

**RÈGLEMENT D'EXÉCUTION (UE) 2021/808 DE LA COMMISSION****du 22 mars 2021****concernant les performances des méthodes d'analyse des résidus de substances pharmacologiquement actives utilisées chez les animaux producteurs d'aliments et l'interprétation des résultats ainsi que les méthodes à employer pour l'échantillonnage et abrogeant les décisions 2002/657/CE et 98/179/CE****(Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)**

LA COMMISSION EUROPÉENNE,

vu le traité sur le fonctionnement de l'Union européenne,

vu le règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil du 15 mars 2017 concernant les contrôles officiels et les autres activités officielles servant à assurer le respect de la législation alimentaire et de la législation relative aux aliments pour animaux ainsi que des règles relatives à la santé et au bien-être des animaux, à la santé des végétaux et aux produits phytopharmaceutiques, modifiant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) n° 999/2001, (CE) n° 396/2005, (CE) n° 1069/2009, (CE) n° 1107/2009, (UE) n° 1151/2012, (UE) n° 652/2014, (UE) 2016/429 et (UE) 2016/2031, les règlements du Conseil (CE) n° 1/2005 et (CE) n° 1099/2009 ainsi que les directives du Conseil 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE et 2008/120/CE, et abrogeant les règlements du Parlement européen et du Conseil (CE) n° 854/2004 et (CE) n° 882/2004, les directives du Conseil 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE et 97/78/CE ainsi que la décision 92/438/CEE du Conseil (règlement sur les contrôles officiels) <sup>(1)</sup>, et notamment son article 34, paragraphe 6,

considérant ce qui suit:

- (1) Le règlement (UE) 2017/625 établit des règles relatives à la réalisation des contrôles officiels et des autres activités officielles par les autorités compétentes des États membres destinés à vérifier le respect de la législation de l'Union, notamment dans le domaine de la sécurité des denrées alimentaires, à toutes les étapes de la production, de la transformation et de la distribution. Il prévoit des règles spécifiques pour les contrôles officiels concernant les substances dont l'utilisation peut avoir pour résultat la présence de résidus dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux et fixe des exigences générales concernant les méthodes à employer pour l'échantillonnage et pour les analyses et les essais en laboratoire lors des contrôles officiels et des autres activités officielles.
- (2) La décision 2002/657/CE de la Commission <sup>(2)</sup> énonce les exigences applicables aux performances des méthodes d'analyse et à l'interprétation des résultats des analyses de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et la décision 98/179/CE de la Commission <sup>(3)</sup> fixe les modalités de prise d'échantillons officiels pour la recherche de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits. Les deux décisions ont été adoptées sur la base de la directive 96/23/CE du Conseil <sup>(4)</sup>, qui a été abrogée par le règlement (UE) 2017/625. Compte tenu des dernières évolutions scientifiques, il convient d'actualiser ces règles et de les intégrer au cadre défini par le règlement (UE) 2017/625 régissant les contrôles officiels.
- (3) Conformément à l'article 1<sup>er</sup>, paragraphe 2, de la décision 2002/657/CE, cette décision ne s'applique pas aux substances pour lesquelles des règles plus spécifiques ont été définies dans la législation de l'Union. Ces substances sont les mycotoxines, les dioxines et les polychlorobiphényles (PCB) de type dioxine ainsi que le plomb, le cadmium, le mercure et le benzo(a)pyrène dans les denrées alimentaires. En ce qui concerne les mycotoxines dans les denrées alimentaires, il convient de respecter les exigences énoncées dans le règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission <sup>(5)</sup> portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires. Le règlement (UE) 2017/644 de la Commission <sup>(6)</sup> portant fixation des méthodes de prélèvement et d'analyse d'échantillons à utiliser pour le contrôle

<sup>(1)</sup> JO L 95 du 7.4.2017, p. 1.

<sup>(2)</sup> Décision 2002/657/CE de la Commission du 14 août 2002 portant modalités d'application de la directive 96/23/CE du Conseil en ce qui concerne les performances des méthodes d'analyse et l'interprétation des résultats (JO L 221 du 17.8.2002, p. 8).

<sup>(3)</sup> Décision 98/179/CE de la Commission du 23 février 1998 fixant les modalités de prise d'échantillons officiels pour la recherche de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits (JO L 65 du 5.3.1998, p. 31).

<sup>(4)</sup> Directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/358/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE (JO L 125 du 23.5.1996, p. 10).

<sup>(5)</sup> Règlement (CE) n° 401/2006 de la Commission du 23 février 2006 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle officiel des teneurs en mycotoxines des denrées alimentaires (JO L 70 du 9.3.2006, p. 12).

<sup>(6)</sup> Règlement (UE) 2017/644 de la Commission du 5 avril 2017 portant fixation des méthodes de prélèvement et d'analyse d'échantillons à utiliser pour le contrôle des teneurs en dioxines, en PCB de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine de certaines denrées alimentaires et abrogeant le règlement (UE) n° 589/2014 (JO L 92 du 6.4.2017, p. 9).

des teneurs en dioxines, en PCB de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine de certaines denrées alimentaires s'applique à l'égard des dioxines et des PCB de type dioxine. Les dispositions en matière de prélèvement d'échantillons et d'analyse en vue des contrôles officiels concernant le plomb, le cadmium, le mercure et le benzo(a)pyrène dans les denrées alimentaires sont définies par le règlement (CE) n° 333/2007 de la Commission <sup>(7)</sup>.

- (4) Pour des raisons de clarté et de sécurité juridique, il convient de fusionner les dispositions applicables aux modes de prise d'échantillons et d'analyse des substances pharmacologiquement actives en un seul acte juridique comme dans le cas des mycotoxines, des dioxines, des PCB de type dioxine, du plomb, du cadmium, du mercure et du benzo(a)pyrène dans les denrées alimentaires.
- (5) Il convient donc d'abroger les décisions 98/179/CE et 2002/657/CE et de les remplacer par le présent règlement.
- (6) Conformément au règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil <sup>(8)</sup>, les coccidiostatiques et les histomonostatiques peuvent être utilisés comme additifs pour l'alimentation animale, c'est pourquoi le règlement (CE) n° 152/2009 de la Commission <sup>(9)</sup> portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux s'applique aux analyses de la teneur en ces substances des aliments pour animaux. Toutefois, il convient d'appliquer le présent règlement lorsque des aliments pour animaux sont analysés au titre des mesures de suivi lors de l'enquête sur la source des échantillons non conformes, dans des cas de non-conformité, établie ou soupçonnée, avec les règles de l'Union applicables à l'utilisation ou aux résidus de substances pharmacologiquement actives autorisées dans les médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux, ou avec les règles de l'Union applicables à l'utilisation ou aux résidus de substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées.
- (7) Afin d'assurer la continuité de l'exécution des contrôles officiels et des autres activités officielles sur les résidus de substances pharmacologiquement actives et pour éviter que toutes les méthodes ne doivent être revalidées simultanément, les méthodes validées avant la date d'entrée en vigueur du présent règlement peuvent rester en usage pendant une période limitée, sous réserve du respect des exigences de l'annexe I, points 2 et 3, de la décision 2002/657/CE. Il convient donc de laisser aux États membres un délai suffisant pour appliquer à toutes les méthodes d'analyse les exigences énoncées dans le présent règlement.
- (8) Les mesures prévues par le présent règlement sont conformes à l'avis du comité permanent des végétaux, des animaux, des denrées alimentaires et des aliments pour animaux,

A ADOPTÉ LE PRÉSENT RÈGLEMENT:

#### *Article premier*

#### **Objet et champ d'application**

Le présent règlement établit des règles concernant les méthodes d'analyse à employer pour le prélèvement d'échantillons et les analyses en laboratoire relatives aux résidus de substances pharmacologiquement actives dans les animaux vivants producteurs de denrées alimentaires, leurs parties et fluides corporels, les excréments, les tissus, les produits d'origine animale, les sous-produits animaux, les aliments pour animaux et l'eau. Il fixe également des règles concernant l'interprétation des résultats de ces analyses de laboratoire.

Le présent règlement s'applique aux contrôles officiels visant à vérifier le respect des exigences relatives à la présence de résidus de substances pharmacologiquement actives.

<sup>(7)</sup> Règlement (CE) n° 333/2007 de la Commission du 28 mars 2007 portant fixation des modes de prélèvement d'échantillons et des méthodes d'analyse pour le contrôle des teneurs en éléments traces et en contaminants issus de procédés de transformation dans les denrées alimentaires (JO L 88 du 29.3.2007, p. 29).

<sup>(8)</sup> Règlement (CE) n° 1831/2003 du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2003 relatif aux additifs destinés à l'alimentation des animaux (JO L 268 du 18.10.2003, p. 29).

<sup>(9)</sup> Règlement (CE) n° 152/2009 de la Commission du 27 janvier 2009 portant fixation des méthodes d'échantillonnage et d'analyse destinées au contrôle officiel des aliments pour animaux (JO L 54 du 26.2.2009, p. 1).

## Article 2

**Définitions**

Aux fins du présent règlement, les définitions figurant à l'article 2 du règlement délégué (UE) 2019/2090 de la Commission <sup>(10)</sup>, dans le règlement (UE) 2019/1871 de la Commission <sup>(11)</sup>, à l'article 2 du règlement (CE) n° 470/2009 du Parlement européen et du Conseil <sup>(12)</sup> et dans le règlement (CEE) n° 315/93 du Conseil <sup>(13)</sup> s'appliquent.

En outre, on entend par:

- 1) «rendement absolu»: le rendement de l'étape finale du procédé d'analyse d'un analyte divisé par la quantité d'analyte dans l'échantillon initial, exprimé en pourcentage;
- 2) «exactitude»: l'écart entre le résultat d'essai et la valeur de référence vraie acceptée, déterminée par la justesse et la fidélité <sup>(14)</sup>;
- 3) «erreur alpha ( $\alpha$ )»: la probabilité que l'échantillon testé soit conforme bien qu'un résultat de mesure non conforme ait été obtenu;
- 4) «analyte»: le constituant d'un système à analyser;
- 5) «substance autorisée»: une substance pharmacologiquement active dont l'utilisation chez les animaux producteurs d'aliments est autorisée en application de la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil <sup>(15)</sup>;
- 6) «erreur bêta ( $\beta$ )»: la probabilité que l'échantillon testé soit en réalité non conforme, bien qu'un résultat de mesure conforme ait été obtenu;
- 7) «biais»: la différence entre la valeur estimée des résultats d'essais et la valeur de référence acceptée;
- 8) «étalon»: une référence traçable de mesure qui représente la quantité de substance concernée d'une manière qui lie sa valeur à une base de référence;
- 9) «matériau de référence certifié» (CRM): un matériau de référence accompagné d'une documentation délivrée par un organisme faisant autorité et fournissant une ou plusieurs valeurs de propriétés spécifiées avec les incertitudes et les traçabilités associées, en utilisant des procédures valables <sup>(16)</sup>;
- 10) «cochromatographie»: une technique dans laquelle une substance inconnue est appliquée sur un support chromatographique avec un ou plusieurs constituants connus, dans l'espoir que le comportement relatif des substances inconnues et connues permettra de déterminer la substance inconnue;
- 11) «étude collaborative»: l'analyse du ou des mêmes échantillons selon la même méthode afin de déterminer les caractéristiques de performance de la méthode dans différents laboratoires, une telle étude permettant de calculer l'erreur de mesure aléatoire et le biais de laboratoire pour la méthode employée;

<sup>(10)</sup> Règlement délégué (UE) 2019/2090 de la Commission du 19 juin 2019 complétant le règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les cas de non-conformité, établie ou soupçonnée, aux règles de l'Union applicables à l'utilisation ou aux résidus de substances pharmacologiquement actives autorisées dans les médicaments vétérinaires ou en tant qu'additifs destinés à l'alimentation des animaux, ou aux règles de l'Union applicables à l'utilisation ou aux résidus de substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées (JO L 317 du 9.12.2019, p. 28).

<sup>(11)</sup> Règlement (UE) 2019/1871 de la Commission du 7 novembre 2019 relatif aux valeurs de référence pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées présentes dans les denrées alimentaires d'origine animale et abrogeant la décision 2005/34/CE (JO L 289 du 8.11.2019, p. 41).

<sup>(12)</sup> Règlement (CE) n° 470/2009 du Parlement européen et du Conseil du 6 mai 2009 établissant des procédures communautaires pour la fixation des limites de résidus des substances pharmacologiquement actives dans les aliments d'origine animale, abrogeant le règlement (CEE) n° 2377/90 du Conseil et modifiant la directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil et le règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil (JO L 152 du 16.6.2009, p. 11).

<sup>(13)</sup> Règlement (CEE) n° 315/93 du Conseil du 8 février 1993 portant établissement des procédures communautaires relatives aux contaminants dans les denrées alimentaires (JO L 37 du 13.2.1993, p. 1).

<sup>(14)</sup> ISO 3534-1: 2006 Statistique — Vocabulaire et symboles — Partie 1: Termes statistiques généraux et termes utilisés en calcul des probabilités (Chapitre 1).

<sup>(15)</sup> Directive 2001/82/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments vétérinaires (JO L 311 du 28.11.2001, p. 1).

<sup>(16)</sup> JCGM 200:2008, Vocabulaire international de métrologie — concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM), troisième édition 2008: <https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm> [chapitre 5 Normes de mesure (Étalons)].

- 12) «méthode de confirmation»: méthode qui fournit des informations complètes ou complémentaires propres à permettre l'identification univoque de la substance et, s'il y a lieu, sa quantification de l'une des manières suivantes:
- a) à la teneur maximale en résidus ou à la teneur maximale, dans le cas des substances autorisées;
  - b) aux valeurs de référence (VR), dans le cas des substances interdites ou non autorisées pour lesquelles une telle valeur est établie;
  - c) à une concentration aussi faible que raisonnablement possible, dans le cas des substances interdites ou non autorisées pour lesquelles aucune valeur de référence n'est établie;
- 13) «coefficient de couverture (k)»: un nombre qui exprime le niveau de confiance souhaité et qui est associé à l'incertitude élargie;
- 14) «limite de décision aux fins de la confirmation (CC $\alpha$ )»: la limite à partir de laquelle il est permis de conclure avec une probabilité d'erreur  $\alpha$  qu'un échantillon est non conforme, la valeur  $1 - \alpha$  désignant la certitude statistique en pourcentage que la limite autorisée a été dépassée;
- 15) «capacité de détection aux fins du dépistage (CC $\beta$ )»: la plus petite teneur en analyte pouvant être détectée ou quantifiée dans un échantillon avec une probabilité d'erreur  $\beta$ :
- a) dans le cas de substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées, la CC $\beta$  est la concentration la plus faible à laquelle une méthode peut détecter ou quantifier, avec une certitude statistique de  $1 - \beta$ , des échantillons contenant des résidus de substances interdites ou non autorisées;
  - b) dans le cas de substances autorisées, la CC $\beta$  est la concentration à laquelle la méthode permet de détecter des concentrations inférieures à la limite autorisée avec une certitude statistique de  $1 - \beta$ ;
- 16) «matériau échantillon supplémenté»: un échantillon enrichi d'une quantité connue de l'analyte à détecter ou à quantifier;
- 17) «étude interlaboratoire»: l'organisation, la réalisation et l'évaluation d'essais sur le ou les mêmes échantillons par deux laboratoires ou plus dans des conditions prédéfinies en vue d'évaluer les performances des essais, sous la forme soit d'une étude collaborative, soit d'un essai d'aptitude;
- 18) «étalon interne (EI)»: une substance non contenue dans l'échantillon et possédant des propriétés physico-chimiques aussi proches que possible de celles de l'analyte à identifier ou à quantifier;
- 19) «niveau considéré»: la concentration d'une substance ou d'un analyte dans un échantillon qui est significative pour déterminer sa conformité avec la législation, au regard:
- a) de la teneur maximale en résidus ou de la teneur maximale pour les substances autorisées conformément au règlement (CE) n° 124/2009 de la Commission <sup>(17)</sup> et au règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission <sup>(18)</sup>;
  - b) des valeurs de référence, pour les substances interdites ou non autorisées pour lesquelles une valeur de référence est établie conformément au règlement (UE) 2019/1871;
  - c) de la concentration la plus faible pouvant être obtenue par analyse, dans le cas des substances interdites ou non autorisées pour lesquelles aucune valeur de référence n'est établie;
- 20) «niveau étalonné le plus bas» (LCL): la concentration la plus faible sur laquelle le système de mesure a été étalonné;
- 21) «matrice»: le matériau dans lequel un échantillon est prélevé;
- 22) «effet de matrice»: la différence de réponse analytique entre un étalon dissous dans le solvant et un étalon avec adaptation matricielle, avec ou sans correction à l'aide d'un étalon interne;

<sup>(17)</sup> Règlement (CE) n° 124/2009 de la Commission du 10 février 2009 établissant des valeurs maximales pour la présence dans les denrées alimentaires de coccidiostatiques ou d'histomonostatiques résultant du transfert inévitable de ces substances vers des aliments pour animaux non cibles (JO L 40 du 11.2.2009, p. 7).

<sup>(18)</sup> Règlement (UE) n° 37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale (JO L 15 du 20.1.2010, p. 1).

- 23) «étalon avec adaptation matricielle»: un blanc de matrice (blanc signifiant sans analyte) auquel l'analyte est ajouté à diverses concentrations après traitement de l'échantillon;
- 24) «étalon avec supplémentation matricielle»: un blanc de matrice (blanc signifiant sans analyte) qui, avant l'extraction au solvant et le traitement de l'échantillon, est supplémenté avec l'analyte à diverses concentrations;
- 25) «mesurande»: la grandeur particulière soumise au mesurage;
- 26) «incertitude de mesure»: un paramètre non négatif associé au résultat de la mesure, qui caractérise la dispersion des valeurs pouvant être raisonnablement attribuées au mesurande, à partir des informations utilisées;
- 27) «critères de performances»: les exigences en matière de caractéristique de performances à partir desquelles il est possible de juger qu'une méthode d'analyse est adaptée à l'usage prévu et donne des résultats fiables;
- 28) «fidélité»: l'étroitesse de l'accord entre les résultats d'essais indépendants obtenus dans des conditions déterminées, exprimée sous forme d'écart type ou de coefficient de variation des résultats d'essais;
- 29) «méthode qualitative»: méthode d'analyse qui détecte ou identifie une substance ou un groupe de substances sur la base de ses propriétés chimiques, biologiques ou physiques;
- 30) «méthode quantitative»: méthode d'analyse qui détermine la quantité ou la fraction massique d'une substance de manière à pouvoir l'exprimer sous forme de valeur numérique dans les unités appropriées;
- 31) «récupération»: la quantité corrigée de la récupération d'un analyte, divisée par la quantité supplémentée d'analyte dans l'échantillon matriciel, exprimée en pourcentage;
- 32) «correction de récupération»: l'utilisation d'étalons internes, d'une courbe d'étalonnage matricielle, d'un facteur de correction de la récupération ainsi que d'une combinaison de ces approches;
- 33) «matériau de référence»: un matériau, suffisamment homogène et stable en ce qui concerne une ou plusieurs propriétés spécifiées, qui a été établi de manière à convenir à l'usage prévu dans un mesurage ou pour l'examen de propriétés nominales <sup>(19)</sup>;
- 34) «effet de matrice relatif»: la différence de réponse analytique entre un étalon dissous dans le solvant et un étalon avec adaptation matricielle, avec correction à l'aide d'un étalon interne;
- 35) «répétabilité»: la fidélité dans des conditions dans lesquelles les résultats d'essai indépendants sont obtenus par la même méthode, sur des individus d'essai identiques, dans le même laboratoire, par le même opérateur utilisant le même équipement, sur de courts intervalles de temps;
- 36) «reproductibilité»: la fidélité dans des conditions dans lesquelles les résultats d'essais sont obtenus par la même méthode sur des individus d'essai identiques, dans des laboratoires différents, avec des opérateurs différents utilisant des équipements différents <sup>(20)</sup>;
- 37) «robustesse»: la sensibilité d'une méthode d'analyse à des variations des conditions d'expérience dans le cadre desquelles la méthode peut être appliquée telle quelle ou moyennant certaines modifications mineures;
- 38) «méthode de dépistage»: une méthode servant à dépister une substance ou une classe de substances au niveau considéré;
- 39) «concentration cible du dépistage» (STC): la concentration inférieure ou égale à la CC $\beta$  à laquelle une mesure de dépistage classe l'échantillon comme étant potentiellement non conforme et «positif au dépistage», et déclenche un essai de confirmation;
- 40) «sélectivité»: la capacité d'une méthode à distinguer l'analyte mesuré d'autres substances;
- 41) «étude monolaboratoire» ou «validation interne»: une étude analytique impliquant un seul laboratoire utilisant une seule méthode pour analyser des matériaux d'essai identiques ou différents dans des conditions différentes sur des intervalles de temps longs justifiés;

<sup>(19)</sup> Commission du Codex Alimentarius, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation mondiale de la santé, directives sur la terminologie analytique (CAC/GL 72-2009).

<sup>(20)</sup> ISO 5725-1:1994 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure — Partie 1: Principes généraux et définitions (chapitre 3).

- 42) «ajout dosé»: une procédure dans laquelle une fraction de l'échantillon est analysée en l'état et des quantités connues de l'analyte étalon sont ajoutées aux autres fractions à analyser avant l'analyse;
- 43) «analyte étalon»: un analyte dont la teneur et la pureté sont connues et certifiées et qui sert de référence lors de l'analyse;
- 44) «substance»: une matière de composition constante caractérisée par les entités qui la composent et par certaines propriétés physiques;
- 45) «fraction à analyser»: la quantité de matériau prélevée de l'échantillon et qui fait effectivement l'objet de l'analyse ou de l'examen;
- 46) «justesse»: l'étroitesse de l'accord entre la valeur moyenne obtenue à partir d'une large série de résultats d'essai et une valeur de référence acceptée;
- 47) «unités»: les unités décrites dans la norme ISO 80000 <sup>(21)</sup> et dans la directive 80/181/CEE du Conseil <sup>(22)</sup>;
- 48) «validation»: la démonstration par examen et fourniture de preuves réelles que les exigences particulières d'un usage prévu donné sont remplies <sup>(23)</sup>, au moyen d'une étude monolaboratoire ou d'une étude collaborative;
- 49) «reproductibilité intralaboratoire» ou «fidélité intermédiaire/reproductibilité interne»: fidélité de mesure dans un ensemble de conditions intralaboratoires, dans un laboratoire spécifique.

#### Article 3

### Méthodes d'analyse

Les États membres veillent à ce que les échantillons prélevés en application de l'article 34 du règlement (UE) 2017/625 soient analysés à l'aide de méthodes répondant aux exigences suivantes:

- 1) être consignées dans des instructions d'essai, de préférence conformément aux annexes de la norme ISO 78-2:1999 Chimie — Plans de normes — Partie 2: Méthodes d'analyse chimique <sup>(24)</sup>;
- 2) être conformes aux critères de performances et autres exigences applicables aux méthodes d'analyse énoncés à l'annexe I, chapitre 1, du présent règlement;
- 3) avoir été validées conformément aux exigences énoncées à l'annexe I, chapitres 2 et 4, du présent règlement;
- 4) permettre l'application des valeurs de référence fixées dans le règlement (UE) 2019/1871, la détection de la présence de substances interdites et non autorisées et l'application des teneurs maximales (TM) fixées sur la base du règlement (CEE) n° 315/93 et du règlement (CE) n° 124/2009, ainsi que des limites maximales de résidus (LMR) fixées sur la base des règlements (CE) n° 1831/2003 et (CE) n° 470/2009.

#### Article 4

### Contrôle de la qualité

Les États membres veillent à la qualité des résultats des analyses effectuées en application du règlement (UE) 2017/625, notamment en contrôlant les essais ou les résultats d'étalonnage conformément à la norme ISO/IEC 17025:2017 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais, et conformément aux exigences en matière de contrôle de la qualité lors des analyses de routine énoncées à l'annexe I, chapitre 3, du présent règlement.

<sup>(21)</sup> ISO 80000-1:2009 Grandeurs et unités — Partie 1: Généralités (Introduction).

<sup>(22)</sup> Directive 80/181/CEE du Conseil du 20 décembre 1979 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux unités de mesure et abrogeant la directive 71/354/CEE (JO L 39 du 15.2.1980, p. 40).

<sup>(23)</sup> ISO/CEI 17025:2017, Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (chapitre 3).

<sup>(24)</sup> ISO 78-2: 1999 Chimie — Plans de normes — Partie 2: Méthodes d'analyse chimique (Annexes).

*Article 5***Interprétation des résultats**

- 1) Le résultat d'une analyse est considéré comme non conforme lorsqu'il est supérieur ou égal à la limite de décision aux fins de la confirmation (CCa).
- 2) Pour les substances autorisées pour lesquelles une LMR ou une TM a été établie, la limite de décision aux fins de la confirmation (CCa) est la concentration à partir de laquelle il peut être conclu, avec une certitude statistique de valeur numérique  $1 - \alpha$ , que la limite autorisée a été dépassée.
- 3) Pour les substances non autorisées ou interdites ou pour les substances autorisées pour lesquelles aucune LMR ou TM n'a été établie chez une espèce ou dans un produit spécifique, la limite de décision aux fins de la confirmation (CCa) est le niveau de concentration le plus faible auquel il peut être conclu, avec une certitude statistique de valeur numérique  $1 - \alpha$ , que l'analyte en question est présent.
- 4) Pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées ou interdites, l'erreur  $\alpha$  est inférieure ou égale à 1 %. Pour toutes les autres substances, l'erreur  $\alpha$  est inférieure ou égale à 5 %.

*Article 6***Méthodes d'échantillonnage**

Les États membres veillent à ce que les échantillons soient prélevés, manipulés et étiquetés conformément aux modalités d'échantillonnage énoncées à l'annexe II du présent règlement.

*Article 7***Abrogations et mesures transitoires**

Les décisions 2002/657/CE et 98/179/CE sont abrogées à compter de la date d'entrée en vigueur du présent règlement.

Toutefois, jusqu'au 10 juin 2026, les exigences énoncées à l'annexe I, points 2 et 3, de la décision 2002/657/CE continuent de s'appliquer aux méthodes qui ont été validées avant la date d'entrée en vigueur du présent règlement.

*Article 8***Entrée en vigueur**

Le présent règlement entre en vigueur le vingtième jour suivant celui de sa publication au *Journal officiel de l'Union européenne*.

Le présent règlement est obligatoire dans tous ses éléments et directement applicable dans tout État membre.

Fait à Bruxelles, le 22 mars 2021.

*Par la Commission*  
*La présidente*  
Ursula VON DER LEYEN

## ANNEXE I

## CHAPITRE 1

**CRITÈRES DE PERFORMANCES ET AUTRES EXIGENCES APPLICABLES AUX MÉTHODES D'ANALYSE****1.1. Exigences applicables aux méthodes de dépistage****1.1.1. Catégories de méthodes de dépistage appropriées**

Des méthodes qualitatives, semi-quantitatives ou quantitatives sont utilisées comme méthodes de dépistage.

**1.1.2. Exigences applicables aux méthodes de dépistage biologique, biochimique ou physico-chimique**

Pour les substances interdites ou non autorisées, la  $CC\beta$  doit être aussi faible que raisonnablement possible et, en tout état de cause, inférieure à la valeur de référence (VR), pour les substances pour lesquelles de telles valeurs sont établies en vertu du règlement (UE) 2019/1871.

Pour les substances pharmacologiquement actives autorisées, la  $CC\beta$  doit être inférieure à la LMR ou à la TM.

Seules les méthodes d'analyse dont on peut démontrer, sur la base de preuves identifiables, qu'elles sont validées et présentent un taux de faux conformes inférieur ou égal à 5 % (erreur  $\beta$ ) doivent être appliquées aux fins du dépistage. En cas de suspicion de résultat non conforme, ledit résultat doit être confirmé par une méthode de confirmation.

Les méthodes de dépistage quantitatives utilisées à la fois pour le dépistage et pour la confirmation doivent satisfaire aux exigences en matière d'exactitude, d'intervalle et de fidélité décrites aux points 1.2.2.1 et 1.2.2.2.

**1.2. Exigences applicables aux méthodes de confirmation****1.2.1. Exigences générales applicables aux méthodes de confirmation**

Pour les substances interdites ou non autorisées, la  $CC\alpha$  doit être aussi faible que raisonnablement possible. Pour les substances interdites ou non autorisées pour lesquelles une VR est établie en vertu du règlement (UE) 2019/1871, la  $CC\alpha$  doit être inférieure ou égale à ladite valeur de référence.

Pour les substances autorisées, la  $CC\alpha$  doit être supérieure à la LMR ou à la TM, tout en étant aussi proche que possible.

Aux fins de la confirmation, seules sont utilisées des méthodes d'analyse dont on peut démontrer, sur la base de preuves identifiables, qu'elles sont validées et présentent un taux de faux non conformes (erreur  $\alpha$ ) inférieur ou égal à 1 % pour les substances interdites ou non autorisées, ou inférieur ou égal à 5 % pour les substances autorisées.

Les méthodes de confirmation doivent fournir des indications sur la composition chimique structurale de l'analyte. Par conséquent, les méthodes de confirmation fondées uniquement sur l'analyse chromatographique et ne prévoyant pas l'utilisation d'une détection par spectrométrie de masse ne conviennent pas à elles seules comme méthodes de confirmation pour les substances pharmacologiquement actives interdites ou non autorisées. Dans le cas où la spectrométrie de masse ne convient pas à des substances autorisées, d'autres méthodes telles que la CLHP-DAD, la CLHP-DFL, ou une combinaison de ces méthodes, peuvent être appliquées.

Lorsque la méthode de confirmation l'exige, un étalon interne approprié est ajouté à la fraction à analyser au début de l'extraction. En fonction des disponibilités, il y a lieu d'utiliser soit des formes de l'analyte marquées d'un isotope stable qui conviennent particulièrement à la détection par spectrométrie de masse, soit des composés analogues fortement apparentés structurellement à l'analyte. S'il n'est pas possible d'utiliser un étalon interne approprié, l'identification de l'analyte est de préférence confirmée par cochromatographie<sup>(1)</sup>. Dans ce cas, un seul pic doit être obtenu, l'augmentation de la hauteur (ou aire) du pic correspondant à la quantité d'analyte ajoutée. Si cela n'est pas réalisable, il convient d'utiliser des étalons avec adaptation matricielle ou avec supplémentation matricielle.

<sup>(1)</sup> La cochromatographie est une méthode dans laquelle l'échantillon extrait à tester avant la ou les étapes chromatographiques est divisé en deux fractions. Une fraction fait l'objet d'une chromatographie en l'état. La deuxième fraction est mélangée avec l'analyte étalon à mesurer. Ce mélange est ensuite chromatographié. La quantité d'analyte étalon ajoutée doit être comparable à la quantité estimée de l'analyte contenue dans l'extrait. L'utilisation de la cochromatographie vise à améliorer l'identification d'un analyte par des méthodes chromatographiques, en particulier lorsqu'il est impossible d'utiliser un étalon interne approprié.

### 1.2.2. Critères de performances généraux applicables aux méthodes de confirmation

#### 1.2.2.1. Justesse par récupération

Pour les analyses répétées d'un matériau de référence certifié, l'écart entre, d'une part, la fraction massique moyenne corrigée de la récupération déterminée expérimentalement et, d'autre part, la valeur certifiée doit être conforme aux intervalles de justesse minimale présentés dans le tableau 1.

Tableau 1

#### Justesse minimale des méthodes quantitatives

Fraction massique	Fourchette
≤ 1 µg/kg	-50 % à +20 %
> 1 µg/kg à 10 µg/kg	-30 % à +20 %
≥ 10 µg/kg	-20 % à +20 %

Lorsque aucun matériau de référence certifié n'est disponible, on peut admettre que la justesse des mesures soit évaluée d'une autre manière, par exemple à l'aide de matériaux disposant de valeurs assignées provenant d'études interlaboratoires ou par ajout de quantités connues du ou des analytes à un blanc de matrice.

#### 1.2.2.2. Fidélité

Le coefficient de variation (CV) pour l'analyse répétée d'un matériau de référence ou supplémenté dans des conditions de reproductibilité intralaboratoire ne doit pas dépasser le niveau calculé par l'équation d'Horwitz. Cette équation s'énonce comme suit:

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

où C représente la fraction de la masse exprimée en puissances (exposant) de 10 (par exemple 1 mg/g = 10<sup>-3</sup>). Pour les fractions massiques inférieures à 120 µg/kg, l'application de l'équation d'Horwitz résulte en des valeurs inacceptables car trop élevées. Par conséquent, le coefficient de variation maximal autorisé ne doit pas être supérieur aux valeurs présentées dans le tableau 2.

Tableau 2

#### Coefficient de variation acceptable

Fraction massique	CV en conditions de reproductibilité (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adapté de l'équation d'Horwitz)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (adapté de l'équation d'Horwitz)
10 – 120 µg/kg	25 *
< 10 µg/kg	30 *

\* Ce CV (%) est fourni à titre d'orientation et devrait être aussi faible que raisonnablement possible.

Pour les analyses effectuées dans des conditions de répétabilité, le coefficient de variation en conditions de répétabilité doit être égal ou inférieur aux deux tiers des valeurs indiquées dans le tableau 2.

#### 1.2.3. Exigences applicables à la séparation chromatographique

Pour les chromatographies liquide (CL) ou en phase gazeuse (CG), le temps de rétention minimal admissible pour l'analyte ou les analytes étudiés doit être de deux fois le temps de rétention correspondant au volume vide de la colonne. Le temps de rétention de l'analyte dans l'extrait doit correspondre à celui de l'étalon, d'un étalon avec adaptation matricielle ou d'un étalon avec supplémentation matricielle, avec une tolérance de ± 0,1 minute. Pour la chromatographie rapide, lorsque le temps de rétention est inférieur à 2 minutes, un écart de moins de 5 % du temps de rétention est admissible. En cas d'utilisation d'un étalon interne, le rapport entre le temps de rétention

chromatographique de l'analyte et celui de l'étalon interne, c'est-à-dire le temps de rétention relatif de l'analyte, doit correspondre à celui de l'étalon, de l'étalon avec adaptation matricielle ou de l'étalon avec supplémentation matricielle, avec un écart maximal de 0,5 % pour la chromatographie en phase gazeuse et de 1 % pour la chromatographie liquide pour les méthodes validées à partir de la date d'entrée en vigueur du présent règlement.

#### 1.2.4. Critères de performances spécifiques applicables à la spectrométrie de masse

##### 1.2.4.1. Détection par spectrométrie de masse

Il convient d'effectuer la détection par spectrométrie de masse en recourant à l'une des options suivantes:

1. enregistrement des spectres de masse complets (balayage complet ou full scan);
2. mesure d'ions sélectionnés (Selected Ion Monitoring, SIM);
3. techniques de spectrométrie de masse en série ( $MS^n$ ) telles que la mesure de réactions sélectionnées (Selected Reaction Monitoring, SRM);
4. une combinaison de techniques de spectrométrie de masse (SM) ou de spectrométrie de masse en série ( $MS^n$ ) associées aux modes d'ionisation appropriés.

La spectrométrie de masse à basse résolution (SMBR, à la résolution de masse unitaire) comme la spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR), notamment les secteurs à double focalisation, les instruments à temps de vol (TOF) et les instruments Orbitrap, sont acceptés.

Pour confirmer l'identité d'un analyte en spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR), l'écart de masse de tous les ions diagnostiques doit être inférieur à 5 ppm (ou, si  $m/z < 200$ , inférieur à 1 mDa). Sur cette base, la résolution effective devrait être choisie pour être adaptée à l'usage prévu, la résolution devant généralement être supérieure à 10 000 pour toute la plage de masse avec une vallée de 10 %, ou 20 000 de largeur à mi-hauteur (LMH).

Lorsque la détermination par spectrométrie de masse est effectuée par enregistrement de spectres complets (SMBR et SMHR), seuls les ions diagnostiques ayant une intensité relative supérieure à 10 % dans le spectre de référence de l'étalon, de l'étalon avec adaptation matricielle ou des étalons avec supplémentation matricielle sont acceptables. Les ions diagnostiques doivent inclure l'ion moléculaire (s'il est présent à une intensité  $\geq 10$  % du pic de base) et des ions fragments ou produits caractéristiques.

Sélection d'ions précurseurs: Lorsque la détermination par spectrométrie de masse est effectuée par fragmentation après sélection d'ions précurseurs, cette sélection est effectuée à la résolution de masse unitaire ou à une meilleure résolution. L'ion précurseur sélectionné doit être l'ion moléculaire, les adduits caractéristiques de l'ion moléculaire, les ions produits caractéristiques ou l'un de leurs ions isotopes. Si la sélection du précurseur comporte une fenêtre de sélection de masse de plus d'un Dalton (par exemple, dans le cas d'une acquisition indépendante de données), la technique est considérée comme une analyse de confirmation par balayage complet.

Ions fragments et produits: Les ions fragments ou produits sélectionnés doivent être des fragments diagnostiques de l'analyte ou du produit mesuré. Les transitions non sélectives (par exemple le cation tropylium ou la perte d'eau) sont omises dans la mesure du possible. L'abondance des ions diagnostiques est déterminée à partir de l'aire ou de la hauteur de pic des chromatogrammes d'ions extraits intégrés. Cette règle s'applique également lorsque des mesures par balayage complet sont utilisées pour l'identification. Le rapport signal-bruit (S/N) de tous les ions diagnostiques doit être supérieur ou égal à trois pour un (3:1).

Intensités relatives: Les intensités relatives des ions diagnostiques (rapport ionique) sont exprimées en pourcentage de l'intensité de l'ion le plus abondant ou de la transition la plus abondante. Il convient de déterminer le rapport ionique en comparant les spectres ou en intégrant les signaux des traces de masse des ions extraits. Le rapport ionique de l'analyte à confirmer doit correspondre à celui des étalons avec adaptation matricielle, des étalons avec supplémentation matricielle ou des solutions étalons à des concentrations comparables, mesuré dans les mêmes conditions, avec un écart relatif de  $\pm 40$  %.

Pour toute analyse par spectrométrie de masse, au moins un rapport ionique doit être déterminé. Il concerne de préférence des ions obtenus dans un même balayage, ou éventuellement dans différents balayages relatifs à une même injection (c'est-à-dire balayage complet et balayage de fragmentation).

## 1.2.4.2. Identification

Un système de points d'identification est utilisé pour sélectionner les modes d'acquisition et les critères d'évaluation adéquats. Pour confirmer l'identité d'une substance dans une matrice pour laquelle une LMR est établie (usage autorisé), un minimum de quatre points d'identification est requis. Pour les substances non autorisées ou interdites, cinq points d'identification sont requis. Un point peut être obtenu pour la séparation chromatographique. Le tableau 3 indique le nombre de points d'identification que permet d'obtenir chacune des techniques. Des points d'identification obtenus avec des techniques différentes peuvent être additionnés pour atteindre le nombre de points requis pour la confirmation.

1. Toutes les analyses spectrométriques de masse doivent être couplées à une technique de séparation montrant une capacité de séparation et une sélectivité suffisantes pour l'application en question. Les techniques de séparation appropriées sont, entre autres, la chromatographie liquide (CL) et en phase gazeuse (CG), l'électrophorèse capillaire (EC) et la chromatographie en phase supercritique (CPS). Dans le cas d'un analyte présentant un quelconque composé isobare ou isomère, l'acceptabilité du temps de rétention (c'est-à-dire  $\pm 0,5$  % en CG et  $\pm 1$  % en CL et en CPS) est obligatoire pour confirmer son identité.
2. Trois techniques distinctes au maximum peuvent être associées pour obtenir le nombre minimal de points d'identification.
3. Des modes d'ionisation différents [par exemple, ionisation électronique (EI) et ionisation chimique (CI)] sont considérés comme des techniques différentes.

Tableau 3

**Points d'identification par technique**

Technique	Points d'identification
Séparation (par CG, CL, CPS, EC)	1
Ion SM-BR	1
Sélection d'ions précurseurs à une plage de masse $< \pm 0,5$ Da	1 (indirect)
Ion produit MS <sup>n</sup> -BR	1,5
Ion SM-HR	1,5
Ion produit MS <sup>n</sup> -HR	2,5

Tableau 4

**Exemples de nombre de points d'identification obtenus pour des techniques et couplages de techniques spécifiques (n = nombre entier)**

Technique(s)	Séparation	Nombre d'ions	Points d'identification
CG-SM (EI ou CI)	CG	n	1 + n
CG-SM (EI et CI)	CG	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
CG-SM (EI ou CI) 2 dérivations	CG	2 (dérivé A) + 2 (dérivé B)	1 + 4 = 5
CL-SM	CL	n (SM)	1 + n
CG- ou CL-MS/MS	CG ou CL	1 précurseur + 2 produits	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
CG- ou CL-MS/MS	CG ou CL	2 précurseurs + 2 produits	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
CG- ou CL-MS <sup>3</sup>	CG ou CL	1 précurseur + 1 produit MS <sup>2</sup> + 1 produit MS <sup>3</sup>	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
CG- ou CL-SMHR	CG ou CL	n	1 + n × 1,5

CG- ou CL-SMHR/SM	CG ou CL	1 précurseur (plage de masse $< \pm 0,5$ Da) + 1 produit	$1 + 1 + 2,5 = 4,5$
CG- ou CL-SMHR et SMHR/SM	CG ou CL	1 ion de balayage complet + 1 ion produit SMHR <sup>a</sup>	$1 + 1,5 + 2,5 = 5$
CG- et CL-SM	CG et CL	2 ions (CGSM) + 1 ion (CLSM)	$1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6$

<sup>a</sup> Aucun point d'identification supplémentaire n'est obtenu pour la sélection des ions précurseurs si ce précurseur est le même ion (ou un adduit ou un isotope) que l'ion SMHR étudié en balayage complet.

1.2.5. *Critères de performances spécifiques applicables à la détermination d'un analyte par chromatographie liquide associée à des techniques de détection autres que la spectrométrie de masse*

Pour les substances autorisées uniquement, les techniques suivantes peuvent être utilisées comme solution de remplacement aux méthodes fondées sur la spectrométrie de masse, pour autant que les critères applicables à ces techniques soient remplis:

1. spectrophotométrie avec détection par barrettes de diodes (DAD) en balayage complet, couplée à la CLHP;
2. spectrophotométrie avec détecteur fluorimétrique (DFL), couplée à la CLHP.

La chromatographie liquide avec détection UV/VIS (longueur d'onde unique) ne convient pas à elle seule comme méthode de confirmation.

1.2.5.1. Critères de performances applicables à la spectrophotométrie à réseau de diodes en balayage complet

Les critères de performances applicables à la séparation chromatographique visés au point 1.2.3 doivent être remplis.

Les longueurs d'onde d'absorption maximales de l'analyte dans le spectre UV doivent être identiques à celles de l'étalon dans la matrice avec une marge maximale déterminée par la résolution du système de détection. Pour la détection par barrettes de diodes, cette marge maximale est généralement de  $\pm 2$  nm. Pour les parties des deux spectres dont l'absorbance relative est supérieure ou égale à 10 %, le spectre de l'analyte au-dessus de 220 nm ne doit pas être différent visuellement du spectre de l'étalon. Ce critère est rempli lorsque, d'une part, les mêmes maxima sont présents et, d'autre part, lorsque la différence des deux spectres n'est en aucun point supérieure à 10 % de l'absorbance de l'étalon. En cas de recherche et de comparaison en bibliothèque assistée par ordinateur, la comparaison des données spectrales des échantillons officiels avec celles de la solution d'étalonnage doit dépasser un facteur de correspondance critique. Ce facteur est déterminé au cours de la procédure de validation pour chaque analyte sur la base des spectres pour lesquels les critères ci-dessus sont remplis. La variabilité des spectres induite par la matrice d'échantillonnage et les performances du détecteur doit être vérifiée.

1.2.5.2. Critères de performance pour la spectrophotométrie avec détecteur fluorimétrique

Les critères de performances applicables à la séparation chromatographique visés au point 1.2.3 doivent être remplis.

La sélection des longueurs d'onde d'excitation et d'émission associées aux conditions chromatographiques doit être effectuée de manière à réduire à un minimum les effets des composants interférents dans les extraits de blancs. Il devrait y avoir un minimum de 50 nanomètres entre la longueur d'onde d'excitation et la longueur d'onde d'émission.

Le maximum du pic le plus proche dans le chromatogramme doit être séparé du pic de l'analyte désigné par au moins une largeur totale de pic à 10 % de la hauteur maximale du pic de l'analyte.

Cela s'applique aux molécules ayant une fluorescence naturelle et aux molécules qui présentent une fluorescence après la transformation ou la dérivation.

## CHAPITRE 2

## VALIDATION

## 2.1. Détermination des caractéristiques de performances des méthodes d'analyse

La validation d'une méthode d'analyse doit démontrer que cette dernière est conforme aux critères applicables pour les caractéristiques de performances correspondantes. Des objectifs de contrôle différents exigent des catégories de méthodes différentes. Le tableau 5 détermine quelle caractéristique de performance doit être vérifiée pour quel type de méthode; une explication complémentaire de chaque paramètre est donnée dans le présent chapitre.

Tableau 5

## Classification des méthodes d'analyse par caractéristique de performance à déterminer

Méthode	Confirmation		Dépistage		
	Qualitative	Quantitative	Qualitatif	Semi-quantitatif	Quantitatif
Substances	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identification conformément au point 1.2	x	x			
CC $\alpha$	x	x			
CC $\beta$	-		x	x	x
Justesse		x			x
Fidélité		x		(x)	x
Effet de matrice relatif/rendement absolu *		x			x
Sélectivité/Spécificité		x	x	x	x
Stabilité #		x	x	x	x
Robustesse		x	x	x	x

x: Il est nécessaire de prouver, au moyen de la validation, que les exigences relatives à la caractéristique de performance sont remplies.

(x) Il n'est pas nécessaire de satisfaire aux exigences de fidélité visées au point 1.2.2.2 pour les méthodes de dépistage semi-quantitatives. Toutefois, la fidélité doit être déterminée pour démontrer que la méthode est adéquate pour éviter les résultats d'analyse faussement conformes.

A: substances interdites ou non autorisées

B: substances autorisées

# Si les données relatives à la stabilité des analytes dans une matrice sont disponibles dans la littérature scientifique ou auprès d'un autre laboratoire, il n'est pas nécessaire que ces données soient à nouveau déterminées par le laboratoire concerné. Toutefois, un renvoi aux données disponibles en matière de stabilité des analytes en solution n'est acceptable que si des conditions identiques sont appliquées.

\* Pertinent pour les méthodes de SM utilisées pour démontrer, au moyen de la validation, que les exigences relatives aux caractéristiques de performances sont remplies. L'effet de matrice relatif de la méthode doit être déterminé lorsque cet effet n'a pas été évalué au cours de la procédure de validation. Le rendement absolu de la méthode est déterminé lorsque aucun étalon interne ou aucun étalonnage avec supplémentation matricielle n'est utilisé.

## 2.2. Justesse, répétabilité et reproductibilité intralaboratoire

Le présent point contient des exemples et des références concernant les procédures de validation. D'autres approches peuvent être utilisées pour démontrer que la méthode répond aux critères de performances pour autant qu'elles fournissent un niveau et une qualité d'information équivalents.

### 2.2.1. Validation classique

Le calcul des paramètres selon les méthodes classiques exige de réaliser plusieurs expériences. Chaque caractéristique de performance doit être déterminée pour chaque variation importante (voir point 2.4). Pour les méthodes multianalytes, plusieurs analytes peuvent être analysés simultanément pour autant que les éventuelles interférences non négligeables aient été écartées. Plusieurs caractéristiques de performances peuvent être déterminées de la même manière. Par conséquent, pour réduire la charge de travail, il est recommandé de combiner autant que possible les expériences (par exemple répétabilité et reproductibilité intralaboratoire avec spécificité, analyse des blancs pour déterminer la limite de décision aux fins de la confirmation et essai de spécificité).

#### 2.2.1.1. Justesse sur la base d'un matériau de référence certifié

Il est préférable de déterminer la justesse d'une méthode d'analyse au moyen d'un matériau de référence certifié (MRC). La procédure à cet égard est décrite dans la norme ISO 5725-4:1994 <sup>(2)</sup>.

En voici un exemple:

1. Analyser 6 réplicats du MRC conformément aux instructions d'essai applicables à la méthode.
2. Déterminer la concentration de l'analyte présente dans chaque échantillon des réplicats.
3. Calculer la moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) pour ces six réplicats.
4. Calculer la justesse en divisant la concentration moyenne détectée par la valeur certifiée (mesurée en concentration) et multiplier par 100 pour exprimer le résultat en pourcentage.

Justesse (%) = concentration moyenne détectée corrigée de la récupération × 100/valeur certifiée

#### 2.2.1.2. Justesse sur la base d'échantillons supplémentés

Si aucun matériau de référence certifié n'est disponible, la justesse de la méthode doit être déterminée par des expériences utilisant un blanc de matrice supplémenté, suivant a minima le schéma suivant:

1. Pour les méthodes validées à partir de la date d'entrée en vigueur du présent règlement, sélectionner le blanc de matériau et le supplémenter à une concentration de:
  - a) 0,5 <sup>(3)</sup>, 1,0 et 1,5 fois la VR; ou
  - b) 0,1 <sup>(4)</sup>, 1,0 et 1,5 fois la LMR ou la TM pour les substances autorisées; ou
  - c) 1,0, 2,0 et 3,0 fois le LCL pour les substances non autorisées (pour lesquelles aucune VR n'a été établie).
2. À chaque niveau, l'analyse doit être réalisée avec six réplicats.
3. Analyser les échantillons.
4. Calculer la concentration détectée dans chaque échantillon.
5. Calculer la justesse pour chaque échantillon à l'aide de l'équation ci-dessous, puis calculer la justesse moyenne et le coefficient de variation moyen pour les six résultats à chaque niveau de concentration.

Justesse (%) = concentration moyenne détectée corrigée de la récupération × 100/niveau d'enrichissement

Pour les méthodes appliquées aux substances autorisées validées avant la date d'application du présent règlement, il suffit de déterminer la justesse de la méthode à l'aide de 6 aliquotes supplémentées à 0,5, 1,0 et 1,5 fois la LMR ou la TM.

<sup>(2)</sup> ISO 5725-4:2020 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 4: Méthodes de base pour la détermination de la justesse d'une méthode de mesure normalisée (Chapitre 3).

<sup>(3)</sup> Lorsque, pour une substance pharmacologiquement active non autorisée, la validation d'une concentration de 0,5 fois la VR n'est pas raisonnablement possible, cette valeur peut être remplacée par la concentration la plus faible, comprise entre 0,5 et 1,0 fois la VR, que l'on peut raisonnablement atteindre.

<sup>(4)</sup> Lorsque, pour une substance pharmacologiquement active spécifique, la validation d'une concentration de 0,1 fois la LMR n'est pas raisonnablement possible, cette valeur peut être remplacée par la concentration la plus faible, comprise entre 0,1 et 0,5 fois la LMR, que l'on peut raisonnablement atteindre.

### 2.2.1.3. Répétabilité

1. Pour les méthodes validées à partir de la date d'entrée en vigueur du présent règlement, un ensemble d'échantillons de blancs de matrices identiques de la même espèce doit être préparé. Ils doivent être supplémentés avec l'analyte de manière à obtenir des concentrations équivalentes à:
  - a) 0,5 <sup>(5)</sup>, 1,0 et 1,5 fois la VR, ou
  - b) 0,1 <sup>(6)</sup>, 1,0 et 1,5 fois la LMR ou la TM pour les substances autorisées, ou
  - c) 1,0, 2,0 et 3,0 fois le LCL pour les substances non autorisées ou interdites si aucune VR n'est applicable.
2. À chaque niveau, l'analyse doit être réalisée avec six réplicats au minimum.
3. Analyser les échantillons.
4. Calculer la concentration détectée dans chaque échantillon.
5. Calculer la concentration moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) des échantillons supplémentés.
6. Répéter ces opérations en deux autres occasions au minimum.
7. Calculer la moyenne globale des concentrations, des écarts types (en calculant la moyenne de l'écart type au carré entre les différentes exécutions, puis en en prenant la racine carrée) et des coefficients de variation pour les échantillons supplémentés.

Pour les méthodes validées avant la date d'entrée en vigueur du présent règlement qui sont appliquées aux substances autorisées, il suffit de déterminer la répétabilité à l'aide de matrices supplémentées à des concentrations de 0,5, 1,0 et 1,5 fois la LMR ou la TM.

Le calcul de la répétabilité peut également être effectué conformément à la norme ISO 5725-2:2019 <sup>(7)</sup>.

### 2.2.1.4. Reproductibilité intralaboratoire

1. Pour les validations effectuées après la date d'entrée en vigueur du présent règlement, préparer un ensemble d'échantillons du matériau d'essai spécifié (matrices identiques ou différentes), supplémenté avec le ou les analytes de manière à obtenir des concentrations équivalentes à:
  - a) 0,5<sup>(5)</sup>, 1,0 et 1,5 fois la VR, ou
  - b) 0,1<sup>(6)</sup>, 1,0 et 1,5 fois la LMR ou la TM pour les substances autorisées, ou
  - c) 1,0, 2,0 et 3,0 fois le LCL pour les substances non autorisées ou interdites si aucune VR n'est applicable.
2. Effectuer l'analyse à chaque niveau de concentration avec au moins six réplicats de blanc de matériau.
3. Analyser les échantillons.
4. Calculer la concentration détectée dans chaque échantillon.

<sup>(5)</sup> Lorsque, pour une substance pharmacologiquement active non autorisée, la validation d'une concentration de 0,5 fois la VR n'est pas raisonnablement possible, cette valeur peut être remplacée par la concentration la plus faible comprise, entre 0,5 et 1,0 fois la VR, que l'on peut raisonnablement atteindre.

<sup>(6)</sup> Lorsque, pour une substance pharmacologiquement active spécifique, la validation d'une concentration de 0,1 fois la LMR n'est pas raisonnablement possible, cette valeur peut être remplacée par la concentration la plus faible, comprise entre 0,1 et 0,5 fois la LMR, que l'on peut raisonnablement atteindre.

<sup>(7)</sup> ISO 5725-2:2019 Exactitude (justesse et fidélité) des résultats et méthodes de mesure – Partie 2: Méthode de base pour la détermination de la répétabilité et de la reproductibilité d'une méthode de mesure normalisée (Chapitre 3).

5. Répéter ces opérations à deux autres occasions au moins, sur différents lots de blanc, avec des opérateurs différents et autant d'environnements différents que possible, par exemple, des lots différents de réactifs, de solvants, des températures ambiantes différentes, des instruments différents ou une variation d'autres paramètres.
6. Déterminer la concentration moyenne, l'écart type et le coefficient de variation (%) des échantillons supplémentés.

Pour les méthodes validées avant la date d'entrée en vigueur du présent règlement qui sont appliquées aux substances autorisées, il suffit de déterminer la reproductibilité intralaboratoire à l'aide de matrices supplémentées à des concentrations de 0,5, 1,0 et 1,5 fois la LMR ou la TM.

Le calcul de la reproductibilité intralaboratoire/de la fidélité intermédiaire peut également être effectué conformément aux normes ISO 5725-2:2019, ISO 11843-1:1997 <sup>(8)</sup>, et aux directives Codex CAC/GL 59-2006 <sup>(9)</sup>.

### 2.2.2. Validation sur la base d'autres modèles

Le calcul des paramètres sur la base d'autres modèles exige d'exécuter un plan d'expérience. Le plan d'expérience doit être établi en fonction du nombre d'espèces et de facteurs différents à étudier. Par conséquent, la première étape de la procédure de validation consiste à examiner les populations d'échantillons qui seront ensuite analysées en laboratoire de manière à déterminer les espèces les plus importantes et les facteurs susceptibles d'influer sur les résultats de mesure. L'approche factorielle permet d'évaluer l'incertitude de mesure des résultats d'essai obtenus dans diverses conditions d'essai dans un laboratoire donné, tels que des analystes différents, des instruments différents, des lots de réactifs différents, des matrices différentes, des durées d'essai et des températures d'essai différentes. Par la suite, la plage de concentration doit être choisie d'une manière adaptée à sa finalité en fonction de la LMR ou de la TM, pour les substances autorisées, ou en fonction de la VR ou du LCL, pour les substances interdites ou non autorisées.

L'approche factorielle vise à établir des données de fidélité et des données de mesure fiables lors de la variation simultanée et contrôlée des facteurs sélectionnés. Elle permet d'évaluer l'incidence combinée des effets factoriels et des effets aléatoires. Le plan d'expérience permet également d'étudier la robustesse <sup>(10)</sup> de la méthode d'analyse et de déterminer l'écart type de reproductibilité interne entre les matrices.

Un exemple de méthode de remplacement s'appuyant sur un plan d'expérience orthogonal est présenté ci-après.

Il est possible d'examiner jusqu'à sept facteurs (facteurs de bruit). L'étude est conçue de manière que la fidélité, la justesse (sur la base d'échantillons supplémentés), la sensibilité, l'incertitude de mesure et les concentrations critiques puissent être déterminées simultanément par la mise en œuvre du plan d'expérience.

Tableau 6

#### Exemple de plan d'expérience orthogonal incluant 7 facteurs (I – VII) variant sur deux niveaux (A/B) dans une étude de validation à huit essais (combinaison factorielle)

Facteur	I	II	III	IV	V	VI	VII
Essai 01	A	A	A	A	A	A	A
Essai 02	A	A	B	A	B	B	B
Essai 03	A	B	A	B	A	B	B
Essai 04	A	B	B	B	B	A	A

<sup>(8)</sup> ISO 11843-1:1997 Capacité de détection – Partie 1: Termes et définitions.

<sup>(9)</sup> Commission du Codex Alimentarius, Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture/Organisation mondiale de la santé, directives pour l'estimation de l'incertitude des résultats (CAC/GL 59-2006).

<sup>(10)</sup> Les variations de conditions expérimentales qui y sont mentionnées peuvent porter sur les matériaux échantillonnés, les analytes, les conditions d'entreposage, l'environnement et/ou la préparation de l'échantillon. Pour toutes les conditions d'expérience qui, dans la pratique, sont sujettes à des variations (par exemple: stabilité des réactifs, composition de l'échantillon, pH, température), toutes les variations pouvant influencer le résultat de l'analyse doivent être indiquées.

Essai 05	B	A	A	B	B	A	B
Essai 06	B	A	B	B	A	B	A
Essai 07	B	B	A	A	B	B	A
Essai 08	B	B	B	A	A	A	B

Le calcul des caractéristiques de la méthode doit être effectué selon la description de Jülicher et al. <sup>(1)</sup>.

### 2.2.3. *Autres approches de validation*

D'autres approches peuvent être utilisées pour démontrer que la méthode répond aux critères de performances applicables aux caractéristiques de performances, pour autant qu'elles fournissent un niveau et une qualité d'information équivalents. On peut aussi effectuer la validation en procédant à une étude interlaboratoire telle que définie par le Codex alimentarius, l'ISO ou l'IUPAC <sup>(12)</sup>, ou par d'autres méthodes telles que des études monolaboratoires ou une validation interne <sup>(13)</sup>. Lorsque d'autres méthodes de validation sont appliquées, il y a lieu de définir le modèle et la stratégie de base avec les prérequis, les hypothèses et les formules correspondantes dans le protocole de validation ou au moins d'en indiquer les références.

### 2.3. **Sélectivité/Spécificité**

La capacité de discrimination entre l'analyte et des substances proches doit être déterminée dans toute la mesure du possible. Il convient de déterminer les interférences d'homologues, d'isomères, de produits de dégradation, de substances endogènes, d'analogues, de métabolites du résidu considéré, de composés matriciels ou de toute autre substance potentiellement interférente et, si nécessaire, de modifier la méthode appliquée pour éviter les interférences recensées. Afin de déterminer la spécificité de la méthode, l'approche suivante est utilisée:

1. Sélectionner une série de composés chimiquement apparentés ou d'autres substances susceptibles d'être rencontrés avec le composé étudié et pouvant être présents dans les échantillons, et vérifier s'ils peuvent interférer avec l'analyse du ou des analyte(s) cible(s).
2. Analyser un nombre approprié de blancs d'échantillons représentatifs, par exemple des lots différents ou des lots provenant de différentes espèces animales ( $n \geq 20$ ) et contrôler la présence d'interférences sous forme de signaux, de pics ou de traces d'ions dans la zone concernée où l'analyte cible est supposé élué.
3. Supplémenter des blancs d'échantillons représentatifs à une concentration pertinente avec des substances susceptibles d'interférer avec l'identification et/ou la quantification de l'analyte et vérifier si la substance ajoutée:
  - a) peut entraîner une fausse identification;
  - b) entrave l'identification de l'analyte cible;
  - c) influence la quantification de façon notable.

### 2.4. **Robustesse**

La méthode d'analyse doit être soumise à des essais visant à déterminer si ses performances sont maintenues dans des conditions expérimentales différentes, pouvant inclure notamment des conditions d'échantillonnage différentes et des variations mineures susceptibles de survenir lors des essais de routine. Pour tester la robustesse de la méthode, les variations introduites dans les conditions expérimentales doivent être mineures. L'importance de ces variations doit être évaluée. Chaque caractéristique de performance doit être déterminée pour toutes les variations mineures pour lesquelles un effet notable sur les performances de l'essai a été démontré.

<sup>(1)</sup> Jülicher, B., Gowik, P. et Uhlig, S. (1998), Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 120, 173.

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

<sup>(13)</sup> Gowik, P., Jülicher, B. et 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.

## 2.5. Stabilité

La stabilité de l'étalon, de l'étalon avec adaptation matricielle et/ou des étalons avec supplémentation matricielle ainsi que de l'analyte ou des constituants de la matrice de l'échantillon pendant l'entreposage ou l'analyse doit être déterminée, car les instabilités peuvent influencer les résultats des essais.

Généralement, la stabilité de l'analyte est bien caractérisée dans différentes conditions d'entreposage. Les expériences réalisées pour contrôler les conditions d'entreposage des étalons et des échantillons, qui sont réalisées dans le cadre du système normal d'accréditation et de contrôle de la qualité des laboratoires, peuvent fournir les informations requises. Si des données de stabilité sont disponibles pour les analytes de la matrice (par exemple sur la base des informations des LRUE, des données publiées, etc.), il n'est pas nécessaire que ces données soient déterminées par chaque laboratoire. Toutefois, le renvoi aux données disponibles en matière de stabilité des analytes en solution et dans la matrice n'est acceptable que si des conditions identiques sont appliquées.

Si les données de stabilité requises ne sont pas disponibles, les approches suivantes devraient être appliquées.

### 2.5.1. Détermination de la stabilité de l'analyte en solution

1. Préparer des solutions de base fraîches du ou des analytes et diluer conformément aux instructions d'essai pour obtenir des aliquotes en nombre suffisant (par exemple: quarante) de chaque concentration sélectionnée. Des échantillons seront préparés avec:
  - a) des solutions de l'analyte utilisées pour la supplémentation;
  - b) des solutions d'analyte utilisées pour l'analyse finale;
  - c) toute autre solution présentant un intérêt (par exemple, des étalons dérivés).
2. Mesurer la teneur en analyte dans la solution fraîchement préparée conformément aux instructions d'essai.
3. Verser des volumes adéquats dans des récipients adaptés, étiqueter et entreposer aux conditions de luminosité et de température prévues par le plan figurant au tableau 7. Le temps d'entreposage doit être choisi en tenant compte de la pratique analytique appliquée, idéalement jusqu'à ce que les premiers phénomènes de dégradation soient observables lors de l'identification et/ou de la quantification. Si aucune dégradation n'est observée au cours de l'étude de stabilité, la durée d'entreposage dans l'étude de stabilité équivaudra à la durée d'entreposage maximale de la solution.
4. Calculer la concentration du ou des analyte(s) dans chaque aliquote par rapport à la concentration de l'analyte dans la solution fraîchement préparée, selon la formule suivante:

$$\text{Analyte restant (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{fraîche}}$$

$C_i$  = concentration à l'instant  $i$  considéré

$C_{\text{fraîche}}$  = concentration de la solution fraîche.

La valeur moyenne de cinq solutions répliquées ayant été entreposées ne doit pas s'écarter de plus de 15 % de la valeur moyenne de cinq solutions répliquées fraîchement préparées. La valeur moyenne des cinq solutions fraîchement préparées sert de base au calcul de la différence en pourcentage.

Tableau 7

#### Plan de détermination de la stabilité de l'analyte en solution

	-20 °C	+4 °C	+20 °C
Obscurité	10 aliquotes	10 aliquotes	10 aliquotes
Lumière			10 aliquotes

### 2.5.2. Détermination de la stabilité du ou des analytes dans la matrice

1. Utiliser, dans la mesure du possible, des échantillons naturellement contaminés. À défaut de matrice contaminée, il y a lieu d'utiliser un blanc de matrice supplémenté avec l'analyte.

2. Avec une matrice naturellement contaminée, déterminer la concentration dans la matrice quand celle-ci est encore fraîche. Entreposer d'autres aliquotes de la matrice contaminée homogénéisée à  $-20\text{ °C}$  ou moins, si nécessaire, et déterminer les concentrations de l'analyte durant toute la période où l'échantillon est conservé dans le laboratoire.
3. À défaut de matrice naturellement contaminée, prendre un peu de blanc de matrice et l'homogénéiser. Diviser la matrice en 5 aliquotes. Supplémenter chaque aliquote avec l'analyte, qui doit de préférence être préparé dans une petite quantité de solution aqueuse. Analyser une aliquote immédiatement. Entreposer les aliquotes restantes à  $-20\text{ °C}$  ou moins, si nécessaire, et les analyser après un entreposage à court, moyen et long terme, en tenant compte des méthodes d'analyse appliquées.
4. Consigner le temps d'entreposage maximal acceptable et les conditions optimales d'entreposage.

La valeur moyenne de cinq solutions répliquées ayant été entreposées et la valeur moyenne de cinq solutions répliquées fraîchement préparées ne peuvent au plus différer que de la reproductibilité intralaboratoire de la méthode. La valeur moyenne des cinq solutions fraîchement préparées sert de base au calcul de la différence en pourcentage.

#### 2.6. Limite de décision aux fins de la confirmation (CCa)

La CCa est déterminée pour les méthodes de confirmation. La CCa doit être établie dans des conditions conformes aux exigences en matière d'identification ou en matière d'identification et de quantification définies dans les «Critères de performances et autres exigences applicables aux méthodes d'analyse» énoncés au chapitre 1.

Pour le contrôle de la conformité des échantillons, l'incertitude type composée a déjà été prise en compte dans la valeur CCa (limite de décision aux fins de la confirmation).

1. Pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées ou interdites, la CCa est calculée comme suit:
  - a) Méthode 1: par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur critique de la variable nette d'état) selon la norme ISO 11843-1:1997<sup>(14)</sup>. Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un blanc de matériau, supplémenté à la VR ou au LCL requis et au-delà, par pas équidistants. Analyser les échantillons. Après identification, comparer le signal, si possible, ou la concentration recalculée, à la concentration ajoutée. La limite de décision est égale à la concentration correspondante à l'ordonnée à l'origine plus 2,33 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire à l'ordonnée à l'origine. Cette méthode s'applique uniquement aux déterminations quantitatives. Il convient de vérifier les limites de décision obtenues par cette approche en analysant le blanc de matrice supplémenté à la limite de décision calculée.
  - b) Méthode 2: en analysant au moins 20 blancs de matériau représentatifs par matrice pour être en mesure de calculer le rapport signal-bruit dans la fenêtre où est attendu l'analyte. On peut utiliser comme limite de décision la valeur correspondant à trois fois le rapport signal-bruit. Cette méthode s'applique aux déterminations quantitatives et qualitatives. Il convient de vérifier les limites de décision obtenues par cette approche en analysant le blanc de matrice supplémenté à la limite de décision calculée.
  - c) Méthode 3:  $CCa = LCL + k$  (unilatéral, 99 %)  $\times$  incertitude type (composée) au LCL

Pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées ou interdites, en fonction de l'expérience de validation (et de ses degrés de liberté), la distribution de Student peut être raisonnablement appliquée ou — si la distribution gaussienne (unilatérale,  $n = \infty$ ) est prise comme base — un facteur  $k$  de 2,33 doit être utilisé.

La reproductibilité intralaboratoire et la justesse permettent de définir l'incertitude type (composée), si elle est déterminée en tenant compte de tous les facteurs d'influence pertinents.

La méthode 2 pour le calcul de la CCa ne peut être utilisée que jusqu'au 1<sup>er</sup> janvier 2026 dans le cas de méthodes validées avant la date d'entrée en vigueur du présent règlement. Pour les méthodes validées après l'entrée en vigueur du présent règlement, seules les méthodes 1 ou 3 sont utilisées.

<sup>(14)</sup> ISO 11843-1:1997 Capacité de détection — Partie 1: Termes et définitions.

2. Pour les substances autorisées, la CC $\alpha$  est calculée comme suit:

- a) Pour les substances autorisées dans des combinaisons d'espèces/matrices pour lesquelles une LMR ou une TM a été établie:
  - i) Méthode 1: par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur critique de la variable nette d'état) selon la norme ISO 11843-1:1997. Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un blanc de matériau, supplémenté à la LMR ou à la TM requise et au-delà, par pas équidistants. Analyser les échantillons. Après identification, comparer le signal, si possible, ou la concentration recalculée, à la concentration ajoutée. La limite de décision ( $\alpha = 5\%$ ) est égale à la concentration correspondante à la LMR ou à la TM plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire à la limite autorisée.
  - ii) Méthode 2:  $CC\alpha = LMR$  (ou  $TM$ ) +  $k$  (unilatéral, 95 %)  $\times$  incertitude type (composée) à la LMR ou à la TM.

Pour les substances autorisées, en fonction de l'expérience de validation (et de ses degrés de liberté), la distribution de Student peut être raisonnablement appliquée ou — si la distribution gaussienne (unilatérale,  $n = \infty$ ) est prise comme base — un facteur  $k$  de 1,64 doit être utilisé.

La reproductibilité intralaboratoire et la justesse permettent de définir l'incertitude type (composée), si elle est déterminée en tenant compte de tous les facteurs d'influence pertinents.

Pour les substances pharmacologiquement actives pour lesquelles la LMR est établie pour la somme des différentes substances, la CC $\alpha$  de la substance dont la concentration dans l'échantillon est la plus élevée est utilisée comme CC $\alpha$  pour évaluer la somme des substances dans l'échantillon étudié.

- b) Pour les substances autorisées dans des combinaisons d'espèces/matrices pour lesquelles aucune LMR n'a été établie, aucun résidu ne doit être présent à moins qu'un traitement autorisé conformément à l'article 11 de la directive 2001/82/CE n'ait été effectué. Pour les substances autorisées pour lesquelles aucune LMR n'a été établie, le calcul de la CC $\alpha$  se fonde sur la cascade de LMR établie par le règlement d'exécution (UE) 2018/470 de la Commission<sup>(15)</sup>. Les méthodes 1 ou 2 du paragraphe ci-dessus s'appliquent, en remplaçant la «LMR» par «0,5 fois la LMR en cascade, avec une valeur cible de 0,1 fois la LMR en cascade lorsque cela est raisonnablement possible».

## 2.7. Capacité de détection aux fins du dépistage (CC $\beta$ )

La CC $\beta$  est déterminée pour les méthodes de dépistage. La CC $\beta$  doit être établie conformément aux «Critères de performances et autres exigences applicables aux méthodes d'analyse» énoncés au chapitre 1 de la présente annexe et conformément aux exigences énoncées dans le tableau 5. Toutefois, il n'est pas nécessaire d'appliquer l'ensemble des exigences d'identification (points 1.2.3, 1.2.4 et 1.2.5) aux méthodes de dépistage.

1. Pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées ou interdites, une erreur  $\beta$  maximale de 5 % doit être garantie. La CC $\beta$  est calculée comme suit:
  - a) Méthode 1: par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur minimale détectable de la variable nette d'état) selon la norme ISO 11843-1:1997. Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un blanc représentatif, supplémenté à la VR ou en dessous, ou en l'absence de VR établie, aux environs de la STC, par pas équidistants. Analyser les échantillons. Comparer le signal à la concentration ajoutée. La capacité de détection est égale à la concentration correspondante à la STC plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire pour la teneur moyenne mesurée à la STC. Une extrapolation nettement inférieure au niveau de supplémentation le plus bas (< 50 % dudit niveau) doit être confirmée par des données expérimentales à l'étape de validation.
  - b) Méthode 2: Étude du blanc de matériau supplémenté à des niveaux de concentration égaux ou inférieurs à la STC. Pour chaque niveau de concentration, 20 blancs supplémentés doivent être analysés afin de garantir une base fiable pour cette détermination. La capacité de détection de la méthode est égale au niveau de concentration où il ne reste que 5 % ou moins de faux résultats conformes.
  - c) Méthode 3:  $CC\beta = STC + k$  (unilatéral, 95 %)  $\times$  incertitude type (composée) à la STC ou au-delà.

<sup>(15)</sup> Règlement d'exécution (UE) 2018/470 de la Commission du 21 mars 2018 portant dispositions détaillées sur les limites maximales de résidus applicables aux fins des contrôles de denrées alimentaires issues d'animaux traités dans l'Union européenne en application de l'article 11 de la directive 2001/82/CE (JO L 79 du 22.3.2018, p. 16).

Pour les substances pharmacologiquement actives non autorisées ou interdites, en fonction de l'expérience de validation (et de son degré de liberté), la distribution de Student peut être raisonnablement appliquée ou, si la distribution gaussienne (unilatérale,  $n = \infty$ ) est prise comme base, un facteur  $k$  de 1,64 doit être utilisé.

La reproductibilité intralaboratoire et la justesse permettent de définir l'incertitude type (composée), si elle est déterminée en tenant compte de tous les facteurs d'influence pertinents.

2. Pour les substances autorisées, une erreur  $\beta$  maximale de 5 % doit être garantie. La  $CC\beta$  est calculée comme suit:

- a) Méthode 1: par la procédure de la courbe d'étalonnage (ici dénommée valeur minimale détectable de la variable nette d'état) selon la norme ISO 11843-1:1997. Dans ce cas, il y a lieu d'utiliser un blanc représentatif, supplémenté au niveau de la limite autorisée et en dessous, à partir de la STC, par pas équidistants. Analyser les échantillons et identifier le ou les analytes. Calculer l'écart type de la teneur moyenne mesurée à la STC.

La capacité de détection est égale à la concentration correspondante à la STC plus 1,64 fois l'écart type de la reproductibilité intralaboratoire pour la teneur moyenne mesurée à la STC.

- b) Méthode 2: par l'étude du blanc de matériau supplémenté à des niveaux de concentration inférieurs à la limite autorisée. Pour chaque niveau de concentration, 20 blancs supplémentés doivent être analysés afin de garantir une base fiable pour cette détermination. La capacité de détection de la méthode est égale au niveau de concentration où il ne reste que 5 % ou moins de faux résultats conformes.
- c) Méthode 3:  $CC\beta = STC + k$  (unilatéral, 95 %)  $\times$  incertitude type (composée) à la STC ou au-delà.

Pour les substances autorisées, en fonction de l'expérience de validation (et de ses degrés de liberté), la distribution de Student peut être raisonnablement appliquée ou, si la distribution gaussienne (unilatérale,  $n = \infty$ ) est prise comme base, un facteur  $k$  de 1,64 doit être utilisé (que la LMR soit appliquée en cascade ou de manière ordinaire).

La reproductibilité intralaboratoire et la justesse permettent de définir l'incertitude type (composée), si elle est déterminée en tenant compte de tous les facteurs d'influence pertinents.

Pour les substances pharmacologiquement actives pour lesquelles la LMR est établie pour la somme de différentes substances, la  $CC\beta$  de la substance dont la concentration dans l'échantillon est la plus élevée est utilisée comme  $CC\beta$  pour évaluer la somme des substances dans l'échantillon étudié.

## 2.8. Courbes d'étalonnage

Lorsque des courbes d'étalonnage sont utilisées pour la quantification:

- 1) cinq niveaux au moins (niveau zéro compris), de préférence équidistants, doivent être utilisés pour construire la courbe,
- 2) l'étendue de mesure de la courbe d'étalonnage doit être décrite,
- 3) le modèle mathématique de la courbe et l'ajustement des données (coefficient de détermination  $R^2$ ) à la courbe doivent être décrits,
- 4) les plages d'acceptabilité des paramètres de la courbe doivent être décrites.

Pour les courbes d'étalonnage fondées sur une solution étalon ou sur des étalons avec adaptation matricielle ou avec supplémentation matricielle, les plages acceptables doivent être indiquées pour les paramètres de la courbe d'étalonnage qui peuvent varier d'une série à l'autre.

## 2.9. Rendement absolu

Le rendement absolu de la méthode est déterminé lorsque aucun étalon interne ou aucun étalonnage avec supplémentation matricielle n'est utilisé.

Lorsque les exigences de justesse énoncées dans le tableau 1 sont remplies, un facteur de correction fixe peut être utilisé. Dans le cas contraire, le facteur de récupération obtenu pour ce lot spécifique doit être utilisé. Il est également possible de recourir à la procédure d'ajout dosé <sup>(16)</sup> ou à un étalon interne au lieu d'un facteur de correction de récupération.

Le rendement absolu est calculé pour au moins six lots représentatifs de la matrice.

Une aliquote du blanc de matrice doit être supplémentée avec l'analyte avant extraction et une seconde aliquote du blanc de matrice doit être supplémentée après la préparation de l'échantillon à un niveau de concentration approprié et la concentration de l'analyte doit être déterminée.

La récupération est calculée comme suit:

$$\text{Rec (analyte)} = (\text{étalon avec supplémentation matricielle}) / (\text{étalon avec adaptation matricielle}) \times 100$$

## 2.10. Effets de matrice relatifs

L'effet de matrice relatif doit être déterminé dans tous les cas. Cette détermination peut se faire soit dans le cadre de la validation, soit dans le cadre d'expériences distinctes. Le calcul de l'effet de matrice relatif doit être effectué pour au moins 20 lots blancs différents (matrice/espèce), selon le champ d'application de la méthode, par exemple les différentes espèces à couvrir.

Le blanc de matrice doit être supplémenté après extraction avec l'analyte à la VR, à la LMR ou à la TM et analysé parallèlement à une solution pure de l'analyte.

L'effet de matrice relatif ou le facteur de matrice (FM) est calculé comme suit:

$$\text{FM (étalon)} = \frac{\text{surface pic étalon EAM}}{\text{surface pic étalon en solution}}$$

$$\text{FM (EI)} = \frac{\text{surface pic EI EAM}}{\text{surface pic EI en solution}}$$

$$\text{FM (étalon normalisé pour l'EI)} = \frac{\text{FM (étalon)}}{\text{FM (EI)}}$$

EI =: étalon interne

EAM =: étalon avec adaptation matricielle

=:

Le coefficient de variation ne doit pas être supérieur à 20 % pour le FM (étalon normalisé pour l'EI).

## CHAPITRE 3

### CONTRÔLE DE LA QUALITÉ LORS DES ANALYSES DE ROUTINE — VÉRIFICATION CONTINUE DES PERFORMANCES DE LA MÉTHODE

Les exigences d'assurance de la qualité des résultats d'analyse énoncées au chapitre 7.7 de la norme ISO/IEC 17025:2017 <sup>(17)</sup> doivent être respectées.

Lors de l'analyse de routine, l'analyse des matériaux de référence certifiés (MRC) est l'option à privilégier pour obtenir des preuves des performances de la méthode. Étant donné qu'il est rare de disposer de MRC contenant les analytes pertinents aux niveaux de concentration requis, il est également possible d'utiliser des matériaux de référence fournis et caractérisés par les LRUE ou les laboratoires titulaires d'une accréditation ISO/IEC 17043:2010 <sup>(18)</sup>. Des matériaux de référence internes, qui font l'objet d'un contrôle régulier, peuvent également être utilisés.

La vérification continue des performances de la méthode par une analyse de routine doit être effectuée tant au stade du dépistage qu'au stade de la confirmation.

<sup>(16)</sup> La quantité d'analyte étalon ajoutée peut se situer par exemple entre deux et cinq fois la quantité estimée de l'analyte contenue dans l'échantillon. Cette procédure permet de déterminer le contenu d'un analyte dans un échantillon compte tenu de la récupération de la procédure d'analyse.

<sup>(17)</sup> ISO/IEC 17025: 2017 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (Chapitre 7.7).

<sup>(18)</sup> ISO/IEC 17043:2010 Évaluation de la conformité — Exigences générales concernant les essais d'aptitude.

#### 1. Au stade du dépistage:

Pour chaque série (lot) d'analyses effectuées, un ensemble d'échantillons soumis aux contrôles de qualité suivants doit être analysé simultanément:

- a) échantillon de contrôle pour l'adéquation du système, idéalement spécifique à la méthode;
- b) échantillons de contrôle de la qualité supplémentés à une concentration proche de la STC et idéalement à la CC $\beta$  du dépistage pour les substances pharmacologiquement actives autorisées ainsi que pour les substances interdites ou non autorisées;
- c) échantillon de contrôle conforme (blancs d'échantillons) et, le cas échéant, blancs de réactif.

#### 2. Au stade de la confirmation:

Pour chaque série (lot) d'analyses effectuées, un ensemble d'échantillons soumis aux contrôles de qualité suivants doit être analysé simultanément:

- a) échantillon de contrôle pour l'adéquation du système, idéalement spécifique à la méthode;
- b) échantillons de contrôle de la qualité supplémentés à une concentration proche de la LMR ou de la TM pour les substances pharmacologiquement actives autorisées, ou proche de la VR ou du LCL pour les substances interdites ou non autorisées (échantillons de contrôle non conformes);
- c) échantillon de contrôle conforme (blancs d'échantillons) et, le cas échéant, blancs de réactif.

L'ordre suivant est recommandé pour les échantillons de contrôle de la qualité: échantillon de contrôle de l'adéquation de l'instrument, échantillon de contrôle conforme, échantillon(s) à confirmer, à nouveau échantillon de contrôle conforme et échantillons de contrôle de la qualité supplémentés (échantillons de contrôle non conformes).

Pour les méthodes quantitatives, avec chaque lot d'échantillons officiels, une courbe d'étalonnage doit être analysée et mesurée avant ou après les échantillons énumérés ci-dessus.

Dans la mesure du possible, la justesse (sur la base d'échantillons supplémentés) de tous les analytes cibles présents dans les échantillons de contrôle non conformes doit être évaluée au moyen de cartes de contrôle qualité conformément au chapitre 7.7 de la norme ISO/IEC 17025:2017. Si cela nécessite un nombre disproportionné de déterminations de la justesse, le nombre d'analytes peut être réduit à un nombre d'analytes représentatifs.

## CHAPITRE 4

### EXTENSION DU CHAMP D'APPLICATION VALIDÉ D'UNE MÉTHODE PRÉCÉDEMMENT VALIDÉE

Il est parfois nécessaire d'étendre le champ d'application d'une méthode entièrement validée précédemment. Dans ces cas, le champ d'application devrait être étendu d'une manière efficace et rigoureuse sur le plan analytique. Pour ce faire, il est possible de procéder à une validation sur un nombre réduit d'échantillons (par exemple, la moitié des échantillons) par rapport à une validation complète.

Néanmoins, le type et le nombre de modifications à valider dans un unique plan de validation réduit doivent toujours être fondés sur les connaissances d'experts et les expériences antérieures: par exemple, un changement de technique de détection nécessiterait en tout état de cause une validation complète.

D'une manière générale, pour assurer la validité permanente de la méthode, ses performances doivent être contrôlées en continu et comparées aux paramètres de validation initialement obtenus. Idéalement, ce contrôle continu des performances de la méthode est conçu de manière que les données manquantes pour une validation complète puissent être collectées au fil du temps (par exemple, avec quelques données provenant d'échantillons de contrôle qualité à chaque série d'analyses).

#### 4.1. Extension des méthodes en ce qui concerne la plage de concentrations

Lors de la modification des LMR, des TM et des VR, il peut s'avérer nécessaire d'ajuster la plage de concentrations pour laquelle une méthode est validée. Dans ce cas, l'application d'un plan de validation réduit est acceptable.

Les courbes d'étalonnage relatives à la plage modifiée doivent être préparées conformément à la procédure validée. Il convient d'analyser différents lots supplémentés à des niveaux de concentration différents (voir points 2.2.1 et 2.2.2). La justesse, la répétabilité et la reproductibilité intralaboratoire/fidélité intermédiaire doivent se situer dans une plage acceptable par rapport à la méthode initialement validée. Le cas échéant, un nouveau calcul de la CC $\beta$  (pour les méthodes de dépistage) et la CC $\alpha$  (pour les méthodes de confirmation) doit être effectué.

#### 4.2. **Extension des méthodes en ce qui concerne des substances supplémentaires**

De manière générale, l'extension d'une méthode à d'autres composés n'est possible que pour des analytes comparables, en matière de structure et de caractéristiques, aux analytes déjà couverts par la méthode d'analyse. Dans ce cas, l'application d'un plan de validation réduit est acceptable. De même, aucun écart n'est autorisé par rapport à la description de la méthode.

Les courbes d'étalonnage des substances supplémentaires doivent être préparées conformément à la procédure validée. Il convient d'analyser différents lots de matériaux matriciels, supplémentés à des niveaux de concentration différents (voir points 2.2.1 et 2.2.2). La justesse, la répétabilité et la reproductibilité intralaboratoire/fidélité intermédiaire doivent se situer dans une plage comparable à celle des autres analytes de la méthode initialement validée et être conformes aux exigences énoncées au point 1.2.2. Il convient de procéder au calcul de la  $CC\beta$  (pour les méthodes de dépistage) et de la  $CC\alpha$  (pour les méthodes de confirmation) pour les nouveaux analytes.

#### 4.3. **Extension des méthodes en ce qui concerne des matrices/espèces**

La décision d'inclure de nouvelles matrices ou espèces pour une méthode d'analyse déjà validée doit toujours être prise au cas par cas sur la base des connaissances et de l'expérience acquises à ce jour avec la méthode en question et des expériences préliminaires évaluant les effets de matrice et les interférences potentiels. De manière générale, une telle extension ne sera possible que pour les matrices présentant des propriétés similaires et pour les analytes non critiques (stabilité, détectabilité).

Les courbes d'étalonnage (étalon ou matrice) doivent être préparées conformément à la procédure validée. Il convient d'analyser différents lots de matériau matriciel, supplémentés à des niveaux de concentration différents (voir points 2.2.1 et 2.2.2). La justesse, la répétabilité et la reproductibilité intralaboratoire/fidélité intermédiaire doivent se situer dans une plage acceptable par rapport à la méthode initialement validée et être conformes aux exigences énoncées au point 1.2.2. En fonction de la méthode de validation, un nouveau calcul de la  $CC\beta$  (pour les méthodes de dépistage) ou de la  $CC\alpha$  (pour les méthodes de confirmation) peut s'avérer nécessaire.

Si les résultats ne se situent pas dans une plage acceptable par rapport aux valeurs de la matrice initiale, une nouvelle validation complète sera nécessaire pour déterminer les paramètres de performances spécifiques de la matrice/l'espèce.

Dans les cas où les LMR d'une substance spécifique diffèrent pour certaines matrices, il sera vraisemblablement difficile d'adapter le champ d'application de la méthode à la nouvelle matrice/espèce et à la concentration, étant donné que, dans ce cas, deux variations doivent être prises en considération. Dans ce cas, une validation complète est recommandée.

---

## ANNEXE II

**PROCÉDURES D'ÉCHANTILLONNAGE ET TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS OFFICIELS****1. Quantité de l'échantillon**

La quantité minimale de l'échantillon est définie dans le programme national de surveillance des résidus. Elle est suffisante pour permettre aux laboratoires agréés d'effectuer les procédures analytiques nécessaires pour réaliser les analyses de dépistage et de confirmation. En ce qui concerne spécifiquement les volailles, l'aquaculture, les lapins, le gibier d'élevage, les reptiles et les insectes, un échantillon est constitué d'un ou plusieurs animaux, selon les exigences applicables aux méthodes d'analyse. En ce qui concerne les œufs, la taille de l'échantillon est au moins de 12 œufs ou plus selon la méthode d'analyse utilisée. Si plusieurs catégories de substances doivent être analysées dans un même échantillon au moyen de méthodes d'analyse différentes, la taille de l'échantillon est augmentée en conséquence.

**2. Division en sous-échantillons**

Sauf impossibilité technique ou absence de prescription en ce sens dans la législation nationale, tout échantillon est divisé en au moins deux sous-échantillons équivalents permettant chacun la réalisation de la procédure analytique complète. La subdivision peut être effectuée sur le lieu d'échantillonnage ou en laboratoire.

**3. Traçabilité**

Chaque échantillon est prélevé de telle sorte qu'il soit toujours possible de remonter jusqu'à l'exploitation d'origine et au lot d'animaux ou à l'animal particulier, le cas échéant. En particulier, pour le lait, selon le choix de l'État membre, les échantillons peuvent être prélevés dans l'un ou l'autre des lieux suivants:

1. à la ferme, à partir de la cuve de collecte;
2. au niveau de l'industrie laitière avant que le lait ne soit transvasé.

**4. Récipients contenant les échantillons**

Les échantillons sont collectés dans des récipients appropriés de nature à assurer l'intégrité et la traçabilité de l'échantillon. En particulier, les récipients sont conçus pour éviter la substitution, la contamination croisée et la détérioration des échantillons. Les récipients sont scellés officiellement.

**5. Rapport de prélèvement**

Un rapport est établi à l'issue de chaque procédure d'échantillonnage.

L'inspecteur consigne au moins les données suivantes dans le rapport de prélèvement:

1. adresse des autorités compétentes;
2. nom de l'inspecteur ou code d'identification;
3. numéro de code officiel de l'échantillon;
4. date du prélèvement;
5. nom et adresse du propriétaire de l'animal ou de la personne responsable des animaux ou des produits d'origine animale;
6. nom et adresse de l'exploitation d'origine de l'animal (lors du prélèvement en exploitation);
7. numéro d'enregistrement de l'établissement/numéro de l'abattoir;
8. identification de l'animal ou du produit;
9. espèce animale;
10. matrice d'échantillonnage;
11. le cas échéant, médicaments administrés pendant les quatre dernières semaines précédant le prélèvement (en cas de prélèvement en exploitation);
12. substances ou groupes de substances à rechercher;
13. remarques particulières.

Le nombre de copies imprimées ou électroniques du rapport à fournir varie en fonction de la procédure d'échantillonnage. Le rapport de prélèvement et ses copies sont remplis de manière à en garantir l'authenticité et la validité juridique, ce qui peut nécessiter que ces documents soient signés par l'inspecteur. En cas de prélèvement en exploitation, l'agriculteur ou son représentant peut être invité à signer l'original du rapport de prélèvement.

L'original du rapport de prélèvement est conservé par l'autorité compétente, qui doit s'assurer qu'aucune personne non autorisée ne peut avoir accès à cet original.

Le cas échéant, l'exploitant ou le propriétaire de l'établissement peut être informé du prélèvement d'échantillons.

#### 6. Rapport de prélèvement destiné au laboratoire

Le rapport de prélèvement établi par les autorités compétentes à l'attention du laboratoire est conforme aux exigences énoncées au chapitre 7 de la norme ISO/IEC 17025:2017 <sup>(1)</sup> et contient au moins les informations suivantes:

1. adresse des autorités compétentes ou des organismes désignés;
2. nom de l'inspecteur ou code d'identification;
3. numéro de code officiel de l'échantillon;
4. date du prélèvement;
5. espèce animale;
6. matrice d'échantillonnage;
7. substances ou groupes de substances à rechercher;
8. remarques particulières.

Le rapport de prélèvement destiné au laboratoire accompagne l'échantillon lors de l'envoi de celui-ci au laboratoire.

#### 7. Transport et entreposage

Les programmes de surveillance des résidus définissent les conditions appropriées d'entreposage et de transport pour chaque combinaison analyte/matrice afin d'assurer la stabilité de l'analyte et l'intégrité de l'échantillon. La durée de transport est aussi courte que possible et la température pendant le transport est propre à garantir la stabilité de l'analyte.

Une attention particulière est à réserver aux caisses de transport, à la température et aux délais de livraison au laboratoire compétent.

En cas de non-respect des prescriptions du programme de surveillance, le laboratoire en informe immédiatement l'autorité compétente.

---

(1) ISO/IEC 17025: 2017 Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (Chapitre 7.7).