II

(Actos cuya publicación no es una condición para su aplicabilidad)

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 14 de abril de 1993

por la que se establecen los métodos que deberán utilizarse para la detección de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático

(93/256/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 85/358/CEE del Consejo, de 16 de julio de 1985, por la que se complementa la Directiva 81/602/CEE referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático [1], cuya última modificación la constituye la Directiva 88/146/CEE [2], y, en particular, el apartado 2 de su artículo 5,

Considerando que el apartado 1 del artículo 8 de la Directiva 64/433/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios intracomunitarios de carne fresca [3], cuya última modificación la constituye la Directiva 92/5/CEE [4], y el párrafo segundo del apartado 4 del artículo 11 de la Directiva 85/397/CEE del Consejo, de 5 de agosto de 1985, relativa a los problemas sanitarios y de policía sanitaria en los intercambios intracomunitarios de leche tratada térmicamente [5], cuya última modificación la constituye la Directiva 89/662/CEE [6], establecen que los exámenes para la detección de residuos deberán efectuarse de acuerdo con métodos seguros científicamente reconocidos, en particular, los que se establecen en directivas comunitarias o en otras normas internacionales;

Considerando que la determinación de los métodos de análisis de muestras incluye la definición de procedimientos analíticos que deben utilizarse, de las normas que deberán observarse para la toma de muestras y de los criterios que deberán aplicarse al realizar los análisis;

Considerando que los procedimientos analíticos adoptados deben ser suficientemente sensibles para detectar la presencia de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático;

Considerando que la toma de muestras es una parte esencial de todo método de análisis; que es, por lo tanto, conveniente establecer las normas relativas a la recogida de muestras;

Considerando que a los efectos de la presente Decisión, es conveniente tomar en consideración los criterios establecidos en el punto 1 del Anexo de la Directiva 85/591/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1985 referente a la introducción de modos de tomas de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana [7];

Considerando que, habida cuenta de la evolución de los conocimientos científicos y técnicos, y en aras de la claridad, es necesario derogar la Decisión 87/410/CEE de la Comisión [8];

Considerando que las medidas previstas en la presente Decisión se ajustan al dictamen del Comité veterinario permanente,

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Los procedimientos analíticos de rutina autorizados para la detección de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático serán los siguientes:

[1] DO nº L 191 de 23. 7. 1985, p. 46.
[2] DO nº L 70 de 16. 3. 1988, p. 16.
[3] DO nº 121 de 29. 7. 1964, p. 2012/64.
[4] DO nº L 57 de 2. 3. 1992, p. 1.
[5] DO nº L 226 de 24. 8. 1985, p. 13.
[6] DO nº L 395 de 30. 12. 1989, p. 13.
[7] DO nº L 372 de 31. 12. 1985, p. 50.
[8] DO nº L 223 de 11. 8. 1987, p. 18.

— inmunoensayo,
— cromatografía de capa fina,
— cromatografía de líquidos,
— cromatografía de gases,
— espectrometría de masas,
— espectrometría,

o cualquier otro método que satisfaga criterios comparables a los establecidos para métodos afines en el Anexo.

Artículo 2

La toma de muestras se efectuará de acuerdo con las normas siguientes:

1) La muestra deberá ser representativa y de tamaño suficiente para permitir efectuar un análisis correcto, repetir dicho análisis y realizar análisis de confirmación.

2) Las muestras deberán marcarse de tal modo que su identificación sea posible en todo momento.

3) La toma, envasado, conservación, transporte y almacenamiento de las muestras deberá realizarse de modo que se mantenga la integridad de éstas y no altere el resultado del análisis. Deberá impedirse el acceso a las muestras por parte de personas no autorizadas.

Artículo 3

Los criterios aplicables a los métodos de análisis de rutina para la detección de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático figuran en el Anexo.

Artículo 4

La presente Decisión será reexaminada antes del 1 de enero de 1996 a fin de tener en cuenta la evolución de los conocimientos científicos y técnicos.

Artículo 5

Queda derogada la Decisión 87/410/CEE.

Artículo 6

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 14 de abril de 1993.

Por la Comisión
René STEICHEN
Miembro de la Comisión

ANEXO

1. DEFINICIONES Y REQUISITOS GENERALES

1.1. Definiciones

1.1.1. *Métodos de análisis de rutina*

Métodos de análisis utilizados por los Estados miembros para poner en práctica los planes nacionales de control de residuos en los animales de abasto y sus productos de conformidad con la Directiva 86/469/CEE del Consejo (1). Los métodos de rutina, que deberán haber sido validados por laboratorios autorizados y deberán cumplir los criterios pertinentes establecidos en el presente Anexo, podrán utilizarse tanto para fines de selección como de confirmación :

— Se entiende por métodos utilizados con fines de criba (métodos criba) los empleados para detectar la presencia de un sustancia analizada o grupo de sustancia analizadas al nivel de interés. Estos métodos se caracterizan por su capacidad de analizar un elevado número de muestras en poco tiempo con el fin de detectar posibles positivos. Con ellos se trata de evitar falsos resultados negativos.

— Se entiende por métodos utilizados con fines de confirmación (métodos de confirmación) los que proporcionan una información total o complementaria que permite la identificación inequívoca de la sustancia analizada al nivel de interés. Estos métodos tienen por objeto tanto evitar la obtención de resultados positivos falsos como lograr que la probabilidad de obtener resultados negativos erróneos sea baja.

1.1.2. *Sustancia analizada*

Componente de una muestra de análisis que se debe detectar, identificar o cuantificar. El término « sustancia analizada » incluye, en su caso, los derivados que se formen a partir de la sustancia analizada durante el análisis.

La medida cuantitativa de un sustancia analizada se indicará como :

— cantidad, expresada como cantidad de masa (por ejemplo µg, ng)

o

— contenido, expresado como fracción de masa (por ejemplo $\mu g\ kg^{-1}$, $ng\ kg^{-1}$), concentración de masa (por ejemplo $\mu g\ l^{-1}$) o concentración (por ejemplo $mol\ l^{-1}$).

1.1.3. *Muestras*

1.1.3.1. Muestra de laboratorio

Muestra preparada para su envío al laboratorio y destinada a inspección o prueba.

1.1.3.2. Muestra de análisis

Muestra preparada a partir de la muestra de laboratorio y de la que se tomarán fracciones problema.

1.1.3.3. Fracción problema

Cantidad de material procedente de la muestra de análisis (o, si ambas son la misma, de la muestra de laboratorio) con la que se realizan los análisis u observaciones.

1.1.4. *Patrón*

Sustancia bien definida con un contenido en sustancia analizada determinado, de la mayor pureza posible, que se utilizará como referencia durante el análisis.

1.1.5. *Material de referencia*

Material del que se hayan confirmado mediante un método validado una o varias propiedades, de manera que pueda utilizarse para calibrar un aparato o comprobar un método de medida.

(1) DO nº L 275 del 26. 9. 1986, p. 36.

1.1.6. *Determinaciones en blanco*

1.1.6.1. Determinación en blanco de la muestra

Procedimiento analítico completo aplicado a una fracción problema procedente de una muestra que no contiene sustancia analizada.

1.1.6.2. Determinación del blanco de reactivos

Procedimiento analítico completo aplicado sin que se halle presente la fracción problema o utilizando una cantidad equivalente de su disolvente adecuado en lugar de aquélla.

1.1.7. *Especificidad*

Capacidad de un método dado para diferenciar la sustancia analizada que se pretende medir de cualquier otra sustancia. Esta característica es función sobre todo del principio que se emplee para efectuar las medidas, si bien puede variar dependiendo del tipo de compuesto o de la matriz.

Los detalles relativos a la especificidad deberán referirse como mínimo a todas las sustancias que pueden dar una señal como respuesta cuando se utilice el procedimiento de medición descrito, por ejemplo, productos homólogos, análogos o metabólicos del residuo de interés. A partir de los detalles relativos a la especificidad debe ser posible obtener cuantitativamente el grado hasta el cual el método puede distinguir entre la sustancia analizada y las restantes sustancias, en las condiciones experimentales.

1.1.8. *Exactitud*

En esta Decisión se refiere a la exactitud de la media. La definición que se empleará está establecida en el punto 2.83 de la norma ISO 3534-1977 (exactitud de la media : diferencia entre el valor auténtico y el resultado medio que se obtendría efectuando el procedimiento experimental un gran número de veces).

Las principales limitaciones de la exactitud son las siguientes :

a) errores aleatorios ;

b) errores sistemáticos.

Cuando el número de análisis efectuados es muy grande, la exactitud de la media se aproxima al error sistemático. Para la evaluación de un método se debe especificar el número de análisis realizados.

La medida de la exactitud será la diferencia entre el valor medio determinado para el material de referencia y el valor auténtico, expresado como porcentaje de este último. Si no se dispone de material de referencia, los parámetros pertinentes podrán evaluarse analizando material de muestra enriquecido.

Cuando no se disponga de métodos perfectamente definidos ni de materiales de referencia certificados, el contenido de la sustancia analizada de una muestra podrá definirse a partir de los resultados obtenidos con un método que arroje el grado máximo de especificidad, exactitud y precisión de la sustancia analizada.

1.1.9. *Precisión*

Diferencia entre los resultados obtenidos aplicando el procedimiento experimental en diversas ocasiones en condiciones establecidas [punto 2.84 de la norma ISO 3534-1977 (1)] ; incluye la repetibilidad y la reproducibilidad.

Repetibilidad :

Diferencia entre los resultados de análisis independientes obtenidos en condiciones de repetibilidad, es decir, con el mismo método sobre un material idéntico, efectuadas en el mismo laboratorio por el mismo técnico utilizando el mismo equipo con breves intervalos de tiempo.

Reproducibilidad :

Diferencia entre los resultados de análisis independientes obtenidos en condiciones de reproducibilidad, es decir, con el mismo método sobre un material problema idéntico, realizadas en diferentes laboratorios por diferentes técnicos utilizando equipo diferente. Según el Anexo de la Directiva 85/591/CEE del Consejo (2), los valores de la precisión para los métodos de análisis cuya adopción tenga que decidirse según lo dispuesto en esa Directiva se obtendrán a partir de un ensayo conjunto efectuado, preferentemente, de conformidad con la norma ISO 5725-1986 (3). A este fin, los términos repetibilidad y reproducibilidad se hallan definidos en la norma ISO 5725-1986. Para realizar dichos ensayos se utilizarán materiales de muestra con un contenido de sustancia analizada conocido que oscile en torno al límite de residuos máximo que deba respetarse.

(1) Organización internacional de Normalización : estadísticas, vocabulario y símbolos.
(2) DO nº L 372 de 31. 12. 1985, p. 50.
(3) Organización internacional de Normalización : precisión de los métodos de prueba : determinación de la repetibilidad y reproducibilidad de un método de prueba estándar mediante pruebas interlaboratorios.

Hasta que no se haya determinado la repoducibilidad de un método mediante un ensayo colaborativo, para la preselección de posibles métodos por revisión de datos, bastará con disponer de los datos sobre repetibilidad.

La medida de repetibilidad y reproducibilidad que deberá emplearse será el coeficiente de variación tal y como se define en el punto 2.35 de la norma ISO 3534-1977 (coeficiente de variación : la relación entre la desviación estándar y el valor absoluto de la media aritmética).

1.1.10. *Límite de detección*

El menor contenido a partir del cual resulta posible deducir la presencia de la sustancia analizada con una seguridad estadística razonable. (Como mínimo el 95 % de las sustancias no autorizadas — véase el punto 1.2.6.1). El límite de detección puede calcularse de diferentes maneras :

a) Realizando determinaciones en blanco, con al menos 20 muestras en blanco, representativas. El límite de detección equivaldrá al contenido aparente correspondiente al valor de la media más tres veces la desviación estándar de las determinaciones en blanco.

Nota 1: Deberá especificarse la cantidad de fracción problema utilizada en el análisis.

Nota 2: Si se prevé que factores tales como la especie, el sexo, la edad, la alimentación u otros factores medioambientales pueden influir sobre las características del método, será necesario un conjunto de 20 muestras en blanco como mínimo para cada una de las poblaciones homogéneas a las que se aplique.

b) En el caso de determinaciones espectrométricas cuyas determinaciones en blanco representativas únicamente produzcan ruido blanco, el límite de detección equivaldrá al contenido aparente correspondiente a tres veces el ruido entre un pico y otro.

1.1.11. *Límite de determinación*

Contenido más pequeño de sustancia analizada respecto al cual el método ha sido validado con una exactitud y precisión determinadas.

1.1.12. *Sensibilidad*

Medida de la capacidad de un método para detectar pequeñas diferencias en cuanto al contenido de sustancia analizada. En la presente Decisión la sensibilidad se expresa como la pendiente de la curva de calibración al nivel de interés.

1.1.13. *Practicabilidad*

Característica de una técnica analítica que depende del objetivo del método y que se determina mediante requisitos tales como el rendimiento y coste de la muestra.

1.1.14. *Aplicabilidad*

Relación de los tipos de muestra o de las sustancias analizadas a los que puede aplicarse el método tal como se presenta o con modificaciones específicas de poca importancia.

1.1.15. *Interpretación de los resultados*

1.1.15.1. Resultado positivo

La presencia de la sustancia analizada en la muestra queda probada, según el procedimiento del análisis, cuando se cumplen los criterios generales y los criterios específicos del método de detección en cuestión.

a) En el caso de sustancias con una tolerancia cero, el resultado del análisis será « positivo » si la identidad de la sustancia analizada en la muestra queda probada de manera inequívoca.

b) En el caso de sustancias con un límite de residuos máximo establecido, el resultado del análisis será « positivo » si el contenido de la sustancia analizada en la muestra determinado experimentalmente (tras la aplicación, en su caso, de coeficientes de recuperación) es mayor que el límite de residuos máximo establecido, el cual tiene en cuenta la probabilidad aceptable de obtener resultados falsos negativos o falsos positivos.

1.1.15.2. Resultado negativo

El resultado del análisis se considerará « negativo » con arreglo al procedimiento analítico cuando se cumplan los criterios generales y los criterios especificados en el método de detección individual, en el caso de análisis de materiales de referencia apropiados y determinaciones en blanco y :

a) en el caso de sustancias con una tolerancia cero, la identidad de la sustancia analizada no ha quedado probada de manera inequívoca,

b) en el caso de sustancias con un límite de residuo máximo establecido, el contenido su sustancia analizada en la muestra que se ha medido se halla por debajo del nivel mencionado en la letra b) del punto 1.1.15.1.

Nota: La obtención de un resultado negativo no prueba que la sustancia analizada no esté presente en la muestra [en el caso a)], ni que el verdadero contenido de la sustancia analizada se halle por debajo del límite de residuos máximo [en el caso b)].

1.1.16. *Co-cromatografía*

Procedimiento en el que se divide la solución problema purificada en dos partes antes de la cromatografía y:

a) una se cromatografía sin más;

b) a la otra parte se añade el patrón que deba identificarse, cromatografiándose a continuación esta solución mixta compuesta por la solución problema y el patrón. La cantidad de patrón añadido y la cantidad prevista de sustancia analizada en la solución problema deberán ser similares.

1.1.17. *Inmunograma*

En la presente Decisión se entenderá por inmunograma un gráfico que presente la respuesta inmunoquímica frente al tiempo de retención o el volumen de elución, obtenido mediante separación cromatográfica con detección inmunoquímica (en general « off-line ») de los componentes del extracto de la muestra.

1.2. **Requisitos generales**

1.2.1. *Criterios*

De conformidad con el Anexo de la Directiva 85/591/CEE del Consejo, los criterios que se establecen a continuación se aplicarán al examen de los métodos de análisis.

1.2.2. *Métodos de criba*

No pueden establecerse requisitos fijos para este tipo de métodos. El aspecto más importante de la realización es que la incidencia de falsos negativos al nivel de interés sea mínima.

1.2.2.1. Deberá definirse la especificidad

1.2.2.2. Exactitud y precisión:

No será necesaria la cuantificación. Los métodos criba podrán ser cualitativos o cuantitativos dependiendo de que la utilización de una sustancia esté prohibida o autorizada. Si bien podrán aceptarse falsos positivos, falsos negativos al nivel de interés deberán ser mínimos.

1.2.2.3. Límite de detección:

Deberá ser apropiado a los fines que se buscan. En el caso de sustancias con un límite de residuos máximo establecido, deberá ser lo suficientemente bajo como para poder detectar residuos a ese nivel. Tratándose de sustancias cuyo empleo en animales de abasto no esté autorizado, el límite de detección deberá ser lo mas bajo posible.

1.2.2.4. Practicabilidad:

Es conveniente que la rapidez del análisis y número de muestras sea elevada y el coste reducido.

1.2.3. *Métodos de confirmación*

1.2.3.1. Especificidad:

En la medida de lo posible, los métodos de confirmación deberán proporcionar una información inequívoca sobre la estructura química de la sustancia analizada. Si se obtiene la misma respuesta con más de un compuesto, el método no puede establecer la diferencia entre esos compuestos.

Los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos sin recurrir al empleo de la detección espectrométrica molecular no son aptos para su utilización como métodos de confirmación.

Si una técnica carece de la suficiente especificidad, la especificidad deseada podrá obtenerse mediante métodos de análisis que combinen de manera adecuada purificación, separación o separaciones cromatográficas y detección inmunoquímica o espectrométrica, por ejemplo, CG-EM, CL-EM, CIA/CG-EM, CG-IR, CL-IR, CL/IMG.

1.2.3.2. Exactitud

En el caso de análisis repetidos de una muestra de referencia, las diferencias entre el contenido medio determinados experimentalmente (tras la aplicación, en su caso, de coeficientes de recuperación) y el valor auténtico estarán dentro de los siguientes límites:

Valor auténtico (fracción de masa)	Intervalo
$\leq 1\ \mu g\ kg^{-1}$	de − 50 % a + 20 %
$> 1\ \mu g\ kg^{-1}$ hasta $10\ \mu g\ kg^{-1}$	de − 30 % a + 10 %
$> 10\ \mu g\ kg^{-1}$	de − 20 % a + 10 %

1.2.3.3. Precisión:

En el caso de análisis repetidos de una muestra de referencia en condiciones de reproducibilidad, los valores típicos del coeficiente de variación (CV) calculados según la ecuación de Horwitz [$(CV(\%) = 2^{(1-0{,}5\ \log C)}$], donde C es el contenido expresado como potencia de 10, serán los siguientes:

Contenido (fracción de masa)	CV (%)
$1\ \mu g\ kg^{-1}$	45 %
$10\ \mu g\ kg^{-1}$	32 %
$100\ \mu g\ kg^{-1}$	23 %
$1\ \mu g\ kg^{-1}$	16 %

Tratándose de análisis realizados en condiciones de repetibilidad, los valores típicos del coeficiente de variación intralaboratorio estarán comprendido entre la mitad y dos tercios de los valores arriba indicados.

1.2.3.4. Límite de detección:

Deberá ser adecuado a los fines que se buscan (véase el punto 1.2.6.1).

1.2.3.5. Límite de determinación:

Deberá ser adecuado a los fines que se buscan (véase el punto 1.2.6.2).

1.2.3.6. Sensibilidad:

Deberá ser adecuada a los fines que se buscan.

1.2.3.7. Practicabilidad:

La rapidez y el coste tienen menor importancia que en el caso de los métodos criba.

En los métodos de confirmación, la mayor parte de las características relacionadas con la practicabilidad tienen menor importancia que los demás criterios definidos en la presente Decisión. En general basta con disponer del equipo y los reactivos necesarios.

1.2.4. *Curvas de calibración*

Si el método depende de una curva de calibración, deberá darse la siguiente información:

— fórmula matemática que describe la curva de calibración,

— intervalos aceptables dentro de los cuales los parámetros de las curvas de calibración pueden variar de un día a otro,

— rango de trabajo de la curva de calibración.

Siempre que sea posible deberán utilizarse patrones internos y materiales de referencia adecuados para el control de calidad de las curvas de calibración de los métodos de confirmación y deberán darse datos sobre la varianza de las variables al menos dentro del rango de trabajo de la curva de calibración.

1.2.5. *Susceptibilidad a la interferencia*

1.2.5.1. Deberán indicarse cualesquiera variaciones de las distintas condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica (por ejemplo, estabilidad de los reactivos, composición de la muestra, pH o temperatura) que puedan afectar a los resultados analíticos. La descripción del método incluirá los medios necesarios para solucionar toda interferencia previsible. En caso necesario, se describirán sistemas alternativos de detección apropiados para la confirmación.

1.2.5.2. Si se realiza una co-cromatografía, entonces sólo deberá obtenerse un pico, siendo la altura (o superficie) del pico aumentado equivalente a la cantidad de sustancia analizada añadido. En el caso de CG o CL, la anchura del pico medida a la mitad de la altura máxima deberá oscilar entre 90 % y 110 % de la anchura original, y los tiempos de retención deberán ser idénticos, con una tolerancia del 5 %. Tratándose de métodos CCF, se intensificará únicamente la mancha que supuestamente se debe a la sustancia analizada; no deberá aparecer ninguna mancha nueva ni se modificará el aspecto.

1.2.5.3. Es de importancia primordial investigar toda interferencia que pudiera proceder de los componentes de la matriz.

1.2.6. *Relación entre los niveles de residuos permitidos y los límites analíticos*

1.2.6.1. En el caso de sustancias cuya utilización con animales de abasto no esté autorizada, el límite de detección del método analítico deberá ser lo suficientemente bajo como para poder detectar con una probabilidad mínima del 95 % los niveles de residuos que cabe esperar tras un uso ilegal de esas sustancias.

1.2.6.2. En el caso de sustancias con un límite de residuos máximo establecido, el límite de determinación del método más tres veces la desviación estándar de éste para una muestra en el límite de residuos máximo no deberá superar el límite de residuos máximo establecido.

1.2.6.3. En el caso de sustancias con un límite de residuos máximo establecido, el método deberá validarse en ese límite y a la mitad y el doble del mismo.

2. CRITERIOS PARA LA IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUO

2.1. Requisitos generales

Los laboratorios que efectúen análisis para la confirmación definitiva de la presencia de residuos de sustancias orgánicas con un peso molecular bajo deberán garantizar que se cumplen los criterios de interpretación de los resultados obtenidos de acuerdo con los requisitos establecidos en la presente sección. Dichos criterios tienen por objeto la identificación de la sustancia analizada y con ellos se pretende evitar que se produzcan falsos positivos. Para obtener un resultado positivo definitivo, los resultados analíticos deberán cumplir los criterios establecidos para el método de análisis en particular.

2.2. Consideraciones generales para el método analítico global

2.2.1. *Preparación de la muestra*

La muestra se recogerá, manipulará y procesará de manera que se obtenga la máxima probabilidad de detectar la sustancia analizada, si ésta se halla presente.

2.2.2. *Susceptibilidad a la interferencia*

Se aplicarán las mismas indicaciones que aparecen en el punto 1.2.5 (susceptibilidad a la interferencia).

2.2.3. *Criterios generales para el procedimiento global*

2.2.3.1. Deberán determinarse la especificidad (1.1.7) y los límites de detección (1.1.10 y determinación (1.1.11) del método utilizado para la determinación de la sustancia analizada en la muestra que se está investigando.

Nota: esta información podrá obtenerse a partir de datos experimentales o de planteamientos teóricos.

2.2.3.2. En el caso de un resultado positivo, el comportamiento físico y químico de la sustancia analizada durante el análisis no podrá distinguirse del patrón correspondiente en la muestra adecuada.

2.2.3.3. El resultado positivo o negativo del análisis sólo será valido dentro de los márgenes de especificidad y de los límites de detección y determinación del procedimiento utilizado para la sustancia analizada y el material de muestra que se están investigando.

2.2.3.4. Es preferible que el material enriquecido o de referencia que contenga cantidades conocidas de sustancia analizada se someta al proceso completo al mismo tiempo que cada una de las series de muestras analizadas. Asimismo, podrá añadirse a las muestras un patrón interno.

2.2.4. *Criterios para la preconcentración, purificación y separación fisica o química « off-line »*

2.2.4.1. En la muestra adecuada analizada deberá encontrarse en aquella fracción que sea típica para el patrón bajo las mismas condiciones experimentales.

2.2.4.2. Junto con el resultado final, positivo o negativo, deberán indicarse igualmente los datos correspondientes al tiempo de retención del patrón, muestras de control y fracciones problema.

2.2.5. *Criterios para las medidas cuantitativas*

2.2.5.1. Deberá medirse y especificarse la recuperación de todas las medidas cuantitativas.

2.2.5.2. La variabilidad intralaboratorio de la recuperación deberá ser lo más baja posible.

2.2.5.3. Deberá indicarse claramente si en los resultados finales se ha corregido o no la recuperación. En caso afirmativo, deberá describirse el método de corrección utilizado.

2.3. **Criterios correspondientes a los métodos de análisis que pueden utilizarse con fines de confirmación únicamente en combinación con otros métodos**

2.3.1. *Requisitos cualitativos para la determinación de una sustancia analizada por IE*

2.3.1.1. Deberá especificarse el rango de trabajo de la curva de calibración, que deberá cubrir por lo general una escala de concentración de diez unidades como mínimo.

2.3.1.2. Se requerirá un mínimo de seis puntos de calibración convenientemente distribuidos a lo largo de la curva de calibración.

2.3.1.3. Los parámetros adecuados de control de calidad deberán corresponderse con los de los ensayos precedentes, por ejemplo, UNE y parámetros de la curva de calibración.

2.3.1.4. Deberán incluirse muestras de control en cada ensayo. Niveles de concentración : cero y partes inferior, media y superior del rango de trabajo de la curva. Los resultados de los controles deberán concordar con los obtenidos en ensayos previos.

Junto con el resultado final, positivo o negativo, deberán indicarse todos los datos no procesados referentes a las muestras de control y a la fracción problema.

2.3.2. *Criterios para la determinación de una sustancia analizada por CG o CL utilizando detección no específica*

2.3.2.1. La sustancia analizada deberá eluir en el tiempo de retención típico del patrón correspondiente, en las mismas condiciones experimentales.

2.3.2.2. El máximo del pico más próximo en el cromatograma deberá hallarse separado del supuesto pico de la sustancia analizada al menos por una anchura total, medida al 10 % de la altura máxima.

2.3.2.3. Para obtener más información podrá realizarse una co-cromatografía y una cromatografía en la que se utilicen al menos dos columnas de diferente polaridad.

2.3.3. *Criterios para la determinación de una sustancia por CCF*

2.3.3.1. El valor o valores R_f de la sustancia analizada deberán concordar con el valor o valores R_f típicos del patrón. Este requisito se cumple cuando el valor o valores R_f de la sustancia analizada se hallen a un $\pm$ 3 % del valor o valores R_f del patrón en la mismas condiciones experimentales.

2.3.3.2. El aspecto de la sustancia analizada no deberá distinguirse del patrón.

2.3.3.3. El centro de la mancha más próxima al correspondiente de la sustancia analizada deberá hallarse separado de él por una distancia como mínimo igual a la mitad de la suma de los diámetros de las manchas.

2.3.3.4. Para más información podrá realizarse una co-cromatografía o una CCF bidimensional.

2.4. **Criterios para los métodos de análisis que pueden utilizarse con fines de confirmación**

2.4.1. *Criterios para la determinación de una sustancia analizada por CL/IE o CL/IMG*

2.4.1.1. En el caso de CL/IMG, el pico de la sustancia analizada en el Img se obtendrá a partir de al menos cinco fracciones de CL.

2.4.1.2. Deberán cumplirse los criterios mencionados en los puntos 2.2.4.1 y 2.2.4.2.

2.4.1.3. Reactivos

Deberán especificarse la procedencia y características del anticuerpo y de los demás reactivos.

2.4.1.4. Curva de calibración

Dado que el método se base en las curvas de calibración, deberá ofrecerse la información en el punto 1.2.4 (curva de calibración). Asimismo, deberán cumplirse los requisitos de calidad establecidos para el IE en los puntos 2.3.1.1 a 2.3.1.4.

2.4.1.5. Si el método no se utiliza en combinación con otros métodos, para efectuar la confirmación deberán realizarse dos separaciones de CL diferentes o dos inmunogramas que utilicen anticuerpos con especificidades diferentes.

2.4.2. *Criterios para la determinación de una sustancia analizada por CL-ES*

2.4.2.1. Deberán cumplirse los criterios mencionados en los puntos 2.3.2.1 y 2.3.2.2.

2.4.2.2. Los máximos de absorción en el espectro de la sustancia analizada deberán presentar las mismas longitudes de onda que los del patrón, dentro de un margen determinado por la resolución del sistema de detección. Para la detección por red de diodos, el margen típico es de ± 2 nm.

2.4.2.3. El espectro de la sustancia analizada por encima de los 220 nm no deberá diferir visualmente del espectro del patrón, para aquellas partes de ambos espectros con una absorbancia relativa ≥ 10 %. Este criterio se satisface cuando se presentan máximos iguales y en ninguno de los puntos observados la diferencia entre ambos espectros es superior al 10 % de la absorbancia del patrón.

2.4.2.4. Si el método no se utiliza en combinación con otros métodos, para efectuar la confirmación será obligatoria la co-cromatografía en la fase CL. En el punto 1.2.5.2 figuran los requisitos que debe cumplir la co-cromatografía.

2.4.3. *Criterios para la determinación de una sustancia analizada por CCF-ES*

2.4.3.1. El método deberá cumplir los criterios establecidos para la CCF en los puntos 2.3.3.1 a 2.3.3.3.

2.4.3.2. Los máximos de absorción del espectro de la sustancia analizada deberán presentar las mismas longitudes de onda que los del patrón, con un margen determinado por la resolución del sistema de detección.

2.4.3.3. El espectro de la sustancia analizada no deberá diferir visualmente del espectro del patrón.

2.4.3.4. Si el método no se utiliza en combinación con otros métodos, para efectuar la confirmación será obligatoria la co-cromatografía en la fase CCF. En el punto 1.2.5.2 figuran los requisitos que debe cumplir la co-cromatografía.

2.4.4. *Criterios para la determinación de una sustancia analizada por CG-EM*

2.4.4.1. Criterios para la CG

2.4.4.1.1. Deberán cumplirse los criterios que figuran en los puntos 2.3.2.1 y 2.3.2.2.

2.4.4.1.2. En caso de que se disponga de un material adecuado, se empleará un patrón interno. Para estos fines se dará preferencia a una forma de la sustancia analizada marcada con isótopo estable o, en su defecto, a un patrón afín con un tiempo de retención próximo al de la sustancia analizada.

2.4.4.1.3. La relación entre el tiempo de retención de la sustancia analizada en la CG y del patrón interno, es decir, el tiempo de retención relativo de la sustancia analizada, deberá ser la misma que la del patrón en la matriz apropiada, con un margen de tolerancia de ± 0,5 %.

2.4.4.1.4. Utilizado como método de confirmación, en caso de no utilizarse un patrón interno, la identificación de la sustancia analizada deberá completarse mediante co-cromatografía.

2.4.4.2. Criterios para la EMBR

2.4.4.2.1. Utilizado como método de criba, deberá determinarse al menos la intensidad del fragmento más abundante.

2.4.4.2.2. Utilizado como método de confirmación, deberán determinarse las intensidades de al menos cuatro fragmentos. En caso de que el compuesto no ofrezca la posibilidad de cuatro iones con el método empleado, la identificación de la sustancia analizada se basará en los resultados de al menos dos métodos de CG-EMBR con distintas técnicas de derivatización o ionización, cada uno de los cuales producirá dos o tres fragmentos.

El ión molecular será preferiblemente uno de los fragmentos seleccionados.

2.4.4.2.3. Las abundancias relativas de todos los fragmentos controlados de la sustancia analizada deberán ser iguales a las del patrón, preferentemente con un margen, por defecto o por exceso, del 10% (método IE) o del 20 % (método IQ).

2.4.5. *Criterios para la identificación de una sustancia analizada por IR*

2.4.5.1. Definición de picos adecuados

Se entiende por picos adecuados los máximos de absorción de un patrón en el espectro de infrarrojos que cumplan los requisitos siguientes.

2.4.5.1.1. El máximo de absorción se hallará en el intervalo de números de onda comprendido entre 1 800 y 500 cm^{-1}.

2.4.5.1.2. La intensidad de absorción no será inferior a :

a) una absorbancia molar específica de 40 respecto a la absorbancia cero y de 20 respecto a la línea de base del pico,

o

b) una absorbancia relativa del 12,5 % de la absorbancia del pico más intenso en la región de 1 800 - 500 cm^{-1}, cuando ambas se midan respecto a la absorbancia vero, y del 5 % de la absorbancia del pico más intenso de la región de 1 800 - 500 cm^{-1} cuando ambas se midan respecto a su línea de base del pico.

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

2.4.5.2. Se determinará el número de picos en el espectro de infrarrojos de la sustancia analizadas cuyas frecuencias se correspondan con un pico « concordante » en el espectro del patrón, con um margen de tolerancia, por exceso o por defecto, de ± 1 cm^{-1}.

2.4.5.3. Criterios para la IR

2.4.5.3.1. La absorción deberá estar presente en todas las regiones del espectro de la sustancia analizada que correspondan a un pico adecuado en el espectro de referencia del patrón.

2.4.5.3.2. Se requiere un mínimo de seis picos adecuados en el espectro de infrarrojos del patrón. Si el número de picos adecuados es inferior a dicha cifra, el espectro en cuestión no podrá utilizarse como espectro de referencia.

2.4.5.3.3. La « puntuación », es decir, el porcentaje de picos « concordantes » observados en el espectro de infrarrojos de la sustancia analizada será al menos de 50.

2.4.5.3.4. En caso de que no exista una correspondencia exacta para un pico adecuado, la región pertinente del espectro de la sustancia analizada deberá ser consistente con la presencia de al menos un pico « concordante ».

2.4.5.3.5. El procedimiento se aplicará únicamente a los picos de absorción del espectro de la muestra cuya intensidad sea al menos tres veces superior al ruido entre un pico y otro.

2.5. **Otros métodos de análisis**

Podrán emplearse para criba o confirmación métodos de análisis o combinaciones de métodos distintos de los estudiados en la Secciones 2.3 y 2.4 (por ejemplo, CL-EM, EM-EM o CG-IR), siempre que cumplan unos criterios análogos que permitan la identificación inequívoca de la sustancia analizada al nivel de interés.

APÉNDICE

Lista de abreviaturas y símbolos

IQ	= ionización química
IIE	= ionización por impacto electrónico
g	= gramo o gramos
CG	= cromatografía de gases
IE	= inmunoensayo
CIA	= cromatografía de inmunoafinidad
IMG	= inmunograma
IR	= espectrometría de infrarrojos
kg	= kilogramo o kilogramos (10^3 g)
l	= litro o litros
CL	= cromatografía de líquidos
EMBR	= espectrometría de masas de baja resolución
mg	= miligramo o miligramos (10^{-3} g)
EM	= espectrometría de masas
ng	= nanogramo o nanogramos (10^{-9} g)
UNE	= unión no específica
R_f	= distancia recorrida en relación con el frente del disolvente
ES	= espectrometría ; por ejemplo, con detección de una red de diodos
CCF	= cromatografía de capa fina
µg	= microgramo o microgramos (10^{-6} g)
/	= técnicas consecutivas « off-line »
-	= técnicas consecutivas « on-line »

ejemplo : CL/CG - EM = CL « off-line », a la que sigue una CG y una EM « on-line ».