	Desviación estándar de la muestra que contiene el analito en el límite permitido (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
s_S	Desviación estándar de la muestra contaminada (determinada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio)
α	Tasa de resultados falsos no conforme
β	Tasa de resultados falsos conforme
CCα	Respuesta con un error α dado y un 50 % de error β
CCβ	Respuesta con un error α muy pequeño y un error β dado

▼B

3.3. EJEMPLO DE CÁLCULO PARA ESTUDIAR LA ROBUSTEZ DEL MÉTODO ANTE CAMBIOS MENORES, SEGÚN EL MÉTODO DE YOUDEN (16)

Comparación de medias (A)

$A_A = \Sigma(A_i)/4$
$A_B = \Sigma(B_i)/4$
$A_C = \Sigma(C_i)/4$
$A_D = \Sigma(D_i)/4$
$A_E = \Sigma(E_i)/4$
$A_F = \Sigma(E_i)/4$
$A_G = \Sigma(G_i)/4$
$A_a = \Sigma(a_i)/4$
$A_b = \Sigma(b_i)/4$
$A_c = \Sigma(c_i)/4$
$A_d = \Sigma(d_i)/4$
$A_e = \Sigma(e_i)/4$
$A_f = \Sigma(f_i)/4$
$A_g = \Sigma(g_i)/4$

Compare las medias de las mayúsculas (A_A a A_G) con las medias de las minúsculas correspondientes (A_a a A_g). Si uno de los factores tiene un efecto, la diferencia será significativamente mayor que las diferencias de los otros factores.

Un método robusto no debe verse afectado por los cambios que, con casi toda certeza, habrá entre laboratorios.

Si no existe una diferencia destacada, la medición más realista del error aleatorio la dan las siete diferencias.

Diferencias (D_i)	Cuadrado de las diferencias (D_i^2)
$D_a = A - a = \Sigma(A_i) - \Sigma(a_i)$	D_a^2 = valor a
$D_b = B - b = \Sigma(B_i) - \Sigma(b_i)$	D_b^2 = valor b
$D_c = C - c = \Sigma(C_i) - \Sigma(c_i)$	D_c^2 = valor c
$D_d = D - d = \Sigma(D_i) - \Sigma(d_i)$	D_d^2 = valor d
$D_e = E - e = \Sigma(E_i) - \Sigma(e_i)$	D_e^2 = valor e
$D_f = F - f = \Sigma(F_i) - \Sigma(f_i)$	D_f^2 = valor f
$D_g = G - g = \Sigma(G_i) - \Sigma(g_i)$	D_g^2 = valor g

Desviación estándar de las diferencias D_i (S_{Di}):

$$S_{D1} = \sqrt{2*\Sigma(D_1^2/7)}$$

Si el valor S_{Di} obtenido es significativamente mayor que la desviación estándar del método hallada en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio expuestas (véase más arriba), puede deducirse que el conjunto de los factores influye en el resultado, aunque cada factor aislado no presente una influencia significativa, y que el método no es lo suficientemente robusto frente a las modificaciones escogidas.

3.4. EJEMPLOS DE CÁLCULO PARA EL PROCEDIMIENTO DE VALIDACIÓN INTERNA

Ejemplos y cálculos para el protocolo de validación interna descrito en el apartado «validación de acuerdo con modelos alternativos» (3.1.3) (13) (14).

3.5. EJEMPLOS DEL MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN

Una muestra de ensayo con un contenido de analito T se divide en dos porciones de ensayo 1 y 2 de masas respectivas m_1 y m_2. La porción de ensayo 2 se enriquece con un volumen V_A de una solución de concentración ρ_A del analito. Tras las fases de extracción y de purificación del método se obtienen dos extractos de las fracciones de ensayo, de volúmenes respectivos V_1 y V_2. Se considera que la recuperación del analito es rc. Ambos extractos se analizan con un método de medición de sensibilidad b y dan una respuesta analítica de x_1 y x_2, respectivamente.

Suponiendo que rc y b sean iguales para el analito en la muestra natural y en la enriquecida, el contenido T puede calcularse de la manera siguiente:

$$T = x_1.V_1.\rho_A.V_A/(x_2.V_2.m_1 - x_1.V_1.m_2)$$

Este método permite determinar la recuperación rc. A continuación, además del análisis que acabamos de describir, se enriquece parte del extracto de la porción

▼B

de ensayo 1 (de volumen V_3) con una cantidad conocida $\rho_B.V_B$ del analito y se analiza. La respuesta analítica es x_3 y la recuperación es:

$$rc = x_2.V_1.V_2.\rho_B.V_B/[x_3.V_1.V_3(T.m_2 + \rho_A.V_A) - x_2.V_2.T.m_1(V_3 - V_B)]$$

Puede calcularse también la sensibilidad b:

$$b = x_1.V_1/rc.T.m_1$$

Se han descrito todas las condiciones de aplicación y los detalles (18).

4. ABREVIATURAS EMPLEADAS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AES	Espectrometría de emisión atómica
AOAC-I	Asociación de químicos analíticos oficiales (AOAC International)
B	Fracción ligada (inmunoanálisis)
CI	Ionización química
CRM	Material de referencia certificado
CV	Coeficiente de variación
2 D	Bidimensional
DAD	Detección por red de diodos
DPASV	Voltamperometría diferencial de impulsos de redisolución anódica
ECD	Detección de la captación electrónica
EI	Ionización por impacto electrónico
CG	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HPTLC	Cromatografía en capa fina de alto rendimiento
HRMS	(Espectrometría de masas) de alta resolución
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IR	Infrarrojo
ISO	Organización Internacional de Normalización
CL	Cromatografía líquida
LR(MS)	(Espectrometría de masas) de baja resolución
MRPL	Límite de funcionamiento mínimo exigido
MS	Espectrometría de masas
m/z	Relación masa/carga
RF	Migración relativa al frente de disolvente (TLC)
RSDL	Desviaciones estándar relativas del laboratorio
SIM	Control de iones específicos
TLC	cromatografía en capa fina
UV	Luz ultravioleta
VIS	Luz visible.

5. REFERENCIAS

(1) ISO 17025: 1999 General requirement for the competence of calibration and testing laboratories.

(2) ISO 3534-1: 1993 Statistical Methods for quality control — Vol. 1 vocabulary and symbols.

(3) ISO Guide 43-1:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes.

(4) ISO Guide 43-2:1997 Proficiency testing by interlaboratory comparisons — Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.

(5) ISO 5725:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1:General principles and definitions; ISO 5725-2 Part 2: Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method; Part 4: Basic

▼B

methods for the determination of the trueness of a standard measurement method.

(6) ISO 78-2:1999 Chemistry — Layouts for standards — Part 2: Methods of chemical analysis.

(7) W. G de Ruig and J. M Weseman «A new approach to confirmation by infrared spectrometry» J. Chemometrics 4 (1990) 61-77.

(8) Véase, por ejemplo, May, T. W., Brumbaugh, W. G., 1982, Matrix modifier and L'vov platform for elimination of matrix interferences in the analysis of fish tissues for lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry: Analytical Chemistry 54(7): 1032-1037 (90353).

(9) Applications of Zeeman Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology, C. Minoia, S. Caroli (Eds.), Pergamon Press (Oxford), 1992, pp. xxvi + 675.

(10) Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry, A. Montaser, D. W. Golighty (Eds.), VCH Publishers, Inc. (New York), 1992.

(11) Plasma Source Mass Spectrometry Developments and Applications, G. Holland, S. D. Tanner (Eds.), The Royal Society of Chemistry, 1997, pp. 329.

(12) IUPAC (1995), Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies, Pure & Applied Chem, 67, 331.

(13) Jülicher, B., Gowik, P. and Uhlig, S. (1998) Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. Analyst, 120, 173.

(14) Gowik, P., Jülicher, B. and Uhlig, S. (1998) Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high performance liquid chromatography-photodiode-array detection. Method description and comprehensive in-house validation. J. Chromatogr., 716, 221.

(15) OAC-I Peer Verified Methods, Policies and Procedures, 1993, AOAC International, 2200 Wilson Blvd., Suite 400, Arlington, Virginia 22201-3301, USA.

(16) W.J. Youden; Steiner, E.H.; «Statistical Manual of the AOAC–Association of Official Analytical Chemists», AOAC-I, Washington DC: 1975, p. 35 ff.

(17) ISO 11843: 1997 Capability of detection — Part 1: Terms and definitions, Part 2: Methodology in the linear calibration case Part 2: Methodology in the linear calibration case.

(18) R.W. Stephany & L.A. van Ginkel: «Yield or recovery: a world of difference». Proceedings 8th Euro Food Chem, Vienna, Austria September 18-20 (1995) Federation of European Chemical Societies, Event 206. ISBN 3-900554-17X, pp. 2-9.

(19) Directive 71/354/EEC of 18 October 1971 on the approximation of the laws of the Member States relating to units of measurement Official Journal L 243, 29/10/1971, p. 29.

(20) ISO 31-0: 1992 Quantities and units — Part 0: General principles.

▼M1

ANEXO II

Límites mínimos de funcionamiento exigidos

Sustancia y/o metabolito	Matrices	MRPL
Cloranfenicol	Carne Huevos Leche Orina Productos de la acuicultura Miel	0,3 µg/kg
Acetato de medroxiprogesterona	Grasa de los riñones de cerdo	1 µg/kg
Metabolitos de nitrofuranos: — furazolidona — furaltadona — nitrofurantoína — nitrofurazona	Carne de aves de corral Productos de la acuicultura	1 µg/kg para todos
▼M2 Suma de verde de malaquita y verde de leucomalaquita	Carne de productos de la acuicultura	2 µg/kg