



PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS COMITÉ DEL CODEX SOBRE MÉTODOS DE ANÁLISIS Y TOMA DE MUESTRAS

36.ª reunión

Budapest (Hungría), 23-27 de febrero de 2015

DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE EL ENFOQUE DE CRITERIOS PARA LOS MÉTODOS QUE UTILIZAN UNA “SUMA DE COMPONENTES”

(Documento elaborado por el Reino Unido¹)

ANTECEDENTES

1. En la 35.ª reunión del Comité del Codex sobre Métodos de Análisis y Toma de Muestras (CCMAS), la delegación de los Estados Unidos de América presentó el informe del grupo de trabajo electrónico (GTe) que figura en el documento CX/MAS 14/35/5 y señaló que había un interés general en el concepto de elaborar criterios para los métodos de Tipo I o los métodos de analitos múltiples, pero que este era un punto de partida y no se había intentado lograr un consenso al respecto. La delegación destacó las recomendaciones formuladas e indicó que el Comité necesitaría considerar una serie de factores cuando decida sobre la elaboración de criterios para los métodos de Tipo I o para los métodos de analitos múltiples, tales como: i) al examinar criterios para métodos de Tipo I, tal vez sea posible establecer procedimientos para evaluar la equivalencia entre métodos y no entre criterios; sin embargo, como no todos los métodos de Tipo I se hicieron iguales, pueden existir casos en los que no se pueda establecer la equivalencia; ii) en el caso de métodos de analitos múltiples, cómo tratar los factores de equivalencia tóxica, si deberían o no quedar fuera de la norma según el enfoque adoptado por el Comité del Codex sobre Pescado y Productos Pesqueros (CCFFP); iii) si era apropiado un enfoque general o si serían necesarios diferentes enfoques para los métodos de analitos múltiples (puede haber diferencias entre toxinas diferentes).

2. El Comité consideró cada una de las recomendaciones:

Recomendación 1: El establecimiento de criterios para las distintas circunstancias (métodos de Tipo I y de analitos múltiples) debería abordarse por separado, tanto durante la elaboración de los criterios como en el Manual de procedimiento.

3. Hubo un acuerdo general sobre esta recomendación.

Recomendación 2: Si se deberían establecer criterios para los métodos de Tipo I; o si debería elaborarse un procedimiento para determinar cuándo tienen los métodos un rendimiento comparable; o si el sistema actual debería mantenerse sin cambios.

4. Hubo un acuerdo general en el sentido de que no deberían elaborarse criterios numéricos para los métodos de Tipo I; sin embargo, deberían estudiarse procedimientos para establecer una equivalencia con dichos métodos.

Recomendaciones 3 y 4: Establecer un enfoque de criterios para los métodos de analitos múltiples.

5. Hubo un acuerdo general en el sentido de que el trabajo debería continuar en este ámbito y de que los factores de equivalencia tóxica no deberían incluirse en un método analítico específico y podrían referenciarse en la norma o en algún otro texto en el que puedan actualizarse y evaluarse periódicamente por procedimientos reconocidos internacionalmente.

¹ El coordinador del grupo de trabajo electrónico, el Dr. Andrew Damant.

6. Considerando el debate general sobre las recomendaciones, el Comité acordó continuar avanzando en el trabajo estableciendo dos grupos de trabajo electrónicos, que estarían abiertos a todos los miembros y observadores y trabajarían solo en inglés, del modo siguiente:
- a) elaboración de procedimientos o directrices para la determinación de la equivalencia con los métodos de Tipo I, dirigido por los Estados Unidos de América, para preparar un documento de debate en el que se examinarían diferentes enfoques para diferentes clases de métodos de Tipo I;
 - b) elaboración de un enfoque de criterios para métodos que usan una “suma de componentes”, dirigido por el Reino Unido. El grupo de trabajo preparará un documento de debate en el que se evalúen y discutan las opciones actuales y se examinen las directrices generales y evalúen los criterios para su uso según los casos.
7. Asimismo, en la 35.^a reunión del CCMAS, el Comité debatió los criterios de rendimiento para métodos destinados a la determinación de biotoxinas marinas en la *Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos*.
8. El Comité aprobó los criterios propuestos por el CCFFP. El Comité señaló que en el método AOAC 2005.06 no se analizan todas las sustancias en el cuadro, pero se abarcan los principales componentes tóxicos. Igualmente se señaló que era útil ofrecer información para los analistas en los *Métodos recomendados de análisis y muestreo* (CODEX STAN 234-1999) referente a cuáles son los métodos de análisis que cumplen los criterios.
9. El Comité aprobó el método AOAC 959.08 y el AOAC 2011.27 (Ensayo obligatorio del receptor) como de Tipo IV. Se comunicó al Comité que el AOAC 959.08 no era factible en algunos países donde los materiales de referencia de la saxitoxina (STX) no se encontraban disponibles, señalando que su comercio está restringido por la Convención de Armas Químicas.
10. En su 37.^o período de sesiones, la Comisión del Codex Alimentarius (CAC) siguió debatiendo los criterios de rendimiento para métodos destinados a la determinación de biotoxinas marinas (Sección I-8.6) recogidos en la *Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos*. La Comisión examinó el proyecto de Sección I-8.6 enmendado y aprobado por el CCMAS.
11. Sin embargo, se manifestaron preocupaciones sobre la clasificación del bioensayo en ratones como método de Tipo IV, lo que impediría utilizarlo para fines de control, inspección y regulación en algunos países. Ello repercutiría negativamente en el comercio, al tratarse de un método ampliamente utilizado y eficaz que permitía una protección adecuada de la salud humana.
12. Asimismo, se señaló que los criterios descritos en el Manual de procedimiento no eran aplicables a los métodos biológicos sino a los métodos químicos y que debería considerarse la posibilidad de excluir los métodos biológicos, tal como se hacía actualmente respecto a los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y de ensayo con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas (ELISA).
13. Las delegaciones reiteraron la opinión de que el CCMAS debería considerar la posibilidad de elaborar criterios para métodos biológicos, ya que los criterios utilizados actualmente para la selección de métodos eran aplicables a los métodos químicos y daban lugar a la clasificación como Tipo IV.
14. La delegación de Sudáfrica manifestó su preferencia por la aprobación tanto de métodos biológicos como de métodos químicos, en lugar de devolver solo el método biológico al CCMAS.
15. Se señaló que convenía mantener tanto los métodos biológicos como los químicos en el mismo estado.
16. Otras delegaciones comentaron que la Sección I-8.6 permitía el uso del bioensayo en ratones y de métodos químicos, y que el CCMAS había seguido los Principios para el establecimiento de métodos de análisis del Codex. También indicaron que el CCMAS estaba examinando criterios para métodos biológicos.

17. La Comisión del Codex Alimentarius:

- i) aprobó la Sección I-8.6.1;
- ii) devolvió la Sección I-8.6.2 al CCMAS y le pidió que examinara la tipificación de los métodos en cuestión; alentó además a los Miembros a presentar información a fin de que el CCMAS tomara una decisión al respecto;
- iii) alentó al CCMAS a examinar sin demora la manera de abordar los métodos biológicos desde la perspectiva de un enfoque basado en criterios;
- iv) señaló las reservas de Sudáfrica ante la decisión mencionada en el punto ii) anterior.

18. Como resultado de los debates celebrados en el 37.º período de sesiones de la Comisión del Codex Alimentarius, se pidió al grupo de trabajo del CCMAS encargado de preparar un enfoque de criterios para los métodos que utilizan una “suma de componentes” que también estudiara la elaboración de criterios para métodos biológicos.

19. El documento de debate se basa en la labor ya coordinada y notificada anteriormente por los Estados Unidos de América².

20. El GTe tuvo más de 60 participantes. Sin embargo, debido al retraso en la elaboración del presente documento de debate, aún no se ha podido consultar al GTe, por lo que el documento presentado es fundamentalmente un documento elaborado por el jefe de la delegación del Reino Unido en lugar del propio GTe.

INTRODUCCIÓN

21. En el Manual de procedimiento se establecen *Criterios generales para la selección de métodos de análisis* (22.ª ed. 2014, versión española, pág. 74). Se evalúan los métodos sobre la base de las características de selectividad, exactitud, precisión, límite de detección, sensibilidad, practicabilidad y aplicabilidad. El Manual también permite el establecimiento de otros criterios según proceda y ofrece cierta orientación sobre la manera de elegir entre diferentes métodos. Asimismo, acepta el “enfoque de criterios” como alternativa a la aprobación de un método específico (*ibídem*). Gracias al enfoque de criterios se puede establecer un conjunto de criterios (valores numéricos) que deberá cumplir un método para que sea aplicable (es decir, “apto para el uso previsto”) a una norma específica. El enfoque de criterios es aplicable a métodos plenamente validados de Tipo II y III, excepto para métodos como RCP y ELISA, pero no se puede aplicar a métodos de Tipo I. Actualmente, el enfoque de criterios requiere información sobre la aplicabilidad, el intervalo mínimo aplicable, el límite de detección y de cuantificación, la precisión (con criterios para la desviación típica relativa de la reproducibilidad), la recuperación y la conformidad (Manual de procedimiento, 22.ª ed. 2014, versión española, pág. 74). En el Manual de procedimiento se han descrito dos enfoques para el establecimiento de criterios. El primero, resumido en el Cuadro 1 del Manual, utiliza el límite especificado (límite máximo o mínimo) para establecer criterios numéricos relacionados con las características mencionadas anteriormente. El segundo incluye la conversión de un método especificado a fin de establecer criterios numéricos para los parámetros presentados en el Cuadro 1. Si bien el método debe estar validado y ser adecuado para el analito y el producto, no existe ningún requisito específico según el cual el método deba estar aprobado antes de “convertirlo” en criterios. Aunque no se indique específicamente en el Manual de procedimiento, las *Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios* se elaboraron examinando solamente las determinaciones de analitos individuales, es decir, métodos en que se mide la concentración de un analito específico y esta determinación se compara con una especificación.

² Discussion Paper on Considering Procedures for Establishing Criteria (Documento de debate sobre la consideración de procedimientos para el establecimiento de criterios) ([CX/MAS 14/35/5](#)).

Cuadro 1: Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios.

Aplicabilidad:	El método debe ser aplicable a la disposición especificada, el producto especificado y los niveles especificados (límite máximo, mínimo o ambos, LM). El intervalo mínimo aplicable del método depende del nivel especificado (LM) que se debe evaluar y puede expresarse, bien como la desviación típica de la reproducibilidad (s_R), bien como límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).			
Intervalo mínimo aplicable:	Respecto de un $LM \geq 0,1$ mg/kg, $[LM - 3 s_R, LM + 3 s_R]$. Respecto de un $LM < 0,1$ mg/kg, $[LM - 2 s_R, LM + 2 s_R]$. s_R^3 = desviación típica de la reproducibilidad.			
Límite de detección (LD):	Respecto de un $LM \geq 0,1$ mg/kg, $LD \leq LM \cdot 1/10$. Respecto de un $LM < 0,1$ mg/kg, $LD \leq LM \cdot 1/5$.			
Límite de cuantificación (LC):	Respecto de un $LM \geq 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM \cdot 1/5$. Respecto de un $LM < 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM \cdot 2/5$.			
Precisión:	Respecto de un $LM \geq 0,1$ mg/kg, valor de HorRat ≤ 2 . Respecto de un $LM < 0,1$ mg/kg, la $RSD_R < 22$ % [44 %?]. RSD_R^4 = desviación típica relativa de la reproducibilidad. $RSD_R \leq 2 PRSD_R$.			
Recuperación (R):	Concentración	Razón	Unidad	Recuperación (%)
	100	1	100 % (100 g/100 g)	98-102
	≥ 10	10^{-1}	≥ 10 % (10 g/100 g)	98-102
	≥ 1	10^{-2}	≥ 1 % (1 g/100 g)	97-103
	$\geq 0,1$	10^{-3}	$\geq 0,1$ % (1 mg/g)	95-103
	0,01	10^{-4}	100 mg/kg	90-107
	0,001	10^{-5}	10 mg/kg	80-110
	0,0001	10^{-6}	1 mg/kg	80-110
	0,00001	10^{-7}	100 μ g/kg	80-110
	0,000001	10^{-8}	10 μ g/kg	60-115
	0,0000001	10^{-9}	1 μ g/kg	40-120
Conformidad:	Existen otras directrices relativas a los intervalos previstos de recuperación en áreas específicas de análisis. En casos en los que se haya demostrado que la recuperación es una función de la matriz, podrán aplicarse otros requisitos especificados. Para la evaluación de la conformidad, debería utilizarse preferiblemente material de referencia certificado.			

22. Los criterios expuestos en el Cuadro 1 deberán ser aprobados para la determinación en cuestión.

ESPECIFICACIONES QUE EXIGEN UNA COMBINACIÓN DE COMPONENTES

23. Aunque no se indique específicamente en el Manual de procedimiento, las *Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios* se elaboraron examinando solamente las determinaciones de analitos individuales. En el documento CX/MAS 14/35/5 del CCMAS se indica que los enfoques detallados en el Manual de procedimiento para analitos individuales no son aptos para establecer criterios para especificaciones que exigen la determinación de una combinación de

³ La s_R debería calcularse aplicando la ecuación de Horwitz/Thompson. Cuando la ecuación de Horwitz/Thompson no sea aplicable (por motivos analíticos o de acuerdo con un reglamento) o cuando se "conviertan" métodos en criterios, entonces debería basarse en la s_R procedente de un estudio apropiado de funcionamiento del método.

⁴ La RSD_R debería calcularse aplicando la ecuación de Horwitz/Thompson. Cuando la ecuación de Horwitz/Thompson no sea aplicable (por motivos analíticos o de acuerdo con un reglamento) o cuando se "conviertan" métodos en criterios, entonces debería basarse en la RSD_R procedente de un estudio apropiado de funcionamiento del método.

componentes. Un ejemplo de ello son las aflatoxinas de las nueces descritas en la *Norma General para los Contaminantes y las Toxinas presentes en los Alimentos y Piensos* (CODEX STAN 193-2005), en cuyo caso la especificación es para la concentración total de aflatoxinas, que se determina mediante la suma de B1, B2, G1 y G2. En el documento CX/MAS 14/35/5 se describe con detalle una serie de opciones posibles, cada una de ellas con ventajas y desventajas, para el establecimiento de criterios en estas situaciones. A saber:

- Opción 2-1: Utilizar la especificación (suma de los componentes) como el nivel especificado (límite máximo o mínimo) y elaborar criterios numéricos sobre la base de este límite y los parámetros presentados en el Cuadro 1.
 - Opción 2-2: Elegir un método adecuado y convertirlo en criterios utilizando las directrices actualmente recogidas en el Manual de procedimiento.
 - Opción 2-2A: Establecer los criterios numéricos a partir del método aprobado para cada uno de los componentes individuales.
 - Opción 2-2B: Establecer los criterios numéricos sobre la base de la especificación y del rendimiento de los métodos para componentes individuales.
- Opción 2-3: Establecer criterios numéricos sobre la base del LM y el número de componentes.

24. Un problema básico muy importante de todas las opciones detalladas en el documento CX/MAS 14/35/5 es la determinación del criterio de desviación típica relativa prevista (PRSD_R). Originalmente, la ecuación de Horwitz/Thompson se obtuvo a partir de datos relacionados con analitos individuales y no es directamente aplicable a la determinación de la PRSD_R de una "suma de componentes". Por lo tanto, no se puede utilizar la ecuación de Horwitz/Thompson ni el HorRat para establecer un valor numérico para la precisión. Al intentar aplicar la ecuación Horwitz/Thompson a la "suma de componentes", podría producirse una situación en la que la precisión de uno o más componentes individuales tuviera que ser superior al 100 %. Durante los debates que se recogen en el documento CX/MAS 14/35/5, la mayoría de los participantes convino en que no era adecuado calcular el valor de la PRSD_R de la suma de especificaciones de componentes a partir del valor del propio LM, ya que en un análisis de componentes múltiples las mediciones de los analitos individuales están relacionadas entre sí y no son, por tanto, independientes. En caso de utilizar la ecuación de Horwitz/Thompson, esta debería limitarse a las mediciones de analitos individuales.

25. En realidad, la mayoría de las mediciones realizadas de especificaciones que son componentes sumados y las concentraciones correspondientes se sitúan dentro del intervalo de Thompson, en que la PRSD_R = 22 %, por lo que todos los métodos que den valores de hasta el 22 % para el analito individual deberían tener una precisión aceptable. Para niveles superiores es posible que el valor de Horwitz sea el criterio.

26. En los debates recogidos en el documento CX/MAS 14/35/5 también se planteó la pregunta general de si en el marco del Codex está "permitido" establecer criterios para analitos que no tengan especificaciones relacionadas. Si bien se trata de una pregunta válida, en el presente documento de debate se considera que si se especifican los analitos individuales (como es el caso de las aflatoxinas en la norma CODEX STAN 193-2005), entonces estos estarán automáticamente relacionados con la especificación total, por lo que se podrán establecer los criterios.

27. Aunque no se señale explícitamente, en el documento CX/MAS 14/35/5 se indica que el enfoque más pragmático es la Opción 2-3, según la cual los criterios numéricos establecidos se basan en el LM y el número de componentes.

28. Las directrices del Manual de procedimiento para establecer valores numéricos relativos al límite de cuantificación son las siguientes:

Límite de cuantificación (LC): Respecto de un LM $\geq 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM \cdot 1/5$.

Respecto de un LM $< 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM \cdot 2/5$.

29. Estas directrices son válidas para el análisis de un componente. Cuando el LM se basa en la suma de componentes, el límite de cuantificación para el componente individual debería ser en teoría proporcionalmente bajo. Al sumar dos componentes, el límite de cuantificación para cada componente debería ser la mitad para cada uno de ellos, y al sumar tres componentes, el límite de cuantificación para cada componente debería ser una tercera parte.

30. De acuerdo con esta afirmación, se sugirieron los siguientes criterios para el límite de cuantificación:

Límite de cuantificación (LC): Respecto de un $LM \geq 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM \cdot 1/5 \cdot 1/n$.
Respecto de un $LM < 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM \cdot 2/5 \cdot 1/n$.
Siendo n el número de componentes.

31. En el caso de análisis de analitos múltiples en los que todos los componentes se ponderen por igual, n es el número de componentes o analitos. Los criterios relacionados con los analitos múltiples (y los analitos individuales, $n = 1$) serían, por tanto, los presentados en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Directrices para establecer valores numéricos relativos a los criterios.

Aplicabilidad: El método debe ser aplicable a la disposición especificada, el producto especificado y los niveles especificados (límite máximo, mínimo o ambos, LM). El intervalo mínimo aplicable del método depende del nivel especificado (LM) que se debe evaluar y puede expresarse, bien como la desviación típica de la reproducibilidad (s_R), bien como límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC).

Intervalo mínimo aplicable para los componentes individuales⁵: Respecto de un $LM/n \geq 0,1$ mg/kg, $[LM/n - 3 s_R, LM + 3 s_R]$.
Respecto de un $LM/n < 0,1$ mg/kg, $[LM/n - 2 s_R, LM + 2 s_R]$.

Nota: el nivel máximo es superior al LM para los componentes individuales.

Límite de detección (LD) para los componentes individuales: Respecto de un $LM/n \geq 0,1$ mg/kg, $LD \leq LM/n \cdot 1/10$.
Respecto de un $LM/n < 0,1$ mg/kg, $LD \leq LM/n \cdot 1/5$.

Límite de cuantificación (LC) para los componentes individuales: Respecto de un $LM/n \geq 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM/n \cdot 1/5$.
Respecto de un $LM/n < 0,1$ mg/kg, $LC \leq LM/n \cdot 2/5$.

Precisión para los componentes individuales: Respecto de un $LM/n \geq 0,1$ mg/kg, valor de HorRat ≤ 2 .
Respecto de un $LM/n < 0,1$ mg/kg, la $RSD_R < 44$ %.
 RSD_R = desviación típica relativa de la reproducibilidad.

Recuperación (R):	Concentración	Razón	Unidad	Recuperación (%)
100		1	100 % (100 g/100 g)	98-102
≥ 10		10^{-1}	≥ 10 % (10 g/100 g)	98-102
≥ 1		10^{-2}	≥ 1 % (1 g/100 g)	97-103
$\geq 0,1$		10^{-3}	$\geq 0,1$ % (1 mg/g)	95-103
0,01		10^{-4}	100 mg/kg	90-107
0,001		10^{-5}	10 mg/kg	80-110
0,0001		10^{-6}	1 mg/kg	80-110
0,00001		10^{-7}	100 μ g/kg	80-110
0,000001		10^{-8}	10 μ g/kg	60-115
0,0000001		10^{-9}	1 μ g/kg	40-120

Conformidad: Existen otras directrices relativas a los intervalos previstos de recuperación en áreas específicas de análisis. En casos en los que se haya demostrado que la recuperación es una función de la matriz, podrán aplicarse otros requisitos especificados. Para la evaluación de la conformidad, debería utilizarse preferiblemente material de referencia certificado.

⁵ En el caso de análisis de analitos múltiples en los que todos los componentes se ponderen por igual, n = número de componentes o analitos.

Ejemplo A:

Aflatoxina, compuesta por cuatro analitos, B1, B2, G1 y G2, en el maní.

El LM = 15 µg/kg;

puesto que hay cuatro analitos, n = 4;

$LM/n = 15/4 \text{ µg/kg} = 3,75 \text{ µg/kg}$.

Utilizando la hoja de cálculo de Excel disponible en el sitio web www.nmkl.org en la sección "how to get method criteria based on ML" (cómo obtener criterios de método basados en el LM), se establece lo siguiente:

Intervalo mínimo aplicable para los componentes individuales:	0,002* – 0,022** mg/kg = 2 – 22 µg/kg. * correspondiente a un LM = 3,75 µg/kg. ** correspondiente a un LM = 15 µg/kg.
Límite de detección (LD) para los componentes individuales:	0,75 µg/kg
Límite de cuantificación (LC) para los componentes individuales:	1,5 µg/kg
Precisión para los componentes individuales:	$RSD_R \leq 44 \%$
Recuperación (R):	40-120 %

Ejemplos de métodos que cumplen los criterios:

AOAC 999.07 Columna de inmunoafinidad LX con derivación post columna.

AOAC 2005.08 LC con derivación fotoquímica post columna.

Ejemplos de métodos que no cumplen los criterios:

AOAC 975.36 (método de minicolumna de Romer) aplicable para $\geq 10 \text{ µg/kg}$.

AOAC 990.34 (ensayo de cribado con sustancias inmunoabsorbentes unidas a enzimas [ImmunoDot Screen Cup]) $\geq 20 \text{ µg/kg}$.

AOCS-AOAC 970.45, AOCS-AOAC 998.03. AOAC 993.17 Cromatografía en capa fina.

Ejemplo B:

Biotoxinas - Grupo del ácido okadaico (OA) (suponiendo componentes ponderados por igual, es decir, los factores de equivalencia tóxica no se aplican).

El LM = 0,16 mg/kg⁶;

puesto que hay tres analitos, n = 3;

$LM/n = 0,16/3 \text{ mg/kg} = 0,05 \text{ mg/kg}$.

Utilizando la hoja de cálculo de Excel disponible en el sitio web www.nmkl.org en la sección "how to get method criteria based on ML" (cómo obtener criterios de método basados en el LM), se establece lo siguiente:

Intervalo mínimo aplicable para los componentes individuales:	0,03* – 0,26** mg/kg * correspondiente a un LM = 0,05 mg/kg. ** correspondiente a un LM = 0,16 mg/kg.
Límite de detección (LD) para los componentes individuales:	0,01 mg/kg
Límite de cuantificación (LC) para los componentes individuales:	0,02 mg/kg

⁶ Oficialmente el LM es 0,16 mg/kg de equivalente de ácido okadaico pero para el propósito de este ejemplo no se han tenido en cuenta los factores de equivalencia tóxica.

Precisión para los componentes individuales: $RSD_R \leq 44 \%$

Recuperación (R): 60-115 %

Utilizando la hoja de cálculo de Excel disponible en el sitio web www.nmkl.org en la sección "how to get method criteria based on ML" (cómo obtener criterios de método basados en el LM), se establece lo siguiente:

Intervalo mínimo aplicable para los componentes individuales: 0,03* – 0,26** mg/kg
 * correspondiente a un LM = 0,05 mg/kg.
 ** correspondiente a un LM = 0,16 mg/kg.

Límite de detección (LD) para los componentes individuales: 0,01 mg/kg

Límite de cuantificación (LC) para los componentes individuales: 0,02 mg/kg

Precisión para los componentes individuales: $RSD_R \leq 44 \%$

Recuperación (R): 60-115 %

Ejemplos de métodos que cumplen los criterios:

Ninguno.

Ejemplos de métodos que no cumplen los criterios:

Método para biotoxinas marinas del Laboratorio de Referencia de la Unión Europea, procedimiento operativo normalizado para el OA y el AZA, 2011 – se interpreta que el LC del método es 0,04 mg/kg tanto para el OA como para el AZA.

Ejemplo C:

Biotoxinas - Grupo de las saxitoxinas (STX) (suponiendo componentes ponderados por igual, es decir, los factores de equivalencia tóxica no se aplican).

El LM = 0,8 mg/kg⁷;

puesto que hay 15 analitos, n = 15;

LM/n = 0,8/15 mg/kg = 0,05 mg/kg.

Utilizando la hoja de cálculo de Excel disponible en el sitio web www.nmkl.org en la sección "how to get method criteria based on ML" (cómo obtener criterios de método basados en el LM), se establece lo siguiente:

Intervalo mínimo aplicable para los componentes individuales: 0,03* – 1,2** mg/kg
 * correspondiente a un LM = 0,05 mg/kg.
 ** correspondiente a un LM = 0,8 mg/kg.

Límite de detección (LD) para los componentes individuales: 0,01 mg/kg

Límite de cuantificación (LC) para los componentes individuales: 0,02 mg/kg

Precisión para los componentes individuales: $RSD_R \leq 44 \%$

Recuperación (R): 60-115 %

Ejemplos de métodos que cumplen los criterios:

AOAC 2005.06 Toxinas paralizantes de mariscos en los mariscos – se interpreta que el LC del método es 0,02 mg/kg para STX y 0,008 mg/kg para dcSTX.

⁷ Oficialmente el LM es 0,8 mg/kg (2HCL) de equivalente de saxitoxina pero para el propósito de este ejemplo no se han tenido en cuenta los factores de equivalencia tóxica.

Ejemplos de métodos que no cumplen los criterios:

AOAC 2005.06 Toxinas paralizantes de mariscos en los mariscos – se interpreta que el LC del método es 0,125 mg/kg para ambas GTX 2 y 3 (juntas) y 0,03 mg/kg para B1.

23. Si bien los métodos detallados en los ejemplos B y C tienen una precisión aceptable, no cumplen los criterios en cuanto al límite de cuantificación para cada analito, lo que pone de manifiesto un problema básico al prorratear el límite de cuantificación (y el límite de detección) en función del número de analitos (n). En caso de que la especificación haga referencia a una suma de componentes, cuanto mayor sea el número de analitos menor será el límite de cuantificación necesario.

24. En la opción 2-2A del documento CX/MAS 14/35/5 se describe el modo en que pueden establecerse los criterios numéricos a partir del método aprobado para cada uno de los componentes individuales. En el Anexo 2 del mismo documento se estipula que la RSD_{total} disminuye cuando el número de componentes aumenta. Sin embargo, al elaborar el Anexo 2 no se tomaron en consideración los efectos de correlación y covarianza, si bien en el siguiente ejemplo D⁸ se ilustra la importancia de estas cuestiones.

Ejemplo D:

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis de las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 en los productos alimenticios; para el análisis varios laboratorios han notificado resultados por separado para las cuatro aflatoxinas de un material en particular. También se muestran sus varianzas y desviaciones típicas. ¿Es posible calcular la desviación típica para el total de aflatoxinas directamente a partir de estas cuatro desviaciones típicas?

Cuadro 3: Reproducción de los resultados obtenidos a partir de la determinación de aflatoxinas (fracción de masa en partes por mil millones, ppb).

Laboratorio	B1	B2	G1	G2	Total
1	8,5	4,3	3,5	1,6	17,9
2	4	2,5	1,7	2,1	10,3
3	6,6	3,6	2,1	2	14,3
4	5,9	3,4	2,3	2,2	13,8
5	4,2	2,2	1,8	1,6	9,8
6	6,2	3,5	2,6	2,7	15,0
7	7,1	3,8	2,6	2,5	16,0
8	5,2	3,4	2,1	2,2	12,9
9	4,9	2,45	2,15	1,8	11,3
10	6,3	3,3	2,3	1,9	13,8
Varianza	1,881	0,438	0,259	0,129	6,40
Desviación típica	1,371	0,662	0,509	0,359	2,53

Si supusiéramos que los resultados para las cuatro aflatoxinas no están relacionados entre sí, obtendríamos la desviación típica de la suma de los cuatro resultados a partir de la raíz cuadrada de la suma de las varianzas individuales, es decir:

$$\sqrt{1,881 + 0,438 + 0,259 + 0,129} = 1,65$$

⁸ Documento técnico n.º 30 del Comité de Métodos de Análisis de la Royal Society of Chemistry, 2008. The standard deviation of the sum of several variables (<http://www.rsc.org/Membership/Networking/InterestGroups/Analytical/AMC/TechnicalBriefs.asp>).

Sin embargo, si calculamos los resultados de aflatoxinas totales de cada laboratorio por separado, obtenemos los valores presentados en la última columna del Cuadro 3. Estos valores tienen una desviación típica de 2,53, considerablemente mayor al cálculo anterior, por lo que ¿a qué se debe la diferencia?

Los valores difieren porque las observaciones no son independientes, sino que muestran una correlación apreciable. Esto se puede comprobar al calcular las covarianzas $cov(x,y)$ (Cuadro 4) y los coeficientes de correlación relativos $r(x,y)$ (Cuadro 5), utilizando las fórmulas siguientes:

$$cov(x,y) = \sum_i (x_i - \hat{x})(y_i - \hat{y}) / (n - 1)$$

$$\equiv r(x,y) s_x s_y$$

Donde x_i, y_i son el par número i de las variables x, y ; mientras que s_x, s_y son las desviaciones típicas individuales.

Cuadro 4: Matriz de covarianzas

	B1	B2	G1	G2
B1	1,881	0,848	0,635	0,032
B2	0,848	0,438	0,277	0,066
G1	0,635	0,277	0,259	0,000
G2	0,032	0,066	0,000	0,129

Cuadro 5: Coeficientes de correlación.

	B1	B2	G1	G2
B1	1	0,934	0,909	0,064
B2	0,934	1	0,823	0,276
G1	0,909	0,823	1	0,000
G2	0,064	0,276	0,000	1

Varios de los coeficientes de correlación son bastante superiores a 0,5, lo que indica que influirán en gran medida en la desviación típica combinada.

Al haber cierto grado de correlación entre las variables, como es el caso de los datos de este ejemplo, la desviación típica correcta de la suma es el resultado de la raíz cuadrada de la suma de las varianzas y las covarianzas, es decir:

$$\sqrt{(1,881 + 0,438 + 0,259 + 0,129 + 2(0,848 + 0,635 + 0,032 + 0,277 + 0,066 + 000))} = 2,53$$

Como se ha señalado anteriormente, este resultado se puede obtener directamente determinando la desviación típica simple de los contenidos de aflatoxinas totales calculados más arriba. (Tenga en cuenta que debe incluirse tanto $cov(x,y)$ como $cov(y,x)$ en la suma; de ahí que aparezca el factor 2 en los valores de covarianza).

Exactamente los mismos principios señalados anteriormente se aplican al cálculo de la incertidumbre típica de sumas de variables. La desviación típica mencionada más arriba ofrece la incertidumbre típica relacionada con efectos aleatorios para el contenido de aflatoxinas total comunicado por un solo laboratorio. Para un promedio de n resultados (por ejemplo, a partir de un conjunto de observaciones realizadas en una tanda en un solo laboratorio), la desviación típica calculada debería dividirse entre \sqrt{n} .

Si existe alguna correlación entre las variables que deban sumarse (o, de hecho, combinarse de algún modo), es importante tenerla debidamente en cuenta a la hora de calcular la desviación típica del resultado. Si se dispone de los datos originales, esto puede hacerse, bien calculando los resultados individuales y extrayendo su desviación típica o bien calculando y sumando las covarianzas necesarias. En caso de disponer solamente de las desviaciones típicas y los coeficientes de correlación (o covarianzas), se debe calcular la desviación típica combinada a partir de las covarianzas.

25. En el ejemplo D se presenta un enfoque para determinar la incertidumbre (típica) en la medición de un resultado analítico basado en las sumas de los componentes, pero existen otros planteamientos publicados en la bibliografía^{9,10}.

26. En la Sección II (página 92) del Manual de procedimiento se señala que “cuando se decida si un resultado analítico se ajusta o no a la especificación, debe fijarse un margen de tolerancia relativo a la incertidumbre en la medición. Esta disposición podrá obviarse en aquellos casos en los que exista un peligro directo para la salud, como en los agentes patógenos de origen alimentario”. En las *Directrices sobre la incertidumbre en la medición* (CAC/GL 54-2004) se brinda orientación general sobre la incertidumbre en la medición pero no se abarca la cuestión de la incertidumbre en la medición relacionada con valores analíticos que son a su vez sumas de componentes. En las *Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados* (CAC/GL 59-2006) se brinda orientación sobre el cálculo de la incertidumbre en los resultados en el ámbito del análisis de plaguicidas y se establece que “la estimación de la incertidumbre de los resultados para residuos de componentes múltiples que tiene su origen en la aplicación de mezclas técnicas que incluyen isómeros estructurales y ópticos, metabolitos y otros productos de descomposición puede exigir un método diferente, especialmente cuando el LMR [límite máximo de residuos] se ha establecido para la suma de todos o algunos de los residuos de los componentes. La evaluación de los errores aleatorios y sistemáticos de los resultados a partir de las mediciones de puntos culminantes múltiples se explica detalladamente en una publicación reciente”¹¹.

27. Si bien no están relacionadas explícitamente con la lógica a que obedece este documento, las cuestiones presentadas en los ejemplos B, C y D, así como en los párrafos anteriores, indican la necesidad de elaborar orientaciones para explicar los enfoques que pueden adoptarse a la hora de determinar la incertidumbre en la medición relacionada con un resultado analítico notificado basado en la suma de componentes.

28. Aunque en el documento CX/MAS 14/35/5 se expresaron reservas en relación con el enfoque presentado en la Opción 2-2A, este se adoptó en la *Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos* (CODEX STAN 292-2008) (revisada en 2014), donde se establecieron los criterios numéricos (basados en el asesoramiento del CCMAS) a partir de los métodos aprobados para cada uno de los componentes individuales de cada uno de los grupos de toxinas. Por ello, se ha establecido ahora una prioridad. La cantidad de esferas analíticas en el marco del Codex en las que se debe adoptar un enfoque basado en la suma de componentes es limitada. En consecuencia, y también debido a las dificultades señaladas en párrafos anteriores, se recomienda que, en caso de que sea necesario establecer criterios numéricos para tales métodos, estos se elaboren a partir de métodos aprobados para cada componente individual y no de manera teórica a partir del valor del LM.

FACTORES DE EQUIVALENCIA TÓXICA

29. En el caso de ciertos productos o analitos, existen especificaciones en que las concentraciones individuales de analitos múltiples se determinan mediante un único método, las concentraciones se convierten en un “equivalente tóxico” utilizando un factor de equivalencia tóxica (FET) y la especificación es un límite basado en la suma de equivalentes. Constituye un ejemplo de este planteamiento la determinación del grupo de saxitoxinas recogida en la *Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos* (CODEX STAN 292-2008). La especificación es para la concentración de equivalentes de saxitoxina, que se determina a partir de 12 congéneres de saxitoxina¹², cada uno de ellos multiplicado por un FET y sumado. Los FET también se utilizan en

⁹ Gauthier Eppe, Gianfranco Diletti, Alwyn Fernandes, Johannes Haedrich, Jerry Hart, Helge Hove, Anna Laura Iamiceli, Alexander Kotz, Rainer Malisch, Philippe Marchand, Wolfgang Moche, Georges Scholl, Giampiero Scortichini, Thorsten Bernsmann, Yves Tondeur y Wim Traag. Measurement Uncertainty for Persistent Organic Pollutants by Isotope-Dilution Mass Spectrometry. Documento presentado en Dioxins 2014 (¿en prensa?).

¹⁰ Medina-Pastor, P., Valverde, A., Pihlstrom, T., Masselte, S., Gamon, M., Mezcuca, M., Rodriguez-Torreblanca, C. y Fernandez-Alba, A. R. Comparative study of the main top-down approaches for the estimation of measurement uncertainty in multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 7609-19, 2011.

¹¹ Soboleva E., Ambrus A., Jarju O., Estimation of uncertainty of analytical results based on multiple peaks, *J. Chromatogr. A.* **1029**, 161-166, 2004.

¹² Se han identificado más de 12 congéneres de saxitoxina; sin embargo, en el método actual aprobado (AOAC 2005.05) solo se recogen 12 compuestos.

otras determinaciones, como las de las dioxinas y los BPC (bifenilos policlorados) análogos a las dioxinas, y los HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos). El enfoque de criterios actual del Manual de procedimiento no se elaboró teniendo en cuenta las especificaciones que utilizan FET o una suma de equivalentes tóxicos.

30. Para utilizar un factor de equivalencia tóxica para determinar un “equivalente tóxico” se necesita un cálculo, por lo que, si este cálculo forma parte del método, históricamente el CCMAS consideraría que estos métodos son de Tipo I. Aun cuando el procedimiento analítico de determinar el valor antes de la conversión fuera lógico (Tipo II/III), la determinación final es de Tipo I, ya que el cálculo es empírico. Otra posible alternativa a la inclusión de los FET en el método sería incluirlos en la norma.

31. En los casos en que se establecen FET, estos generalmente se relacionan con la sustancia más tóxica del conjunto de sustancias objeto de análisis, por lo que un enfoque pragmático consistiría en garantizar que todos los criterios de rendimiento establecidos relacionados con los métodos específicos del analito se basen en el propio componente más tóxico (por ejemplo, de acuerdo con Oshima, en el caso de las toxinas paralizantes de mariscos, la saxitoxina), puesto que este se encontrará en la fracción de masa más pequeña y, por lo tanto, tendrá la menor precisión prevista. Aplicando el modelo de Horwitz correctamente, el resto tendría una mayor precisión en caso de constituir el componente dominante en una muestra de ensayo en el límite, ya que sus fracciones de masa serían mayores. Así pues, si un método funciona cuando el componente más tóxico se encuentra en el límite de equivalencia tóxica, debería ser más eficaz cuando cualquier otra suma ponderada está en el límite.

32. Durante los debates celebrados en la 35.^a reunión del CCMAS, recogidos en el documento CX/MAS 14/35/5, la mayoría de los participantes convino en que no deberían incluirse los factores de equivalencia tóxica en un método analítico específico, sino que deberían estar comprendidos en la norma. Este fue el enfoque adoptado al enmendar la *Norma para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos* (CODEX STAN 292-2008), donde se establecieron criterios de rendimiento numérico no ponderados (es decir, no se aplicaron FET) a partir de diversos métodos aprobados.

CRITERIOS DEL FUNCIONAMIENTO DE LOS MÉTODOS NUMÉRICOS PARA MÉTODOS BIOLÓGICOS

33. Históricamente, el CCMAS ha considerado que métodos biológicos como el bioensayo en ratones deberían clasificarse como de Tipo I (método de definición), donde el método determina un valor al que puede llegarse solo mediante la aplicación del método en cuestión y, por definición, es el único método para establecer el valor aceptado del parámetro medido.

34. En el Cuadro 6 se muestran los resultados de una búsqueda de palabras clave en los *Métodos recomendados de análisis y muestreo* (CODEX STAN 234-1999) de métodos de “bioensayo” y el tipo de método asignado.

Cuadro 6: Métodos de “bioensayo” detallados en la norma CODEX STAN 234-1999.

Producto	Disposición	Método	Principio	Tipo
Margarina	Vitamina D	AOAC 936.14	Bioensayo (en ratas)	II
Minarina	Vitamina D	AOAC 936.14	Bioensayo (en ratas)	II
Alimentos especiales	Ácido fólico	AOAC 944.12	Ensayo microbiológico	II
Alimentos especiales	Nicotinamida para alimentos con base de leche	AOAC 944.13	Ensayo microbiológico	II
Alimentos especiales	Ácido pantoténico/alimentos enriquecidos	AOAC 945.74	Ensayo microbiológico	II
Alimentos especiales	Ácido pantoténico/alimentos no enriquecidos	The Analyst 89 (1964):1, 3-6, ibíd. 232 US Dept. Agr., Agr. Handbook 97 (1965)	Ensayo microbiológico	IV
Alimentos especiales	Relación de eficiencia de las proteínas (REP)	AOAC 960.48	Bioensayo en ratas	I

Alimentos especiales	Vitamina B12	AOAC 952.20	Ensayo microbiológico	II
Alimentos especiales	Vitamina B6	AOAC 961.15	Ensayo microbiológico	II
Alimentos especiales	Vitamina D	AOAC 936.14	Bioensayo en ratas	IV
Preparados de continuación	Ácido pantoténico	AOAC 992.07 (Mide el pantotenato total: ácido pantoténico libre + CoA- + compuesto con la proteína transportadora de grupos acilo; y se mide como ácido D-pantoténico o D-pantotenato cálcico)	Ensayo microbiológico	II
Preparados para lactantes	Ácido fólico	AOAC 992.05 (Mide el ácido fólico libre más los folatos libres sin combinar presentes de forma natural, agregados y medidos como ácido fólico) EN 14131:2003 (Folato total [libre más combinado], agregado y medido como ácido fólico)	Ensayo microbiológico	II
Preparados para lactantes	Niacina	AOAC 985.34 (niacina preformada y nicotinamida)	Ensayo microbiológico y turbidimetría	III
Preparados para lactantes	Vitamina B6	AOAC 985.32	Ensayo microbiológico	III
Preparados para lactantes	Vitamina B6	EN 14166:2008 (Agrega piridoxal, piridoxina y piridoxamina libres y combinados, y se mide como piridoxina)	Ensayo microbiológico	III

35. Aunque el método AOAC 936.14 tiene la etiqueta de “bioensayo” en la norma CODEX STAN 234, es, de hecho, un método de bioensayo en ratas. Los métodos de bioensayo en ratas detallados en la norma CODEX STAN 234 se clasifican como métodos de Tipo I, Tipo II (método de referencia) o Tipo IV (método provisional). En la 37.ª reunión del CCMAS, tanto el bioensayo en ratones (AOAC 959.08) como el ensayo de fijación a receptores (AOAC 2011.27) se clasificaron como métodos de Tipo IV, lo que generó debates posteriores en el 37.º período de sesiones de la Comisión del Codex Alimentarius.

36. Partiendo de la información presentada anteriormente no queda claro si se está adoptando un enfoque congruente en la “tipificación” de métodos biológicos como el bioensayo en ratones o en ratas. En la 36.ª reunión del CCMAS se recomendó que el Comité considerara la posibilidad de formar un grupo de trabajo electrónico para estudiar la “tipificación” de los bioensayos en ratones y ratas en mayor detalle con la finalidad de elaborar un enfoque armonizado y coherente.

37. En caso de considerarse que todos los métodos de bioensayo en ratones y ratas son de Tipo I, la cuestión relativa a los criterios de rendimiento numérico no es pertinente, puesto que los métodos son métodos de definición y no tienen, por tanto, equivalentes.

38. En caso de considerarse que los bioensayos en ratones y ratas se pueden clasificar como de Tipo II, entonces debería adoptarse el enfoque detallado en la Opción 2-2A del documento CX/MAS 14/35/5 (es decir, los criterios de rendimiento numérico se establecen a partir del método aprobado) a fin de mantener la coherencia con el planteamiento expuesto en la Norma 292-2008 del Codex. En caso de que los métodos de bioensayo en ratones y ratas se puedan clasificar como de Tipo II, podría ser necesario que un GTe estudiara la equivalencia entre los métodos biológicos y los químicos.

RECOMENDACIONES PRELIMINARES Y CUESTIONES PARA DEBATIR

- 1) En caso de que se deban establecer criterios de rendimiento numérico para los métodos aplicados a disposiciones que incluyen la suma de componentes analíticos, esto se debería hacer a partir del método aprobado para cada uno de los componentes individuales en lugar del LM.
- 2) En caso de establecer criterios de rendimiento numérico para las disposiciones mediante las cuales se exige la suma de componentes, esto se debería hacer para cada uno de los componentes sin ponderar.
- 3) En caso de aceptar las recomendaciones 1 y 2, se debería enmendar la sección *Criterios generales para la selección de métodos de análisis* del Manual de procedimiento para indicar que el proceso basado en el valor del LM solo es adecuado para análisis de analitos individuales y que, en caso de que se deban elaborar criterios para las disposiciones que exijan una suma de componentes, el proceso basado en el método aprobado será la opción preferida.
- 4) En caso de que las disposiciones requieran el uso de factores de equivalencia tóxica (FET), estos se deberían detallar en la especificación del Codex, pero deberían ser independientes de la elaboración de criterios de rendimiento numérico.
- 5) Se debería ampliar la competencia del GTe encargado de la “suma de componentes” a fin de incluir la elaboración de un documento de debate sobre los enfoques que se pueden utilizar para establecer la incertidumbre en la medición de los resultados analíticos que son sumas de componentes.
- 6) El CCMAS debería considerar la posibilidad de formar un GTe para estudiar las cuestiones pendientes relacionadas con la “tipificación” de los métodos de bioensayo en ratones y ratas y su equivalencia con los análisis basados en productos químicos.