

Guía de criterios de aceptación para la validación de nuevas matrices en procedimientos de análisis de residuos de plaguicidas

1. Introducción

Según el Reglamento de la UE 2017/625 entre las responsabilidades de los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) está la coordinación de las actividades de los laboratorios oficiales a fin de armonizar y mejorar los métodos de análisis, ensayo o diagnóstico de laboratorio y su utilización.

El documento SANTE 11312/2021 sobre “Control de Calidad y Validación de Métodos para el Análisis de Plaguicidas” es un documento de referencia armonizado entre todos los Estados Miembros de la Unión Europea que establece los requisitos de validación y de control de calidad para los métodos de análisis de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos, dirigido a los laboratorios de control oficial de la UE.

En dicho documento se indican los criterios de aceptación para el desempeño de los métodos cuantitativos durante la validación inicial y se propone un modo pragmático de realizar el procedimiento de validación para incluir una nueva matriz en el alcance, así como los criterios de aceptación de esa matriz adicional. Sin embargo, algunos de los criterios de aceptación han generado dudas de interpretación entre los laboratorios de control oficial.

Debido a la falta de un procedimiento unificado de la forma de realizar las comprobaciones de matrices nuevas y a las dudas mencionadas anteriormente en cuanto a alguno de los criterios de funcionamiento de los métodos, se ha considerado necesaria la elaboración de este documento por parte de los Laboratorios Nacionales de Referencia españoles, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) y el Centro Nacional de Alimentación (CNA) y se ha consensuado en el Grupo de Trabajo de laboratorios de análisis de residuos de plaguicidas.

El presente documento se considera una **guía orientativa** que pretende facilitar el trabajo de los laboratorios de control oficial que realizan residuos de plaguicidas, pero también serán admisibles otros procedimientos debidamente justificados.

2. Objeto y campo de aplicación

El objetivo de esta guía es armonizar el procedimiento y los criterios de aceptación de la validación que permitan garantizar la validez del resultado de una nueva matriz incluida en un grupo de matrices previamente validado. También se pretende aclarar determinados conceptos del documento SANTE en relación con la extensión de un método de análisis de residuos de plaguicidas a nuevas matrices en ese caso (recogido en la sección 4 del apéndice A de este documento SANTE).

3. Validación adicional para nuevas matrices

De acuerdo con el documento SANTE, para demostrar que el método analítico es adecuado para el fin previsto en la nueva matriz perteneciente a un grupo de matrices previamente validado, se debe llevar a cabo una evaluación del sesgo del método con ensayos de recuperación, además de comprobar que se cumplen los parámetros de identificación de los analitos: tiempo de retención y la relación de los iones (*ion ratio*) indicados en los párrafos D2, D11, D12 y tabla 3.

Esta comprobación se llevará a cabo mediante la extracción de una única muestra en la matriz nueva adicionada al límite de cuantificación (LQ) objetivo y, si las recuperaciones de los analitos están dentro del rango 60-140% y se cumplen los criterios de identificación, se concluirá que todos los analitos pueden considerarse validados. Si posteriormente se reciben más muestras de ese producto, el laboratorio debería utilizarlas para el control de calidad continuo. Después de cinco o más comprobaciones de recuperación de este tipo, se debería calcular la recuperación media, que debe estar dentro del rango 70-120% con una RSD igual o inferior al 20%, si bien se tendrá en cuenta lo descrito a continuación cuando las recuperaciones estén fuera de este intervalo.

Cuando la recuperación individual (comprobación) para un analito esté fuera del intervalo 60-140%, el primer paso será investigar las posibles causas de esa situación.

Una de las causas podría ser el empleo de curvas de calibrado del tipo *matrix-matched* con matrices diferentes a la de la muestra, que está desaconsejado para estos analitos. El empleo de matrices diferentes a esta es válido solo para el primer análisis (cribado o *screening* de positivos) para estos analitos.

Cuando el laboratorio haya utilizado ese tipo de calibración en una matriz diferente a la analizada, deberá repetir el calibrado con la misma matriz¹ y cuantificar nuevamente la muestra adicionada al LQ.

Para abordar estos casos, se distinguen dos situaciones dependiendo del tipo de método de calibrado que aplique el laboratorio, que son:

- a) **Métodos de calibrado que corrigen el sesgo.** Se trata de alguno de los siguientes: el uso de adiciones de estándar antes de la extracción (párrafo C24 del Documento SANTE), adición antes de la extracción de un estándar interno marcado isotópicamente (párrafo C35) o el uso del *procedural calibration* (párrafo C28).
- b) **Métodos que no corrigen el sesgo.** Básicamente, la calibración *matrix-matched* (párrafos C21-C23).

¹ Se considera mismo tipo matriz al mismo código según el Reglamento 396/2005, por ejemplo, para 0140030: Melocotones, se considerará lo mismo que 0140030-001(paraguayas), 0140030-002 (nectarinas) y 0140030-990 (Otros híbridos de *Persica vulgaris*; sinónimo: *Prunus persica*, no mencionados en otra parte).

(a) Métodos de calibrado que corrigen el sesgo.

Para aquellos analitos cuyo valor de recuperación en la comprobación (valor individual) esté fuera del intervalo 60-140%, el laboratorio llevará a cabo al menos cinco ensayos de recuperación al LQ, siendo suficiente hacerlas en condiciones de repetibilidad. Este quintuplicado es el número de réplicas que indica el documento SANTE para una validación completa (párrafo G3).

Con los resultados obtenidos, se calculará la recuperación media y el RSD_r y las combinaciones analito matriz deberán cumplir los siguientes criterios:

- Recuperación aparente media dentro del intervalo 70-120%
- $RSD_r \leq 20\%$.

En el caso de que se cumplan estos criterios, las combinaciones analito/ matriz afectadas se considerarán validadas.

(b) Métodos que no corrigen el sesgo.

Para aquellos analitos cuyo valor de recuperación en la comprobación (valor individual) esté fuera del intervalo 60-140%, el laboratorio podrá proceder de alguna de las formas siguientes:

- Puede utilizar datos del histórico del grupo de matrices. Es decir, se puede evaluar si el valor de recuperación individual de la nueva matriz se encuentra en el rango de valores de validación inicial u *on-going* que se ha observado en ese grupo de matrices. Para hacerlo, se debe tener un mínimo de cinco valores y la recuperación individual (comprobación) deberá estar en el intervalo de recuperación media $\pm 2 \cdot RSD$, de acuerdo con el apartado C43 del documento SANTE. Si es así, se considera validado el analito en la matriz nueva.
- Se puede hacer una validación adicional con al menos cinco réplicas del nivel del LQ objetivo, siendo suficiente hacerlas en condiciones de repetibilidad. Si la recuperación media se encuentra en el intervalo 70-120% con una $RSD_r \leq 20\%$, se considerará validado el analito en la matriz nueva.

En ambos procedimientos se pueden aceptar valores de recuperaciones medias en los intervalos 30-70% y 120-140% cuando los datos sean consistentes ($RSD_r \leq 20\%$), pero las bases para este comportamiento deberán estar debidamente justificados. Un ejemplo sería demostrar que la distribución del analito entre matriz y extractante se mantiene en un nivel bajo, lo que puede conseguirse con al menos cinco valores de recuperación, que es el número mínimo de réplicas que indica el documento SANTE para una validación completa. También podría ser que pueda encontrarse en bibliografía, como la publicada por los EURLs o en publicaciones científicas de alto impacto (revistas en los cuartiles Q1 y Q2).

Debe tomarse en consideración que puede ser necesario ampliar la curva de calibrado, especialmente en la parte baja de la misma, para que no haya extrapolación en el cálculo de estos valores de recuperación.

El laboratorio debería establecer el procedimiento para la corrección del sesgo del método para los casos en los que la recuperación media se encuentre fuera del intervalo 80-120%. El laboratorio decidirá cómo corrige el sesgo del método en los análisis de rutina. En caso de aplicar la **corrección matemática**, se puede realizar según aparece en el párrafo E4 del Documento SANTE: usando la recuperación media de la validación inicial, la recuperación media de la validación *on-going* o la recuperación (media) de la muestra usada como control de calidad de la secuencia.

Por debajo de la recuperación del 60%, el resultado debe informarse de acuerdo con el procedimiento establecido para la corrección del sesgo.

Condiciones que aplicar en ambos tipos de métodos.

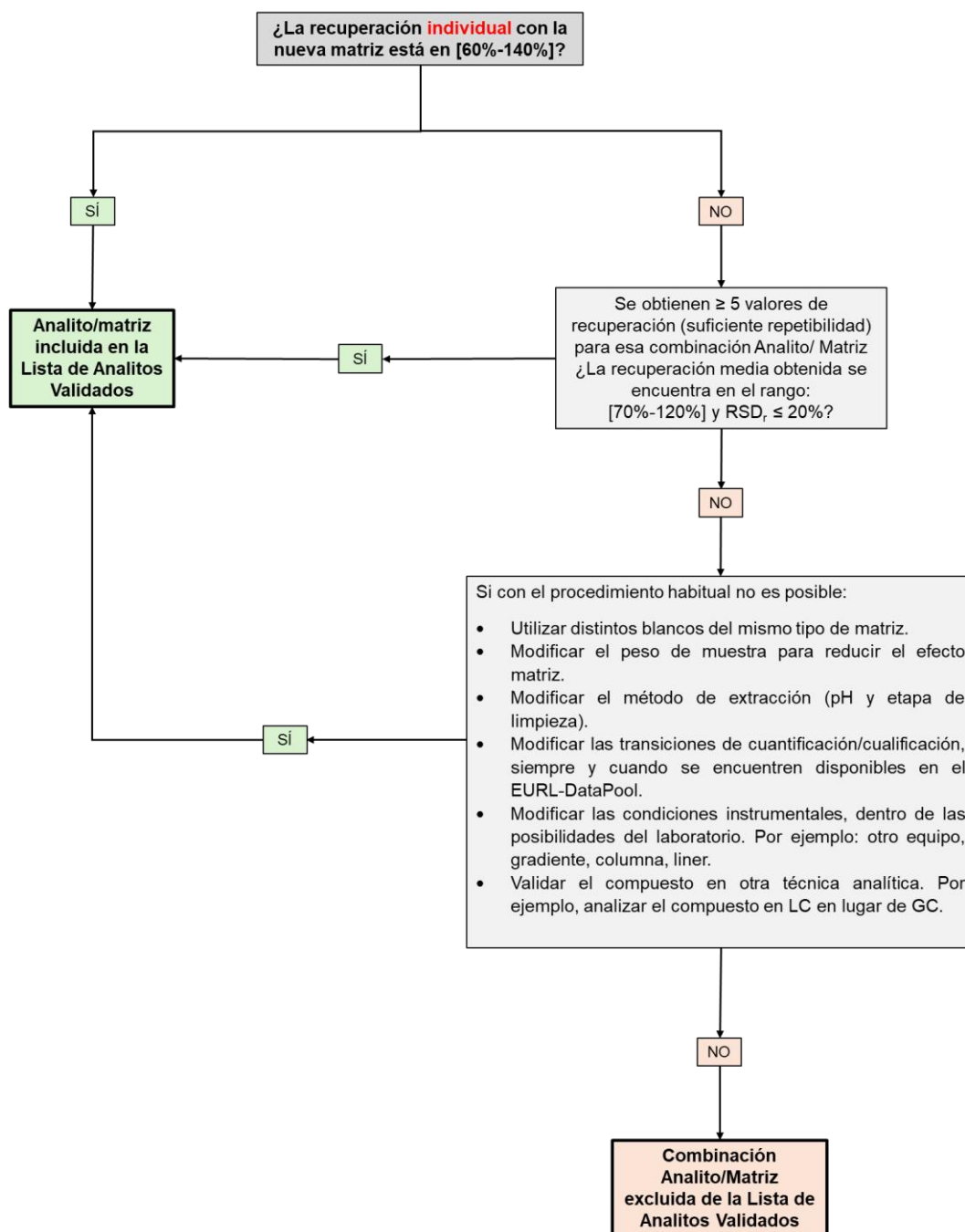
Si, de acuerdo con lo indicado anteriormente, algún analito sigue sin cumplir los requisitos de exactitud y precisión y en consecuencia no puede incluirse en la lista de matrices validadas, podrían llevarse a cabo las siguientes actuaciones, de acuerdo con los recursos de los que disponga el laboratorio:

- Utilizar distintos blancos del mismo tipo de matriz en las réplicas de recuperación para incluir la variabilidad de las muestras.
- Modificar el peso de muestra para reducir el efecto matriz.
- Validar el compuesto en otra técnica analítica. Por ejemplo, analizar el compuesto en LC en lugar de GC.
- Modificar el método de extracción (pH y etapa de limpieza).
- Modificar las transiciones de cuantificación/cualificación, siempre y cuando se encuentren disponibles en la base de datos EURL-DataPool.
- Modificar las condiciones instrumentales, dentro de las posibilidades del laboratorio. Por ejemplo: otro equipo, gradiente, columna, liner.
- Usar *procedural calibration*.

En el caso de que tras los resultados de las actuaciones realizadas no se cumplan los requisitos indicados en cada caso, la combinación analito/ matriz quedará excluida de la lista de compuestos validados.

ANEXO 1: Árbol de decisión para métodos que corrigen el sesgo.

a) MÉTODOS DE CALIBRADO QUE CORRIGEN EL SESGO



ANEXO 2: Árbol de decisión para métodos que no corrigen el sesgo.

b) MÉTODOS DE CALIBRADO QUE **NO** CORRIGEN EL SESGO

