

CODEX ALIMENTARIUS

NORMAS INTERNACIONALES DE LOS ALIMENTOS



Organización de las Naciones
Unidas para la Alimentación
y la Agricultura



Organización
Mundial de la Salud

E-mail: codex@fao.org - www.codexalimentarius.org

DIRECTRICES SOBRE CRITERIOS DE RENDIMIENTO PARA MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN LOS ALIMENTOS Y LOS PIENSOS

CXG 90-2017

Adoptadas en 2017.

OBJETIVO

1. La finalidad de estas directrices es definir y describir los criterios de rendimiento que deben cumplir los métodos para analizar residuos de plaguicidas en los alimentos y piensos (en adelante alimentos). Aborda las características/parámetros para ofrecer una confianza científicamente aceptable en el método analítico que es apto para el uso previsto y puede utilizarse para evaluar con seguridad residuos de plaguicidas para supervisión nacional o bien el comercio internacional.
2. Este documento es aplicable tanto a métodos para residuos individuales como a métodos multiresiduos (MRM) que analizan los compuestos seleccionados en todos los productos alimenticios según la definición de residuo.
3. Estas directrices tratan los análisis cualitativos y cuantitativos, cada uno de los cuales tienen sus propios criterios con respecto al rendimiento del método. También se abordan los criterios del rendimiento de los métodos para identificación y confirmación del analito.

PRINCIPIOS PARA LA SELECCIÓN Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS

A. Definición del objetivo del método y el ámbito de aplicación

4. La finalidad del método se describe normalmente en una declaración sobre su ámbito de aplicación en el cual se definen los analitos (residuos), las matrices y los intervalos de concentración. También indica si el método es para cribado, cuantificación, identificación y/o confirmación de resultados.
5. En aplicaciones regulatorias, el límite máximo de residuos (LMR) se expresa en función de la definición de residuo. Los métodos analíticos para residuos deben ser capaces de medir todos los componentes de la definición de residuo.
6. La *aptitud para los fines* es el grado en que el funcionamiento de un método cumple las necesidades del usuario final y el grado de correspondencia con los criterios (objetivos de calidad de los datos) acordados entre el laboratorio y el usuario final (o cliente) de los datos, dentro de las limitaciones técnicas y de presupuesto. Los criterios de *aptitud para los fines* se pueden basar en algunas de las características descritas en este documento, pero en último término se expresarán como incertidumbre combinada aceptable¹.
7. La selección de los métodos está basada en los analitos y la finalidad prevista de los análisis².

B. Complementar otras directrices de la Comisión del Codex Alimentarius

8. La Comisión del Codex Alimentarius (CAC) ha publicado unas directrices³ para laboratorios que participan en el análisis de alimentos para la importación/exportación que recomiendan que esos laboratorios:
 - a. deben utilizar procedimientos de control interno de calidad, como los que se describen en las "Directrices armonizadas sobre el control interno de la calidad en laboratorios de química analítica;"
 - b. deben participar en programas de ensayos de aptitud para el análisis de alimentos que cumplen el requisito establecido en el "Protocolo armonizado internacional para ensayos de aptitud de laboratorios analíticos (químicos) (Pure Appl. Chem., vol 78, No. 1, pp.145-186, 2006);" y
 - c. siempre que estén disponibles, deben utilizar métodos que han sido validados según principios establecidos por la CAC.
9. Los métodos analíticos se utilizarán en el marco del Sistema de gestión de calidad⁴ en los laboratorios, reconocido y aprobado, y de aceptación internacional, para que sean consistentes con los principios del documento para aseguramiento de la calidad (QA) y control de la calidad (QC), citado anteriormente.

C. Validación del método

10. El proceso de validación del método tiene la finalidad de demostrar que un método es *apto para su uso*. Esto significa que, si un analista bien preparado realiza un ensayo, utilizando el equipo y los materiales especificados y siguiendo exactamente el protocolo del método, se pueden obtener resultados precisos, fiables, y compatibles dentro de los límites estadísticos especificados para el análisis de una muestra. La validación debe demostrar la identidad y concentración del analito, teniendo en cuenta efectos de la matriz,

¹ Directrices armonizadas para la validación de métodos de análisis por un solo laboratorio de la UIQPA, Pure & Appl. Chem., 74(5), 2002; 835 – 855

² Documento de directrices sobre métodos de análisis para residuos de plaguicidas, OCDE, ENV/JM/MONO (2007)17

³ *Directrices para evaluar la competencia de los laboratorios de ensayo que participan en el control de las importaciones y exportaciones de alimentos* (CXG 27-1997)

⁴ [Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración](#), ISO/IEC 17025 (2005).

proporcionar una caracterización estadística de resultados de recuperación e indicar si la frecuencia de falsos positivos y falsos negativos son aceptables. Cuando se sigue el método utilizando estándares analíticos adecuados, un analista capacitado debe obtener resultados dentro de los criterios de rendimiento establecidos sobre el mismo material de muestra o equivalente en cualquier laboratorio de control de residuos experimentado. Para asegurar que el rendimiento del método sigue siendo apropiado con el paso del tiempo, la validación del método debe evaluarse continuamente (p.ej., muestras adicionales de recuperación).

PARÁMETROS DE RENDIMIENTO PARA MÉTODOS ANALÍTICOS

11. Los requisitos generales para los criterios de rendimiento individuales de un método se resumen a continuación.^{1,5}

A. Documentación del método

12. Además de los criterios de rendimiento (objetivos de calidad de los datos), la documentación del método que se elabora tras la validación debe proporcionar la siguiente información:
- la identidad de los analitos que figura en la definición de residuo;
 - el intervalo de concentración que abarca la validación;
 - las matrices utilizadas en la validación (categorías de productos representativos, p.ej., productos agrícolas similares basados en características que incluyen humedad, grasa y contenido de azúcar, pH);
 - protocolo con la descripción de los equipos, reactivos, procedimiento detallado paso a paso (incluyendo las variaciones admisibles (por ejemplo: “calentar a 100 ± 5 °C durante 30 ± 5 min”), procedimientos de calibración y control de la calidad, las medidas especiales de seguridad que sean necesarias, la aplicación a que se destina y sus requisitos críticos en cuanto a incertidumbre;
 - si se requiere, en el procedimiento de validación se calculará un resultado cuantitativo de la incertidumbre de medición expandida (MU) para el método.

B. Selectividad

13. Lo ideal debe ser evaluar la selectividad para demostrar que no hay interferencias que afectan significativamente al análisis. En la práctica no es posible ensayar el método con respecto a todos los posibles interferentes, pero es necesario comprobar los interferentes habituales analizando un blanco (proceso) de reactivo en cada lote de reactivos. Cuando los reactivos y/o disolventes se cambian entre los lotes de muestras, podrían realizarse evaluaciones adicionales del blanco de reactivo. En los blancos de reactivos tienden a aparecer los niveles generales de plastificantes, sangrado de septa, agentes de limpieza, impurezas del reactivo, contaminación del laboratorio, transferencia, etc. y el analista debe reconocerlos cuando se producen. También deben conocerse las interferencias de analito a analito comprobando los analitos individuales en soluciones estándar mixtas. Las interferencias de la matriz se evaluarán mediante análisis de muestras que se sepa que están exentas de analitos y se necesitará un blanco de matriz con cada lote de muestras o adoptar un enfoque de adición estándar para la cuantificación (véase la Sección E).
14. Por regla general, la selectividad debe ser tal que las posibles interferencias no tengan ningún impacto en el rendimiento del método. La prueba definitiva de selectividad consiste en las tasas de falsos positivos y negativos en los análisis. Para estimar las tasas de falsos positivos y negativos durante la validación del método debe analizarse un número adecuado de blancos por matriz (que no sean de la misma fuente) junto con matrices adicionales al nivel de informe del analito.

C. Calibración

15. Exceptuando los errores que pudieran producirse en la preparación de los materiales de calibración, los errores de calibración representan habitualmente un componente menor de la incertidumbre total y se pueden asignar sin riesgo a otras categorías. Por ejemplo, los errores aleatorios producto de la calibración son parte de la incertidumbre, mientras que los errores sistemáticos causan sesgo analítico y ambos se evalúan en conjunto durante la validación y el control de calidad en curso. No obstante, es útil conocer algunas de las características de la calibración al comienzo de la validación de un método porque afectan a la optimización del protocolo final. Por ejemplo, se debe conocer de antemano si la curva de calibración es lineal o cuadrática, pasa por el origen y es afectada por la matriz de la muestra o no. Las directrices descritas en este documento se refieren más a la validación, que puede ser más detallada que la calibración realizada durante análisis de rutina.

⁵ Documento de directrices de la OCDE para la validación individual de métodos-directrices analíticos cuantitativos utilizados como corroboración de requisitos de datos antes y después del registro para la protección de las plantas y productos biocidas, ENV/JM/MONO (2014)20

16. Es necesario repetir las mediciones para proporcionar una estimación empírica de la incertidumbre. Se recomiendan los siguientes procedimientos de calibración para la validación inicial del método:
- se deben realizar determinaciones a cinco o más concentraciones (considerar múltiples inyecciones por concentración);
 - los patrones de referencia deben espaciarse uniformemente en el intervalo de concentraciones de interés y el intervalo de calibración debe abarcar todo el intervalo de concentración que pueda encontrarse;
 - los patrones de calibración deben dispersarse en toda la secuencia, o abarcar el principio y el final de la serie para demostrar que la integridad de la calibración se mantiene en toda la secuencia; y se debe trazar la adecuación de la función de calibración e inspeccionar visualmente y/o por el cálculo de los residuos (las diferencias entre las concentraciones reales y calculadas de los patrones), evitando el exceso de confianza en los coeficientes de correlación. Si los residuos de la curva de calibración se desvían en más de $\pm 20\%$ - 30% (30% para las concentraciones de calibración cercanas al LOQ instrumental), se deben considerar estadísticamente los valores atípicos, que posiblemente lleven al nuevo análisis de la secuencia si los criterios del control de calidad no se cumplen.

D. Linealidad

17. La linealidad puede analizarse examinando una representación gráfica de los residuos obtenidos por la regresión lineal de las respuestas a las concentraciones en un conjunto de calibración adecuado. Una línea curva indica una posible *falta de adecuación* debido a que la función de calibración no es lineal. En ese caso, se debe probar y aplicar otra función como la cuadrática, utilizando al menos cinco niveles de concentración. A pesar de que el coeficiente de determinación (R^2) se utiliza actualmente de forma generalizada como una indicación de la calidad de la adecuación, puede ser engañoso porque da mayor importancia a las soluciones con concentraciones más elevadas. En este caso, debe considerarse un factor de ponderación apropiado, como $1/x$ o $1/x^2$ para minimizar el posible impacto del intervalo de concentraciones relativo.
18. En general, se recomienda el uso de regresión ponderada lineal o función cuadrática ponderada en lugar de regresión lineal para la determinación de las concentraciones bajas en partes por billón ($\mu\text{g}/\text{kg}$). El valor apropiado de la intercepción debe ser lo más cercano posible a cero para reducir errores en el cálculo de las concentraciones de residuos en los niveles bajos, si bien la curva de calibración no debe forzarse a través del origen sin justificación.

E. Efectos de la matriz

19. La calibración ajustada a la matriz se utiliza comúnmente para compensar efectos de la matriz. Para la calibración deben utilizarse extractos de matriz testigo, preferiblemente del mismo tipo que la muestra o similar. Un modelo práctico alternativo para compensar los efectos de la matriz en el análisis con cromatografía de gases (CG) es la utilización de componentes químicos (protectores de analitos) que se añaden tanto a los extractos de la muestra como a las soluciones de calibración a fin de maximizar (preferiblemente) por igual la respuesta de los plaguicidas en los calibradores en disolvente y extractos de la muestra. Formas alternativas para compensar los efectos de la matriz son utilizar la adición de patrón, estándares internos (IS) marcados isotópicamente o sucedáneos de sustancias químicas. Sin embargo, estos criterios suelen ser difíciles en los MRM porque hay demasiados residuos en matrices diferentes a niveles diferentes para elaborar procedimientos de rutina, y la falta de patrones marcados isotópicamente para tantos analitos. Lo mejor es que si se dispone de patrones marcados isotópicamente, esos patrones deben representar el intervalo de compuestos seleccionados y las recuperaciones deben estar dentro de los criterios para las muestras adicionadas con patrones no marcados isotópicamente. Si se utiliza calibración de solo disolvente, se debe realizar una medición de los efectos de la matriz para demostrar la equivalencia de los resultados mediante la comparación de las respuestas de la matriz ajustada con patrones de solo disolvente.

F. Veracidad y recuperación

20. La veracidad es la proximidad en la concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado de la propiedad objeto de medición. La veracidad se expresa en términos cuantitativos como "sesgo", cuanto menor es el sesgo, mayor es la veracidad. Típicamente, el sesgo se determina comparando la respuesta obtenida aplicando el método a un material de referencia certificado (si está disponible) con el valor asignado conocido del material. Preferiblemente se recomienda realizar pruebas multilaboratorio. Cuando la incertidumbre del valor de referencia no es insignificante, la evaluación de los resultados debe tener en cuenta dicha incertidumbre además de la variabilidad estadística obtenida a partir del análisis del material de referencia. En ausencia de material^{1,5} de referencia certificado, las directrices recomiendan el uso de un material de referencia disponible que esté bien caracterizado para el propósito del estudio de validación.

21. Recuperación se refiere a la proporción de analito determinada en el resultado final comparada con la cantidad añadida a una muestra (generalmente a una muestra testigo) antes de la extracción, generalmente expresada como un porcentaje. Los errores en la medición conducirán a cifras de recuperación sesgadas que se desviarán de la recuperación real en el extracto final. Recuperación de rutina se refiere a la(s) determinación(es) realizada(s) en adiciones del control de calidad en el análisis de cada lote de muestras.

G. Precisión

22. La precisión es la proximidad en la concordancia entre resultados de ensayos (repetidos) independientes obtenidos en condiciones estipuladas. Habitualmente se expresa como desviación estándar (SD) o como desviación estándar relativa (RSD), conocida también como coeficiente de variación (CV). La distinción entre precisión y sesgo depende del nivel en el que se contempla el sistema de análisis. Así, desde el punto de vista de una sola determinación, cualquier desviación que afecte a la calibración utilizada en el análisis puede considerarse un sesgo. Desde el punto de vista del analista que revisa el trabajo de un año, el sesgo analítico será diferente cada día y actuará como variable aleatoria con una precisión asociada, incorporando cualquier condición estipulada para la estimación de esta precisión.
23. Para la validación por un solo laboratorio deben tenerse en cuenta dos tipos de condiciones: (a) la repetibilidad, la variabilidad de las mediciones dentro de la misma secuencia analítica, y (b) la reproducibilidad intralaboratorios, la variabilidad de los resultados entre múltiples conjuntos de la misma muestra. Es importante que los valores de precisión sean representativos de las condiciones de ensayo probables. En primer lugar, la variación de las condiciones entre las series debe ser representativa de lo que ocurriría normalmente en el laboratorio durante la aplicación sistemática del método. Esto puede hacerse mediante la validación/verificación constante del rendimiento del método. Por ejemplo, las variaciones de los lotes de reactivos, analistas e instrumentos deben medirse en controles de calidad permanentes. En segundo lugar, la matriz y (preferiblemente) el tamaño de partículas del material de ensayo utilizados deben ser típicos de los materiales que se encontrarán probablemente en las aplicaciones reales.
24. En validaciones en un solo laboratorio, la precisión suele variar con la concentración del analito. Las suposiciones habituales son que: a) la precisión no cambia en función de la concentración del analito o, b) que la desviación estándar es proporcional a la concentración del analito o es linealmente dependiente de la misma. Ambas hipótesis deben comprobarse si se espera que la concentración del analito varíe de forma sustancial (es decir, cuando el nivel del analito se aproxima al LOQ).
25. Pueden obtenerse datos de precisión de una gran variedad de tipos de condiciones diferentes además de los mínimos de condiciones de repetibilidad y entre procesos analíticos indicados aquí, y puede ser conveniente obtener información adicional. Por ejemplo, para la evaluación de los resultados o para mejorar la medición, puede ser útil disponer de estimaciones independientes de los efectos del operador y de proceso analítico, de los efectos interdiarios o intradiarios o tener una indicación de la precisión que se puede alcanzar utilizando un instrumento o varios. Se dispone de diversos diseños y técnicas de análisis estadísticos diferentes y es muy recomendable prestar atención al diseño experimental en todos los estudios de este tipo. La validación inicial debe realizarse en el límite objetivo de cuantificación (LOQ) o límite de información del método, y al menos otro nivel superior, por ejemplo, 2-10x el LOQ específico o el LMR.

H. Límite de cuantificación (LOQ)

26. Por la definición existente durante años entre los químicos analíticos, el LOQ es la concentración en la que la relación señal/ruido promedio (S/N) es igual a 10 en el análisis. En la práctica solo puede estimarse el LOQ, porque la determinación precisa del LOQ real requiere muchos análisis de muestras adicionadas y matrices testigo, pero el LOQ puede cambiar de día a día debido al estado de funcionamiento del instrumento, entre muchos otros factores. Algunas pautas de validación requieren que el LOQ sea verificado para satisfacer los criterios de rendimiento del método a través de experimentos de adición en el LOQ, pero las variaciones de día a día en el LOQ tienden a obligar al analista a sobreestimar el verdadero método LOQ, lo cual puede ser difícil para aplicar la definición estricta del LOQ ($S/N = 10$). Por lo tanto, adicionar al nivel validado más bajo (LVL) es el criterio más descriptivo y adecuado. Además, no debe hacerse cuantificación de analitos por debajo del nivel calibrado más bajo (LCL) en la misma secuencia analítica. La S/N en el LCL debe ser ≥ 10 (conc. \geq LOQ), que puede configurarse como una comprobación de idoneidad del sistema necesaria para cada secuencia analítica. Se puede incluir también una matriz adicionada de control de calidad en cada secuencia para verificar que se logra el límite de información en el análisis (un nivel de acción que es típicamente \geq que el LCL). En esencia, el punto de la validación no es para determinar el LOQ, sino para demostrar que la concentración más baja comunicada se ajusta a la necesidad del análisis. Si bien no es de utilidad para la cuantificación, algunos analistas pueden desear calcular el límite de detección (LOD) ($S/N = 3$) para inferir la presencia del analito a concentraciones demasiado bajas para poder estimar la concentración del analito.

I. Intervalo analítico

27. El intervalo validado es el intervalo de concentración de analito en el cual el método se puede considerar validado. El nivel más bajo validado (LVL) es la concentración más baja evaluada durante la validación que cumple los criterios de rendimiento del método. Es importante comprender que el intervalo validado no es necesariamente idéntico al intervalo útil de la calibración instrumental. La calibración puede abarcar un amplio intervalo de concentraciones, pero el intervalo validado (una parte más importante en términos de la incertidumbre) abarcará habitualmente un intervalo más reducido. En la práctica, la mayoría de los métodos se validan al menos a dos niveles de concentración. El intervalo validado puede ser tomado como una extrapolación razonable entre estos puntos de concentración, pero muchos laboratorios eligen validar a un tercer nivel para demostrar la linealidad. Para supervisar las concentraciones de residuos con respecto a las normas del Codex, el método analítico debe ser lo suficientemente sensible como para que el LVL para cada analito esté al límite máximo de residuos del Codex (CXL) actual o por debajo del mismo. El intervalo de validación debe abarcar el CXL vigente. Cuando no existe un CXL, el nivel más bajo puede ser LMR establecidos por una autoridad normativa nacional. Si no existe CXL o LMR para un par de matriz/analito dado, entonces 0,01 mg/kg o el LOQ (el que sea mayor) suele servir como el LVL deseable. En los MRM, el objetivo analítico habitual es fijar el LVL (y el nivel de información) a 0,01 mg/kg en distintos productos, pero representativos.

J. Robustez

28. La robustez (a menudo sinónimo de solidez) de un método de análisis es la resistencia al cambio de los resultados obtenidos mediante un método de análisis cuando se realizan pequeñas modificaciones de las condiciones experimentales descritas en el procedimiento. En el protocolo del método deben formularse los límites de los parámetros experimentales (aunque no siempre se ha hecho así en el pasado), y estas desviaciones admisibles no deben producir, por separado o combinadas, ningún cambio significativo en los resultados obtenidos. En este contexto se entiende por "cambio significativo" que el método no cumpliría los objetivos de calidad de los datos definidos por la *aptitud para los fines*. Se debe identificar qué aspectos del método pueden afectar a los resultados y se debe evaluar su influencia sobre el rendimiento del método mediante pruebas de robustez.
29. Algunos de los factores que pueden ser objeto de ensayo de robustez son: pequeños cambios en los instrumentos, la marca/lote de reactivo o cambios en el analista; concentración de un reactivo; pH de una solución; temperatura de una reacción; tiempo que se deja transcurrir antes de dar por terminado un proceso y/u otros factores pertinentes.

K. Incertidumbre de la medición (MU)

30. El sistema formal de estimación de la incertidumbre de la medición es una estimación calculada mediante una ecuación o modelo matemático, en torno al cual se puede esperar que el valor real se encuentre dentro de un nivel definido de probabilidad. Los procedimientos descritos en la validación de métodos tienen por objeto asegurar que la ecuación utilizada para estimar el resultado, en la que se tienen debidamente en cuenta errores aleatorios de todo tipo, es una expresión válida que comprende todos los efectos reconocidos y significativos que afectan al resultado. Consideraciones adicionales y descripción de la incertidumbre de la medición se proporcionan en "*Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados*"⁶.
31. Es preferible expresar la incertidumbre de la medición en función de la concentración y comparar esta función con un criterio de *aptitud para los fines* acordados entre el laboratorio y el cliente o usuario final de los datos. Una posibilidad es calcular la MU a partir de datos de ensayos de aptitud⁶.

CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD DEL RENDIMIENTO DE LOS MÉTODOS DE CRIBA

32. Los métodos de criba son habitualmente de carácter cualitativo o semicuantitativo y tienen como objetivo distinguir las muestras que no contienen residuos por encima de un valor umbral ("negativas") de aquellas que puedan contener residuos que sobrepasen ese valor ("positivas indicadas"). La estrategia de validación, por tanto, se concentra en el establecimiento de una concentración umbral por encima de la cual los resultados son "potencialmente positivos", la determinación de un índice estadísticamente fundamentado para detecciones falsas o negativas, la evaluación de interferencias y el establecimiento de las condiciones de uso adecuadas. El concepto de criba brinda a los laboratorios medios efectivos para ampliar su ámbito analítico a analitos con una baja probabilidad de que se encuentren en las muestras. Se deben seguir supervisando los analitos que se dan con mayor frecuencia utilizando métodos multiresiduos (MRM) cuantitativos validados. Al igual que en los métodos cuantitativos, los métodos de criba deben verificarse también en cuanto a selectividad y sensibilidad. En algunas aplicaciones pueden ser útiles equipos de ensayo comerciales, pero en la práctica, las técnicas actuales pocas veces han cumplido económicamente las necesidades de diagnóstico. La selectividad y el ámbito de aplicación analítico suelen mejorar cuando antes de la detección

⁶ *Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados* (CXG 59-2006)

se utiliza cromatografía u otra forma de separación. Otro enfoque es utilizar métodos de criba que involucran detección basada en espectrometría de masas (MS), que es capaz de distinguir unas sustancias químicas de otras.

33. La selectividad de los métodos de criba debe poder distinguir la presencia del compuesto seleccionado o grupos de compuestos, de otras sustancias que puede tener el material de muestra. Normalmente la selectividad de los métodos de criba es menor que la de un método cuantitativo. Los métodos de criba pueden aprovecharse de una característica estructural común a un grupo o clase de compuestos y pueden estar fundamentados en inmunoensayos o respuestas espectrofotométricas que pueden no identificar de forma inconfundible un compuesto.
34. La validación de un método de criba basada en un límite de detección de selección (SDL) se puede concentrar en la detectabilidad. Para cada tipo de matriz representativo (grupo de productos)⁷, una validación mínima debe incluir el análisis de un número recomendado de al menos 5 muestras adicionadas al SDL estimado. Las muestras seleccionadas y al menos 5 blancos de matrices de fuentes diferentes (p.ej., obtenidas de mercados diferentes o de distintos campos agrícolas, etc.). Más duplicados de mayor diversidad proporcionan una mejor validación. Un mínimo de dos muestras diferentes para cada tipo de matriz, deben ser apropiadas para el alcance deseado del laboratorio. Pueden tomarse datos adicionales de validación de los datos del control de calidad analítica en curso y la verificación del rendimiento del método durante análisis sistemáticos. El SDL del método de criba cualitativo es la concentración más baja en la cual se ha detectado un analito (que no reúna necesariamente los criterios de identificación de MS) en el 95% de las muestras al menos (por ejemplo, se acepta un porcentaje del 5% de los falsos negativos).

CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD DEL RENDIMIENTO DE LOS MÉTODOS CUANTITATIVOS

35. La selectividad es de particular importancia en la definición de los criterios funcionales de los métodos cuantitativos utilizados en los programas de control reglamentario para los residuos de plaguicidas en los alimentos. En una situación ideal, el método debe proporcionar una respuesta señal que esté exenta de interferencias de otros analitos y compuestos de matrices que puedan estar presentes en una muestra o un extracto de la muestra. Los análisis cromatográficos basados en picos que no tienen una buena resolución proporcionan resultados cuantitativos menos fiables. El uso de detectores para elementos específicos o diferentes longitudes de onda de detección o detectores basados en MS diferentes que pueden distinguir mejor un compuesto o estructura particular, junto con la separación cromatográfica, mejora la selectividad de los métodos cuantitativos.
36. El requisito de recuperación de un intervalo de residuos de plaguicidas en una sola extracción aumenta la posibilidad de selectividad comprometida en los MRM en comparación con los métodos de residuos individuales. La utilización de extracción menos selectiva y procedimientos de limpieza puede dar lugar a mayor coextracción de material de la matriz en el extracto final. La naturaleza y cantidades de tal material coextraído pueden variar considerablemente en base a analitos de interés del método de la matriz. Por lo tanto, se debe prestar atención al establecer los criterios para la precisión y veracidad de los MRM con el fin de garantizar que la cuantificación no se vea afectada por interferencias de sustancias químicas.
37. Además de la selectividad de un método, se debe demostrar la capacidad del método para proporcionar un resultado cuantitativo que es fiable (es decir, exactitud, véase la sección F y precisión, véase la sección G). Lo ideal es que la desviación estándar relativa entre la muestra original y las replicaciones sea inferior al 20%.
38. Los criterios de aceptabilidad de un método analítico cuantitativo deben demostrar tanto en la fase inicial de validación como de validación en curso, que es capaz de proporcionar valores promedios de recuperación aceptables en cada fase de adición. Para la validación se recomienda analizar un mínimo de 5 duplicados (para comprobar la recuperación y precisión) en el LVL, LOQ seleccionado o límite de información del método, y al menos un nivel más alto adicional, por ejemplo, 2-10x el LVL seleccionado o el LMR. Si un método se utiliza para pruebas de cumplimiento (es decir, si un producto cumple con un LMR establecido), el LMR (o CXL) debe estar dentro del intervalo de concentración validado. Cuando la definición de residuo consta de dos o más analitos, entonces el método debe validarse para todos los analitos.
39. La veracidad de un método puede determinarse mediante el análisis de un material de referencia certificado, al comparar los resultados con los obtenidos con otro método para el que los criterios funcionales han sido rigurosamente establecidos con anterioridad (normalmente, un método de estudio en colaboración) o mediante la determinación de la recuperación de un analito fortificado en un material de muestra testigo conocido. Las recuperaciones medias aceptables a efectos de cumplimiento normalmente deben variar entre 70-120% con una RSD \leq 20%. Para concentraciones muy bajas (p.ej., <0,01 mg/kg) algunos laboratorios pueden aceptar criterios de funcionamiento que están fuera de estos criterios (p.ej., 60 – 120% con una RSD <30%). En algunos casos (normalmente con MRM), las recuperaciones fuera de este intervalo pueden ser

⁷ Cuadro 5, *Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas* (CXG 40-1993)

aceptables, por ejemplo, cuando la recuperación es más baja pero uniforme (p.ej., demostrando buena precisión). Esto es más justificable si la razón del bajo sesgo sistemático está bien establecida por la química (p.ej., distribución de analitos conocida entre las fases en un paso de particionado). No obstante, si es posible, se debe utilizar un método más veraz. Las recuperaciones >120% pueden ser atribuibles a un interferente o sesgo positivo que deben investigarse.

40. Se recomienda el análisis de la matriz dosificada o acumulada para corroborar la validación del método. Para la interpretación de recuperaciones es necesario reconocer que es posible que el analito adicionado a una muestra de ensayo no se comporta de la misma manera que el analito dosificado o acumulado biológicamente (residuo de plaguicida). En muchas situaciones, la cantidad de un residuo dosificado o acumulado que es extraído es menor que la cantidad total de residuos dosificados o acumulados que se encuentra realmente presente. Esto podría ser el resultado de pérdidas que ocurren durante la extracción, la unión intracelular de los residuos, la presencia de conjugados u otros factores que no son totalmente representados por los experimentos de recuperación utilizando las matrices testigo fortificadas con el analito. A menudo se necesitan residuos radiomarcados o materiales de referencia estándar para evaluar las recuperaciones de residuos dosificados o acumulados.
41. A concentraciones relativamente altas se prevé que las recuperaciones analíticas se aproximen a un cien por ciento. A concentraciones menores, particularmente con métodos que incluyan extracción, aislamiento y pasos de concentración, las recuperaciones podrían ser menores que a concentraciones más altas. Con independencia de las recuperaciones promedio que se observen, es deseable la recuperación con baja variabilidad para poder hacer una corrección fiable de la recuperación en el resultado final, cuando sea necesario.
42. En general, cuando la recuperación media se encuentra dentro del 70-120%, los datos de residuos no tienen que ajustarse. Las correcciones de recuperación deben aplicarse siguiendo las directrices establecidas en CXG 37-2001⁸. Esto facilitará la comparación directa de los conjuntos de datos. Las funciones de corrección deben establecerse sobre la base de consideraciones estadísticas apropiadas y documentadas, archivadas y puestas a disposición para clientes y revisores. En los datos se debe (a) indicar claramente si se ha aplicado o no una corrección de recuperación y (b) si procede, incluir la magnitud de la corrección y el método mediante el cual se obtuvo. Esto ayudará a realizar la comparabilidad directa de los conjuntos de datos. Las funciones de corrección se fijarán a partir de consideraciones estadísticas adecuadas, serán documentadas, archivadas y estarán disponibles para el cliente.
43. De conformidad con la norma ISO IEC17025⁴, se debe participar en un programa de ensayos de aptitud. Se dispone de muchos programas de ensayos de aptitud para los laboratorios de todo el mundo que realizan supervisión de residuos de plaguicidas. También pueden realizarse ensayos entre laboratorios.

CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD DEL RENDIMIENTO DE LOS MÉTODOS PARA IDENTIFICACIÓN Y CONFIRMACIÓN DEL ANALITO

44. Por el momento, los errores graves (errores espurios efectuados durante la preparación de la muestra) son la mayor fuente de identificación errónea en los métodos basados en MS. Por esta razón, todas las medidas de aplicación reglamentaria (por encima de un LMR o para las que no tienen LMR en ese producto) requieren la confirmación del resultado a través de reextracción de una porción de ensayo repetida de la muestra original y reanálisis, utilizando preferiblemente diferentes preparaciones y/o análisis de muestras.
45. La selectividad es la consideración principal para los métodos de identificación. El método debe ser suficientemente selectivo para proporcionar una identificación unívoca. La MS acoplada a un método de separación cromatográfica es una combinación muy potente para identificar un analito en el extracto de la muestra. Este método proporciona información sobre la estructura del analito que no puede obtenerse solo con cromatografía. Los instrumentos GC-MS y LC-MS (examen completo, modo seleccionado de iones, alta resolución, tándem MS/MS, sistemas híbridos, entre otras técnicas avanzadas) proporcionan muchos parámetros medibles, como tiempos de retención, forma de los picos cromatográficos, intensidades iónicas y abundancias/razones relativas, precisiones en masa, y otros aspectos útiles para ayudar a hacer identificaciones de analitos. Sin embargo, pueden desarrollarse y aplicarse métodos eficaces utilizando técnicas no basadas en MS (p.ej., HPLC con detección por red de fotodiodos, GC con detección selectiva de elementos), especialmente si la confirmación del resultado del ensayo se realiza con químicas de columnas alternativas.⁹

⁸ Directrices armonizadas de la IUQPA para el empleo de la información de recuperación en la medición analítica. Pure & Appl. Chem., 71, 1999; 337 – 348. CXG 37-2001

⁹ *Directrices sobre buenas prácticas en el análisis de residuos de plaguicidas* (CXG 40-1993)

A. Identificación basada en MS

46. No hay ningún criterio de aceptación universal para la identificación. En el Cuadro 1 se dan ejemplos de criterios.
47. Las prácticas actuales en el análisis cualitativo y cuantitativo de los residuos de plaguicidas contienen normalmente cromatografía + seguimiento de iones seleccionados (SIM) o MS/técnicas de MS. La MS con espectro completo es también un instrumento aceptable que utiliza factores de comparación con bibliotecas espectrales y/o abundancias relativas de iones principales dentro del espectro completo. El último caso puede tratarse como razones iónicas en los criterios dados a continuación utilizando al menos 3 iones. En el primer caso, deben utilizarse factores de comparación para fines de identificación normativa, y las bibliotecas espectrales de referencia deben obtenerse de patrones de gran pureza sustraídos de información general en el mismo instrumento utilizando las mismas condiciones que en el análisis de la muestra. Deben cumplirse los siguientes criterios de identificación:
- Los valores de referencia del tiempo de retención del analito deben ser determinados a partir de patrones de calibración ajustados a la matriz de alta concentración analizados al mismo tiempo (dentro del mismo lote). De lo contrario, si se sabe que no hay presencia de interferencias, pueden utilizarse soluciones estándar a base de disolventes.
 - Los valores de referencia de la razón iónica se fijarán igual que en el párrafo 47 a. Los distintos iones utilizados para identificación se deben coeluir y tener formas de pico similares. El ion del patrón de calibración con la intensidad promedio más alta se utilizará como el denominador en la relación de iones, expresado en % (debido a fluctuaciones de la señal, efectos de la matriz, etc... desviaciones de las razones iónicas hasta el 30% son aceptables).
 - Las relaciones señal ruido de los picos medidos deben ser superiores a 3 y/o la señal debe exceder el nivel umbral de intensidad comparado con la señal de un patrón de calibración apropiado o control que comprenda el nivel de intensidad.
 - Las transiciones iónicas elegidas con fines de identificación deben tener sentido químico/estructural (asegúrese de que los iones elegidos no tengan su origen en un degradado, impureza, o confusión con una sustancia química diferente al analito).
 - Se debe demostrar que todas las muestras de blanco de reactivo y de la matriz medidas deben estar exentas de transferencia, contaminación e interferencias superiores al 20% del LOQ. Para las muestras de blanco de reactivo, puede ser aceptable 30% de LOQ.
 - Para análisis de MS, es preferible supervisar los iones con una relación masa/carga mayor de 100.
48. El tiempo mínimo de retención aceptable para el (los) analito(s) debe ser al menos el doble del tiempo de retención del volumen en vacío (muerto) de la columna. El tiempo de retención del analito en el extracto debe corresponder con el del valor de referencia (47a), dentro del tiempo de retención relativo de $\pm 0,2$ min o 0,2%, tanto para cromatografía de gases como para cromatografía líquida (preferiblemente $\pm 0,1$ min si es posible).
49. Los métodos basados en espectrometría de masas de alta resolución se consideran que proporcionan mayor fiabilidad debido a mediciones exactas de la masa/carga del ion que no pueden obtenerse utilizando técnicas de espectrometría de masas de resolución de unidad. Distintos tipos y modelos de detectores de espectrometría de masas proporcionan grados diferentes de selectividad, lo cual guarda relación con la confianza en la identificación. Los ejemplos de criterios de identificación proporcionados en el Cuadro 1 deben considerarse únicamente directrices para identificación, no criterios absolutos para demostrar la presencia o ausencia de un compuesto.
- ## B. Confirmación
50. Si el análisis inicial no ofrece identificación unívoca o no cumple con los requisitos del análisis cuantitativo, es necesario un análisis de confirmación. Esto puede suponer el reanálisis del extracto o la muestra. Cuando el CXL/LMR se excede, es necesario un análisis de confirmación de otra porción de la muestra. Para combinaciones inusuales de plaguicida/matriz, se recomienda también un análisis de confirmación.
51. Si el método de confirmación inicial no está basado en una técnica de MS, los métodos de confirmación deben incluir identificación del analito basada en MS. Además, los métodos de confirmación deben utilizar un enfoque independiente fundamentado en distintos mecanismos químicos (como separaciones de GC y LC). En algunas situaciones puede ser conveniente que sea confirmado por laboratorios independientes. En el Cuadro 2 hay un resumen de ejemplos de técnicas analíticas que pueden ser apropiadas para reunir los criterios para métodos analíticos de confirmación.

Cuadro 1. Criterios de identificación de diferentes técnicas de MS

Detector / características de MS	Sistemas típicos (ejemplos)	Adquisición	Requisitos de identificación	
			número mínimo de iones	otros
Resolución de la unidad de masa	cuadrupolar, trampa iónica, tiempo de vuelo (TOF)	examen completo, intervalo m/z limitado, seguimiento de iones seleccionados (SIM)	3 iones	<p>S/N $\geq 3^e$</p> <p>Los picos de analitos en los cromatogramas de iones extraídos deben coincidir plenamente.</p> <p>Razón iónica dentro del $\pm 30\%$ (relativo) del promedio de los patrones de calibración de la misma secuencia^f</p>
MS/MS	triple cuadrupolar trampa iónica, trampa cuadrupolar Q-TOF, Q-Orbitrap	supervisión de la reacción seleccionada o múltiple, resolución de masa para el aislamiento del ion precursor igual o mejor que resolución de la unidad de masa	2 iones del producto	
Medición exacta de masa	MS de alta resolución: TOF o Q-TOF Orbitrap o Q-Orbitrap FT-ICR-MS MS sector	Examen completo, intervalo m/z limitado, SIM fragmentación con o sin selección del ion precursor, o combinación de ello	2 iones con precisión de masa ≤ 5 ppm ^{a,b,c})	
		MS de fase individual combinada y MS/MS con resolución de masa para el aislamiento del ion precursor igual o mejor que la resolución de la unidad de masa	<p><u>2 iones:</u></p> <p>1 ion molecular, molécula (desprotonada) o ion aducto con precisión de masa ≤ 5 ppm^{a,c}</p> <p><u>más</u></p> <p>1 ion^d del producto MS/MS</p>	

^{a)} preferiblemente incluyendo el ion molecular, molécula (des)protonada o ion aducto

^{b)} incluyendo al menos un fragmento de ion

^{c)} < 1 mDa para m/z < 200

^{d)} ≤ 5 ppm

^{e)} en ausencia de ruido, debe haber una señal en al menos 5 exámenes seguidos

^{f)} si la exactitud de la masa de un precursor y su ion del producto es ≤ 5 ppm, la tolerancia de la razón iónica es opcional.

Cuadro 2. Ejemplos de métodos de detección apropiados para el análisis de confirmación de sustancias

Método de detección	Criterio
LC o GC y MS	Si se realiza seguimiento de suficiente número de fragmentos iónicos
LC-DAD	Si el espectro UV es característico
LC – fluorescencia	En combinación con otras técnicas
2-D TLC – (espectrofotometría)	En combinación con otras técnicas
GC-ECD, NPD, FPD	Solo si se combina con dos o más técnicas de separación
LC-inmunoafinidad	En combinación con otras técnicas
LC-UV/VIS (longitud de onda individual)	En combinación con otras técnicas

ANEXO

DEFINICIONES

Adición de estándar: El método de adición de estándar es un tipo de modelo de análisis cuantitativo que se utiliza a veces en química analítica mediante el cual se añade directamente a las partes alícuotas de extractos finales una cantidad conocida del analito.

Analito: La sustancia química buscada o determinada en una muestra (CXG 72-2009).

Aplicabilidad: Los analitos, matrices y concentraciones para los cuales puede utilizarse satisfactoriamente un método de análisis (CXG 72-2009).

Coefficiente de variación (CV): Denominado con frecuencia como Desviación estándar relativa (RSD). Esto es una medida de precisión en estudios cuantitativos comparando la variabilidad de los conjuntos con distintos medios.

Confirmación: La combinación de dos o más análisis que concuerdan entre sí, al menos uno de los cuales satisface los criterios de identificación.

Definición de residuo: El espectro de compuestos a analizar que pueden comprender el compuesto original, metabolitos, isómeros, productos de reacción y/o degradantes. La definición de residuo es normalmente determinada por un órgano normativo.

Degradado (degradante, producto de degradación): Componente de un residuo de plaguicida que se produce en un producto como resultado de una transformación abiótica del plaguicida (p.ej., calor, luz, humedad, pH, etc.)

Desviación estándar relativa (DER): La desviación estándar dividida por el valor absoluto de la media aritmética, expresada porcentualmente. Se refiere a la precisión del método (conocida también como coeficiente de variación CV).

Efecto de la matriz: Una influencia de uno o más componentes no detectados de la muestra sobre la medición de la concentración o masa de analitos.

Enriquecimiento: Adición de analitos para los efectos de determinar la recuperación (se conoce también como adición).

Estándar interno (IS): Una sustancia química añadida a una cantidad conocida a las muestras y/o patrones en un análisis químico, incluyendo las soluciones testigo y estándar de calibración. Esta sustancia puede utilizarse para la calibración representando gráficamente la relación de la señal del analito con respecto a la señal del estándar interno como una función de las concentraciones. Esta relación de las muestras se utiliza después para obtener las concentraciones de analitos. El estándar interno utilizado debe proporcionar una señal que es similar a la señal de analito en la mayoría de los aspectos, pero lo suficientemente diferente para que las dos señales sean distinguibles entre sí.

Falso negativo: Un resultado que indica erróneamente que el analito no se halla presente o que no excede una concentración específica (p.ej., CXL/LMR o nivel de documentación).

Falso positivo: Un resultado que indica erróneamente que el analito se halla presente o que excede una concentración específica (p.ej., CXL/LMR o nivel de documentación).

Identificación: Proceso de determinación inequívoca de la identidad química de todos o cualquier componente de la definición de residuo.

Incertidumbre: Un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían atribuirse razonablemente a la medición.

Interferencia: Respuesta intrínseca o extrínseca no relacionada a un analito (ruido) debido a factores electrónicos, químicos u otros factores relacionados con la instrumentación, el medio ambiente, el método o la muestra.

Interferente: Una sustancia química u otro factor que provoca una interferencia.

Límite de cuantificación (LOQ): La concentración más baja del analito que puede ser cuantificada. Normalmente se define como la concentración mínima del analito en la muestra de ensayo que puede determinarse con precisión (repetibilidad) y exactitud aceptable bajo las condiciones indicadas del ensayo. Para el ámbito de aplicación de este documento, es normalmente la concentración del analito en que la señal/ruido promedio es 10. [Véase también el párrafo 26].

Límite de detección (LOD): La concentración más baja o masa del analito que puede detectarse (pero no cuantificarse) en una muestra. En la práctica, es normalmente la concentración del analito en la que la señal/ruido promedio es 3.

Límite de detección en el cribado (LDC): Nivel más bajo de enriquecimiento que se ha demostrado que tiene una certeza a un nivel de confianza del 95%.

Linealidad: La capacidad de un método de análisis, dentro de un intervalo determinado, para proporcionar una respuesta instrumental o resultados, directamente proporcional a la cantidad de analito que se determinará en la muestra de laboratorio (CXG 72-2009).

Matriz: La sustancia o componente (p.ej. alimento) que se somete a muestreo en estudios de residuos de plaguicidas.

Metabolito: Componente de un residuo de plaguicida que se encuentra en un producto debido a una transformación biótica (metabolismo) de un plaguicida en un sistema biológico (p.ej., planta, animal).

Matriz testigo: Material de muestra o porción analítica que contiene una concentración no detectable de los analitos de interés.

Método cuantitativo: Un método con el que se pueden obtener resultados (determinativos) de la concentración de analitos con veracidad y precisión que reúne los criterios establecidos.

Método de confirmación: Un método es capaz de proporcionar información adicional de acuerdo con un resultado anterior. En una situación ideal se analiza una submuestra diferente con un método con un mecanismo químico diferente al del primer análisis, y uno de los métodos se ajusta a los criterios de identificación del analito con un grado aceptable de certidumbre al nivel de interés.

Método de criba: Un método que satisface criterios predeterminados para detectar la presencia o ausencia de un analito o clase de analitos a concentraciones iguales o mayores que la concentración mínima de interés.

Método de residuo único: Un método que determina un único analito o un pequeño grupo de analitos con propiedades físico-químicas similares.

Método multiresiduos (MMR): Un método que puede determinar un gran número de compuestos normalmente de distintas clases químicas.

Nivel calibrado más bajo (LCL): La concentración (o masa) más baja que el sistema de determinación está calibrado correctamente, mediante el análisis de los lotes.

Nivel validado más bajo (LVL): El menor nivel de adición validado que cumple los criterios de rendimiento del método.

Precisión: Grado de variabilidad de una medición en torno a una media.

Preparación de la muestra: Consiste en la extracción de una porción de ensayo de la muestra, su limpieza y otros pasos que conducen a la solución de la muestra para el análisis.

Protector de analitos: Compuestos que interactúan estrechamente para llenar sitios activos en el sistema de cromatografía de gases, reduciendo las interacciones de analitos con esos sitios activos y produciendo menos prolongación de picos o pérdidas, por tanto, una respuesta de analitos más elevada.

Recuperación: Cantidad medida como un porcentaje de la cantidad de analito(s) (según la definición de residuo), originalmente añadida a una muestra de la matriz correspondiente, que no contiene ningún nivel detectable del analito o contiene un nivel detectable conocido. Los experimentos de recuperación proporcionan información tanto sobre la precisión como de la veracidad, y por tanto de la exactitud del método.

Repetibilidad: Precisión expresada normalmente como RSD, obtenida a través del mismo procedimiento de medición o procedimiento de ensayo; el mismo operador; el mismo equipo de medición o ensayo utilizado en las mismas condiciones; la misma ubicación y repetición durante un breve período de tiempo (CXG 72-2009).

Reproducibilidad: Precisión (normalmente expresada como RSD) de las condiciones de observación en las que se obtienen resultados independientes de ensayos o mediciones con el mismo método de objetos idénticos de medición o ensayo realizados en instalaciones de ensayo o medición diferentes, con operadores distintos que emplean equipos diferentes (CXG 72-2009).

Residuo no añadido: Residuo que se produce en un producto que se debe al uso específico de un plaguicida, al consumo por un animal o a la contaminación medioambiental en el campo, en contraposición a los residuos presentes debido al enriquecimiento de muestras en el laboratorio.

Robustez: Una medida de la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas de los parámetros del método; proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento en un uso normal (CXG 72-2009).

Selectividad: La medida en que un método puede determinar analitos específicos en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar (CXG 72-2009).

Sensibilidad: Cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente

en el valor de la cantidad objeto de la medición (CXG 72-2009).

SIM: seguimiento del ion seleccionado, una técnica de detección de espectrometría de masas.

Soluciones estándar ajustadas a la matriz: Soluciones estándar preparadas en extractos finales de testigos de la matriz similares a las de la muestra.

TOF: tiempo de vuelo, una metodología de detección utilizada en espectrometría de masas.

Veracidad: La proximidad en la concordancia entre el promedio de un número infinito del valor de cantidad medido replicado y un valor de cantidad de referencia (CXG 72-2009).