

REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2021/808 DE LA COMISIÓN**de 22 de marzo de 2021****relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo, y por el que se derogan las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE****(Texto pertinente a efectos del EEE)**

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 999/2001, (CE) n.º 396/2005, (CE) n.º 1069/2009, (CE) n.º 1107/2009, (UE) n.º 1151/2012, (UE) n.º 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) n.º 1/2005 y (CE) n.º 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) n.º 854/2004 y (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo (Reglamento sobre controles oficiales) ⁽¹⁾, y en particular su artículo 34, apartado 6,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (UE) 2017/625 establece normas para la realización de los controles oficiales y otras actividades oficiales por parte de las autoridades competentes de los Estados miembros, a fin de verificar el cumplimiento de la legislación de la Unión, entre otros ámbitos, en el de la seguridad alimentaria en todas las fases del proceso de producción, transformación y distribución. Establece normas específicas sobre los controles oficiales relativos a sustancias cuyo uso pueda generar residuos en alimentos y piensos, así como requisitos generales para los métodos que deben utilizarse para el muestreo, los análisis y los ensayos de laboratorio durante los controles oficiales y otras actividades oficiales.
- (2) La Decisión 2002/657/CE de la Comisión ⁽²⁾ establece los requisitos para el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados de los análisis de determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y productos de origen animal, y la Decisión 98/179/CE de la Comisión ⁽³⁾ establece normas específicas relativas a la toma de muestras oficiales para el control de determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y productos de origen animal. Ambas decisiones fueron adoptadas con arreglo a la Directiva 96/23/CE del Consejo ⁽⁴⁾, derogada por el Reglamento (UE) 2017/625. En vista de los nuevos avances científicos, estas normas deben actualizarse e integrarse en el marco de los controles oficiales establecido en el Reglamento (UE) 2017/625.
- (3) Según lo dispuesto en el artículo 1, párrafo segundo, de la Decisión 2002/657/CE, dicha Decisión no será aplicable a sustancias sujetas a normas más específicas de la legislación de la Unión, a saber, micotoxinas en los productos alimenticios, dioxinas y policlorobifenilos (PCB) similares a las dioxinas en productos alimenticios, y plomo, cadmio, mercurio y benzo(a)pireno en los productos alimenticios. Las micotoxinas presentes en los productos alimenticios deben cumplir los requisitos establecidos en el Reglamento (CE) n.º 401/2006 de la Comisión ⁽⁵⁾, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. En el caso de las dioxinas y los PCB similares a las dioxinas, se aplica el Reglamento (UE) 2017/644 de la Comisión ⁽⁶⁾, por el que se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control de los

⁽¹⁾ DO L 95 de 7.4.2017, p. 1.

⁽²⁾ Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 14 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (DO L 221 de 17.8.2002, p. 8).

⁽³⁾ Decisión 98/179/CE de la Comisión, de 23 de febrero de 1998, por la que se fijan normas específicas relativas a la toma de muestras oficiales para el control de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos (DO L 65 de 5.3.1998, p. 31).

⁽⁴⁾ Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, relativa las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE (DO L 125 de 23.5.1996, p. 10).

⁽⁵⁾ Reglamento (CE) n.º 401/2006 de la Comisión, de 23 de febrero de 2006, por el que se establecen los métodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios (DO L 070 de 9.3.2006, p. 12).

⁽⁶⁾ Reglamento (UE) 2017/644 de la Comisión, de 5 de abril de 2017, por el que se establecen métodos de muestreo y de análisis para el control de los niveles de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios y por el que se deroga el Reglamento (UE) n.º 589/2014 (DO L 92 de 6.4.2017, p. 9).

niveles de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios. El Reglamento (CE) n.º 333/2007 de la Comisión ⁽⁷⁾ establece las disposiciones relativas al muestreo y el análisis para los controles oficiales de plomo, cadmio, mercurio y benzo(a)pireno en los productos alimenticios.

- (4) Por motivos de claridad y seguridad jurídica, conviene fusionar las disposiciones aplicables al muestreo y análisis de las sustancias farmacológicamente activas en un único acto jurídico, como en el caso de las micotoxinas, las dioxinas, los PCB similares a las dioxinas, el plomo, el cadmio, el mercurio y el benzo(a)pireno en los productos alimenticios.
- (5) Por tanto, deben derogarse las Decisiones 98/179/CE y 2002/657/CE y sustituirse por el presente Reglamento.
- (6) Según lo dispuesto en el Reglamento (CE) n.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽⁸⁾, los coccidiostáticos e histomonóstatos pueden ser utilizados como aditivos para piensos, por lo que el Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión ⁽⁹⁾, que establece los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos, se aplica a los análisis del contenido de estas sustancias en los piensos. No obstante, dicho Reglamento debe aplicarse cuando el análisis de los piensos se realiza como parte de las medidas de seguimiento durante las investigaciones de la fuente de muestras no conformes en casos de incumplimiento, supuesto o demostrado, de las normas de la Unión aplicables al uso de sustancias farmacológicamente activas autorizadas, o sus residuos, en medicamentos veterinarios o como aditivos de piensos, o de las normas de la Unión aplicables al uso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, o sus residuos.
- (7) A fin de garantizar la continuidad de la ejecución de los controles oficiales y otras actividades oficiales en residuos de sustancias farmacológicamente activas, y con el fin de evitar que todos los métodos deban ser revalidados al mismo tiempo, los métodos que hayan sido validados antes de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento podrán seguir utilizándose durante un período de tiempo limitado, siempre que se cumplan los requisitos de los puntos 2 y 3 del anexo I de la Decisión 2002/657/CE. Procede, por tanto, conceder a los Estados miembros tiempo suficiente para aplicar los requisitos establecidos en el presente Reglamento a todos los métodos analíticos.
- (8) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de Vegetales, Animales, Alimentos y Piensos.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Objeto y ámbito de aplicación

El presente Reglamento establece las normas sobre los métodos analíticos utilizados para el muestreo y los análisis de laboratorio relativos a residuos de sustancias farmacológicamente activas en animales vivos productores de alimentos, partes y fluidos de su cuerpo, excrementos, tejidos, productos de origen animal, subproductos animales, piensos y agua. Establece asimismo las normas para la interpretación de los resultados de dichos análisis de laboratorio.

El presente Reglamento se aplica a los controles oficiales destinados a verificar el cumplimiento de los requisitos relativos a la presencia de residuos de sustancias farmacológicamente activas.

⁽⁷⁾ Reglamento (CE) n.º 333/2007 de la Comisión, de 28 de marzo de 2007, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control de los niveles de elementos traza y de los contaminantes de proceso en los productos alimenticios (DO L 088 de 29.3.2007, p. 29).

⁽⁸⁾ Reglamento (CE) n.º 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal (DO L 268 de 18.10.2003, p. 29).

⁽⁹⁾ Reglamento (CE) n.º 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos (DO L 54 de 26.2.2009, p. 1).

Artículo 2

Definiciones

A efectos del presente Reglamento, se aplicarán las definiciones del artículo 2 del Reglamento Delegado (UE) 2019/2090 de la Comisión ⁽¹⁰⁾, del Reglamento (UE) 2019/1871 de la Comisión ⁽¹¹⁾, del artículo 2 del Reglamento (CE) n.º 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹²⁾ y del Reglamento (CEE) n.º 315/93 del Consejo ⁽¹³⁾.

También se aplicarán las siguientes definiciones:

- 1) «recuperación absoluta»: cantidad de analito recuperado en la fase final de un proceso analítico dividida entre la cantidad de analito de la muestra original, expresada como porcentaje;
- 2) «exactitud»: grado de acuerdo entre un resultado de ensayo y el valor de referencia verdadero aceptado, determinada estimando la veracidad y la precisión ⁽¹⁴⁾;
- 3) «error alfa (α)»: probabilidad de que la muestra analizada sea conforme, aunque se haya obtenido un resultado de medición no conforme;
- 4) «analito»: componente de un sistema que debe analizarse;
- 5) «sustancia autorizada»: sustancia farmacológicamente activa autorizada para el uso en animales productores de alimentos de conformidad con la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁵⁾;
- 6) «error beta (β)»: probabilidad de que la muestra analizada sea en realidad no conforme, aunque se haya obtenido un resultado de medición conforme;
- 7) «sesgo»: diferencia entre el valor estimado del resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado;
- 8) «patrón de calibración»: referencia trazable para las mediciones que representa la cantidad de sustancia de interés de una manera que vincula su valor a una base de referencia;
- 9) «material de referencia certificado (MRC)»: material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos ⁽¹⁶⁾;
- 10) «cocromatografía»: técnica en la que se aplica a un soporte cromatográfico una sustancia desconocida junto con uno o varios compuestos conocidos, con la expectativa de que el comportamiento relativo de las sustancias desconocidas y conocidas ayude a identificar la sustancia desconocida;
- 11) «estudio colaborativo»: análisis de la misma muestra o muestras utilizando el mismo método para determinar las características de funcionamiento del método en diferentes laboratorios. Permite calcular el error aleatorio de medición y el sesgo de laboratorio del método utilizado;

⁽¹⁰⁾ Reglamento Delegado (UE) 2019/2090 de la Comisión, de 19 de junio de 2019, que complementa al Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que respecta a los casos de sospecha o constatación de incumplimiento de las normas de la Unión aplicables al uso de sustancias farmacológicamente activas autorizadas o sus residuos en medicamentos veterinarios o como aditivos de piensos o de las normas de la Unión aplicables al uso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas o sus residuos (DO L 317 de 9.12.2019, p. 28).

⁽¹¹⁾ Reglamento (UE) 2019/1871 de la Comisión, de 7 de noviembre de 2019, relativo a los valores de referencia para las sustancias farmacológicamente activas no autorizadas presentes en los alimentos de origen animal y por el que se deroga la Decisión 2005/34/CE (DO L 289 de 8.11.2019, p. 41).

⁽¹²⁾ Reglamento (CE) n.º 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n.º 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 152 de 16.6.2009, p. 11).

⁽¹³⁾ Reglamento (CEE) n.º 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios (DO L 037 de 13.2.1993, p. 1).

⁽¹⁴⁾ ISO 3534-1: 2006. Estadística. Vocabulario y símbolos. Parte 1: Términos estadísticos generales y términos empleados en el cálculo de probabilidades (capítulo 1).

⁽¹⁵⁾ Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios (DO L 311 de 28.11.2001, p. 1).

⁽¹⁶⁾ JCGM 200:2008, Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales y términos asociados (VIM) (capítulo 5. Patrones de medida). Tercera edición (2008): <https://www.iso.org/sites/JCGM/VIM-JCGM200.htm>.

- 12) «método de confirmación»: método que proporciona información completa o complementaria que permite identificar y, de ser necesario, cuantificar de manera inequívoca la sustancia de alguna de las siguientes maneras:
- a) en el límite máximo de residuos o contenido máximo de sustancias autorizadas;
 - b) en el valor de referencia a efectos de intervención de las sustancias prohibidas o no autorizadas para las que se haya establecido dicho valor;
 - c) en la concentración más baja que se pueda alcanzar razonablemente de la sustancia prohibida o no autorizada para las que no se haya establecido el valor de referencia a efectos de intervención;
- 13) «factor de cobertura (k)»: número que expresa el nivel de confianza deseado y que está asociado a la incertidumbre expandida;
- 14) «límite de decisión para confirmación (CC α)»: límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error de α que una muestra no es conforme, y el valor $1 - \alpha$ significa certeza estadística en porcentaje de que se ha superado el límite permitido;
- 15) «capacidad de detección del cribado (CC β)»: contenido mínimo de analito que puede ser detectado o cuantificado en una muestra con una probabilidad de error de β :
- a) en el caso de sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas, la CC β es la concentración más baja en la que un método es capaz de detectar o cuantificar, con una certeza estadística de $1 - \beta$, muestras que contengan residuos de sustancias prohibidas o no autorizadas;
 - b) en el caso de sustancias autorizadas, la CC β es la concentración en la que el método es capaz de detectar concentraciones por debajo del límite permitido con una certeza estadística de $1 - \beta$;
- 16) «material de muestra enriquecido»: muestra enriquecida con una cantidad conocida del analito que debe detectarse o cuantificarse;
- 17) «estudio interlaboratorios»: organización, realización y evaluación de ensayos de la misma muestra o muestras por dos laboratorios o más, con arreglo a condiciones predeterminadas, para evaluar el funcionamiento de los ensayos, ya sea en forma de estudio colaborativo o de ensayo de aptitud;
- 18) «patrón interno»: sustancia, no contenida en la muestra, que tiene propiedades fisicoquímicas lo más parecidas posible a las del analito que debe identificarse o cuantificarse;
- 19) «nivel de interés»: concentración de una sustancia o un analito en una muestra que es significativa para determinar su conformidad con la legislación en lo relativo a:
- a) el límite máximo de residuos o el contenido máximo de sustancias autorizadas con arreglo al Reglamento (CE) n.º 124/2009 de la Comisión ⁽¹⁷⁾ y al Reglamento (UE) n.º 37/2010 de la Comisión ⁽¹⁸⁾;
 - b) el valor de referencia a efectos de intervención de las sustancias prohibidas o no autorizadas para las que se haya establecido dicho valor de referencia con arreglo al Reglamento (UE) 2019/1871;
 - c) la concentración más baja que se pueda alcanzar analíticamente de las sustancias prohibidas o no autorizadas para las que no se haya establecido valor de referencia a efectos de intervención;
- 20) «nivel mínimo calibrado (NMC)»: concentración mínima a la que se ha calibrado el sistema de medición;
- 21) «matriz»: material del que se toma una muestra;
- 22) «efecto matriz»: diferencia de respuesta analítica entre un patrón disuelto en el disolvente y un patrón similar a la matriz, con o sin corrección mediante patrón interno;

⁽¹⁷⁾ Reglamento (CE) n.º 124/2009 de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que establece los contenidos máximos de coccidiostáticos e histomonóstatos presentes en los alimentos como resultado de la transferencia inevitable de estas sustancias en los piensos a los que no están destinadas (DO L 040 de 11.2.2009, p. 7).

⁽¹⁸⁾ Reglamento (UE) n.º 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal (DO L 015 de 20.1.2010, p. 1).

- 23) «patrón similar a la matriz»: matriz en blanco (libre de analito) a la que se añade analito en un rango de concentraciones tras el tratamiento de la muestra;
- 24) «patrón de matriz enriquecida»: matriz en blanco (libre de analito) a la que, antes de la extracción con disolventes y del tratamiento de la muestra, se ha añadido el analito en un rango de concentraciones;
- 25) «mensurando»: cantidad particular que se somete a medición;
- 26) «incertidumbre de medida»: parámetro no negativo, asociado con el resultado de la medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mensurando, a partir de la información utilizada;
- 27) «criterios de funcionamiento»: requisitos aplicables a una característica de funcionamiento en función de los cuales se puede determinar que un método analítico es adecuado para el uso previsto y ofrece resultados fiables;
- 28) «precisión»: grado de acuerdo entre los resultados independientes de ensayos obtenidos en condiciones prescritas. Se expresa como la desviación estándar o el coeficiente de variación de los resultados del ensayo;
- 29) «método cualitativo»: método analítico que detecta o identifica una sustancia o grupo de sustancias basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas;
- 30) «método cuantitativo»: método analítico que determina la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico de unidades apropiadas;
- 31) «recuperación»: cantidad correcta recuperada de un analito dividida entre la cantidad enriquecida del analito en la muestra matriz, expresada como porcentaje;
- 32) «corrección de la recuperación»: uso de patrones internos, de una curva de calibración de matriz y de un factor de corrección de la recuperación, y también una combinación de estos métodos;
- 33) «material de referencia»: material, suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, que se ha establecido que es idóneo para el uso previsto en un proceso de medición o en un examen de las propiedades nominales ⁽¹⁹⁾;
- 34) «efecto matriz relativo»: diferencia de respuesta analítica entre un patrón disuelto en el disolvente y un patrón similar a la matriz con corrección mediante patrón interno;
- 35) «repetibilidad»: precisión bajo condiciones en las que se obtienen resultados independientes, con el mismo método, sobre idénticas muestras, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, y utilizando los mismos equipos de medición, durante un corto intervalo de tiempo;
- 36) «reproducibilidad»: precisión bajo condiciones en las que los resultados se obtienen con el mismo método, sobre muestras idénticas, en laboratorios diferentes, con operadores distintos y utilizando equipos diferentes ⁽²⁰⁾;
- 37) «robustez»: vulnerabilidad de un método analítico frente a cambios de las condiciones experimentales en las que puede aplicarse el método tal cual o con determinadas modificaciones menores;
- 38) «método de cribado»: método utilizado para el cribado de una sustancia o clase de sustancia en el nivel de interés;
- 39) «concentración de cribado establecida»: concentración igual o inferior a la $CC\beta$ en la que una medición de cribado clasifica la muestra como «cribado positivo» potencialmente no conforme y que da lugar a que se realice un ensayo de confirmación;
- 40) «selectividad»: capacidad de un método de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias;
- 41) «estudio intralaboratorio» o «validación interna»: estudio analítico realizado por un solo laboratorio que utiliza el mismo método para proceder a análisis, separados por largos intervalos de tiempo justificados, de idénticos o diferentes materiales de ensayo en condiciones distintas;

⁽¹⁹⁾ «Directrices sobre la terminología analítica» (CAC/GL 72-2009) de la Comisión del Codex Alimentarius (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud).

⁽²⁰⁾ ISO 5725-1:1994. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 1: Principios generales y definiciones (capítulo 3).

- 42) «adición de patrón»: procedimiento en el que una parte de la muestra se analiza tal cual, y a las demás porciones de ensayo se les añade, antes del análisis, cantidades conocidas del analito patrón;
- 43) «analito patrón»: analito de contenido y pureza conocidos y certificados que se utiliza como referencia en el análisis;
- 44) «sustancia»: materia de composición constante caracterizada por las entidades que la componen y por determinadas propiedades físicas;
- 45) «porción de ensayo»: cantidad de material extraído de la muestra en la que se realiza el análisis o la observación;
- 46) «veracidad»: grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado;
- 47) «unidades»: unidades descritas en la norma ISO 80000 ⁽²¹⁾ y la Directiva 80/181/CEE del Consejo ⁽²²⁾;
- 48) «validación»: demostración mediante examen y puesta a disposición de pruebas efectivas de que se cumplen los requisitos particulares de un uso específico previsto ⁽²³⁾, gracias a un estudio intralaboratorio o un estudio colaborativo;
- 49) «reproducibilidad intralaboratorio» o «reproducibilidad de precisión intermedia/interna»: precisión de la medición en determinadas condiciones intralaboratorio en un laboratorio específico.

Artículo 3

Métodos de análisis

Los Estados miembros garantizarán que las muestras tomadas de conformidad con el artículo 34 del Reglamento (UE) 2017/625 se analicen utilizando métodos que cumplan los siguientes requisitos:

- 1) estar documentados en instrucciones de ensayo, de preferencia con arreglo a los anexos de la norma ISO 78-2:1999 Química. Diseños para normas. Parte 2: Métodos de análisis químico ⁽²⁴⁾;
- 2) cumplir los criterios de funcionamiento y otros requisitos aplicables a los métodos analíticos establecidos en el capítulo 1 del anexo I del presente Reglamento;
- 3) haber sido validados de conformidad con los requisitos establecidos en los capítulos 2 y 4 del anexo I del presente Reglamento;
- 4) permitir el cumplimiento de los valores de referencia a efectos de intervención establecidos en el Reglamento (UE) 2019/1871, la detección de sustancias prohibidas y no autorizadas, así como el cumplimiento de los contenidos máximos (CM) fijados con arreglo al Reglamento (CEE) n.º 315/93 y al Reglamento (CE) n.º 124/2009 y los límites máximos de residuos (LMR) fijados con arreglo a los Reglamentos (CE) n.º 1831/2003 y n.º 470/2009.

Artículo 4

Control de calidad

Los Estados miembros garantizarán la calidad de los resultados de los análisis efectuados de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625, en particular controlando los resultados de los ensayos o de la calibración con arreglo a la norma ISO/IEC 17025:2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración, y de conformidad con los requisitos de control de calidad durante análisis de rutina establecidos en el capítulo 3 del anexo I del presente Reglamento.

⁽²¹⁾ ISO 80000-1:2009. Magnitudes y unidades. Parte 1: Generalidades.

⁽²²⁾ Directiva 80/181/CEE del Consejo, de 20 de diciembre de 1979, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre las unidades de medida y por la que se deroga la Directiva 71/354/CEE (DO L 39 de 15.2.1980, p. 40).

⁽²³⁾ ISO/IEC 17025:2017. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (capítulo 3).

⁽²⁴⁾ ISO 78-2: 1999 Química. Diseños para normas. Parte 2: Métodos de análisis químico (anexos).

*Artículo 5***Interpretación de los resultados**

- 1) El resultado de un análisis se considerará no conforme cuando sea igual o superior al límite de decisión para confirmación (CC α).
- 2) En el caso de sustancias autorizadas para las que se haya establecido un LMR o un CM, el límite de decisión para confirmación (CC α) será la concentración a partir de la cual pueda decidirse, con certeza estadística de valor numérico $1 - \alpha$, que se ha superado el límite permitido.
- 3) En el caso de sustancias no autorizadas o prohibidas para las que no se haya establecido un LMR o un CM en una especie o producto determinados, el límite de decisión para confirmación (CC α) será el nivel de concentración más bajo en el que pueda decidirse, con certeza estadística de valor numérico $1 - \alpha$, que el analito se encuentra presente.
- 4) En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, el error α será igual o inferior al 1 %. Para todas las demás sustancias, el error α será igual o inferior al 5 %.

*Artículo 6***Métodos de muestreo**

Los Estados miembros garantizarán que las muestras se tomen, manipulen y etiqueten de conformidad con los métodos detallados de muestreo establecidos en el anexo II del presente Reglamento.

*Artículo 7***Derogaciones y medidas transitorias**

Quedan derogadas las Decisiones 2002/657/CE y 98/179/CE a partir de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento.

No obstante, hasta el 10 de junio de 2026, los requisitos establecidos en los puntos 2 y 3 del anexo I de la Decisión 2002/657/CE seguirán aplicándose a los métodos que hayan sido validados antes de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento.

*Artículo 8***Entrada en vigor**

El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

El presente Reglamento será obligatorio en todos sus elementos y directamente aplicable en cada Estado miembro.

Hecho en Bruselas, el 22 de marzo de 2021.

Por la Comisión
La Presidenta
Ursula VON DER LEYEN

ANEXO I

CAPÍTULO 1

CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO Y OTROS REQUISITOS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS**1.1. Requisitos aplicables a los métodos de cribado****1.1.1. Categorías de métodos adecuados de cribado**

Como métodos adecuados de cribado se utilizarán métodos cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos.

1.1.2. Requisitos aplicables a los métodos de cribado biológicos, bioquímicos o fisicoquímicos

La CC β de las sustancias prohibidas o no autorizadas será la más baja posible de alcanzar razonablemente y, en cualquier caso, inferior al valor de referencia a efectos de intervención (VRI) de las sustancias para las que se haya establecido dicho valor en virtud del Reglamento (UE) 2019/1871.

En el caso de las sustancias farmacológicamente activas autorizadas, la CC β será inferior al límite máximo de residuos (LMR) o al contenido máximo (CM).

Solo se utilizarán para el cribado aquellos métodos analíticos de los que se pueda demostrar de manera documentada que están validados y que tienen un porcentaje de falsos conformes (error β) igual o inferior al 5 %. Si se sospecha que un resultado es no conforme, dicho resultado se confirmará mediante un método de confirmación.

Los métodos cuantitativos de cribado utilizados tanto para el cribado como para la confirmación cumplirán los mismos requisitos de exactitud, rango y precisión que los descritos en los puntos 1.2.2.1 y 1.2.2.2.

1.2. Requisitos aplicables a los métodos de confirmación**1.2.1. Requisitos generales para métodos de confirmación**

El CC α de las sustancias prohibidas o no autorizadas será el más bajo posible de alcanzar razonablemente. El CC α de las sustancias prohibidas o no autorizadas para las que se haya establecido un VRI en virtud del Reglamento (UE) 2019/1871 será igual o inferior al VRI.

El CC α de las sustancias autorizadas será superior, pero lo más cercano posible, al LMR o al CM.

Para la confirmación, solo se utilizarán aquellos métodos analíticos de los que se pueda demostrar de manera documentada que están validados y que tienen un porcentaje de falsos no conformes (error α) igual o inferior al 1 % para las sustancias prohibidas o no autorizadas, o igual o inferior al 5 % para las sustancias autorizadas.

Los métodos de confirmación proporcionarán información sobre la composición química estructural del analito. En consecuencia, los métodos de confirmación basados exclusivamente en análisis cromatográficos sin recurrir a la detección por espectrometría de masas no son adecuados por sí solos como métodos de confirmación para sustancias farmacológicamente activas prohibidas o no autorizadas. En caso de que la espectrometría de masas no sea adecuada para sustancias autorizadas, pueden utilizarse otros métodos, como la HPLC-DAD y la HPLC-FLD o una combinación de ambas.

Cuando el método de confirmación así lo requiera, al comenzar el procedimiento de extracción se añadirá un patrón interno adecuado a la porción de ensayo. Se emplearán, según su disponibilidad, formas marcadas por isótopos estables del analito, especialmente adecuadas para la detección por espectrometría de masas, o compuestos análogos cuya estructura esté estrechamente relacionada con el analito. Cuando no pueda utilizarse un patrón interno adecuado, la identificación del analito se confirmará, de preferencia, mediante cocromatografía⁽¹⁾. En este caso, solo se obtendrá un pico, en el cual la altura (o superficie) máxima será equivalente a la cantidad de analito añadida. Si esto no es posible, se utilizarán patrones similares a la matriz o de matriz enriquecida.

⁽¹⁾ La cocromatografía es un procedimiento en el que se divide el extracto muestra en dos partes antes de las etapas cromatográficas. Una parte se cromatografía tal cual. La otra parte se mezcla con el analito patrón que debe medirse y se cromatografía también esta mezcla. La cantidad de analito patrón añadido debe ser similar a la cantidad de analito estimada en el extracto. La cocromatografía se usa para mejorar la identificación de un analito por métodos cromatográficos, especialmente cuando no puede utilizarse un patrón interno adecuado.

1.2.2. Criterios generales de funcionamiento para métodos de confirmación

1.2.2.1. Veracidad por recuperación

En el caso de análisis repetidos de un material de referencia certificado, la desviación entre la fracción de masa media determinada experimentalmente, con corrección de recuperación, y el valor certificado cumplirá los rangos de veracidad mínima recogidos en el cuadro 1.

Cuadro 1

Veracidad mínima de los métodos cuantitativos

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

Cuando no se disponga de materiales de referencia certificados, es aceptable que la veracidad de las mediciones se evalúe de otras maneras como, por ejemplo, utilizando materiales con valores asignados a partir de estudios interlaboratorios o añadiendo cantidades conocidas del analito o analitos a una matriz en blanco.

1.2.2.2. Precisión

El coeficiente de variación (CV) para el análisis repetido de un material de referencia o enriquecido, en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio, no superará el nivel calculado mediante la ecuación de Horwitz. La ecuación es la siguiente:

$$CV = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$$

donde C es la fracción de masa expresada como potencia (exponente) de 10 (por ejemplo, 1 mg/g = 10⁻³). Para las fracciones de masa inferiores a 120 µg/kg, la aplicación de la ecuación de Horwitz arroja valores inaceptablemente altos. Por consiguiente, el coeficiente de variación máximo autorizado no deberá ser superior a los valores presentados en el cuadro 2.

Cuadro 2

Coefficiente de variación aceptable

Fracción de masa	CV de reproducibilidad (%)
> 1 000 µg/kg	16 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
> 120 µg/kg – 1 000 µg/kg	22 (adaptado a partir de la ecuación de Horwitz)
10 – 120 µg/kg	25 *
< 10 µg/kg	30 *

* * El CV (%) presentado es una orientación y debe ser tan bajo como sea razonablemente posible.

En el caso de los análisis efectuados en condiciones de repetibilidad, el coeficiente de variación en condiciones de repetibilidad será igual o inferior a dos tercios de los valores enumerados en el cuadro 2.

1.2.3. Requisitos aplicables a la separación cromatográfica

Para la cromatografía líquida (LC) o de gases (GC), el tiempo de retención mínimo aceptable para los analitos examinados será el doble del tiempo de retención correspondiente al volumen vacío de la columna. El tiempo de retención del analito en el extracto corresponderá al del patrón de calibración, al de un patrón similar a la matriz o al de un patrón de matriz enriquecida, con una tolerancia de ± 0,1 minuto. Para la cromatografía rápida, en la que el tiempo de retención es inferior a 2 minutos, se aceptará una desviación inferior al 5 % del tiempo de retención. En caso de que se utilice un patrón interno, la relación entre el tiempo de retención cromatográfica del

analito y el del patrón interno, es decir, el tiempo relativo de retención del analito, se corresponderá con el del patrón de calibración, el patrón similar a la matriz o el patrón de matriz enriquecida, con una desviación máxima del 0,5 % para la cromatografía de gases y del 1 % para la cromatografía líquida, en el caso de métodos validados a partir de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento.

1.2.4. Criterios específicos de funcionamiento para la espectrometría de masas

1.2.4.1. Detección por espectrometría de masas

La detección por espectrometría de masas se llevará a cabo mediante alguna de las opciones siguientes:

1. registro de espectros de masa de barrido completo (FS);
2. registro selectivo de iones (SIM);
3. técnicas de espectrometría de masas secuencial (MS^n), como el registro selectivo de la reacción (SRM);
4. una combinación de técnicas de espectrometría de masas (MS) o espectrometría de masas secuencial (MS^n) con modos de ionización adecuados.

Son adecuadas la espectrometría de masas de baja resolución (LRMS, a resolución de masa unitaria) y la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS), incluidos, por ejemplo, los instrumentos de doble focalización, de tiempo de vuelo (TOF) y orbitrap.

Para confirmar la identidad de un analito en HRMS, la desviación de la masa de todos los iones de diagnóstico será inferior a 5 ppm (o en el caso de $m/z < 200$, inferior a 1 mDa). Sobre esta base, debe seleccionarse la resolución efectiva idónea para el fin previsto. La resolución será normalmente superior a 10 000 para todo el rango de masas a un valle del 10 %, o superior a 20 000 en anchura a media altura (FWHM).

Cuando la determinación mediante espectrometría de masas se lleve a cabo registrando espectros de barrido completo (tanto LRMS como HRMS), solo son adecuados los iones de diagnóstico con una intensidad relativa superior al 10 % en el espectro de referencia del patrón de calibración, patrón similar a la matriz o patrones de matriz enriquecida. Los iones de diagnóstico incluirán el ion molecular (si se encuentra presente en una intensidad de ≥ 10 % del pico base) y los iones fragmento o iones producto característicos.

Selección del ion precursor: cuando la determinación mediante espectrometría de masas se realiza por fragmentación tras la selección del ion precursor, la selección del ion precursor se realiza con una resolución de masa unitaria o mejor. El ion precursor seleccionado será el ion molecular, los aductos característicos del ion molecular, los iones producto característicos o uno de sus iones isotópicos. Si la selección del precursor tiene una ventana de selección de la masa de más de un dalton (por ejemplo, en caso de adquisición independiente de datos), la técnica se considerará un análisis confirmatorio de barrido completo.

Iones fragmento e iones producto: los iones producto o fragmento seleccionados serán iones de diagnóstico para el analito o producto medido. Siempre que sea posible, se omitirán las transiciones no selectivas (por ejemplo, el catión de tropilio o la pérdida de agua). La abundancia de iones de diagnóstico se determinará a partir del área o la altura del pico de los cromatogramas integrados de ion extraído. Esto también se aplica cuando se utilizan mediciones de barrido completo para la identificación. La relación señal-ruido de todos los iones de diagnóstico será igual o superior a tres a uno (3:1).

Intensidades relativas: las intensidades relativas de los iones de diagnóstico (relación de iones) se expresan como porcentaje de la intensidad del ion o de la transición más abundante. La relación de iones debe determinarse comparando espectros o integrando las señales de las trazas de masa de iones extraídos. La relación de iones del analito que debe confirmarse corresponderá a las de los patrones similares a la matriz, los patrones de matriz enriquecida o las disoluciones patrón en concentraciones comparables, medidas en las mismas condiciones, con una desviación relativa de ± 40 %.

Para todos los análisis mediante espectrometría de masas, se determinará al menos una relación de iones. Se trata preferentemente de iones obtenidos en un único barrido, pero los iones también pueden proceder de distintos barridos en la misma inyección (es decir, barrido completo y barrido de fragmentación).

1.2.4.2. Identificación

Se utilizará un sistema de puntos de identificación para seleccionar los modos de adquisición y los criterios de evaluación adecuados. Para confirmar la identidad de sustancias para las que se ha establecido un LMR (uso autorizado) presentes en una matriz, se requiere un mínimo de 4 puntos de identificación. En el caso de las sustancias no autorizadas o prohibidas, se requieren 5 puntos de identificación. Un punto puede proceder de la separación cromatográfica. El cuadro 3 muestra el número de puntos de identificación que aporta cada una de las técnicas. Para alcanzar el número de puntos de identificación necesario para la confirmación, pueden añadirse puntos de identificación obtenidos a partir de diferentes técnicas.

1. Todos los análisis mediante espectrometría de masas deberán combinarse con una técnica de separación que muestre una potencia de separación y una selectividad suficientes para la aplicación específica. Entre las técnicas de separación adecuadas se encuentran la cromatografía líquida y de gases, la electroforesis capilar (CE) y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). En los casos en que el analito presente cualquier compuesto isobárico o isomérico, la aceptabilidad del tiempo de retención (a saber, $\pm 0.5\%$ en GC y $\pm 1\%$ en LC y SFC) es obligatoria para confirmar su identidad.
2. Se combinará un máximo de tres técnicas distintas para alcanzar el número mínimo de puntos de identificación.
3. Los diferentes modos de ionización (por ejemplo, la ionización por impacto electrónico y la ionización química) se consideran técnicas diferentes.

Cuadro 3

Puntos de identificación por técnica

Técnica	Puntos de identificación
Separación (modo GC, LC, SFC, CE)	1
Ion LR-MS	1
Selección de ion precursor en un rango de masas $<\pm 0,5$ Da	1 (indirecto)
Ion producto LR-MS ⁿ	1,5
Ion HR-MS	1,5
Ion producto HR-MS ⁿ	2,5

Cuadro 4

Ejemplos de número de puntos de identificación, técnicas específicas y combinaciones de técnicas (n = un número entero)

Técnica(s)	Separación	Número de iones	Puntos de identificación
GC-MS (EI o CI)	GC	n	1 + n
GC-MS (EI y CI)	GC	2 (EI) + 2 (CI)	1 + 4 = 5
GC-MS (EI o CI) 2 derivados	GC	2 (Derivado A) + 2 (Derivado B)	1 + 4 = 5
LC-MS	LC	n (MS)	1 + n
GC- o LC-MS/MS	GC o LC	1 precursor + 2 productos	1 + 1 + 2 × 1,5 = 5
GC- o LC-MS/MS	GC o LC	2 precursores + 2 productos	1 + 2 + 2 × 1,5 = 6
GC- o LC-MS ³	GC o LC	1 precursor + 1 producto MS ² + 1 producto MS ³	1 + 1 + 1,5 + 1,5 = 5
GC- o LC-HRMS	GC o LC	n	1 + n × 1,5

GC- o LC-HRMS/MS	GC o LC	1 precursor (rango de masas $<\pm 0,5$ Da) + 1 producto	$1 + 1 + 2,5 = 4,5$
GC- o LC-HRMS y HRMS/MS	GC o LC	1 ion de barrido completo + 1 ion producto de HRMS ^a	$1 + 1,5 + 2,5 = 5$
GC- y LC-MS	GC y LC	2 iones (GCMS) + 1 ion (LCMS)	$1 + 1 + 2 + 1 + 1 = 6$

^a No se obtiene ningún punto de identificación adicional para la selección del ion precursor, si este es el mismo ion (o un aducto o isótopo) que el ion HRMS registrado en barrido completo.

1.2.5. *Criterios de funcionamiento específicos para la determinación de un analito mediante cromatografía líquida con técnicas de detección distintas de la espectrometría de masas*

Solo en el caso de sustancias autorizadas, podrán utilizarse las técnicas siguientes como alternativa a los métodos basados en la espectrometría de masas, siempre que se cumplan los criterios pertinentes para estas técnicas:

1. espectrofotometría con detección por diodos en serie (DAD) mediante barrido completo en caso de utilizarse con HPLC;
2. espectrofotometría de detección por fluorescencia (FLD) en caso de utilizarse con HPLC.

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

1.2.5.1. *Criterios de funcionamiento de la espectrofotometría con detección por diodos en serie mediante barrido completo*

Deberán cumplirse los criterios de funcionamiento de la separación cromatográfica incluidos en el capítulo 1.2.3.

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

1.2.5.2. *Criterios de funcionamiento para la espectrofotometría de detección por fluorescencia*

Deberán cumplirse los criterios de funcionamiento de la separación cromatográfica incluidos en el capítulo 1.2.3.

La selección de las longitudes de onda de excitación y de emisión en combinación con las condiciones cromatográficas se harán de tal manera que se minimicen los efectos de componentes de interferencia en extractos de muestras en blanco. Debe haber un mínimo de 50 nanómetros entre la longitud de onda de excitación y la de emisión.

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

Ello se aplica a las moléculas que presentan fluorescencia natural y a las que la presentan después de transformación o derivatización.

CAPÍTULO 2

VALIDACIÓN

2.1. Características de funcionamiento que deben determinarse para los métodos analíticos

Mediante la validación del método, se demostrará que el método analítico cumple los criterios relativos a las características de funcionamiento aplicables. Controles con objetivos diferentes requieren distintas categorías de métodos. El cuadro 5 determina qué característica de funcionamiento debe verificarse para qué tipo de método. En el presente capítulo se ofrece una explicación más detallada de cada parámetro.

Cuadro 5

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

Método	Confirmación		Cribado		
	Cualitativo	Cuantitativo	Cualitativo	Semicuantitativo	Cuantitativo
Sustancias	A	A, B	A, B	A, B	A, B
Identificación con arreglo a 1.2	x	x			
CC α	x	x			
CC β	-		x	x	x
Veracidad		x			x
Precisión		x		(x)	x
Efecto matriz relativo/ recuperación absoluta *		x			x
Selectividad/especificidad		x	x	x	x
Estabilidad #		x	x	x	x
Robustez		x	x	x	x

x: Deberá demostrarse mediante la validación que se cumplen los requisitos de la característica de funcionamiento.

x) Los métodos de cribado semicuantitativo no necesitan cumplir los requisitos de precisión del capítulo 1.2.2.2. No obstante, se determinará la precisión con el fin de demostrar la idoneidad del método para evitar resultados analíticos que den falsos conformes.

A: sustancias prohibidas o no autorizadas

B: sustancias autorizadas

Si se dispone de datos de estabilidad de los analitos de una matriz procedentes de publicaciones científicas o de otro laboratorio, no es necesario que el laboratorio en cuestión determine de nuevo estos datos. Sin embargo, las referencias a los datos disponibles sobre la estabilidad de los analitos en disolución solo son aceptables si se aplican condiciones idénticas.

* Pertinentes para que los métodos de MS demuestren mediante la validación que cumplen los requisitos aplicables a las características de funcionamiento. El efecto matriz relativo del método se determinará cuando dicho efecto no se haya evaluado durante el proceso de validación. La recuperación absoluta del método se determinará cuando no se utilice ningún patrón interno o ninguna calibración de matriz enriquecida.

2.2. Veracidad, repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

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

2.2.1. Validación convencional

El cálculo de los parámetros por métodos convencionales exige la realización de diversos experimentos aislados. Debe determinarse cada característica de funcionamiento para cada cambio importante (véase la sección 2.4). Con los métodos multianalito pueden analizarse varios analitos simultáneamente, siempre que se hayan descartado posibles interferencias de importancia. De modo similar pueden determinarse varias características de funcionamiento. Así pues, para minimizar la carga de trabajo es conveniente combinar los experimentos cuando sea posible (por ejemplo, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio con la especificidad, el análisis de muestras en blanco para determinar el límite de decisión para confirmación y las pruebas de especificidad).

2.2.1.1. Veracidad mediante material de referencia certificado

Es preferible determinar la veracidad de un método analítico mediante material de referencia certificado (MRC). El procedimiento para ello se describe en la norma ISO 5725-4:1994 ⁽²⁾.

Presentamos un ejemplo a continuación:

1. analice seis muestras idénticas del MRC siguiendo las instrucciones de ensayo del método;
2. determine la concentración del analito en cada una de dichas muestras;
3. calcule la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) para estas seis muestras;
4. calcule la veracidad dividiendo la concentración media detectada entre el valor certificado (medido como concentración) y multiplíquelo por 100, para expresar el resultado en porcentaje.

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

2.2.1.2. Veracidad mediante muestras enriquecidas

Si no se dispone de material de referencia certificado, la veracidad del método se determinará mediante experimentos con una matriz en blanco enriquecida, como mínimo de acuerdo con el sistema siguiente:

1. Para los métodos validados a partir de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento, seleccione material en blanco y enriquezca en una concentración de:
 - a) 0,5 ⁽³⁾, 1,0 y 1,5 veces el VRI; o
 - b) 0,1 ⁽⁴⁾, 1,0 y 1,5 veces el LMR o el CM de sustancias autorizadas; o
 - c) 1,0, 2,0 y 3,0 veces el NMC de sustancias no autorizadas (para las que no se ha establecido VRI).
2. En cada nivel deberá procederse al análisis con un mínimo de seis muestras idénticas.
3. Analice las muestras.
4. Calcule la concentración detectada en cada muestra.
5. Calcule la veracidad de cada muestra utilizando la ecuación que figura a continuación y, seguidamente, calcule la veracidad media y el coeficiente de variación medio de los seis resultados en cada nivel de concentración.

Veracidad (%) = (concentración media detectada tras introducción del factor corrector de recuperación) × 100/nivel de enriquecimiento

En el caso de los métodos para sustancias autorizadas validados antes de la fecha de aplicación del presente Reglamento, será suficiente una determinación de la veracidad del método utilizando seis alícuotas enriquecidas a 0,5, 1,0 y 1,5 veces el LMR o el CM.

⁽²⁾ ISO 5725-4:2020 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado (artículo 3).

⁽³⁾ Cuando, para una sustancia farmacológicamente activa no autorizada, la validación de una concentración de 0,5 veces el VRI no sea razonablemente posible, la concentración de 0,5 veces el VRI puede sustituirse por la concentración más baja que pueda alcanzarse razonablemente entre 0,5 veces y 1,0 veces el VRI.

⁽⁴⁾ Cuando, para una determinada sustancia farmacológicamente activa, la validación de una concentración de 0,1 veces el LMR no sea razonablemente posible, la concentración de 0,1 veces el LMR puede sustituirse por la concentración más baja que pueda alcanzarse razonablemente entre 0,1 veces y 0,5 veces el LMR.

2.2.1.3. Repetibilidad

1. Para los métodos validados a partir de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento, se preparará un conjunto de muestras de matrices en blanco idénticas de la misma especie. Se enriquecerán con el analito para obtener concentraciones equivalentes a:
 - a) 0,5 ⁽⁵⁾, 1,0 y 1,5 veces el VRI, o
 - b) 0,1 ⁽⁶⁾, 1,0 y 1,5 veces el LMR o el CM de sustancias autorizadas, o
 - c) 1,0, 2,0 y 3,0 veces el NMC de sustancias no autorizadas o prohibidas en caso de que no sea aplicable VRI alguno.
2. En cada nivel deberá procederse al análisis con un mínimo de seis muestras idénticas.
3. Analice las muestras.
4. Calcule la concentración detectada en cada muestra.
5. Calcule la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.
6. Repita estos pasos al menos otras dos veces.
7. Calcule las medias generales de las concentraciones, de las desviaciones estándar (haciendo la media de las desviaciones estándar al cuadrado de las distintas ocasiones y calculando la raíz cuadrada del resultado obtenido) y de los coeficientes de variación de las muestras enriquecidas.

En el caso de los métodos para sustancias autorizadas validados antes de la fecha de aplicación del presente Reglamento, será suficiente una determinación de la repetibilidad con matrices enriquecidas en concentraciones a 0,5, 1,0 y 1,5 veces el LMR o el CM.

Otra posibilidad es calcular la repetibilidad con arreglo a la norma ISO 5725-2: 2019 ⁽⁷⁾.

2.2.1.4. Reproducibilidad intralaboratorio

1. Para las validaciones efectuadas tras la entrada en vigor del presente Reglamento, prepare un conjunto de muestras de materiales de ensayo especificados (de matrices idénticas o diferentes), enriquecidas con el analito o analitos para dar concentraciones equivalentes a:
 - a) 0,5 ⁽⁵⁾, 1,0 y 1,5 veces el VRI, o
 - b) 0,1 ⁽⁶⁾, 1,0 y 1,5 veces el LMR o el CM de sustancias autorizadas, o
 - c) 1,0, 2,0 y 3,0 veces el NMC de sustancias no autorizadas o prohibidas en caso de que no sea aplicable VRI alguno.
2. Realice el análisis de cada nivel de concentración con al menos seis muestras idénticas de material en blanco.
3. Analice las muestras.
4. Calcule la concentración detectada en cada muestra.

⁽⁵⁾ Cuando, para una sustancia farmacológicamente activa no autorizada, la validación de una concentración de 0,5 veces el VRI no sea razonablemente posible, la concentración de 0,5 veces el VRI puede sustituirse por la concentración más baja que pueda alcanzarse razonablemente entre 0,5 veces y 1,0 veces el VRI.

⁽⁶⁾ Cuando, para una determinada sustancia farmacológicamente activa, la validación de una concentración de 0,1 veces el LMR no sea razonablemente posible, la concentración de 0,1 veces el LRM puede sustituirse por la concentración más baja que pueda alcanzarse razonablemente entre 0,1 veces y 0,5 veces el LMR.

⁽⁷⁾ ISO 5725-2:2019 Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normal (artículo 3).

5. Repita estos pasos al menos otras dos veces con diferentes lotes de material en blanco, diferentes operadores y tantas condiciones ambientales diferentes como sea posible, por ejemplo lotes diferentes de reactivos y disolventes, temperaturas ambiente diferentes, distintos instrumentos o una variación de otros parámetros.
6. Determine la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) de las muestras enriquecidas.

En el caso de los métodos para sustancias autorizadas validados antes de la fecha de aplicación del presente Reglamento, será suficiente una determinación de la reproducibilidad intralaboratorio con matrices enriquecidas en concentraciones a 0,5, 1,0 y 1,5 veces el LMR o el CM.

Otra posibilidad es calcular la reproducibilidad intralaboratorio/precisión intermedia de acuerdo con las normas ISO 5725-2: 2019, ISO 11843-1: 1997 ⁽⁸⁾ o Codex CAC/GL 59-2006 ⁽⁹⁾.

2.2.2. Validación mediante modelos alternativos

El cálculo de los parámetros mediante modelos alternativos exige la realización de un plan experimental, que deberá elaborarse en función del número de especies y de factores diferentes que se pretenda estudiar. Por ello, en el primer paso de todo el proceso de validación se estudiarán las poblaciones de muestras que se analizarán en el futuro en el laboratorio para determinar las especies más importantes y los factores que pueden influir en los resultados de las mediciones. El enfoque factorial permite evaluar la incertidumbre de medida de los resultados de ensayos obtenidos en un laboratorio determinado en diversas condiciones de ensayo, como diferentes analistas, instrumentos, lotes de reactivos, matrices, duraciones de ensayo y temperaturas de ensayo. Posteriormente, se debe elegir el rango de concentraciones adaptado a la finalidad en función del LMR o del CM de sustancias autorizadas, o del VRI o del NMC de sustancias prohibidas o no autorizadas.

El enfoque factorial tiene por objeto establecer datos de precisión y de medición fiables mediante una variación controlada simultánea de los factores seleccionados. Permite evaluar el impacto combinado de los efectos factoriales y los efectos aleatorios. El diseño experimental también permite la investigación de la robustez ⁽¹⁰⁾ del método analítico y la determinación de la desviación estándar de la reproducibilidad interna con las distintas matrices.

Se presenta a continuación un ejemplo de planteamiento alternativo mediante un plan de diseño experimental ortogonal.

Pueden examinarse hasta siete factores (factores de ruido). El estudio está diseñado de tal manera que la precisión, la veracidad (basada en muestras enriquecidas), la sensibilidad, la incertidumbre de medida y las concentraciones críticas puedan determinarse simultáneamente mediante la aplicación del plan experimental.

Cuadro 6

Ejemplo de plan de diseño experimental ortogonal con siete factores (I-VII) variados en dos niveles (A/B) en un estudio de validación con ocho tandas (combinación de nivel de factores)

Factor	I	II	III	IV	V	VI	VII
Tanda 01	A	A	A	A	A	A	A
Tanda 02	A	A	B	A	B	B	B
Tanda 03	A	B	A	B	A	B	B
Tanda 04	A	B	B	B	B	A	A

⁽⁸⁾ ISO 11843-1:1997 Capacidad de detección. Parte 1: Términos y definiciones

⁽⁹⁾ «Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados» (CAC/GL 59-2006) de la Comisión del Codex Alimentarius (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud).

⁽¹⁰⁾ Los cambios de las condiciones experimentales a que se hace referencia pueden consistir en cambios en los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento o las condiciones ambientales o de preparación de la muestra. Deberá indicarse cualquier variación de las condiciones experimentales susceptibles de fluctuación en la práctica (por ejemplo, estabilidad de los reactivos, composición de la muestra, pH o temperatura) que puedan afectar a los resultados analíticos.

Tanda 05	B	A	A	B	B	A	B
Tanda 06	B	A	B	B	A	B	A
Tanda 07	B	B	A	A	B	B	A
Tanda 08	B	B	B	A	A	A	B

El cálculo de las características del método se efectuará según lo descrito por Jülicher *et al* ⁽¹¹⁾.

2.2.3. Otros enfoques de validación

Pueden utilizarse otros enfoques para demostrar que el método cumple los criterios de funcionamiento para las características de funcionamiento, a condición de que alcancen la misma cantidad y calidad de información. La validación también puede realizarse a través de estudios interlaboratorios, como se establece en el Codex Alimentarius, las normas ISO o la IUPAC ⁽¹²⁾, o de acuerdo con métodos alternativos tales como estudios en un solo laboratorio o la validación interna ⁽¹³⁾. Si se aplican procedimientos alternativos de validación, se indicará en el protocolo de validación el modelo y la estrategia, con sus respectivos requisitos previos, hipótesis y fórmulas, o, cuando menos, sus referencias.

2.3. Selectividad/especificidad

La capacidad de discriminación entre el analito y las sustancias estrechamente relacionadas se determinará al máximo posible. Se determinará la interferencia de homólogos, isómeros, productos de degradación, sustancias endógenas, análogos, productos metabólicos del residuo de interés, de compuestos de la matriz o de cualquier otra sustancia que pueda interferir y, en caso necesario, se modificará el método para evitar las interferencias detectadas. Para determinar la especificidad del método, se utilizará el siguiente planteamiento:

1. Seleccione una gama de compuestos químicamente relacionados u otras sustancias que puedan encontrarse en las muestras con el compuesto de interés, y compruebe si podrían interferir en el análisis de los analitos.
2. Analice un número apropiado de muestras en blanco representativas como, por ejemplo, diferentes lotes o lotes de diferentes especies animales ($n \geq 20$) y verifique posibles interferencias de señales, picos o indicios de iones en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito.
3. Enriquezca muestras en blanco representativas hasta una concentración adecuada con sustancias que pueden interferir con la identificación o la cuantificación del analito e investigue si la sustancia añadida:
 - a) puede conducir a una falsa identificación;
 - b) dificulta la identificación del analito;
 - c) influye de manera apreciable en la cuantificación.

2.4. Robustez

El método analítico se someterá a ensayo para comprobar su funcionamiento continuado en diferentes condiciones experimentales, que incluyen, por ejemplo, condiciones de muestreo diferentes y cambios menores que pueden producirse en los ensayos rutinarios. Para comprobar la robustez del método, los cambios introducidos en las condiciones experimentales deben ser menores. Se evaluará la importancia de estos cambios. Se determinará cada característica de funcionamiento para todos los cambios menores que hayan tenido un efecto demostrado significativo en el funcionamiento del análisis.

⁽¹¹⁾ Jülicher, B., Gowik, P., Uhlig, S. (1998). Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 123, 173-179.

⁽¹²⁾ IUPAC (1995). Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Applied Chem*, 67(2), 331-343.

⁽¹³⁾ Gowik, P., Jülicher, B., 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(1-2), 221-232.

2.5. Estabilidad

Se determinará la estabilidad del patrón de calibración, el patrón similar a la raíz y los patrones de matriz enriquecida, así como la estabilidad de los componentes del analito o la matriz en la muestra, durante el almacenamiento o el análisis, ya que las inestabilidades pueden influir en el resultado del ensayo.

Normalmente, la estabilidad del analito está debidamente caracterizada para diversas condiciones de almacenamiento. Los experimentos realizados para supervisar las condiciones de almacenamiento de los patrones y las muestras, que se llevan a cabo como parte del sistema normal de acreditación de laboratorio y control de calidad, pueden proporcionar la información requerida. Si los datos de estabilidad de los analitos en la matriz están disponibles (por ejemplo, a partir de información de los laboratorios de referencia de la UE, datos publicados, etc.), no es necesario que cada laboratorio determine dichos datos. Sin embargo, referirse a los datos disponibles sobre la estabilidad de los analitos en la disolución y en la matriz solo es aceptable si se aplican condiciones idénticas.

En caso de que no se disponga de los datos de estabilidad requeridos, deberán utilizarse los métodos descritos a continuación.

2.5.1. Determinación de la estabilidad del analito en la solución

1. Prepare nuevas soluciones madre del analito y dilúyalas, siguiendo las instrucciones de ensayo, para obtener el número suficiente de alícuotas (por ejemplo, 40) de cada concentración seleccionada. Se prepararán muestras de:
 - a) soluciones del analito empleadas para el enriquecimiento;
 - b) soluciones del analito empleadas para el análisis final;
 - c) cualquier otra solución de interés (por ejemplo, patrones derivados).
2. Mida el contenido de analito en la solución recién preparada, siguiendo las instrucciones de ensayo.
3. Vierta los volúmenes adecuados en recipientes apropiados, etiquételos y almacénelos de acuerdo con las condiciones de luz y temperatura del esquema del cuadro 7. El tiempo de almacenamiento será el elegido teniendo en cuenta la práctica analítica aplicada, idealmente hasta que se observen los primeros fenómenos de degradación durante la identificación o la cuantificación. Si no se observa degradación durante el estudio de estabilidad, la duración de almacenamiento del estudio de estabilidad será igual a la duración del período máximo de almacenamiento de la solución.
4. Calcule la concentración del analito (o los analitos) en cada alícuota en comparación con la concentración del analito en la solución recién preparada, siguiendo la siguiente fórmula:

$$\text{analito restante (\%)} = C_i \times 100 / C_{\text{recién preparada}}$$

C_i = concentración en el momento i

$C_{\text{recién preparada}}$ = concentración de la solución recién preparada

El valor medio de cinco soluciones idénticas que se hayan almacenado no diferirá en más de un 15 % del valor medio de cinco soluciones idénticas recién preparadas. El valor medio de las cinco soluciones recién preparadas se utilizará como base para calcular la diferencia porcentual.

Cuadro 7

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

	- 20 °C	+ 4 °C	+ 20 °C
Oscuridad	10 alícuotas	10 alícuotas	10 alícuotas
Luz			10 alícuotas

2.5.2. Determinación de la estabilidad del analito (o los analitos) en la matriz

1. Utilice muestras reales siempre que sea posible. Cuando no disponga de una matriz real, utilice una matriz en blanco enriquecida con el analito.

2. Si dispone de matriz real, determine la concentración en la matriz mientras aún está fresca. Almacene otras alícuotas de la matriz real homogeneizado a -20 °C, o menos si es necesario, y determine las concentraciones del analito mientras la muestra se conserve en el laboratorio.
3. Si no dispone de matriz real, tome una matriz en blanco y homogenícela. Divida la matriz en cinco alícuotas. Enriquezca cada alícuota con el analito, preparado de preferencia en una pequeña cantidad de solución acuosa. Analice una alícuota inmediatamente. Almacene las alícuotas restantes a una temperatura mínima de -20 °C, o inferior si es necesario, y analícelas tras un almacenamiento a corto, medio y largo plazo, teniendo en cuenta los métodos analíticos aplicados.
4. Registre el tiempo máximo aceptable y las condiciones óptimas de almacenamiento.

El valor medio de cinco soluciones idénticas que se hayan almacenado no diferirá en más de la reproducibilidad intralaboratorio del método con respecto al valor medio de cinco soluciones idénticas recién preparadas. El valor medio de las cinco soluciones recién preparadas se utilizará como base para calcular la diferencia porcentual.

2.6. Límite de decisión para confirmación (CC α)

El CC α se determinará para los métodos de confirmación. El CC α se establecerá en condiciones que cumplan los requisitos de identificación o identificación más cuantificación definidos en los «Criterios de funcionamiento y otros requisitos de los métodos analíticos» establecidos en el capítulo 1.

Para el control de conformidad de las muestras, la incertidumbre estándar combinada de medida ya ha sido tenida en cuenta en el valor del CC α (límite de decisión para confirmación).

1. En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, el CC α se calculará como sigue:
 - a) Método 1: mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843-1:1997⁽¹⁴⁾ (donde se denomina «valor crítico de la variable de estado neto»). En este caso, se utilizará material en blanco enriquecido hasta el VRI o el NMC, y por encima de ellos, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal cuando sea posible, o la concentración recalculada, frente a la concentración añadida. El límite de decisión es igual a la concentración correspondiente en la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio en la ordenada en el origen. Este método solo es aplicable a ensayos cuantitativos. Los límites de decisión obtenidos con este método se verificarán analizando matrices en blanco enriquecidas al límite de decisión calculado.
 - b) Método 2: analizando un mínimo de 20 materiales en blanco representativos por matriz, para poder calcular la relación señal-ruido en la banda de tiempo en la que se espera encontrar el analito. Puede usarse como límite de decisión un valor triple al de la relación señal-ruido. Esto es aplicable a análisis cuantitativos y cualitativos. Los límites de decisión obtenidos con este método se verificarán analizando matrices en blanco enriquecidas al límite de decisión calculado.
 - c) Método 3: $CC\alpha = NMC + k(\text{unilateral, } 99\%) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida al NMC}$

En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, dependiendo del experimento de validación (y de sus respectivos grados de libertad), podría aplicarse razonablemente la distribución t, o si se toma como base la distribución de Gauss (unilateral, $n = \infty$) se utilizará un factor k de 2,33.

La reproducibilidad intralaboratorio y la veracidad son adecuadas para definir la incertidumbre estándar (combinada) de medida, si se determina teniendo en cuenta todos los factores pertinentes de influencia.

El método 2 para el cálculo del CC α solo podrá utilizarse hasta el 1 de enero de 2026 en el caso de métodos validados antes de la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento. Para los métodos validados después de la entrada en vigor del presente Reglamento, solo se utilizarán los métodos 1 o 3.

⁽¹⁴⁾ ISO 11843-1:1997 Capacidad de detección. Parte 1: Términos y definiciones

2. En el caso de sustancias autorizadas, el CC α se calculará como sigue:

- a) para las sustancias autorizadas en combinaciones de matrices/especies para las que se haya fijado un LMR o un CM:
 - i) Método 1: mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843-1:1997 (donde se denomina «valor crítico de la variable de estado neto»). En este caso, se utilizará material en blanco enriquecido hasta el LMR o el CM, y por encima de ellos, en incrementos equidistantes. Analice las muestras. Tras la identificación, delimite la señal cuando sea posible, o la concentración recalculada, frente a la concentración añadida. El límite de decisión ($\alpha = 5\%$) es igual a la concentración correspondiente al LMR o el CM más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio en el límite permitido.
 - ii) Método 2: $CC\alpha = LMR$ (o CM) + $k(\text{unilateral, } 95\%) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida al LMR o CM}$.

En el caso de sustancias autorizadas, dependiendo del experimento de validación (y de sus respectivos grados de libertad), podría aplicarse razonablemente la distribución t, o si se toma como base la distribución de Gauss (unilateral, $n = \infty$) se utilizará un factor k de 1,64.

La reproducibilidad intralaboratorio y la veracidad son adecuadas para definir la incertidumbre estándar (combinada) de medida, si se determina teniendo en cuenta todos los factores pertinentes de influencia.

En el caso de las sustancias farmacológicamente activas para las que se haya establecido un LMR de la suma de diferentes sustancias, la CC α de la sustancia con la concentración más alta de la muestra se utilizará como CC α para evaluar la suma de las sustancias en la muestra medida.

- b) En el caso de sustancias autorizadas en combinaciones de matrices/especies para las que no se haya fijado LMR, no deberán hallarse residuos a menos que haya tenido lugar un tratamiento autorizado de conformidad con el artículo 11 de la Directiva 2001/82/CE. En el caso de las sustancias autorizadas para las que no se haya fijado LMR, para el cálculo del CC α se utilizará el LMR en cascada establecido en virtud del Reglamento de Ejecución (UE) 2018/470 de la Comisión ⁽¹⁵⁾. Se aplicará el método 1 o 2 del párrafo anterior, pero «LMR» se refiere a «0,5 veces el LMR en cascada, con el objetivo 0,1 vez el LMR en cascada, cuando sea razonablemente viable».

2.7. Capacidad de detección del cribado (CC β)

Se determinará la CC β para los métodos de cribado. La CC β se establecerá tal como se define en los «Criterios de funcionamiento y otros requisitos de los métodos analíticos» establecidos en el capítulo 1 del presente anexo, y de conformidad con los requisitos establecidos en el cuadro 5. Sin embargo, no es necesario aplicar a los métodos de cribado todos los requisitos de identificación (véanse los puntos 1.2.3, 1.2.4 y 1.2.5).

1. En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, se garantizará un error β máximo del 5 %. La CC β se calculará de la manera siguiente:
 - a) Método 1: el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843-1:1997 (denominado valor mínimo detectable de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material en blanco representativo enriquecido, en incrementos equidistantes, hasta el VRI, y por debajo del mismo, o si no se ha establecido VRI, alrededor de la concentración de cribado establecida. Analice las muestras. Delimite la señal frente a la concentración añadida. La capacidad de detección es igual a la concentración correspondiente a la concentración de cribado establecida más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio medido en la concentración de cribado establecida. La extrapolación muy inferior al nivel de enriquecimiento más bajo (< 50 % del nivel de enriquecimiento más bajo) se confirmará mediante datos experimentales en la fase de validación.
 - b) Método 2: Investigación del material en blanco enriquecido hasta la concentración de cribado establecida y por encima de la misma. Para cada nivel de concentración, se procederá al análisis de 20 materiales en blanco enriquecidos a fin de garantizar la fiabilidad de esta determinación. La capacidad de detección del método es igual al nivel de concentración en el que solo queda $\leq 5\%$ de resultados de falso conforme.
 - c) Método 3: $CC\beta = \text{concentración de cribado establecida} + k(\text{unilateral, } 95\%) \times \text{incertidumbre estándar (combinada) de medida en la concentración de cribado establecida o por encima de ella}$.

⁽¹⁵⁾ Reglamento de Ejecución (UE) 2018/470 de la Comisión, de 21 de marzo de 2018, que establece normas detalladas sobre el límite máximo de residuos a tener en cuenta a efectos de control de alimentos derivados de animales tratados en la UE según lo dispuesto en el artículo 11 de la Directiva 2001/82/CE (DO L 79 de 22.3.2018, p. 16).

En el caso de sustancias farmacológicamente activas no autorizadas o prohibidas, dependiendo del experimento de validación (y de sus respectivos grados de libertad), podría aplicarse razonablemente la distribución t, o si se toma como base la distribución de Gauss (unilateral, $n = \infty$), se utilizará un factor k de 1,64.

La reproducibilidad intralaboratorio y la veracidad son adecuadas para definir la incertidumbre estándar (combinada) de medida, si se determina teniendo en cuenta todos los factores pertinentes de influencia.

2. En el caso de sustancias autorizadas, se garantizará un error β máximo del 5 %. La $CC\beta$ se calculará de la manera siguiente:

a) Método 1: mediante el procedimiento de curva de calibración, de conformidad con la norma ISO 11843-1:1997 (denominado valor mínimo detectable de la variable de estado neto). En este caso, se utilizará material en blanco representativo enriquecido, en incrementos equidistantes, hasta el límite permitido empezando por la concentración de cribado establecida, y por debajo de dicho límite. Analice las muestras e identifique los analitos. Calcule la desviación estándar del contenido medio medido en la concentración de cribado establecida.

La capacidad de detección es igual a la concentración correspondiente a la concentración de cribado establecida más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio medido en la concentración de cribado establecida.

b) Método 2: investigación del material en blanco enriquecido a niveles de concentración por debajo del límite permitido. Para cada nivel de concentración, se procederá al análisis de 20 materiales en blanco enriquecidos a fin de garantizar la fiabilidad de esta determinación. La capacidad de detección del método es igual al nivel de concentración en el que solo queda ≤ 5 % de resultados de falso conforme.

c) Método 3: $CC\beta$ = concentración de cribado establecida + $k(\text{unilateral, } 95 \%) \times$ incertidumbre estándar (combinada) de medida en la concentración de cribado establecida o por encima de ella.

En el caso de sustancias autorizadas, dependiendo del experimento de validación (y de sus respectivos grados de libertad), podría aplicarse razonablemente la distribución t, o si se toma como base la distribución de Gauss (unilateral, $n = \infty$), se utilizará un factor k de 1,64 (tanto si se usa un LMR en cascada como un LMR normal).

La reproducibilidad intralaboratorio y la veracidad son adecuadas para definir la incertidumbre estándar (combinada) de medida, si se determina teniendo en cuenta todos los factores pertinentes de influencia.

En el caso de las sustancias farmacológicamente activas para las que se haya establecido un LMR de la suma de diferentes sustancias, la $CC\beta$ de la sustancia con la concentración más alta de la muestra se utilizará como $CC\beta$ para evaluar la suma de las sustancias de la muestra medida.

2.8. Curvas de calibración

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

- 1) emplear al menos cinco niveles preferiblemente equidistantes (incluido el nivel cero) en la construcción de la curva;
- 2) describir el intervalo de trabajo de la curva;
- 3) describir la fórmula matemática de la curva y la bondad del ajuste de los datos (coeficiente de determinación R^2) a la curva;
- 4) describir los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva.

Para las curvas de calibración basadas en una disolución patrón, en patrones similares a la matriz o en patrones de matriz enriquecida, se indicarán los márgenes aceptables para los parámetros de la curva de calibración, que pueden variar de una serie a otra.

2.9. Recuperación absoluta

La recuperación absoluta del método se determinará cuando no se utilice ningún patrón interno o ninguna calibración de matriz enriquecida.

Cuando se cumplan los requisitos de veracidad establecidos en el cuadro 1, podrá utilizarse un factor de corrección fijo. En caso contrario, se aplicará el factor de recuperación obtenido para ese lote específico. Como alternativa, se utilizará el procedimiento de adición de patrón ⁽¹⁶⁾ o un patrón interno, en lugar de utilizar un factor de corrección de recuperación.

La recuperación absoluta se calculará para al menos seis lotes representativos de matriz.

Una alícuota de matriz en blanco se enriquecerá con el analito antes de la extracción, y una segunda alícuota de matriz en blanco se enriquecerá tras la preparación de la muestra a un nivel de concentración adecuado, y se determinará la concentración del analito.

La recuperación se calculará de la manera siguiente:

$$\text{Rec (analito)} = (\text{patrón de matriz enriquecida})/(\text{patrón similar a la matriz}) \times 100$$

2.10. Efecto matriz relativo

El efecto matriz relativo se determinará en todos los casos. Esto puede hacerse como parte de la validación o en experimentos separados. Se efectuará el cálculo del efecto matriz relativo para al menos 20 lotes en blanco diferentes (matrices/especies), según el ámbito de aplicación del método, como, por ejemplo, diferentes especies que deben cubrirse.

Tras la extracción, la matriz en blanco debe enriquecerse con el analito al VRI, el LMR o el CM, y debe analizarse junto con una disolución pura del analito.

El efecto matriz relativo o factor matriz (FM) se calcula como sigue:

$$\text{FM (patrón)} = \frac{\text{área del pico del PSM}}{\text{área del pico de la disolución patrón}}$$

$$\text{FM (PI)} = \frac{\text{área del pico del PI PSM}}{\text{área del pico del PI disolución}}$$

$$\text{FM (patrón normalizado para PI)} = \frac{\text{FM (patrón)}}{\text{FM (PI)}}$$

PI: patrón interno

PSM: patrón similar a la matriz

El coeficiente de variación no superará el 20 % para el FM (patrón normalizado para PI).

CAPÍTULO 3

CONTROL DE CALIDAD DURANTE ANÁLISIS DE RUTINA. VERIFICACIÓN CONTINUA DEL FUNCIONAMIENTO DEL MÉTODO

Deberán cumplirse los requisitos para garantizar la calidad de los resultados analíticos del capítulo 7.7 de la norma ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁷⁾.

Durante los análisis de rutina, el análisis de los materiales de referencia certificados (MRC) es la opción preferible para aportar pruebas del funcionamiento del método. Dado que rara vez se dispone de MRC que contengan los analitos pertinentes en los niveles de concentración requeridos, también pueden utilizarse como alternativa materiales de referencia suministrados y caracterizados por los laboratorios de referencia de la Unión Europea o por laboratorios que posean una acreditación ISO/IEC 17043: 2010 ⁽¹⁸⁾. Otra posibilidad es utilizar materiales de referencia internos que se controlen periódicamente.

La verificación continua del funcionamiento del método durante análisis de rutina debe llevarse a cabo en la fase de cribado y en la fase de confirmación.

⁽¹⁶⁾ La cantidad de analito patrón añadida puede ser, por ejemplo, entre dos y cinco veces superior al contenido estimado de analito en la muestra. Este procedimiento está diseñado para determinar el contenido de un analito en una muestra, teniendo en cuenta la recuperación del procedimiento analítico.

⁽¹⁷⁾ Norma ISO/IEC 17025: 2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (capítulo 7.7).

⁽¹⁸⁾ ISO/IEC 17043:2010 Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud.

1. Fase de cribado:

Para cada serie (tanda) de análisis realizados, se analizará simultáneamente un conjunto de las siguientes muestras de control de calidad:

- a) muestra de control de la adecuación del instrumento al sistema, idealmente específica del método;
- b) muestras de control de calidad enriquecidas en una concentración próxima a la concentración de cribado establecida e idealmente en la $CC\beta$ del cribado para sustancias farmacológicamente activas, así como para sustancias prohibidas o no autorizadas;
- c) muestra de control conforme (muestras en blanco) y, cuando sea pertinente, blancos de reactivo.

2. Fase de confirmación:

Para cada serie (tanda) de análisis realizados, se analizará simultáneamente un conjunto de las siguientes muestras de control de calidad:

- a) muestra de control de la adecuación del instrumento al sistema, idealmente específica del método;
- b) muestras de control de calidad enriquecidas en una concentración próxima al LMR o CM para las sustancias farmacológicamente activas o próxima al VRI o al NMC para las sustancias prohibidas o no autorizadas (muestras de control no conformes);
- c) muestra de control conforme (muestras en blanco) y, cuando sea pertinente, blancos de reactivo.

Se recomienda el siguiente orden para las muestras de control de calidad: muestra de control de la adecuación del instrumento al sistema, muestra de control conforme, muestras pendientes de confirmación, muestra de control conforme de nuevo y muestra de control de calidad enriquecida (muestras de control no conformes).

En el caso de los métodos cuantitativos, con cada tanda de muestras oficiales se analizará y medirá una curva de calibración antes o después de las muestras enumeradas en el párrafo anterior.

Cuando sea posible, se evaluará la veracidad (a partir de muestras enriquecidas) de todos los analitos de las muestras de control no conformes, mediante gráficos de control de calidad de conformidad con el capítulo 7.7 de la norma ISO/IEC 17025: 2017. Si ello requiere un número desproporcionado de determinaciones de veracidad, el número de analitos podrá reducirse a varios analitos representativos.

CAPÍTULO 4

AMPLIACIÓN DEL ÁMBITO DE APLICACIÓN VALIDADO DE UN MÉTODO VALIDADO CON ANTERIORIDAD

A veces es necesario ampliar el ámbito de aplicación de un método validado globalmente con anterioridad. En estos casos, la ampliación del ámbito de aplicación debe llevarse a cabo de manera eficiente y sólida desde el punto de vista analítico. Esto puede lograrse realizando una validación en un número reducido de muestras (por ejemplo, la mitad de muestras), en comparación con una validación completa.

No obstante, el tipo y el número de modificaciones que deben validarse en un único sistema de validación reducido siempre se basará en conocimientos especializados y experiencias anteriores. Por ejemplo, un cambio en la técnica de detección requeriría una validación completa en cualquier caso.

En general, para garantizar que el método siga siendo válido, su funcionamiento será objeto de un seguimiento continuo y se comparará con los parámetros de validación obtenidos inicialmente. Idealmente, este control continuo del funcionamiento del método está diseñado de manera que los datos que faltan para una validación completa puedan recogerse con el tiempo (por ejemplo, con algunos puntos de datos procedentes de muestras de control de calidad en cada serie analítica).

4.1. Ampliaciones de los métodos relativas al rango de concentraciones

Debido a cambios en los LMR, los CM y los VRI, puede resultar necesario ajustar el rango de concentraciones para el que está validado un método. En tal caso, es aceptable la aplicación de un sistema de validación reducido.

Las curvas de calibración del intervalo modificado deben prepararse según el procedimiento validado. Deben analizarse diferentes lotes enriquecidos a diferentes niveles de concentración (véanse los puntos 2.2.1 y 2.2.2). La veracidad, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio/precisión intermedia deben situarse dentro de un intervalo aceptable en comparación con los del método validado originalmente. Cuando proceda, debe volver a calcularse la $CC\beta$ (métodos de cribado) y el $CC\alpha$ (métodos de confirmación).

4.2. Ampliaciones de los métodos relativas a sustancias adicionales

En general, ampliar el método a otros compuestos solo es posible si se trata de analitos con estructura y características similares a las de los analitos que ya están incluidos en el método analítico. En tal caso, es aceptable la aplicación de un sistema de validación reducido. De la misma manera, no se permiten divergencias con respecto a la descripción del método.

Las curvas de calibración de las nuevas sustancias deben prepararse según el procedimiento validado. Deben analizarse diferentes tandas de materiales matriz enriquecidos a diferentes niveles de concentración (véanse los puntos 2.2.1 y 2.2.2). La veracidad, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio/precisión intermedia deben situarse dentro de un intervalo comparable a los de los demás analitos del método validado originalmente, y deben ajustarse a los requisitos establecidos en el punto 1.2.2. Deben calcularse la $CC\beta$ (métodos de cribado) y el $CC\alpha$ (métodos de confirmación) para los nuevos analitos.

4.3. Ampliaciones de los métodos relativas a matrices o especies

La decisión de incluir nuevas matrices o especies en un método analítico ya validado se tomará siempre caso por caso, basándose en el conocimiento y la experiencia adquiridos hasta el momento con el método y en experimentos preliminares que evalúen posibles efectos matriz e interferencias. En general, esto solo será posible en el caso de matrices que presenten propiedades similares y de analitos no críticos (estabilidad, detectabilidad).

Las curvas de calibración (patrón o matriz) deben prepararse según el procedimiento validado. Deben analizarse diferentes tandas de material matriz enriquecido a diferentes niveles de concentración (véanse los puntos 2.2.1 y 2.2.2). La veracidad, la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio/precisión intermedia deben situarse dentro de un intervalo aceptable en comparación con las del método validado originalmente, y deben ajustarse a los requisitos establecidos en el punto 1.2.2. En función del método de validación, puede ser necesario volver a calcular la $CC\beta$ (métodos de cribado) o el $CC\alpha$ (métodos de confirmación).

Si los resultados no se encuentran dentro de un intervalo aceptable en comparación con los valores de la matriz original, será necesaria una nueva validación completa para determinar los parámetros específicos de funcionamiento de la matriz o especie.

En aquellos casos en los que el LMR de una sustancia específica difiera en determinadas matrices, probablemente resultará muy difícil adaptar el ámbito de aplicación a la nueva matriz o especie y a la nueva concentración, ya que, en este caso, deben tenerse en cuenta dos modificaciones. En estos casos se recomienda realizar una validación completa.

ANEXO II

PROCEDIMIENTOS DE MUESTREO Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS OFICIALES**1. Cantidad de muestras**

Las cantidades mínimas de muestras se definirán en el programa nacional de control de residuos. Dichas cantidades serán suficientes para que los laboratorios autorizados puedan efectuar los procedimientos analíticos necesarios para completar el cribado y los análisis de confirmación. Concretamente en el caso de las aves de corral, la acuicultura, los conejos, la caza de cría, los reptiles y los insectos, las muestras se compondrán de uno o varios animales, dependiendo de los requisitos de los métodos analíticos. En el caso de los huevos, el tamaño de la muestra será de al menos 12 huevos, según los métodos analíticos utilizados. Si deben analizarse varias categorías de sustancias en una única muestra con diferentes métodos analíticos, el tamaño de la muestra se incrementará en consecuencia.

2. División en submuestras

Cada muestra se dividirá al menos en dos submuestras equivalentes, de forma que sea posible realizar el procedimiento analítico completo de cada una, excepto si es técnicamente imposible o no lo exige la normativa nacional. La subdivisión podrá efectuarse en el lugar donde se recojan las muestras o en el laboratorio.

3. Trazabilidad

Cada muestra se tomará de forma que sea siempre posible obtener su trazabilidad hasta la explotación de origen y el animal o lote de animales, cuando proceda. En particular, las muestras de leche pueden tomarse, según decidan los Estados miembros, en cualquiera de los lugares siguientes:

1. en la explotación, en las cisternas colectoras;
2. en la industria del sector lácteo, antes de descargar la leche.

4. Recipientes para muestras

Las muestras se recogerán en recipientes adecuados para mantener la integridad y la trazabilidad de las muestras. En particular, los recipientes deberán evitar la sustitución, la contaminación cruzada y la degradación, y deberán estar provistos de un precinto oficial.

5. Informe de muestreo

Después de cada muestreo se elaborará un informe.

El inspector incluirá en el informe de muestreo al menos los datos siguientes:

1. dirección de las autoridades competentes;
2. nombre y apellidos del inspector o código de identificación;
3. número de código oficial de la muestra;
4. fecha del muestreo;
5. nombre, apellidos y dirección del propietario o de la persona responsable de los animales o de los productos de origen animal;
6. nombre y dirección de la explotación de origen del animal (en caso de que el muestreo se haya realizado en la explotación);
7. número de registro del establecimiento o número del matadero;
8. identificación del animal o del producto;
9. especie animal;
10. matriz de la muestra;
11. cuando proceda, medicación administrada en las cuatro semanas anteriores al muestreo (cuando el muestreo se haya realizado en la explotación);
12. sustancia o grupos de sustancias objeto de examen;
13. observaciones particulares.

En función del procedimiento de muestreo, se facilitarán copias impresas o electrónicas del informe. El informe de muestreo y sus copias se cumplimentarán de forma que se garantice su autenticidad y validez jurídica, lo que puede requerir que estos documentos estén firmados por el inspector. Cuando el muestreo se realice en la explotación, podrá invitarse al ganadero o a su suplente a firmar el informe de muestreo original.

El original del informe de muestreo quedará en poder de la autoridad competente, que impedirá que puedan acceder a él personas no autorizadas.

En caso necesario, el ganadero o propietario de la explotación podrá ser informado de la toma de muestras.

6. Informe de muestreo para el laboratorio

El informe de muestreo para el laboratorio establecido por las autoridades competentes cumplirá los requisitos establecidos en el capítulo 7 de la norma ISO/IEC 17025:2017 ⁽¹⁾ y contendrá al menos la información siguiente:

1. dirección de las autoridades competentes o de los organismos designados;
2. nombre y apellidos del inspector o código de identificación,
3. número de código oficial de la muestra;
4. fecha del muestreo;
5. especie animal;
6. matriz de la muestra;
7. sustancia o grupo de sustancias objeto de examen;
8. observaciones particulares.

El informe de muestreo para el laboratorio acompañará a la muestra cuando se envíe al laboratorio.

7. Transporte y almacenamiento

Los programas de control de residuos especificarán las condiciones adecuadas de almacenamiento y transporte de cada combinación de analito/matriz para garantizar la estabilidad del analito y la integridad de la muestra. El transporte durará lo menos posible y la temperatura durante el transporte deberá ser la adecuada para garantizar la estabilidad del analito.

Se prestará una atención especial a las cajas de transporte, la temperatura y el plazo de entrega al laboratorio responsable.

En caso de que se incumpla cualquier requisito del programa de control, el laboratorio informará de ello inmediatamente a la autoridad competente.

⁽¹⁾ Norma ISO/IEC 17025: 2017 Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (capítulo 7.7).