

II

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

COMISIÓN

DECISIÓN DE LA COMISIÓN

de 14 de julio de 1987

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

(87/410/CEE)

LA COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS,

Visto el Tratado constitutivo de la Comunidad Económica Europea,

Vista la Directiva 85/358/CEE del Consejo, de 16 de julio de 1985, por la que se complementa la Directiva 81/602/CEE, referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático⁽¹⁾, modificada por el Reglamento (CEE) nº 3768/85⁽²⁾ y, en particular, su artículo 5,

Considerando que, en virtud del apartado 2 del artículo 5 de la Directiva 85/358/CEE, incumbe a la Comisión determinar, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 11 de la Directiva anteriormente citada, los métodos de análisis de muestras que deberán utilizarse para la detección de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático;

Considerando que, con arreglo a la letra b) del apartado 1 del artículo 4 de la Directiva 64/433/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1964, relativa a problemas sanitarios en materia de intercambios intracomunitarios de carne fresca⁽³⁾, cuya última modificación la constituye la Directiva 86/587/CEE⁽⁴⁾, y con arreglo al párrafo segundo del apartado 4 del artículo 11 de la Directiva 85/397/CEE del Consejo, de 5 de agosto de 1985, relativa a los problemas sanitarios y de policía sanitaria en los intercambios intracomunitarios de leche tratada térmicamente⁽⁵⁾, cuya modificación la constituye el Reglamento (CEE) nº 3768/85, los exámenes deberán efectuarse de acuerdo con métodos científicamente reconocidos y prácticamente experimentados, en particular, los que se definen en las directivas comunitarias o en otras normas internacionales;

Considerando que el establecimiento de los métodos de análisis de muestras incluye la definición de los sistemas de análisis que deberán utilizarse, de las normas que deberán seguirse para la toma de muestras, así como de los criterios relativos a la realización de los análisis;

Considerando que los métodos de análisis que se adopten deben tener la sensibilidad suficiente para detectar la presencia de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático;

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

Considerando que el Consejo adoptó el 20 de diciembre de 1985 la Directiva 85/591/CEE referente a la introducción de modos de toma de muestras y de métodos de análisis comunitarios para el control de los productos destinados a la alimentación humana⁽⁶⁾; que, a efectos de la presente Decisión, es conveniente tomar en consideración los criterios establecidos en el punto 1 del Anexo de la Directiva anteriormente citada;

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

HA ADOPTADO LA PRESENTE DECISIÓN:

Artículo 1

Los métodos de análisis de muestras autorizados para la detección de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático serán los siguientes:

⁽¹⁾ DO nº L 191, de 23. 7. 1985, p. 46.

⁽²⁾ DO nº L 362, de 31. 12. 1985, p. 8.

⁽³⁾ DO nº 121, de 29. 7. 1964, p. 2012/64.

⁽⁴⁾ DO nº L 339, de 2. 12. 1986, p. 26.

⁽⁵⁾ DO nº L 226, de 24. 8. 1985, p. 13.

⁽⁶⁾ DO nº L 372, de 31. 12. 1985, p. 50.

- Inmunoensayo (IA),
- Cromatografía en capa fina (TLC),
- Cromatografía en líquidos de alto rendimiento (HPLC),
- Cromatografía de gases (GC),
- Espectrometría de masas (MS),
- Espectrometría (SP).

Artículo 2

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

1. El tamaño de las muestras deberá ser suficiente para permitir un análisis correcto, la repetición de dicho análisis y la realización de las pruebas de confirmación.
2. Las muestras deberán marcarse de tal modo que sea posible su identificación en cualquier fase del examen.
3. Los métodos de envasado, conservación y transporte deberán mantener la integridad de la muestra y no alterar el resultado del examen.

Artículo 3

Los criterios relativos a la realización de los análisis figuran en el Anexo.

Artículo 4

La presente Decisión será examinada de nuevo antes del 1 de enero de 1991 para tener en cuenta la evolución de los conocimientos científicos y técnicos.

Artículo 5

Los destinatarios de la presente Decisión serán los Estados miembros.

Hecho en Bruselas, el 14 de julio de 1987.

Por la Comisión

Frans ANDRIESEN

Vicepresidente

ANEXO

CAPÍTULO I: CRITERIOS GENERALES

Introducción

A fin de llevar a cabo una evaluación objetiva de los procedimientos de detección de residuos, debemos disponer de datos cuantitativos sobre algunas características tipo de los procedimientos. Además, deben establecerse requisitos cuantitativos para algunas de estas características que tengan en cuenta, entre otros factores, el objetivo del método (por ejemplo, selección, determinación cuantitativa, confirmación...). En este capítulo se definen los criterios establecidos en el Anexo a la Directiva 85/591/CEE tal y como deberán aplicarse al examen de los métodos normales para el análisis de residuos de sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático.

Definicionesi) *Especificidad*

Especificidad es la capacidad de un método dado para diferenciar el analizado que se pretende medir de toda otra sustancia. Esta característica es función sobre todo del principio que se emplee para efectuar las medidas. Los detalles relativos a la especificidad deberán referirse cuanto menos a todas las sustancias que puedan dar una señal como respuesta cuando se utilice el procedimiento de mediciones descrito, por ejemplo productos homólogos, análogos o metabólicos del residuo de interés. A partir de los detalles relativos a la especificidad será posible obtener cuantitativamente el grado hasta el cual el método puede distinguir entre el analizado y las restantes sustancias, en condiciones experimentales.

ii) *Exactitud*

En este documento, la exactitud se refiere a la exactitud de la media. La definición que emplearemos se halla establecida en la norma ISO 3534/1977, punto 2.83 (exactitud de la media: diferencia entre el valor auténtico y el resultado medio que se obtendría efectuando el procedimiento experimental muchísimas veces).

Nota: Las principales limitaciones de la exactitud son:

- a) errores aleatorios,
- b) errores aleatorios, por ejemplo, baja recuperación.

Cuando el número de experimentos efectuados es muy grande, la exactitud de la media se aproxima al error sistemático.

Deberá especificarse el número de experimentos cuando se lleve a cabo la elaboración de los resultados del método.

La medida práctica de exactitud que se emplea es la diferencia entre el valor medio medido para el material de referencia y el valor auténtico, expresada como porcentaje del valor auténtico.

iii) *Precisión*: variaciones de la repetibilidad intralaboratorio (dentro de un laboratorio) y de la reproducibilidad interlaboratorio (dentro de un laboratorio y entre diversos laboratorios).

Se empleará el término estadístico general de «precisión» tal y como lo define la norma ISO 3534-1977, punto 2.84 (precisión: diferencia entre los resultados obtenidos efectuando el procedimiento experimental en diversas ocasiones bajo condiciones establecidas).

Según el Anexo de la Directiva 85/591/CEE, los valores de la precisión para los métodos de análisis cuya adopción tenga que decidirse según lo establecido por las disposiciones de dicha Directiva se obtendrán a partir de un ensayo conjunto efectuado, preferentemente, de conformidad con la norma ISO 5725/1986. A este fin, los términos repetibilidad y reproducibilidad se hallan definidos en la norma ISO 5725/1986.

Para preseleccionar métodos posibles por revisión de datos, es suficiente disponer de los datos sobre repetibilidad. El término «repetibilidad» utilizado para ello es el que se halla definido en la norma ISO 3534-1977, 2.85 a) [repetibilidad: la diferencia entre resultados sucesivos obtenidos con el mismo método sobre un material de prueba idéntico y en las mismas condiciones (mismo técnico, mismo equipo, mismo laboratorio e intervalos breves de tiempo)].

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

iv) *Límite de detección*

El límite de detección es el menor contenido medido a partir del cual resulta posible deducir la presencia del analizado con una seguridad estadística razonable. Equivale a la media del contenido medio de muestras en blanco representativas ($n \geq 20$) más tres veces la desviación estándar de la media.

Nota: Si se prevé qué factores como la especie, el sexo, la edad, etc. pueden influir sobre las características del método, será necesario un conjunto de muestras en blanco para cada una de las poblaciones homogéneas a las que se aplique el mismo.

v) *Sensibilidad*

La sensibilidad es una medida de la facultad de un método para notar pequeñas diferencias en cuanto al contenido de analizado. En este documento se define la sensibilidad como la pendiente de la curva de calibración en el punto de interés.

vi) *Practicabilidad y aplicabilidad*

La practicabilidad constituye una característica no estándar de un procedimiento analítico. Depende del objetivo del método, y viene determinada por requisitos tales como el gasto de muestra y los costes.

La aplicabilidad consiste en una relación de los productos a los que puede aplicarse el método seleccionable, tal y como éstos se presentan o con modificaciones de poca importancia.

vii) *En caso necesario podrán seleccionarse otros criterios**Límite de decisión*

El límite de decisión es el contenido más bajo de analizado que se detectará, si existe realmente, con seguridad estadística razonable, y que podrá determinarse según los criterios de identificación del método. Si tanto la exactitud como la precisión se mantienen constantes en una escala de concentración alrededor del límite de detección, el límite de decisión será igual a la medida del contenido medido de las muestras en blanco representativas más seis veces la desviación estándar de la media.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es el menor contenido medido por encima del cual resulta posible la determinación del analizado con un grado específico de exactitud y repetibilidad (dentro de un laboratorio).

Requisitos en cuanto a la exactitud y a la repetibilidad*Exactitud*

En el caso de análisis repetidos de la muestra de referencia, la diferencia entre la media y el valor auténtico, expresada como porcentaje del valor auténtico, no excederá los límites siguientes:

	<i>límites</i>
— valor auténtico hasta 1 μ /kg:	de -50 % a +20 %
— valor auténtico superior a 1 μ /kg y hasta 10 μ /kg:	de -20 % a +10 %
— valor auténtico superior a 10 μ /kg:	de -20 % a +10 %

Repetibilidad

En el caso de análisis repetidos y de la muestra de referencia, el coeficiente de variación (CV) de la media no sobrepasará los valores siguientes:

	<i>CV</i>
— media hasta 1 μ /kg:	0,30
— media superior a 1 μ /kg y hasta 10 μ /kg:	0,20
— media superior a 10 μ /kg:	0,15

Curvas de calibración

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

- la fórmula matemática que describe la curva de calibración,
- los valores numéricos de los parámetros de las curvas de calibración, con intervalos de confianza del 95 % (en condiciones óptimas),
- intervalos aceptables dentro de los cuales pueden variar de un día a otro los parámetros de las curvas de calibración,
- el alcance de la curva de calibración,
- datos sobre la variación de las variables válidos cuanto menos para el alcance de la curva de calibración.

Susceptibilidad a la interferencia

Se indicarán, para todas las condiciones experimentales que puedan experimentar fluctuaciones en la práctica (por ejemplo, estabilidad de reactivos, composición de la muestra, pH, temperatura), todas las variaciones que puedan afectar a los resultados analíticos.

Si se sabe que ciertas sustancias pueden interferir con la determinación del analizado, ello se indicará igualmente, junto con toda sugerencia para solucionar este problema. Es de importancia primordial investigar toda interferencia que pudiera ser ocasionada por los componentes de soporte. Así pues, deberá indicarse el mayor equivalente de muestra que no ejerza interferencia sobre la determinación del analizado (tras cualquier « purificación » especificada de muestra).

Relación entre los valores de tolerancia y los límites analíticos

Para sustancias con tolerancia cero, el límite de decisión del método analítico deberá ser lo suficientemente bajo para detectar con una probabilidad mínima del 95 % niveles de residuo que sean generalmente probables tras un uso ilegal del producto.

Para sustancias con un nivel de tolerancia establecido al máximo nivel fisiológico natural, el límite de cuantificación no sobrepasará la cifra obtenida restando a dicha tolerancia el resultado de multiplicar por tres la desviación estándar del método para una muestra al nivel de tolerancia.

Material de referencia

Se considerará material de referencia una muestra de una sustancia o un solo objeto manufacturado en los que haya sido posible determinar con la suficiente exactitud una o varias de sus propiedades, de modo que pueda utilizarse para calibrar un aparato o comprobar un método de medición. La certificación se establecerá según un procedimiento técnicamente válido.

Si no se dispone de material de referencia, podrán evaluarse los parámetros relevantes mediante el análisis de muestras reforzadas.

CAPÍTULO II : CRITERIOS DE CALIDAD PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

1. Lista de abreviaturas y de símbolos

Analítica general

GC	= cromatografía de gas ;
HPLC	= cromatografía líquida a alta presión ;
HPTLC	= cromatografía de capa fina de alto rendimiento ;
HRMS	= espectrometría de masas de alta resolución ;
IA	= inmunoensayo ;
IR	= infrarrojo ;
UV	= ultravioleta ;
LRMS	= espectrometría de masas de baja resolución ;
MS	= espectrometría de masas ;
RIA	= radioinmunoensayo ;
SP	= espectrometría, por ejemplo una red de diodos ;
TLC	= cromatografía de capa fina ;
/	= técnicas consecutivas no en serie ;
—	= técnicas consecutivas en serie ;

ej: HPLC/CG-MS = HPLC no en serie, a la que sigue una GC y una MS en serie.

Para RLA :

cpm	= cuentas por minuto ;
dpm	= desintegraciones por minuto ;
T	= radioactividad total (cpm o dpm) añadida a una muestra ;
B	= radioactividad de la fracción unida de una muestra ;
Bo	= radioactividad de la fracción unida de una muestra en blanco ;
B/Bo	= proporción de la radioactividad de la fracción unida de una muestra con respecto a la de una muestra en blanco (* proporción de unión con respecto a la unión cero *) ;
%B/Bo	= radioactividad de la fracción unida de una muestra expresada como porcentaje de la muestra en blanco ;
Bo/T	= proporción de la radioactividad de la fracción unida de una muestra en blanco con respecto a la actividad añadida (proporción de unión cero con respecto al total) ;
NSB/ASB	= unión no específica.

Para MS :

amu	= unidad de masa atómica ;
CI	= ionización química ;
EI	= ionización por impacto electrónico ;
MID	= detección de ión múltiple ;
M	= masa ;
Z	= carga ;
HFB	= ácido heptafluorobutírico o derivado del heptafluorobutirilo ;
MOX	= derivado de la metoxima ;
TMS	= derivado del trimetilsilil ;
MOX-TMS	= metoxima y derivado del timetilsilil ;
F+	= ión fragmento ;
(F+1) ⁺	= satélite isótopo natural, 1 M/Z mayor que el ión fragmento del isótopo principal correspondiente ;
M+	= ión molecular ;
(M+1) ⁺	= satélite isótopo natural, 1 M/Z mayor que el ión molecular del isótopo principal correspondiente.

2. Introducción

Los laboratorios que efectúen pruebas para la detección de residuos de sustancias que presenten una acción hormonal y de sustancias que presenten una acción tiroestática aplicarán los criterios de calidad para la interpretación de los resultados obtenidos mediante métodos analíticos de acuerdo con los requisitos de este capítulo, los criterios de calidad se han concebido para el análisis cualitativo y pretenden impedir que se produzcan resultados positivos falsos. Para obtener una conclusión positiva, los resultados analíticos deberán cumplir los criterios de calidad establecidos para el método de detección empleado.

3. **Definiciones relativas a la presencia de un analizado**
- 3.1. *Analizado*: el componente de una muestra de prueba cuya presencia deba determinarse. El término « analizado » incluye a los derivados que se formen a partir del analizado durante el análisis, si llega el caso.
- 3.2. *Material estándar*: una sustancia bien definida de la mayor pureza posible, que se utilizará durante el análisis como referencia.
- 3.3. *Positivo*: la presencia del analizado dentro de la muestra queda probada según el método cuando se cumplen los criterios generales y los criterios específicos del método de detección correspondiente. Se dice entonces que el resultado del análisis es « positivo ».
- 3.4. *Negativo*: el resultado del análisis se considerará « negativo » si no se cumplen los criterios especificados para el método en cuestión o el análisis no indica la presencia del analizado dentro de la muestra por encima del límite de decisión.
- 3.5. *Co-cromatografía*: se aplica el siguiente procedimiento. Antes de la cromatografía, se divide la solución de prueba purificada en dos partes.
- a) una parte se cromatografía sin más,
- b) a la otra parte se le añade el material estándar que deba identificarse, cromatografiándose a continuación esta solución mixta de analizado y material estándar.
- La cantidad de material estándar añadido deberá ser igual aproximadamente a la cantidad estimada del analizado.
4. **Consideraciones generales para el procedimiento analítico global**
- 4.1. *Criterios generales para el procedimiento global*
- El método deberá haber demostrado su capacidad para distinguir entre el analizado y todos los materiales interferentes conocidos en el soporte adecuado.
- El comportamiento físico y químico del analizado durante el análisis no podrá distinguirse del del material estándar correspondiente en el soporte adecuado.
- 4.2. *Criterios generales para las técnicas de separación*
- Las muestras de referencia que contengan cantidades conocidas de analizados deberán someterse al proceso completo al mismo tiempo que cada una de las series de muestras de pruebas analizadas.
- 4.3. *Criterio para la preconcentración, purificación y separación física y/o química no en serie, en caso dado*
- El analizado deberá encontrarse en la fracción característica del material estándar correspondiente en el soporte adecuado.
- 4.4. *Criterio para la separación en serie, dado el caso (por ejemplo, GC)*
- El analizado deberá salir con un tiempo de retención característico para el material estándar correspondiente contenido en el soporte adecuado.
- 4.5. *Preparación de la muestra de prueba*
- La muestra de prueba deberá prepararse a partir de una muestra de laboratorio de manera que se obtenga la máxima probabilidad de detectar el analizado, si éste se halla presente.
- 4.6. *Preparación de la fracción de prueba*
- La fracción de prueba deberá prepararse a partir de una muestra de prueba de manera que se obtenga la máxima probabilidad de detectar el analizado, si éste se halla presente.
5. **Requisitos de calidad para la determinación de un analizado por RIA**
- Con fines de selección:
- 5.1. Deberá especificarse el alcance de la curva de calibración, la cual deberá cubrir por lo general una escala de concentración de diez unidades como mínimo.
- 5.2. Deberán incluirse muestras de control en cada ensayo. Niveles de concentración: cero y partes inferior, media y superior del alcance de la curva. Los resultados de los controles deberán concordar con los obtenidos en ensayos previos.
- 5.3. En el límite de decisión el coeficiente de variación para las muestras de control deberá ser inferior a 0,15.
- 5.4. Se requiere un mínimo de 6 puntos de calibración, convenientemente distribuidos a lo largo de la curva de calibrado.
- 5.5. Deberá controlarse y especificarse la recuperación.
- 5.6. La curva de calibración deberá presentar la mayor precisión en torno al límite de decisión.
- 5.7. Los parámetros adecuados de control de calidad deberá corresponder a los ensayos precedentes, por ejemplo Bo/T, NSB, pendiente y ordenada en el origen de la curva de calibración.
- Nota*: La conformidad con esos requisitos de calidad no excluye la posibilidad de resultados positivos erróneos originados por errores sistemáticos, tales como reactividades cruzadas de anticuerpos, o por interferencia de muestras no representativas.

6. Criterios para la identificación de un analizado por detección GC

- 6.1. El analizado deberá salir con el tiempo de retención característico del material estándar correspondiente.
- 6.2. El máximo de pico más próximo en el cromatograma deberá hallarse separado del pico designado del analizado al menos por una anchura completa, medida a la mitad de la altura máxima.
- 6.3. Para efectuar la identificación, será obligatorio llevar a cabo una co-cromatografía adicional en la fase de GC. El resultado de la misma será que se intensificará únicamente el pico que supuestamente se debe al analizado, lo que significa que la anchura medida a la mitad de la altura máxima oscilará a un $\pm 10\%$ respecto a la anchura original. Este requisito podrá considerarse cumplido si los tiempos de retención son idénticos, con una tolerancia del 10% , de la anchura del pico a la mitad de la altura máxima.

7. Criterios para la identificación de un analizado por TLC o HPTLC

- 7.1. El valor o valores R_f del analizado deberán concordar con el valor o valores R_f característicos del material estándar. Este requisito se cumple cuando el valor o valores R_f del analizado se hallen a un $\pm 3\%$ del valor o valores R_f del material estándar, bajo las mismas condiciones.
- 7.2. El aspecto del analizado no podrá ser distinto del del material estándar.
- 7.3. El centro del punto más próximo al correspondiente al analizado deberá hallarse separado de él por una distancia cuanto menos igual a la mitad de la suma de los diámetros de los puntos.
- 7.4. Para efectuar la identificación será obligatorio efectuar una co-cromatografía adicional en la fase de TLC.
Como consecuencia, se intensificará únicamente el punto que supuestamente se debe al analizado; no deberá aparecer ningún punto nuevo, y no se modificará el aspecto del punto.
- 7.5. Para efectuar la confirmación será obligatorio efectuar una TLC bidimensional.

8. Criterios para la identificación de un analizado por detección HPLC-SP

- 8.1. La máxima longitud de onda de absorción en el espectro UV del analizado deberá ser la misma que la del material estándar, con un margen determinado por la resolución del sistema de detección. Para la detección por red de diodos, el margen típico es de ± 2 nm.
- 8.2. El espectro del analizado no podrá diferir visualmente del espectro del material estándar, para las partes de ambos espectros con una absorbancia relativa $> 10\%$. Este criterio se satisface cuando se presentan máximos iguales y en ninguno de los puntos observados la diferencia de los dos espectros es superior al 10% de la absorbancia del material estándar.
- 8.3. Para efectuar la identificación, es obligatoria la co-cromatografía en la operación de HPTLC. Como resultado, se intensificará sólo el pico que supuestamente corresponde al analizado.

9. Criterios para la identificación de un analizado por TLC-SP o HPTLC-SP

- 9.1. El valor o valores R_f del analizado deberán concordar con el valor o valores R_f característicos del material estándar. Este requisito se cumple cuando el valor o valores R_f del analizado se hallen a un $\pm 3\%$ del valor o valores R_f del material estándar, bajo las mismas condiciones.
- 9.2. El aspecto del analizado no podrá ser distinto del del material estándar.
- 9.3. El centro del punto más próximo al correspondiente al analizado deberá hallarse separado de él por una distancia cuanto menos igual a la mitad de la suma de los diámetros de los puntos.
- 9.4. Para efectuar la identificación es obligatorio llevar a cabo una co-cromatografía adicional en la fase TLC. Como resultado, se intensificará sólo el círculo que supuestamente corresponde al analizado; no aparecerá ningún círculo nuevo.
- 9.5. La máxima longitud de onda de absorción en el espectro del analizado será la misma que la del material estándar, con un margen determinado por la resolución del sistema de detección.
- 9.6. El espectro del analizado no será distinto visualmente del espectro del material estándar.

10. Criterios para la identificación de un analizado por GC-HRMS

- 10.1. Para poderse clasificar como mediciones de alta resolución, deberán obtenerse los resultados a una resolución superior a 9 500 y con un valle no superior al 10 % de la altura de los picos.
- 10.2. La relación de intensidades entre la respuesta de los iones F^+ y $(F+1)^+$ o los M^+ y $(M+1)^+$ del derivado del material estándar deberá ser igual al valor teórico con un margen A %.
- 10.3. La masa fragmento del derivado del analizado (determinada por cotejo de picos) deberá ser igual al valor teórico del derivado correspondiente del material de referencia, con un margen de tolerancia de B amu.

Nota: El Cuadro 1 del Apéndice muestra como ejemplos los valores de A y B para una serie de agentes anabólicos. Sin embargo, el método no se limita a los agentes anabólicos, sino que puede aplicarse en general.

11. Criterios para la identificación de un analizado por GC-LRMS**11.1. Criterios de cromatografía de gas**

El tiempo de retención del analizado en la GC deberá ser el mismo que el de los estándares de referencia, con un margen de tolerancia de ± 5 segundos.

Si se emplea un estándar interno, el tiempo de retención relativo (B/A) del analizado deberá ser el mismo que el del material estándar, con un margen $\pm 5/A$, en el soporte adecuado, donde:

A = tiempo de retención absoluto de un estándar interno, en segundos;

B = tiempo de retención absoluto del analizado en segundos.

11.2. Criterios de espectrometría de masas

- 11.2.1. Todos los iones controlados deberán derivarse del analizado que salga con un mismo tiempo de retención.

- 11.2.2. Deberán determinarse las intensidades de al menos dos iones, y, preferiblemente, de más.

Nota: Para lograr la identificación inequívoca de un analizado, deberá elegirse un número adecuado de iones, el cual dependerá del compuesto concreto y de la especificidad de los iones elegidos. Se recomienda la selección de al menos 4 iones en el caso de la mayor parte de los derivados de las sustancias anabólicas que figuran en los cuadros 2 a 6 del Apéndice.

- 11.2.3. Las intensidades relativas de los iones detectados, expresados como porcentaje de la intensidad del ión de mayor intensidad (pico base) deberán ser las mismas que las del estándar de referencia adecuado dentro de un margen de ± 20 % (método CI) o ± 10 % (método EI).

- 11.2.4. El ión molecular del material estándar deberá hallarse presente, si es posible, en el espectro MID del analizado.

Nota: En los cuadros 2 a 6 del Apéndice se reflejan como ejemplos detalles de los iones moleculares y los iones fragmento de los derivados TMS, MOX-TMS, MOX y HFB- de una serie de agentes anabólicos y compuestos emparentados. Sin embargo, estos criterios no son exclusivamente para los derivados, sino que pueden aplicarse en general.

12. Criterios para la identificación de un analizado por espectrometría IR**12.1. Definición de picos adecuados**

Los picos adecuados son los máximos de absorción de un material estándar en el espectro IR que cumplan los siguientes requisitos:

- 12.1.1. El máximo de absorción se hallará en el intervalo de números de onda de 1 800 a 500 cm^{-1} .

- 12.1.2. La intensidad de la absorción no será inferior a:

- 12.1.2.1. un coeficiente de absorbancia molar específica de:

- 40, con respecto a la absorbancia cero, y
- 20, con respecto a la línea de la base del pico,

o

- 12.1.2.2. una absorbancia relativa de:

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

Nota: Aun cuando desde el punto de vista teórico puedan preferirse picos adecuados según 12.1.2.1, en la práctica los picos según 12.1.2.2 son más fáciles de determinar.

- 12.2. *Número de picos adecuados*
Se requiere un mínimo de seis picos adecuados
- 12.3. *Código de picos adecuados*
Las posiciones exactas de los picos adecuados, con los números de onda completos, constituyen los parámetros objetivos y digitalizados para evaluar los espectros de las muestras.
Nota: El cuadro 7 del Apéndice presenta los picos adecuados de los espectros IR de 49 agentes anabólicos y compuestos emparentados. Sin embargo, el método no se limita exclusivamente a los agentes anabólicos sino que puede aplicarse en general.
- 12.4. *Empleo de los cuadros de pico adecuados*
- 12.4.1. Se comparan las composiciones de los picos en el espectro IR del analizado con las posiciones de los picos adecuados en el espectro IR del material estándar.
- 12.4.2. Se determina el número de picos en el espectro IR del analizado cuyas frecuencias correspondan con un pico adecuado en el espectro IR del material estándar, con un margen de $+ 1 \text{ cm}^{-1}$.
- 12.4.3. Se calcula la « puntuación » del material estándar en el espectro del analizado.
- 12.4.4. Definición de « puntuación »:
La « puntuación » es el porcentaje de los picos adecuados que se encuentra en el espectro IR del analizado.
- 12.5. *Criterios*
- 12.5.1. La puntuación será cuanto menos del 50 %.
- 12.5.2. El procedimiento se aplicará únicamente a los picos de absorción en el espectro de muestra cuya intensidad sea al menos tres veces superior al ruido entre un pico y otro.

APÉNDICE

CUADRO 1

Datos para confirmar la presencia de agentes anabólicos por HRMS

Derivado (1)	Masa de ión		Relación de intensidades		Masa de ión	
	ión F ⁺ ión M ⁺ , M/Z valor nominal (amu)	ión (F+1) ⁺ ión (M+1) ⁺ , M/Z valor nominal (amu)	valor teórico	A margen (%)	M/Z valor teórico (2) (amu)	B M/Z margen (amu)
DES-TMS	M ⁺ 412	413	0,3777	8	412,2254	0,0012
DE-TMS	M ⁺ 410	411	0,3772	8,5	410,2097	0,0012
HEX-TMS	F ⁺ 207	208	0,1889	17	207,1205	0,0007
NT-TMS	M ⁺ 346	347	no se aplica		346,2328	0,0015
NT-TMS	F ⁺ 256	257	no se aplica		256,1827	0,0015
NT-MOX-TMS	M ⁺ 375	376	no se aplica		375,2593	0,0015
epi NT-MOX-TMS	M ⁺ 375	376	no se aplica		375,2593	0,0015
E2-di-TMS	M ⁺ 416	417	no se aplica		416,2567	0,0015

- (1) DES = dietilestilbestrol,
 DE = dienestrol,
 HEX = hexestrol,
 NT = 19-nortestosterona-17β (nandrolona),
 epiNT = 19-nortestosterona-17α,
 E2 = Estradiol-17-β.

(2) Calculado a partir del isótopo ¹²C = 12,0000.

CUADRO 2

Derivados TMS de una serie de anabólicos y compuestos emparentados. Iones que deberán usarse para efectuar la confirmación mediante LRMS (por EI)

	PM	M/Z (1)			
Dienestrol	410	<u>410</u>	395	381	
Dietilestilbestrol	412	<u>412</u>	397	383	
5α-Estrana-(3β,17α)-diol	422	<u>407</u>	332	<u>242</u>	201
17α-Estradiol	416	<u>416</u>	401	<u>326</u>	<u>285</u>
17β-Estradiol	416	<u>416</u>	401	<u>326</u>	<u>285</u>
17β-Estradiol-16,16,17(d3) (2)	419	<u>419</u>	404	<u>329</u>	<u>285</u>
Etinilestradiol	440	<u>440</u>	<u>425</u>	300	<u>285</u>
Hexestrol	414	<u>207</u>	191	179	
Metandrostenolona	372	<u>372</u>	357	302	282
Metiltestosterona	374	<u>359</u>	317	304	<u>284</u>
α-Nortestorona	346	<u>346</u>	331	<u>256</u>	215
β-Nortestorona	346	<u>346</u>	331	<u>256</u>	215
Testosterona	360	<u>360</u>	345	<u>270</u>	226
17-α-Trembolona	342	<u>342</u>	252	237	211
17-β-Trembolona	342	<u>342</u>	252	237	211
α-Zearalanol	538	<u>538</u>	523	<u>433</u>	307
β-Zearalanol	538	<u>538</u>	523	<u>433</u>	307
Zearalanona	464	<u>464</u>	<u>449</u>	335	307
Zearalenona	462	<u>462</u>	429	<u>333</u>	305

(1) Ión subrayado : « pico base ».

(2) Patrón interno.

CUADRO 3

Derivados MOX-TMS de una serie de anabólicos y compuestos emparentados. Iones que deberán emplearse para efectuar la confirmación mediante LRMS (por EI)

	PM	M/Z (1)			
Medroxiprogesterona	474	474	459	<u>443</u>	353
Metandrostenolona	401	<u>401</u>	386	370	280
Metiltestosterona	403	403	<u>313</u>	298	282
α -Nortestosterona	375	<u>375</u>	360	344	285
β -Nortestosterona	375	<u>375</u>	360	344	285
Testosterona	389	<u>389</u>	374	358	268
α -Trenbolona	371	<u>371</u>	281	266	253
β -Trenbolona	371	<u>371</u>	281	266	253
Zearalanona	493	493	<u>478</u>	462	406
Zearalenona	491	491	460	444	<u>333</u>

(1) Ión subrayado : « pico base ».

CUADRO 4

Derivados MOX de una serie de anabólicos y compuestos emparentados. Iones que deberán emplearse para efectuar la confirmación mediante LRMS (por EI)

	PM	M/Z (1)			
Acetato de medroxiprogesterona	415	415	330	<u>312</u>	287
Acetato de megestrol	413	413	353	338	<u>310</u>
Acetato de melengestrol	425	425	365	350	<u>322</u>
Acetato de trenbolona	341	<u>341</u>	298	281	266

(1) Ión subrayado : « pico base ».

CUADRO 5

Derivados HFB de una serie de anabólicos y compuestos emparentados. Iones que deberán emplearse para efectuar la confirmación mediante LRMS (por EI)

	PM	M/Z (1)			
Dietilestilbestrol	660	660	631	447	<u>341</u>
Dienestrol	658	658	629	<u>445</u>	341
Hexestrol	662	332	<u>331</u>	304	303
17 β -Estradiol,16,16,17(d3) (2)	667	<u>667</u>	454	412	359

(1) Ión subrayado : « pico base ».

(2) Patrón interno.

CUADRO 6

Derivados HFB de los estilbenos. Iones que deberán emplearse para efectuar la confirmación mediante LRMS (por CI)

(a) *CI Amonio*

	PM	M/Z (!)			
Hexestrol	662	681	<u>680</u>	484	466
Dietilestilbestrol	660	678	482	<u>464</u>	

(!) Ión subrayado : « pico base ».

(b) *CI Metano*

	PM	M/Z (!)			
Dietilestilbestrol	660	661	465	<u>464</u>	
Dienestrol	658	659	463	462	<u>369</u>

(!) Ión subrayado : « pico base ».

Notas

1. Las intensidades relativas de algunos de los iones indicados en estos cuadros son demasiado bajas (cerca del 10 %) para emplearse de manera fiable para la confirmación.
2. Las intensidades relativas de los iones pueden variar en función de la cantidad de analizado que se inyecte en la columna. En el caso del dietilestilbestrol a bajas concentraciones en procedimiento CI metano, el ión 661 constituye el pico base (esto es, hay menos fragmentación a la forma mono-HFB). Por tanto, será importante comparar las intensidades relativas de ión para el analizado con las de un estándar de referencia, trabajando con una concentración aproximadamente igual.
3. La ionización con metano provoca la escisión de la molécula de hexestrol. Los iones fragmento de masa inferior no resultan bien separados de los restantes.

CUADRO 7

Picos adecuados en los espectros IR de 49 agentes anabólicos y compuestos emparentados

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
β E2	α E2	E2Ac	E2diAc	E2P	E2diP	E2S	E2Bz	E2ME	EE
		1 701	1 766 1 734	1 712	1 763 1 757 1 733		1 729		
1 610	1 610	1 620		1 696 1 619			1 600	1 610	1 615
1 586	1 586 1 500	1 584		1 583				1 577 1 502	1 584 1 501
1 498 1 449 1 416	1 443	1 498 1 460	1 494	1 499 1 460 1 444	1 492 1 460 1 419	1 494 1 420	1 498 1 451	1 469 1 444	1 473 1 449 1 433
1 382 1 357 1 320 1 302	1 379 1 352	1 373 1 351	1 375	1 350	1 381 1 351	1 392 1 307	1 380 1 315	1 374 1 334 1 313	1 384 1 358
1 283 1 250 1 231	1 284 1 253 1 234	1 292 1 276 1 248 1 235	1 262 1 248	1 288 1 249 1 225 1 212	1 273 1 247 1 224	1 241	1 266 1 223 1 216	1 291 1 278 1 252 1 236	1 299 1 257 1 203
1 156 1 130 1 118 1 102	1 154 1 119 1 101	1 152	1 198 1 177 1 149	1 151	1 197 1 154 1 139	1 176	1 176 1 152 1 128	1 183 1 153 1 130 1 120	1 184 1 160 1 147 1 135 1 122 1 111
1 056 1 021 1 012	1 074 1 054 1 036 1 013	1 017	1 040 1 015	1 086 1 072 1 012	1 078 1 055 1 033 1 014	1 097 1 075 1 049 1 018	1 067 1 025 1 012	1 055 1 042 1 025	1 069 1 055 1 043 1 022 1 006
962 930 917 905	994 970 945 919		946	962	917	932 908			971 930 914
874 820	866 821	873	885	878 871 816	897 807	887 866 847 822 808	889	898 870 818	880 857 823
786 733	787					770	705	785	789
		624				650	688		646 622
	573					579 519			568

11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	E1	E3	Eq	EqIn	β T	α T	TAc	TP	TiC
	1 719		1 719	1 717			1 741	1 729	1 733
1 612	1 621	1 610	1 623	1 622	1 666 1 658 1 612	1 654 1 610	1 672 1 618	1 669 1 611	1 667 1 617
1 580 1 506	1 584	1 501	1 588 1 509 1 500	1 599					
1 467 1 449	1 499	1 452	1 470 1 407	1 480 1 460 1 423	1 470 1 432	1 432	1 449 1 433	1 450	1 470 1 450
1 377 1 352 1 325	1 396 1 361	1 384 1 353 1 322	1 354	1 389	1 378 1 360	1 380	1 377 1 362 1 333	1 331	1 378 1 331
1 291 1 255 1 242	1 287 1 250	1 285 1 254 1 238 1 201	1 278 1 246	1 225 1 208	1 277 1 233	1 276 1 231	1 274 1 232	1 270 1 240	1 294 1 272 1 230
1 183 1 165 1 146 1 133 1 121 1 109		1 174 1 149 1 118 1 103	1 158 1 148	1 169	1 199 1 131 1 114	1 189		1 185	1 182 1 125 1 103
1 062 1 036 1 019	1 055	1 068 1 062 1 034	1 056	1 066	1 067 1 056 1 017		1 041 1 022	1 080 1 043 1 020	1 043 1 009
967 905	920	964 943 928 917			957 943		945		941
862 844 833 823	877 819	886 871 851 818	875 810	849 817	870		863	863	864
789 702	788	787							
658 620	673	662							
		582							

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
NTL	NTPP	Eti	βTB	αTB	TBA	P	MP	MPA	MGA
1 735	1 730				1 737			1 732 1 717	1 731 1 710
1 676 1 619	1 675 1 618	1 659 1 612	1 639	1 643	1 660	1 699 1 663 1 616	1 696 1 664 1 603	1 673 1 608	1 664 1 629
	1 501		1 569	1 578	1 573				1 584
1 473 1 418	1 447	1 430 1 418	1 438	1 450 1 435	1 439	1 439	1 448		1 460 1 447
1 381 1 335	1 330	1 383 1 331	1 379 1 353 1 346 1 322	1 391 1 369 1 346 1 321 1 310	1 375	1 386 1 358 1 328	1 349	1 365	1 390 1 366
1 299 1 269 1 240 1 205	1 297 1 259 1 205	1 288 1 232	1 288 1 267 1 226	1 279 1 240 1 229	1 245	1 279 1 237 1 228 1 204	1 271 1 233	1 261 1 253	1 269 1 260 1 247 1 224
1 175	1 177	1 191 1 125	1 199 1 101	1 198 1 150 1 126		1 162	1 186 1 123	1 187	1 167 1 143 1 127 1 109
1 053	1 080 1 049	1 068 1 060	1 075 1 054 1 017	1 088 1 028 1 011	1 096 1 053 1 023		1 093	1 080 1 056	1 083 1 059 1 014
	965			937	987	948		965	963
	879	869		852		871	871		878
	752 704	724		795 762					
		697							
							597		

41	42	43	44	45	46	47	48	49
MLGA	DE	DES	HEX	DEdiAc	DESdiP	Z	Cort	HCort
1 738 1 716				1 757	1 763 1 754			1 714
1 666 1 625	1 619 1 608	1 609	1 613			1 644 1 615	1 694 1 648 1 618	1 644 1 610
1 579	1 591 1 513	1 590 1 514	1 598 1 516	1 503	1 504	1 587		
1 444 1 416	1 426	1 462 1 427	1 458 1 440		1 459	1 464	1 447 1 413	1 432
1 389 1 372 1 318	1 333	1 337		1 368	1 363	1 381 1 353 1 311	1 391	
1 260 1 245 1 231 1 205	1 247 1 205	1 282 1 247 1 204	1 218	1 218	1 210	1 259 1 200	1 269	1 271 1 237
1 123	1 171 1 102	1 173 1 114	1 174 1 107	1 196 1 164	1 157	1 167	1 186 1 159	1 133 1 115
1 037		1 012		1 019	1 076 1 019	1 096 1 075	1 075 1 064 1 037	1 047 1 006
972 953 930				910		989		942 900
881	853 834 826	851 831 805	847 830 804	865	895	840	875	865
	775	721	716					
627 612	649 620	646	646	679				
551	520	586	573 510					

Lista de abreviaturas

1 β E2	Estradiol-17 β
2 α E2	Estradiol-17 α
3 E2Ac	Acetato de estradiol-17
4 E2diAc	Diacetato de estradiol
5 E2P	Propionato de estradiol-17
6 E2diP	Dipropionato de estradiol
7 E2S	Sulfato de estradiol-3
8 E2Bz	Benzoato de estradiol-3
9 E2ME	Metiléter de estradiol-3
10 EE	Etinilestradiol
11 M	Mestranol
12 E1	Estrona
13 E3	Estriol
14 Eq	Equilina
15 EqIn	Equilenina
16 β T	Testosterona-17 β
17 α T	Testosterona-17 α
18 TAc	Acetato de testosterona
19 TP	Propionato de testosterona
20 TiC	Isocaproato de testosterona
21 TD	Decanoato de testosterona
22 TU _n	Undecanoato de testosterona
23 TPP	Fenilpropionato de testosterona
24 TBz	Benzoato de testosterona
25 MT	Metiltestosterona-17 α
26 MT-DP(11)	Metiltestosterona-D9(11)
27 β NT	Nortestosterona-17 β
28 α NT	Nortestosterona-17 α
29 NTP	Propionato de nortestosterona
30 NTD	Decanoato de nortestosterona
31 NTL	Laureato de nortestosterona
32 NTPP	Fenilpropionato de nortestosterona
33 ETi	Etilesterona
34 β TB	Trenbolona-17 β
35 α TB	Trenbolona-17 α
36 TBA	Acetato de trenbolona
37 P	Progesterona
38 MP	Medroxiprogesterona
39 MPA	Acetato de medroxiprogesterona
40 MGA	Acetato de megestrol
41 MLGA	Acetato de melengestrol
42 DE	Dienestrol
43 DES	Dietilèstilbestrol
44 HEX	Hexestrol
45 DEdiAc	Diacetato de dienestrol
46 DESdiP	Dipropionato de dietilèstilbestrol
47 Z	Zeranol
48 Cort	Corticosterona
49 HCort	Hidrocortisona
